

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl II
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. A. Karschin

**Protonensensitivität des Hitzerezeptors von primär
afferenten Neuronen der Küken in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Andreas Schmalfuß
aus Marktleuthen

Würzburg, 8. September 2006

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Marlen Petersen
Koreferent: Prof. Dr. med. dent. Bernd Klaiber
Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:
14./15. November 2007

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meiner Großmutter und meinen Eltern in Liebe gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

A. EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1. Geschichte des Zahnschmerzes und der Behandlung.....	1
2. Schmerz und Nozizeption	2
2.1 Definition des Schmerzes und der Nozizeption	2
2.2 Aufbau und Funktion der Nozizeptoren.....	3
2.3 Nozizeptoren der Zahnpulpa.....	4
2.4 Nozizeptoren der Haut	5
3. Perzeption noxischer Hitzereize	6
3.1 Hitzerezeptoren.....	6
3.1.1 Der Hitzerezeptor TRPV1.....	6
3.1.2 Sensibilisierung des TRPV1 durch Entzündungsmediatoren.....	8
3.1.3 Untersuchungen des TRPV1 in Neuronen vom Vogel	8
4. Fragestellung.....	9
B. MATERIAL UND METHODEN	10
1. Versuchstiere.....	10
2. Herstellen einer Zellkultur.....	10
2.1 Narkose der Tiere und Präparation der Wirbelsäule	10
2.2 Ganglionektomie	11
2.3 Herstellung einer Einzelzell-Suspension.....	11
2.4 Reinigen der Einzelzell-Suspension und Aussäen der Zellen.....	12
2.5 Kulturbedingungen	13
3. Cobalt-Färbung	14
3.1 Theoretische Grundlagen.....	14
3.2 Durchführung der Cobalt-Färbung	15
3.3 Stimulation der Neurone	17
3.4 Auswertung der Cobalt-uptake Experimente.....	18
4. Elektrophysiologie	19
4.1 Theoretischer Hintergrund	19
4.2 Patch-clamp Pipetten	19
4.3 Lösungen	21
4.4 Patch-clamp Versuchsstand.....	21

4.5 Durchführung der Versuche	24
C. ERGEBNISSE	26
1. Cobalt-uptake Experimente	26
1.1 Protonensensitivität in Abhängigkeit von der Dauer in Zellkultur	26
1.2 Protonensensitivität in Abhängigkeit von der Temperatur	27
1.3 Einfluss verschiedener Kalzium-Antagonisten	30
2. Patch-clamp Untersuchungen	32
D. DISKUSSION.....	38
1. Methodik	38
1.1 In vitro Bedingungen	38
1.2 Thermische Reize, Protonen und Kalzium-Antagonisten.....	39
1.3 Cobalt-uptake Experimente.....	39
1.4 Patch-clamp Technik	40
2. Ergebnisse	41
2.1 Anteil der hitzesensitiven Neurone in Abhängigkeit von der Dauer in Zellkultur und von der Protonenkonzentration des Mediums	41
2.2 Anteil hitzesensitiver Neurone in Abhängigkeit von der Stimulus- temperatur und von der Protonenkonzentration des Mediums	42
2.3 Beteiligung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle	43
2.4 Patch-clamp Untersuchungen	44
E. ZUSAMMENFASSUNG	46
F. LITERATURVERZEICHNIS	48
G. ANHANG	54

A. EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG

1. Geschichte des Zahnschmerzes und der Behandlung

„Der Zahnschmerz ist - abgesehen vom Tod - der größte und grausamste aller Schmerzen“ (De re medica libri octo. item; 30 n. Chr.). Zu dieser Erkenntnis kam der römische Arzt Aulus Cornelius Celsus (3-64 n. Chr.) im 1. Jahrhundert nach Christus. Die Geschichte der Zahnschmerzen ist allerdings wesentlich älter und gewann mit dem Einzug der Zivilisation durch die Zunahme kariöser Zähne an Bedeutung. Schädelfunde der Jungsteinzeit von etwa 15000 bis 10000 v. Chr. wiesen noch kaum kariöse Zähne auf. Mit dem stetig wachsenden Problem der Karies entstand um 1800 v. Chr. die erste Karies-Entstehungstheorie, veranschaulicht auf einer altbabylonischen Tontafel. Danach ist ein Zahnwurm schuld an den Zahnschmerzen. Eine Darstellung des Zahnwurms entstand um 1780 in Form einer Elfenbeinschnitzerei (Abb. 1). Unter welchen starken Zahnschmerzen die Menschen in frühen Zeiten litten und unter welchen Qualen sie die Zahnbehandlung über sich ergehen ließen, wird aus einer Vielzahl alter Bilder deutlich (Abb. 2).



Abbildung 1: Darstellung des Zahnwurms. Elfenbeinschnitzerei. Südfrankreich, 1780 (aus „Die Zahnheilkunde in Kunst- und Kulturgeschichte“, DuMont, 1983).



Abbildung 2: Schmerzhafte Zahnbehandlung 1622; „Der Zahnarzt“ Gerard van Honthorst (aus „Die Zahnheilkunde in Kunst- und Kulturgeschichte“, DuMont, 1983).

Versuche, den Schmerz auszuschalten oder wenigstens zu verringern sind sehr alt. Hierzu wurden beispielsweise pflanzliche Mittel wie Mohnsaft, Alraune, Bilsenkrautsamen oder Alkohol verwendet. Mitte des 19. Jahrhunderts wurden die bereits bekannten Substanzen Lachgas, Äther und Chloroform als Narkosemittel erkannt und gewannen damit in der Zahnmedizin und auch in der Medizin an Bedeutung. 1844 ließ sich Horace Wells (1815-1848) in einem Selbstversuch einen Weisheitszahn ziehen, nachdem er sich vorher mit Lachgas betäubt hatte. Der Einsatz dieser Narkosemittel ermöglichte eine schmerzlose Zahnbehandlung. Etwa 40 Jahre später erfolgte durch den Wiener Augenarzt Carl Koller (1857-1944) die Einführung der Lokalanästhetika in die Medizin. Er führte 1884 erste Versuche mit Cocain zur Lokalanästhesie durch. Damit wurde eine weitere Möglichkeit zur schmerzfreien zahnärztlichen Behandlung geschaffen, ohne am zentralen Nervensystem angreifen zu müssen. Im Jahr 1905 gelang die synthetische Herstellung des Lokalanästhetikums Prokain durch den Münchner Chemiker Alfred Einhorn (1857-1917), welches unter dem Handelsnamen Novocain® geführt wurde. Novocain® besitzt im Gegensatz zum Cocain wesentlich weniger Nebenwirkungen.

2. Schmerz und Nozizeption

2.1 Definition des Schmerzes und der Nozizeption

Schmerz wird nach der Empfehlung der *'International Association for the Study of Pain'* wie folgt definiert: „Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ (übersetzte Definition; Merskey, 1979). Die Funktion des Schmerzes ist, den Körper über schädigende Einflüsse zu informieren, um eine weitere Schädigung vermeiden zu können. Als Nozizeption bezeichnet man die Aufnahme von noxischen Reizen, die Weiterleitung der Information in peripheren Nervenfasern und zentrale Verarbeitung der Information.

2.2 Aufbau und Funktion der Nozizeptoren

Nozizeptoren sind spezialisierte sensorische Neurone, die Informationen noxischer Reize aufnehmen, in ein elektrisches Signal umwandeln und zum zentralen Nervensystem leiten. Die aufsteigenden nozizeptiven Bahnen sind in Abbildung 3 dargestellt. Nozizeptoren lassen sich hinsichtlich der Leitungsgeschwindigkeit ihrer Axone in 2 Gruppen einteilen. Nozizeptoren

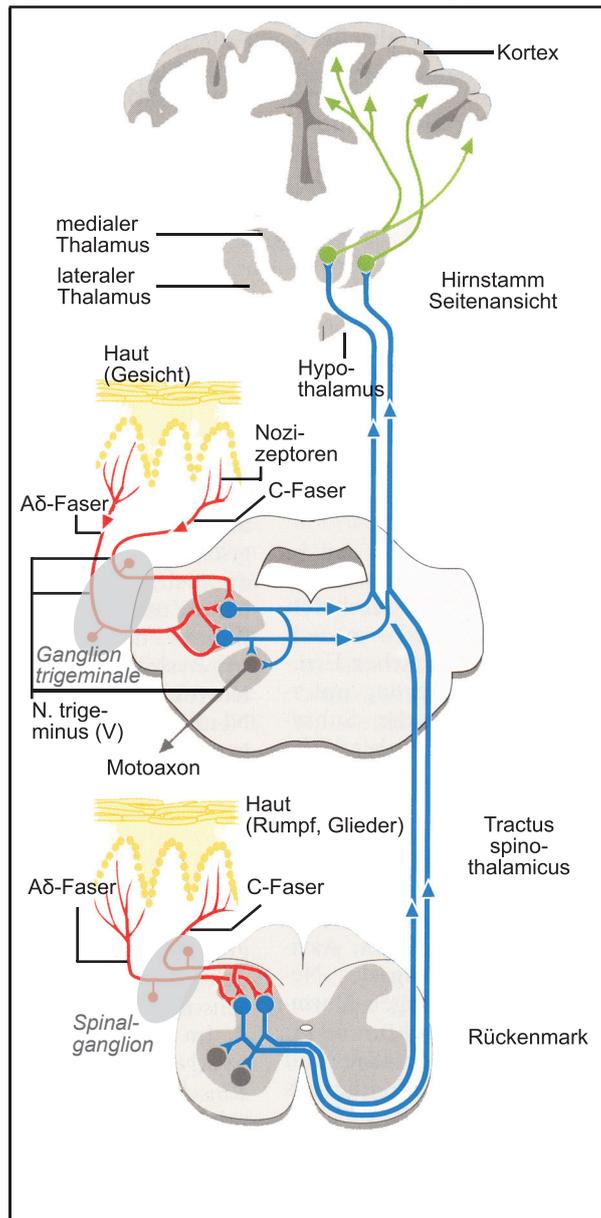


Abbildung 3: Schematische Übersicht über den Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen (modifiziert nach „Physiologie des Menschen“, Springer, 26. Auflage, 1995).

mit unmyelinisierten C-Fasern besitzt eine Leitungsgeschwindigkeit von 0,5-2 m/s. Ihre Somata sind klein bis mittelgroß. Erregungen von Nozizeptoren mit C-Fasern vermitteln den zweiten Schmerz, der als dumpf, brennend und schlecht lokalisierbar beschrieben wird. Die Gruppe der Nozizeptoren mit dünnen myelinisierten A δ -Fasern besitzt eine Leitungsgeschwindigkeit von 15-30 m/s. Ihre Somata sind mittelgroß. Erregung von Nozizeptoren mit A δ -Fasern rufen einen schnellen, ersten Schmerz hervor, der als hell, stechend und gut lokalisierbar beschrieben wird. Die Anzahl der Neurone mit C-Fasern ist größer als die Anzahl der mit A δ -Fasern.

2.3 Nozizeptoren der Zahnpulpa

Zahnpulpa und Dentin sind durch den Schmelz vor schädigenden äußeren Reizen gut geschützt. Bei freiliegendem Dentin bzw. eröffneter Pulpa geht dieser Schutz verloren und nahezu alle Reize führen zu Schmerz-sensationen. Die nozizeptive Innervation eines Zahnes ist in einer Übersicht in Abbildung 4 dargestellt. Die afferente Innervation mit Nervenfasern beschränkt sich auf pulpanahe Bereiche des Dentins.

Histologische Untersuchungen an Zähnen haben gezeigt, dass die Pulpa sowohl von Nozizeptoren mit A δ -Fasern, als auch von solchen mit C-Fasern innerviert wird. Die Somata dieser Afferenzen liegen im Ganglion trigeminale (Abb. 3). Entsprechend der bereits erwähnten Einteilung vermitteln die Nozizeptoren der Pulpa mit A δ -Fasern einen „hellen“, gut lokalisierbaren Zahnschmerz. Die Nozizeptoren der Pulpa mit C-Fasern vermitteln einen dumpfen, schlecht lokalisierbaren Zahnschmerz.

Zahnschmerzen entstehen unter anderem bei direkter Stimulation nozizeptiver Fasern. Dies kann über eine Manipulation von freiliegendem Dentin geschehen. Zur Erklärung der mechanischen Empfindlichkeit des Dentins hat Brannstrom das Hydrodynamische Modell entwickelt (Brannstrom et al., 1967). Liegt Dentin frei, kommt es zur Öffnung der mit Liquid gefüllten Dentinkanälchen. Es entsteht ein langsamer Auswärtsfluss des Liquides durch den höheren Druck in der Pulpa gegenüber der Mundhöhle, der allerdings nicht als schmerzhaft empfunden wird. Schmerzempfindungen können durch Druckveränderungen erzeugt werden, die den Flüssigkeitsstrom verstärken oder

ihn umkehren. Kälte kontrahiert beispielsweise das Liquid und erzeugt somit einen schnellen Auswärtsstrom und starke Schmerzen. Weiterhin kann durch Dehydration (Trocknung mit Luft erzeugt Kapillarkräfte), hyperosmotische (starke Zuckerlösungen) oder dehydrierende Lösungen eine Flüssigkeitsverschiebung nach außen verursacht werden. Eine Flüssigkeitsverschiebung nach innen kann durch Hitze (50-70°C) oder Druck erzeugt werden.

Eine pulpa Entzündung (Pulpitis) kann aufgrund mechanischer, thermischer oder chemischer Irritationen entstehen. Am häufigsten entsteht eine Pulpitis jedoch aufgrund bakterieller Prozesse (Karies).

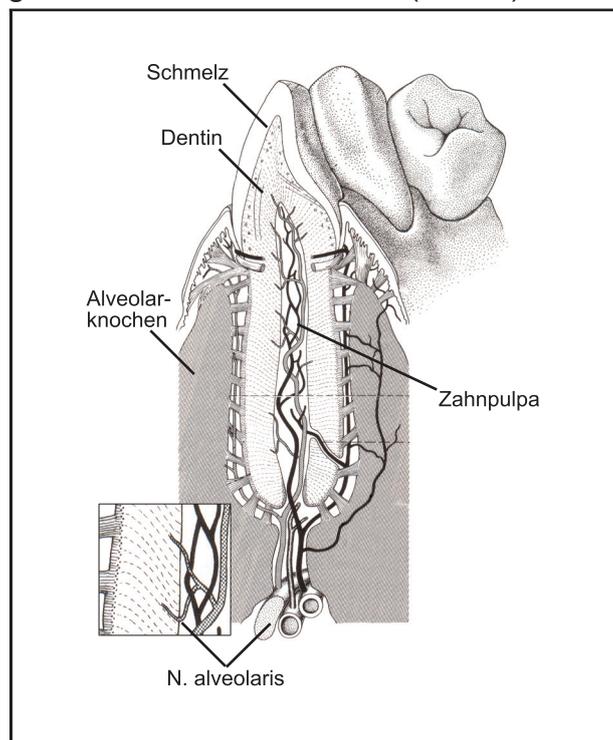


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur eines menschlichen Schneidezahnes und seines Halteapparates im Längsschnitt; Inset: Innervation der pulpanahen Bereiche des Dentins (modifiziert nach „Benninghoff Anatomie Band 1“, Urban&Schwarzenberg, 16. Auflage, 2002).

2.4 Nozizeptoren der Haut

Die Nozizeptoren der Haut sind bisher am besten untersucht. Die Somata der Haut-Afferenzen liegen in den Spinalganglien (Abb. 3). In Hautnerven

wurden sensorische Afferenzen nachgewiesen, die entweder nur auf noxische mechanische Reize, auf noxische mechanische und thermische Reize oder sowohl auf mechanische, thermische und chemische Reize reagieren. Nozizeptoren, die alle drei dieser Reizqualitäten aufnehmen können, werden als polymodale Nozizeptoren bezeichnet.

3. Perzeption noxischer Hitzereize

3.1 Hitzerezeptoren

Noxische Reize werden durch spezifische Membran-Rezeptoren aufgenommen. Die Perzeption noxischer thermischer Reize erfolgt spezifisch über Proteine, die zur Rezeptorfamilie „transient receptor potential“ (TRP) gehören (Harteneck et al., 2000; Clapham et al., 2001). Da der zuerst klonierte hitzetransduzierende Rezeptor auch durch Substanzen der Klasse der Vanilloide aktiviert wird (siehe 3.1.1), werden diese Hitzerezeptoren als TRPV bezeichnet. Von den TRPV sind bereits mehrere Subtypen bekannt (Tab. 1) und charakterisiert worden (Caterina et al., 1997; Hayes et al., 2000; Caterina et al., 1999; Kanzaki et al., 1999; Peier et al., 2002). Funktionell unterscheiden diese sich insbesondere hinsichtlich der Temperaturschwelle, bei der sie aktiviert werden können (Tab. 1).

TRPV			
Name	Temperaturschwelle	DNS nachgewiesen in	Referenzen
TRPV1 (VR1)	~ 42°C	Mensch, Maus, Ratte, Küken	Caterina et al., 1997; Hayes et al., 2000
TRPV2 (VRL-1)	~ 52°C	Mensch, Maus, Ratte	Caterina et al., 1999; Kanzaki et al., 1999
TRPV3	~ 22°C	Mensch, Maus	Peier et al., 2002

Tabelle 1: Nomenklatur und Expression der TRPV

3.1.1 Der Hitzerezeptor TRPV1

Im Jahre 1997 gelang die Klonierung und Charakterisierung des TRPV1

(Caterina et al., 1997). Dieser wird nicht nur durch noxische Hitzereize ($>42^{\circ}\text{C}$), sondern auch durch die exogene Substanz Capsaicin sowie durch Protonen ($\text{pH} < 5,0$) direkt aktiviert. Der TRPV1 erhielt zunächst die Bezeichnung VR1, da der Agonist Capsaicin (Abb. 6) chemisch zur Gruppe der Vanilloide gehört. In der Natur kommt Capsaicin in der Peperoni (Abb. 6) vor und verleiht dieser Frucht den charakteristisch scharfen, brennenden Geschmack (Szolcsanyi und Jancso-Gabor, 1975). TRPV1 ist ein unspezifischer Kationenkanal mit einer Permeabilität für die Ionen $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+}$ (Bevan und Szolcsanyi, 1990). Dieser Hitzerezeptor besteht vermutlich aus 6 Transmembrandomänen, wobei die Region zwischen der fünften und sechsten Domäne die Porenstruktur bildet. Sowohl der N-Terminus mit drei repetitiven Ankyrindomänen als auch der C-Terminus ragen ins Zytoplasma (Abb. 7) (Caterina et al., 1997). Der TRPV1 wird vor allem in sensorischen Nerven exprimiert, in einer geringeren Dichte auch im Gehirn, im Rückenmark und in einer Vielzahl der viszeralen Organe wie Leber und Milz (Cortright et al., 2001; Hayes et al., 2000). Auch in der Zahnpulpa wurde der TRPV1 nachgewiesen (Chaudhary et al., 2001).

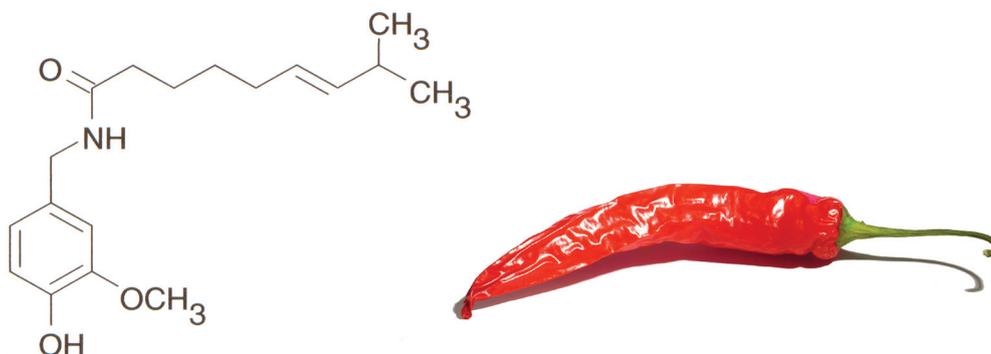


Abbildung 6: Abbildung einer Peperoni und Strukturformel von Capsaicin

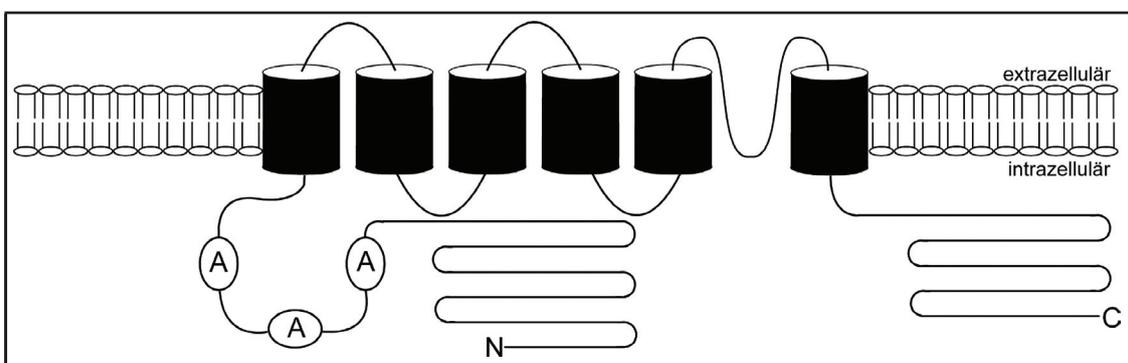


Abbildung 7: Struktur des TRPV1 (modifiziert nach Caterina et al., 1997)

3.1.2 Sensibilisierung des TRPV1 durch Entzündungsmediatoren

Der TRPV1 kann in seiner Aktivität durch Entzündungsmediatoren sensibilisiert werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind unter anderem an isolierten Somata sensorischer Neuronen gezeigt worden. Eine Sensibilisierung des Rezeptors gegenüber Hitze und Capsaicin ist bisher nachgewiesen worden für Mediatoren wie Adenosintriphosphat (ATP) (Kwak et al., 2000; Tominaga et al., 2001), Bradykinin (BK) (Chuang et al., 2001), „nerve growth factor“ (NGF) (Shu und Mendell, 1999), Prostaglandin E2 (PGE2) (Lopshire und Nicol, 1998) und Protonen (Petersen und LaMotte, 1993).

In Abszessflüssigkeiten dentogen bedingter Abszesse wurden Protonenkonzentrationen von bis zu pH 6,2 nachgewiesen (Wiese et al., 1999). Dieser Wert ist nicht ausreichend, um den TRPV1 direkt zu aktivieren, wohl aber, um ihn gegenüber Hitzereizen zu sensibilisieren. Für den Agonisten Capsaicin konnte gezeigt werden, dass die Amplitude des durch Capsaicin erzeugten Ioneneinstroms bei einem Anstieg der Protonenkonzentration von pH 7,3 auf pH 6,3 um das 7-fache erhöht wird (Petersen und LaMotte, 1993). Funktionell bedeutet dies, dass die thermische Schwelle zur Aktivierung von Nozizeptoren gesenkt wird und diese Entzündungsmediatoren über den TRPV1 dentale Nozizeptoren permanent aktivieren. Diese Mechanismen sind am entzündungsbedingten Zahnschmerz beteiligt.

3.1.3 Untersuchungen des TRPV1 in Neuronen vom Vogel

Untersuchung an Vögeln zeigten, dass diese im Gegensatz zur Ratte Capsaicin-unempfindlich sind (Szolcsanyi et al., 1986; Sann et al., 1987). Die Ursache hierfür wurde erst erkannt, nachdem man zeigen konnte, dass Capsaicin über einen spezifischen Rezeptor wirkt. Dieser Rezeptor wird auch durch Hitze und Protonen aktiviert (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Jordt et al., 2000). Vogelneurone exprimieren eine Variante des TRPV1, die sich nicht durch Capsaicin, aber durch Hitze aktivieren lässt (Caterina et al., 1997; Hayes et al., 2000).

4. Fragestellung

Bekannt ist, dass Küken einen niederschweligen Hitzerezeptor exprimieren, der sich hinsichtlich seiner Capsaicin-Insensitivität und hinsichtlich der Regulation der Expression durch den *nerve growth factor* (NGF) vom niederschweligen Hitzerezeptor von Säugetieren unterscheidet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der auf noxische Hitzereize reagierende Thermorezeptor in primär sensorischen Neuronen vom Vogel durch Protonen sensibilisiert wird.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 3-21 Tage alte Küken (Lehr- und Versuchstierstation, Kitzingen) verwendet. Ihr Gewicht betrug 70-350 g. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem mit Sägespänen ausgestreuten und mit einer Wärmelampe versehenen Freilaufgehege (2x2 m). Die Experimente wurden bei der zuständigen Behörde, der Regierung von Unterfranken, angezeigt.

2. Herstellen einer Zellkultur

2.1 Narkose der Tiere und Präparation der Wirbelsäule

Die Küken wurden mit einer letalen Dosis von etwa 40 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Narkoren®, 30 mg/ml, Rhone Merieux, Laupheim) durch eine intraperitoneale Injektion getötet. Die Entnahme der Wirbelsäule und Isolierung der Zellen erfolgte bei den Küken ähnlich wie bereits für Ratten beschrieben (Petersen et al., 1993). Zunächst wurden die Daunen bzw. Federn entfernt. Anschließend wurde die Haut im Bereich der Wirbelsäule mit Hilfe einer spitzen Schere und einer chirurgischen Pinzette abpräpariert. Kranial der Schwanzwurzel und kaudal des Kopfes wurde die Wirbelsäule durchtrennt. Durch Schnitte seitlich der Wirbelsäule wurde diese von umgebenden Strukturen befreit. Die isolierte Wirbelsäule wurde in eine mit ‚Dulbecco`s phosphate buffered saline‘ (D-PBS, GIBCO) gefüllte Glaspetrischale gelegt. In dieser wurde die Wirbelsäule in drei bis vier etwa gleich große Stücke geteilt und in eine neue, mit D-PBS gefüllte Petrischale überführt. Anschließend wurde die Wirbelsäule von kranial nach kaudal, entlang der Mittellinie geteilt, um einen optimalen Zugang zu den Ganglien zu erreichen. Hierbei wurden mechanische Belastungen vermieden, um die Neuronen nicht zu schädigen. Die längsgeteilten Wirbelsäulenabschnitte wurden nun für die Ganglioneomie in eine Petrischale mit ‚Dulbecco`s modified Eagle`s Medium‘ (D-MEM, Sigma) gegeben. Dem D-MEM wurde das bakterizid wirkende Antibiotikum Gentamicin (GIBCO) zugesetzt.

2.2 Ganglionektomie

Für die Ganglionektomie wurde ein Binokular (Zeiss) verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden mit einer sehr feinen, gebogenen Augenschere (Geuder®) und einer sehr feinen, spitzen Pinzette (Nr. 5, Dumont Medical, Schweiz) durchgeführt. Ein Stück der Wirbelsäule wurde in eine mit D-MEM gefüllte Petrischale (Ø 60 mm) gegeben. Die Wirbelsäule wurde so gelegt, dass der Wirbelkanal mit den *Foramina intervertebralia* gut einsehbar war. Nach Entfernung des Rückenmarks war das Ganglion als leicht gelbliche und nicht transluzente Verdickung im Foramen zu erkennen. Das Ganglion wurde vorsichtig angehoben und nach der Durchtrennung des umgebenden Bindegewebes und der Nervenstränge aus dem Foramen isoliert und in eine Petrischale (Ø 35 mm) mit D-MEM gegeben. Von den insgesamt 46 Spinalganglien des Kükens wurden 20-30 Ganglien entnommen. Die Isolierung der Ganglien musste schnell erfolgen, um eine Schädigung der Neurone durch mangelnde O₂-Versorgung zu vermeiden.

Anschließend wurden die Ganglien unter dem Binokular (Zeiss) von der umgebenden bindegewebigen Kapsel sowie von Nervensträngen freipräpariert und in eine mit D-MEM gefüllte Petrischale (Ø 35 mm) überführt.

2.3 Herstellung einer Einzelzell-Suspension

Für die Kultivierung wurden die Somata in keimfreie Bedingungen überführt und alle folgenden Schritte zur Verhinderung einer Kontamination unter einer Sterilbank (Lamin Air®, Heraeus) durchgeführt. Die enzymatische Behandlung der Ganglien erfolgte im Inkubator (Heraeus 6000, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂-Begasung unter Wasserdampfsättigung.

Dazu wurden die Ganglien, in eine mit 5 ml Collagenase Typ B (0,40 U/ml, gelöst in D-MEM) gefüllten Petrischale (Ø 35 mm) umgesetzt und bei 37°C für 90-135 Minuten (je nach Körpergewicht des Tieres) inkubiert. Nach jeweils 30-45 Minuten wurde die Hälfte der Collagenase-Lösung durch neue Lösung ersetzt. Um eine gleichmäßige Aktivität der Collagenase an den Ganglien zu gewährleisten, wurde die Petrischale in etwa 10 minütlichen Abständen geschwenkt. Die Ganglien wurden anschließend mit einer beschichteten

(Sigmacote®, Sigma) Pasteur-Pipette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen umgesetzt. Überschüssige Collagenase wurde abgesogen. Die Ganglien wurden durch Zugabe von etwa 8 ml D-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Ganglien in Trypsin (25,000 U/ml, gelöst in D-PBS) für 11 Minuten im Inkubator bei 37°C behandelt. Durch Zugabe von etwa 8 ml D-MEM wurden die Ganglien gewaschen. Anschließend wurde zu den Ganglien etwa 2 ml D-MEM gegeben. Daraufhin wurden die Ganglien mehrmals durch die Öffnung einer beschichteten Pasteur-Pipette gesogen, um so die Somata mechanisch aus dem Zellverband zu lösen. Die Spitze der Pasteur-Pipette wurde zuvor durch eine Flamme gezogen, um scharfe Kanten abzurunden.

2.4 Reinigen der Einzelzell-Suspension und Aussäen der Zellen

Um die Neurone nun von Geweberesten weitgehend zu trennen, wurde die Zell-Suspension vorsichtig auf eine Percoll-Lösung (Tab. 2) geschichtet, so dass sich beide Lösungen nicht vermischten. Nach 5 minütiger Zentrifugation (2500 U/min) (Megafuge 1.0, Heraeus) wurde der Überstand bis zum Pellet abgesogen. Das Pellet mit den Somata wurde in 8 ml D-MEM durch vorsichtiges Schwenken aufgenommen, weitere 5 Minuten (1000 U/min) zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesogen. Dieser Reinigungs-Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Im letzten Schritt wurde dem Pellet etwa 3 ml F12+ Kulturmedium zugegeben (Tab. 3) und bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde soweit abgesogen, dass je nach Anzahl der beschichteten Deckgläser (Ø 10 mm) diese mit etwa 50 µl beschichtet werden konnten. Das Pellet wurde nochmals im Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette eine homogene Verteilung der zellulären Bestandteile im Medium hergestellt.

Percoll-Lösung	
6,717 ml	Aqua a.i.
0,932 ml	PBS 10fach-Konzentrat
2,354 ml	Percoll® (Dichte: 1,13 g/ml)

Tabelle 2: Zusammensetzung der Percoll-Lösung

Auf jedes Deckglas (Vorbereitung siehe unten) wurden 50 µl der Zellsuspension aufgetragen. Nach der Beschichtung des ersten Deckglases wurde unter dem Mikroskop die Dichte der Neurone kontrolliert. Für Zellkulturen, die für die Kobaltfärbung vorgesehen waren, wurde eine Dichte von etwa 200 Neuronen pro Deckglas angestrebt. Für Zellkulturen, die für Patch-clamp Versuche vorgesehen waren, genügte eine geringere Dichte.

Vorbereitung der Deckgläser: Um eine Haftung der Somata auf den Deckgläsern zu gewährleisten, wurden diese wie folgt vorbereitet: Die Deckgläser wurden trocken autoklaviert, mit einer Pinzette einzeln aufgenommen, mehrmals durch die Flamme gezogen und in eine sterile Glaspetrischale gelegt. Auf jedes Deckglas wurde 35 µl Poly-L-Lysin (MW>300.000) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens vier Stunden wurden die Deckgläser mit D-PBS gewaschen, um überschüssiges Poly-L-Lysin zu entfernen. Hierzu wurde zunächst das Poly-L-Lysin auf den Deckgläsern abgetupft, anschließend kurz in D-PBS getaucht und in einzelne Petrischalen (Ø 35 mm) gegeben. Dann wurde zum Waschen in drei Wiederholungen in jede Petrischale etwa 4 ml D-PBS gegeben und anschließend vollständig mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt.

2.5 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂-Begasung unter Wasserdampfsättigung kultiviert. Nach etwa 6 Stunden adhärten die Neurone auf den Deckgläsern ausreichend gut. Frühestens nach dieser Zeit wurde jeweils 2 ml F12+ Kulturmedium (Tab. 3) in die Petrischalen mit den beschichteten

Kulturmedium	
44 ml	Dulbecco`s modified eagle`s medium mixture F-12 ham (F12; Sigma)
5 ml	Pferdeserum hitzeinaktiviert (GIBCO)
0,15 ml	Aminosäuren (GIBCO)
0,25 ml	L-Glutamin (Seromed)
0,5 ml	Penicillin/Streptomycin (GIBCO)
50 µl	nerve growth factor 7S (NGF)

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums F12+

Deckgläsern gegeben. Das Kulturmedium war zuvor auf 37°C angewärmt worden. Während der Kulturzeit wurde täglich jeweils 1 ml Medium durch Neues ersetzt. Die Zeit der Kultivierung betrug, abhängig von den geplanten Versuchen, 1-3 Tage.

3. Cobalt-Färbung

3.1 Theoretische Grundlagen

Um aus der heterogenen Population von Spinalganglienzellen hitze-sensitive Neurone zu identifizieren, wurde die Cobalt-uptake Methode eingesetzt. Diese Methode wurde von Hogan und von Winter entwickelt (Hogan, 1983; Winter, 1987). Sie basiert auf folgendem Prinzip: Der hitzesensitive Rezeptor TRPV1 ist ein unselektiver Kationenkanal. Eine Aktivierung führt zum Einstrom von Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Na^+ -Ionen und zum Ausstrom von K^+ -Ionen (Bevan und Szolcsanyi, 1990). Werden Co^{2+} -Ionen in das extrazelluläre Medium gegeben, so kommt es auch zu einem Einstrom dieser Ionen, die anschließend mit Ammoniumpolysulfid präzipitiert werden (Tab. 4). Das Fällungsprodukt Cobaltsulfid (CoS_2) ist braun. Die hitzesensitiven, braun gefärbten Somata können so unter dem Mikroskop von den hitzeinsensitiven Somata unterschieden werden (Abb. 8).

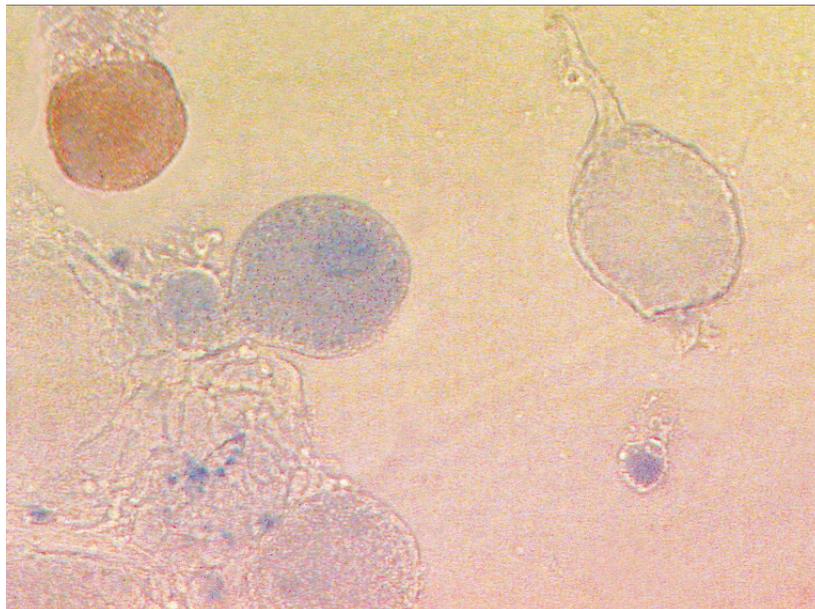


Abbildung 8: Mikrophotographie eines Hitze-positiven (links), eines Hitze-negativen (rechts) und eines toten Neurons (Mitte)

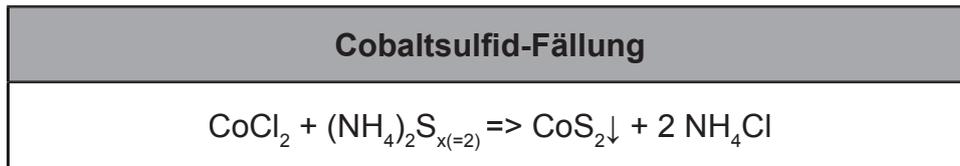


Tabelle 4: Reaktionsformel der Cobaltsulfid-Fällung

3.2 Durchführung der Cobalt-Färbung

Die Färbung wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Lösungen wurden aus Gründen der Haltbarkeit im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Mindestens eine Stunde vor Färbebeginn wurden die Lösungen in Kunststoff-Färbeschalen (Cell Wells™, Corning) bzw. Glaspetrischalen (Ø 34 mm) gegeben, um Raumtemperatur zu erreichen. Bei jeder Färbung wurden maximal vier Deckgläser gefärbt, um konstante Färbebedingungen zu erreichen.

Die Deckgläser wurden für die einzelnen Schritte der Färbeprozedur mit einer feinen Pinzette umgesetzt. Dabei musste beachtet werden, dass die Deckgläser zügig von einer in die nächsten Lösung kamen, um eine Beanspruchung der Zellen zu vermeiden. Die Behandlung mit Paraformaldehyd und Ammoniumpolysulfid erfolgte unter einem Abzug.

Assay-Puffer mit HEPES (pK 6,8-8,2)		Assay-Puffer mit MES (pK 5,5-6,7)	
<i>Substanz</i>	<i>Molarität [mM]</i>	<i>Substanz</i>	<i>Molarität [mM]</i>
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,75	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,75
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0
KCl	5,0	KCl	5,0
Glucose	12,0	Glucose	12,0
HEPES	10,0	MES	10,0
Sucrose	137,0	Sucrose	137,0
NaCl	57,1	NaCl	57,1
<p><i>pH-Wert: mit KOH auf gewünschten Wert einstellen</i></p> <p><i>Osmolarität:</i> 296 mOsmol/kg bei pH 7,4 (HEPES) 288 mOsmol/kg bei pH 5,8 (MES)</p>			

Tabelle 5: Zusammensetzung der Assay-Puffer mit HEPES (links) bzw. MES (rechts)

Die Cobalt-Färbung wurde entsprechend des Färbeprotokolls (vgl. Anhang S. 58) durchgeführt. Die Deckgläser mit den Somata wurden zunächst für 2 Minuten in Assay-Puffer (37°C) (Tab. 5) gewaschen. Anschließend erfolgte für 8 Minuten die Stimulation der Somata durch Hitze und/oder Protonen in einem cobaltchloridhaltigen Assay-Puffer (5 mM CoCl_2 in Assay-Puffer mit HEPES bzw. MES). Nach der Stimulation wurde jedes Deckglas in Assay-Puffer für 2 Minuten gewaschen. Für die Präzipitation der intrazellulären Co^{2+} -Ionen wurde das Deckglas für 2 Minuten in Ammoniumpolysulfid-Lösung gegeben (Tab. 6). Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt. Zwischen den nun folgenden Schritten wurde das Deckglas für jeweils 2 Minuten mit D-PBS gewaschen.

Ammoniumpolysulfid-Lösung	
<i>Herstellung des Assay-Puffers:</i>	
<i>Substanz</i>	<i>Molarität [mM]</i>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,74
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,0
KCl	5,0
Glucose	12,0
HEPES	10,0
Sucrose	60,0
NaCl	58,0
<i>pH-Wert: mit KOH auf 7,4 einstellen</i>	
<i>Osmolarität: 207 mOsmol/kg</i>	
<i>Herstellung der Verbrauchslösung:</i>	
Ammoniumsulfid 1/100 mit Assay-Puffer speziell für Ammoniumsulfid verdünnen.	

Tabelle 6: Herstellung der Ammoniumpolysulfid-Lösung

Um bei der Auswertung intakte von toten Neuronen unterscheiden zu können, wurde neben der Cobalt-Färbung eine Trypan-Blau Färbung durchgeführt. Tote Neurone stellen sich aufgrund der beschädigten Membran nach dieser

Färbung blau dar (Abb. 8). Zur Färbung der Zellen mit Trypan-Blau wurden die Deckgläser auf einen kleinen Kunststoffring gelegt und 70 µl Trypan-Blau Lösung (0,1% gelöst in D-PBS) aufpipettiert. Nach 10 Minuten wurden die Deckgläser von überschüssigem Trypan-Blau mit Hilfe eines feuchten Papiertuches befreit und in D-PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 20 Minuten in Paraformaldehyd-Lösung (4%). Anschließend wurden die Neurone mit PBS und mit bidestilliertem Wasser jeweils 2 Minuten gewaschen. Die Eindeckelung erfolgte mit DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2.)octan, Sigma) (Tab. 7). Hierfür wurde zunächst das Wasser mit einem Papiertuch von dem Deckglas abgezogen. Objektträger (76x26x1 mm, Fa. Marienfeld) wurden mit 1,4 µl DABCO versehen und die Deckgläser auf den Objektträger gelegt. Überschüssiges DABCO wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgesaugt.

Um ein Verdunsten des DABCO's zu verhindern, wurde der Rand der Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

DABCO-Lösung
1,4-Diazabicyclo(2.2.2.)octan (Sigma) 2,5% Stammlösung: 2,5 g DABCO in 100 ml PBS Eingedeckelt wird mit 0,25% Lösung: 1 Teil 2,5% Stammlösung 9 Teile Glycerin 1 Teil PBS

Table 7: Zusammensetzung der DABCO-Lösung

3.3 Stimulation der Neurone

Temperatur: Die Neurone wurden bei Raumtemperatur, 37°C, 40°C und 44°C stimuliert. Die Stimulation mit 37°C, 40°C und 44°C erfolgte im Wärmeschrank (Heraeus). Der cobaltchloridhaltige Assay-Puffer wurde zuvor jeweils auf die entsprechende Temperatur gebracht. Um eine Veränderung der Osmolarität durch eine Verdunstung von Wasser zu vermeiden, wurden die Lösungen mit einem Deckel abgedeckt.

Protonen: Zur Stimulation der Neurone mit erhöhten Protonenkonzentrationen wurde der cobaltchloridhaltige Assay-Puffer auf

den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Bei Stimulationen mit pH 6,6, 6,2 und 5,8 wurde der mit MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid sodium salt) gepufferte cobaltchloridhaltige Assay-Puffer verwendet. Bei den Kontrollen unter physiologischen Protonenkonzentrationen von pH 7,4 wurde der mit HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperanzine-1-ethanesulfonicacid) gepufferte cobaltchloridhaltige Assay-Puffer verwendet. Die Experimente mit unterschiedlich hohen Protonenkonzentrationen wurden bei Raumtemperatur, 37°C, 40°C und 44°C durchgeführt.

Kalziumkanal-Antagonisten: In Experimenten mit Antagonisten wurden diese in entsprechender Konzentration sowohl dem Assay-Puffer (37°C) des ersten Waschschrilles, als auch dem Cobaltchlorid-Assay bei entsprechender Stimulustemperatur zugegeben.

Der Kalziumkanal-Antagonist Verapamil ist schlecht in Wasser löslich. Deshalb wurde eine Stocklösung aus Verapamil und dem Detergens **Dimethylsulfoxide** (DMSO) hergestellt. Entsprechend der gewünschten Konzentration wurde die Verapamil-Stocklösung dem Assay-Puffer des ersten Waschschrilles als auch dem Cobaltchlorid-Assay zugefügt. Alle anderen verwendeten Antagonisten wie Nickel (Ni^{2+}) und Amilorid konnten direkt dem Assay-Puffer sowie dem Cobaltchlorid-Assay zugegeben werden.

3.4 Auswertung der Cobalt-uptake Experimente

Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Axiophot 135, Zeiss) durchgeführt, welches über eine CCD-Kamera (Sony) mit einem PC verbunden war. Als Bildverarbeitungsprogramm kam die Software OPTIMAS (Optimas Corp., USA) zur Anwendung. Alle Neurone, die weder anderen Neuronen überlagert noch durch Trypan-Blau angefärbt waren wurden zur Auswertung herangezogen. Gefärbte Zellen (braun) wurden visuell von ungefärbten Zellen unterschieden. Neben der Färbung der Zellen wurde auch die Größe der Neurone bestimmt. Mit Hilfe einer Computermaus wurden die einzelnen Neurone umfahren; das Bildverarbeitungsprogramm errechnete daraus die eingeschlossene Fläche. Die Querschnittsflächen wurden als Maß für die Größe verwendet und die erhaltenen Daten über die Software Excel (Microsoft) gespeichert. Pro Datenpunkt jedes Einzelversuchs wurden mindestens 3 Tiere

und jeweils 100-200 Somata eines Deckgläschen ausgewertet. Die einzelnen Werte wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben.

4. Elektrophysiologie

4.1 Theoretischer Hintergrund

Die von Neher und Sakmann entwickelte Patch-clamp Technik (Neher und Sakmann, 1976) ermöglicht die Registrierung von Strömen im Milliampere-Bereich. Für diese Methode erhielten Neher und Sakmann 1991 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Das Prinzip der Patch-clamp Technik beruht darauf, dass eine Glaspipette mit einem äußerst dünnen Öffnungsdurchmesser (0,5-1,0 μm) auf die Zellmembran aufgesetzt wird. Anschließend wird ein Unterdruck erzeugt und es kommt zu einer dichten Verbindung der Membran mit der Pipette. Es entsteht ein hochohmiger Widerstand (gigaseal) und Membranströme können somit von dem vielfach stärkeren Hintergrundrauschen isoliert dargestellt werden. Dieser Zustand ist die Voraussetzung für die verschiedenen, möglichen Konfigurationen der Patch-clamp Technik (Hamill et al., 1981) (Abb. 9).

Es können beispielsweise direkt unter der Pipette befindliche Ionenkanäle (attached-cell Konfiguration) oder Summenströme der gesamten Zellmembran (whole-cell Konfiguration) bestimmt werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden in der whole-cell Konfiguration durchgeführt. Bei dieser Konfiguration wird nach dem Erreichen des hochohmigen Widerstandes durch Unterdruck die Zellmembran unter der Pipettenöffnung zerstört. Somit können Ionenströme im Picoampere-Bereich an der Zellmembran registriert werden.

4.2 Patch-clamp Pipetten

Die Patch-clamp Pipetten wurden mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (Modell PB-7; Narishige) (Abb. 10) aus mittelhartem Borsilikatglas (Schmelzpunkt 700-850°C, 200 μl) in zwei Ziehschritten durch eine Glühwendel hergestellt. Im ersten Schritt wurden die Glaskapillaren vorgezogen, d.h. erhitzt und um etwa 0,7-1,0 cm ausgezogen. Nach der Abkühlung wurden die Kapillaren voll ausgezogen,

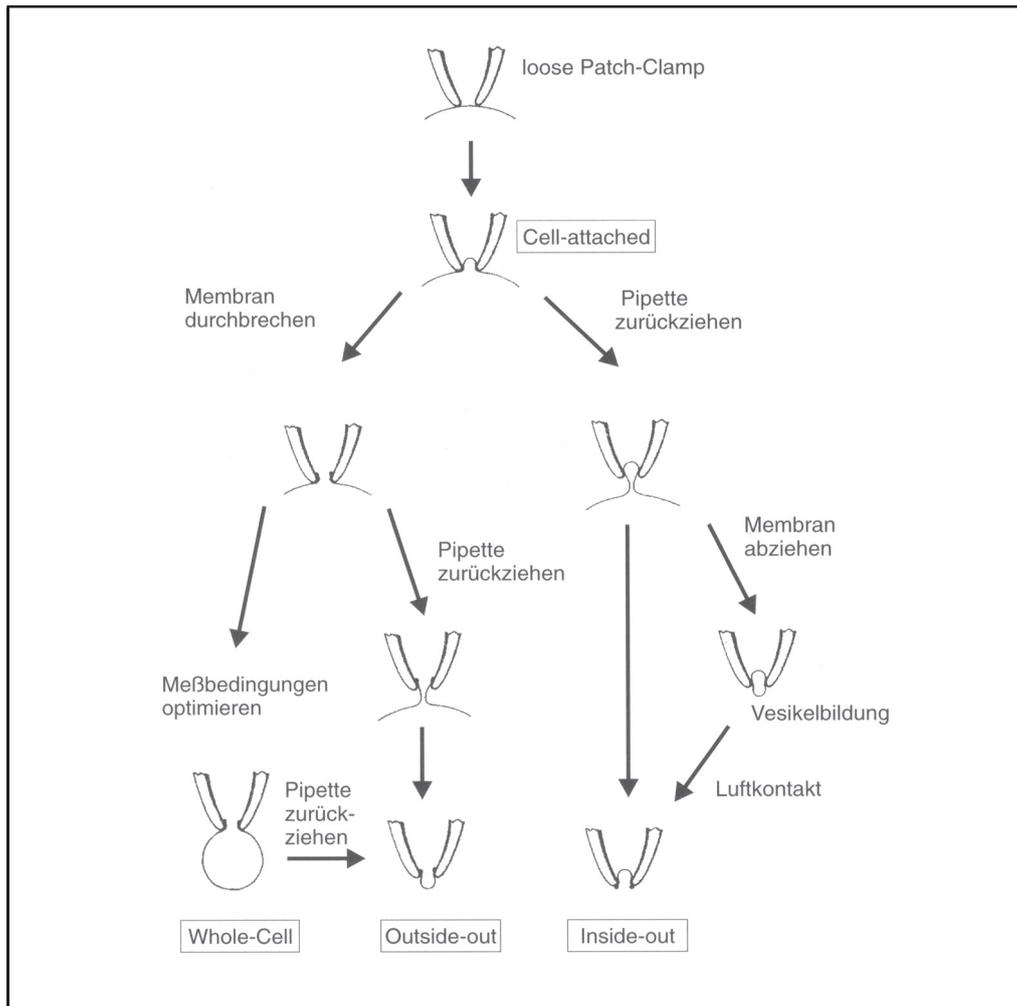


Abbildung 9: Darstellung der verschiedenen Patch-clamp Konfigurationen (modifiziert nach Hamill et al., 1981)

wodurch 2 Patch-clamp Pipetten entstanden. Der Spitzendurchmesser betrug etwa 2 μm . Anschließend wurden an einem glühenden Draht einer Mikroforge unter optischer Kontrolle (Laborlux K) die Pipettenspitze hitzepoliert, um den Spitzendurchmesser weiter zu verkleinern (Spitzendurchmesser 0,5–1,0 μm) und scharfe Kanten zu glätten.

Direkt vor Versuchsbeginn wurde die Patch-clamp Pipette mit einer 'internen' Lösung (Tab. 8) befüllt. Verbliebene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Schütteln entfernt und die Pipette anschließend auf Blasenfreiheit unter einer Lupe kontrolliert. Die so hergestellten Pipetten hatten einen Widerstand von 2-6 M Ω .



Abbildung 10: Abbildung des Pipetten-Ziehgerätes

4.3 Lösungen

Für die Patch-clamp Versuche wurden folgende Lösungen verwendet: Die Patch-Pipetten wurden mit einer internen Lösung befüllt (Tab. 8). Während der Versuche wurde diese aus Gründen der Haltbarkeit kühl gelagert und nach Beendigung der Versuche tiefgekühlt aufbewahrt.

Die externen Lösungen (Tab. 9) dienten neben der Vitalerhaltung der Somata auch als Träger für die Stimuli respektive Hitze, Protonen und Antagonisten. Vor Versuchsbeginn mussten sie Raumtemperatur angenommen haben. Aus Gründen der Haltbarkeit wurden sie tiefgefroren aufbewahrt.

4.4 Patch-clamp Versuchsstand

Der Messplatz für die Patch-clamp Versuche ist in Abbildung 11 dargestellt. Er bestand aus einem Inversmikroskop (Axiovert 135; Zeiss), welches auf einem durch Druckluft schwingungs isolierten Labortisch stand. Ein Faraday-Käfig aus gelochten Metallblechen schirmte den Arbeitsplatz vor elektrischen Störungen ab. Unter Videokontrolle (Sony 3CCD Color Video Camera und dem Programm

Interne Lösung	
Substanz	Molarität [mM]
KCl	140
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	1,0
BAPTA	11,0
HEPES	10,0
Mg-ATP	2,0
<i>pH-Wert: mit KOH auf 7,4 einstellen</i>	
<i>Osmolarität: 308 mOsmol/kg</i>	

Tabelle 8: Zusammensetzung der internen Lösung für Patch-clamp Experimente

Externe Lösung mit HEPES (pK 6,8-8,2)		Externe Lösung mit MES (pK 5,5-6,7)	
Substanz	Molarität [mM]	Substanz	Molarität [mM]
NaCl	140	NaCl	140
KCl	3,5	KCl	3,5
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0	CaCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,0	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,0
Glucose	20,0	Glucose	20,0
HEPES	10,0	MES	10,0
<i>pH-Wert: mit KOH auf gewünschten Wert einstellen</i>			
<i>Osmolarität:</i>			
<i>310 mOsmol/kg bei pH 7,4 (HEPES)</i>			
<i>302 mOsmol/kg bei pH 5,8 (MES)</i>			

Tabelle 9: Zusammensetzung der externen Lösung für Patch-clamp Experimente mit HEPES (links) bzw. MES (rechts)

Grabit) konnten über einen Bildschirm jegliche Bewegungen der Zellen und die der Patch-clamp Pipetten kontrolliert werden. Den Mikropipettenhalter (CV 201 Advantage; Axon Instruments) steuerte ein ferngesteuerter elektronischer motorgetriebener Mikromanipulator (Phytron®). Für die Umströmung der Zellen sorgte eine Tropfpipette mit computergesteuerter



Abbildung 11: Patch-clamp Versuchsstand

Heizspirale (Abb. 12), die über ein Mehrwege-Ventil (Parker) Zufluss von unterschiedlichen Lösungen erhalten konnte. Der Aufbau entsprach dem von Dittert entwickelten „fast multichannel superfusion system“ (Dittert et al., 1998). Die Zulaufgeschwindigkeit ($\approx 1,5$ ml/min) der Lösungen wurde abgeglichen. Anschließend wurde das der gewünschten Stimulustemperatur entsprechende Heizintervall über das computergesteuerte Heizgerät ausgewählt. Während der Versuchsdurchführung musste darauf geachtet werden, dass die Lösungen in direkter Nähe der zu untersuchenden Zelle (<100 μm) appliziert wurden und über die Zellen flossen. Die Superfusionslösung wurde kontinuierlich mit Hilfe einer Pumpe (Klusch Medizintechnik; Freiburg) abgesaugt.

Zur Registrierung elektrischer Signale diente eine chlorierte Silber-

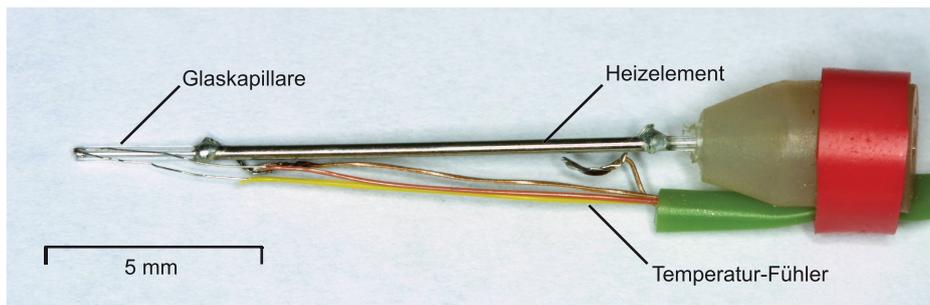


Abbildung 12: Heizgerät für die Superfusionslösungen

Messelektrode. Als Referenzelektrode diente eine ebensolche Bad-Elektrode.

Die weiteren elektronischen Komponenten des Patch-clamp Versuchsstandes bestanden aus Vorverstärker, Verstärker (Axopatch 200A; Axon Instruments), einem Oszilloskop und einem IBM-PC, der sämtliche Daten der Versuche speicherte.

Als Software für die Aufzeichnung der Daten und eine erste Bearbeitung wurden die Programme DigiDat 1200 interface und pClamp 6.0 (Axon Instruments) verwendet. Mit diesen Programmen konnten die Temperaturstimuli sowie die erzeugten Ionenströme der untersuchten Zelle im zeitlichen Verlauf darstellt werden.

4.5 Durchführung der Versuche

Eine detaillierte Ansicht des Versuchsaufbaus mit Messkammer, Elektroden, Patch-clamp Pipette und Absaugung ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein Bruchstück eines Deckglases mit den adhärierenden Somata wurde in die Messkammer mit der Badlösung gelegt. Es wurde mit Hilfe des Mikroskops ein Soma gewählt. Über eine im Okular befindlichen Meßeinheit wurde der Durchmesser bestimmt. Der Zufluss der Badlösung wurde mit Hilfe eines manuellen Manipulators (Leitz) in die direkte Nähe ($\sim 100 \mu\text{m}$) der zu untersuchenden Zelle gebracht. Die Absaugung wurde so eingestellt, dass stets ein dünner Film Superfusionslösung über die Zellen floss. Die Temperatur des Hitzereizes und die Dauer des Stimulus konnten frei gewählt werden. Für die Hitzestimulationen wurden die Lösungen so erhitzt, dass sie diese etwa 5 Sekunden lang hielten. Bei der Kombination von Hitzestimulus und Protonen wurden die Zellen zunächst mit der zu testenden Protonenkonzentrationen

4-6 Sekunden superfundiert und anschließend der Hitzestimulus zugeschaltet.

Die mit der internen Lösung befüllten Patch-clamp Pipette wurde in die Aufnahme mit der Silberelektrode eingespannt und mit Hilfe des Mikromanipulators vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch leichtes Ansaugen wurde eine stabile Glas-Membran-Verbindung erzeugt, was sich durch einen hochohmigen Widerstand im Gigaohmbereich widerspiegelte. Konnte dieser erreicht werden, wurde durch starkes Ansaugen an der Pipette die Membran unter dieser zerstört. Somit wurde die gewünschte whole-cell Konfiguration erreicht und es konnte mit den Untersuchungen begonnen werden.

Pro Deckglas wurde jeweils nur eine Zelle den Untersuchungen unterzogen.

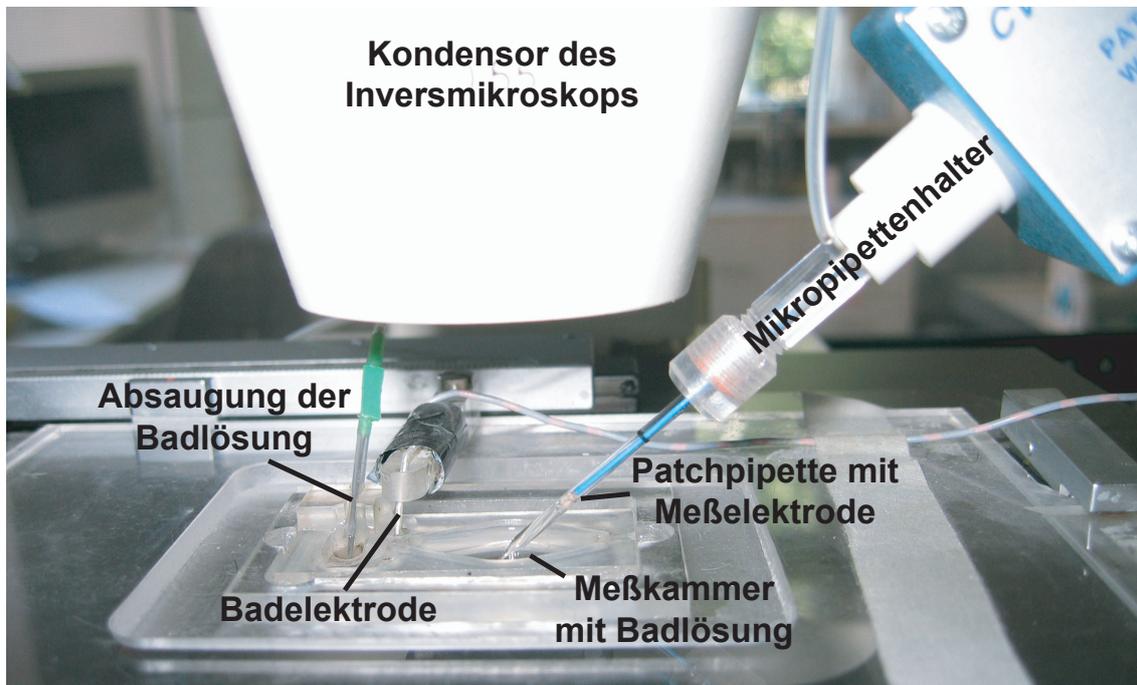


Abbildung 13: Messkammer für die Patch-clamp Versuche

C. ERGEBNISSE

1. Cobalt-uptake Experimente

1.1 Protonensensitivität in Abhängigkeit von der Dauer in Zellkultur

Um zu untersuchen, ob der Anteil hitzesensitiver Neurone in Anwesenheit von erhöhten Protonenkonzentrationen steigt, wurden die Zellen bei 44°C mit cobalthaltigem Assay-Puffer stimuliert, der einen pH von 7,4 sowie pH 6,6 und pH 5,8 hatte. Die Experimente wurden nach 1, 2 und 3 Tagen unter Kulturbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

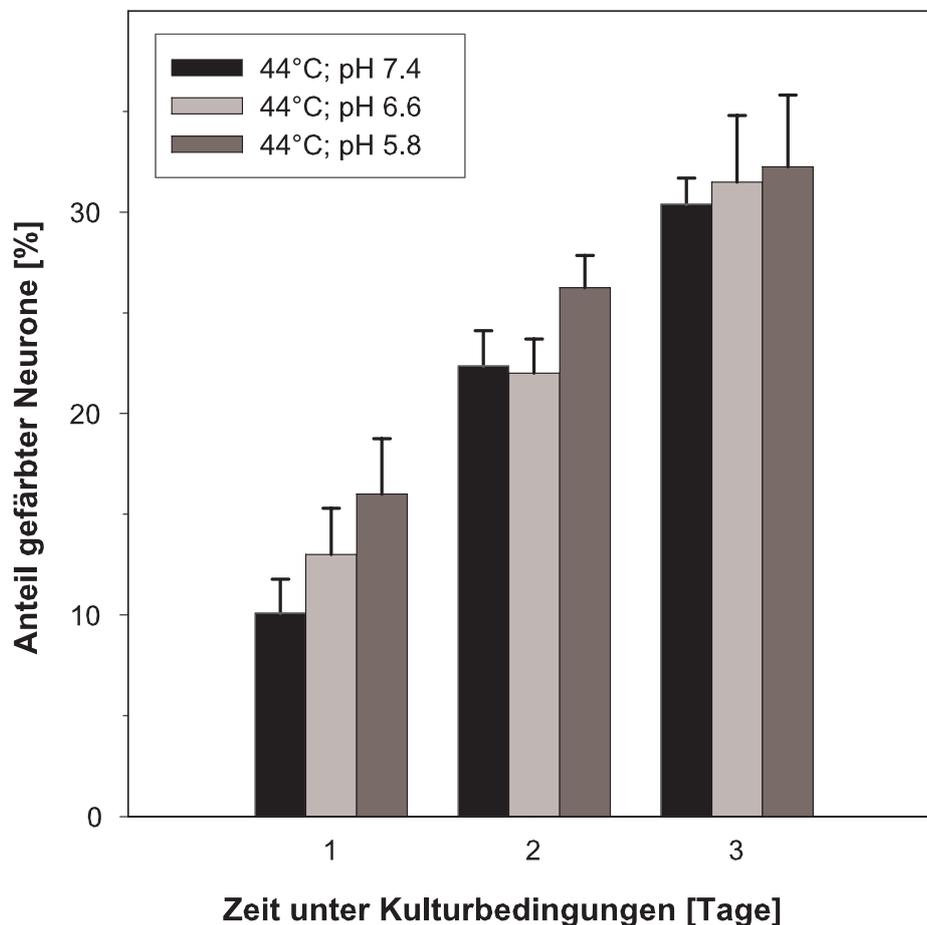


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der durch Cobaltsulfid gefärbten Neurone. Stimulation: 44°C, pH 7,4 (schwarze Balken); 44°C, pH 6,6 (hellgraue Balken); 44°C pH 5,8 (dunkelgraue Balken). Zeit in Kulturbedingungen: 1, 2 und 3 Tage. Es wurden 4-5 unabhängige Zellkulturen verwendet und pro Datenpunkt jeweils insgesamt 400-500 Neurone ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

Am ersten Tag unter Kulturbedingungen antworteten $10,1\% \pm 1,7\%$ der Somata bei pH 7,4 auf den Hitzestimulus. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 6,6 ergab einen geringen Anstieg der antwortenden Somata auf $13,0\% \pm 2,3\%$. Bei einem pH-Wert von 5,8 betrug der Anteil $16,0\% \pm 2,8\%$ und war damit höher als nach Stimulation mit pH 6,6 und pH 7,4.

Mit zunehmender Zeit in Zellkultur erhöhte sich der Anteil gefärbter Somata. Bei einem pH von 7,4 stieg der Anteil antwortender Somata von $10,1\% \pm 1,7\%$ am ersten Kulturtag auf $22,4\% \pm 1,7\%$ am zweiten Kulturtag und auf $30,4\% \pm 1,3\%$ am dritten Kulturtag. Ebenfalls erhöhte sich der Anteil gefärbter Somata bei einem pH von 6,6. Am ersten Kulturtag färbten sich $13,0\% \pm 2,3\%$, am zweiten Kulturtag $22,0\% \pm 1,7\%$ und am dritten Kulturtag auf $31,5\% \pm 3,3\%$. Bei einem pH von 5,8 erhöhte sich der Anteil gefärbter Somata ausgehend von $16,0\% \pm 2,8\%$ am ersten auf $26,3\% \pm 1,6\%$ am zweiten Kulturtag. Am dritten Kulturtag stieg der Anteil gefärbter Somata auf $32,3\% \pm 3,6\%$. Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Anteil hitzesensitiver Somata an den ersten 3 Kulturtagen unabhängig von der Protonenkonzentration erhöht.

1.2 Protonensensitivität in Abhängigkeit von der Temperatur

Im folgenden war die Frage, ob sich bei unterschiedlichen Temperaturen und Protonenkonzentrationen der Anteil cobaltgefärbter Neurone ändert. Hierfür wurde die Cobaltfärbung mit Protonenkonzentrationen von pH 7,4, pH 6,6, pH 6,2 und pH 5,8 bei Raumtemperatur, 37°C , 40°C und 44°C durchgeführt. Für diesen Versuchsteil wurden 1 Tag alte Zellkulturen verwendet. Die Ergebnisse bei Raumtemperatur sind in Abbildung 15 dargestellt, die bei 37°C , 40°C und 44°C in Abbildung 16.

Bei Raumtemperatur führte eine Erhöhung der Protonenkonzentration von pH 7,4 auf pH 6,6 zu einem Anstieg gefärbter Somata von $3,3\% \pm 0,5\%$ auf $7,8\% \pm 1,7\%$. Eine weitere Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 6,2 erhöhte den Anteil gefärbter Somata auf $16,0\% \pm 3,5\%$ und bei einem pH von 5,8 auf $35,0\% \pm 4,0\%$ (Abb. 15).

Bei einer Temperatur von 37°C und einem pH von 7,4 antworteten $4,8\% \pm 1,3\%$ der Somata. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 6,6 führte zu einem Anstieg des Anteils an gefärbten Somata auf $12,8\% \pm 1,3\%$. Eine

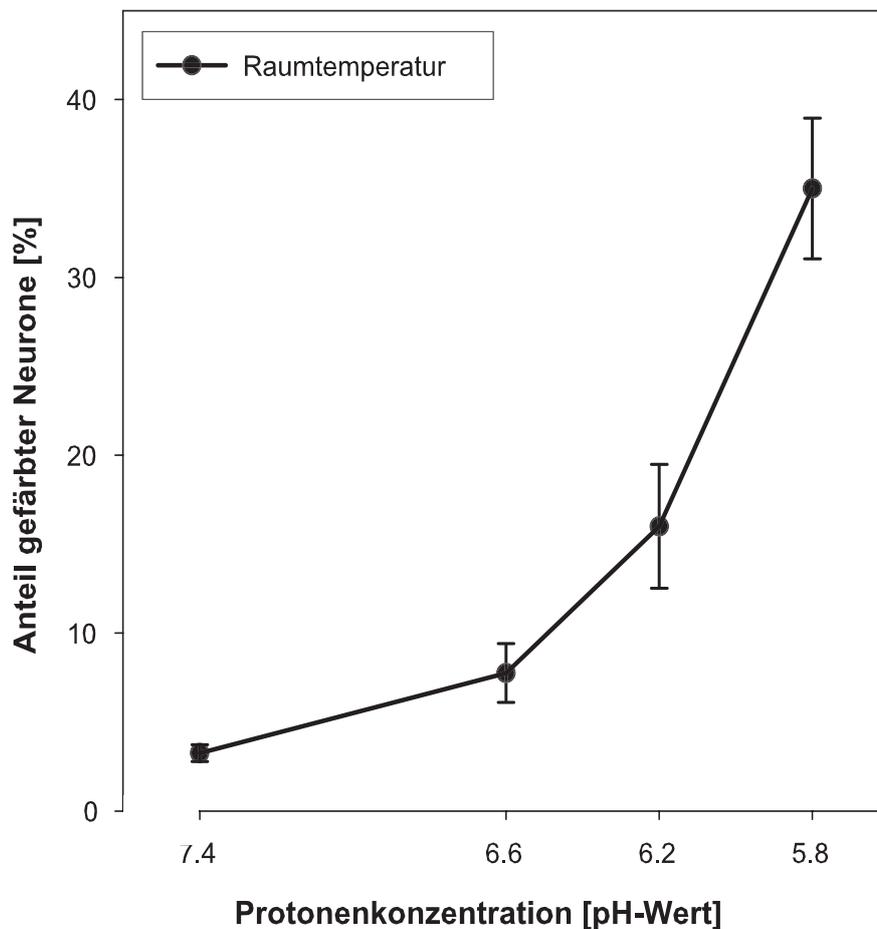


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der durch Cobaltsulfid gefärbten Neurone in Abhängigkeit von der extrazellulären Protonenkonzentration. Stimulation: Raumtemperatur. Protonenkonzentration des cobalthaltigen Assay-Puffers: pH 7,4, pH 6,6, pH 6,2 und pH 5,8. Zeit unter Kulturbedingungen: 1 Tag. Es wurden 3-4 unabhängige Zellkulturen verwendet und pro Datenpunkt jeweils 300-400 Neurone ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

Erhöhung der Protonenkonzentration von pH 6,6 auf einen pH von 6,2 ergab einen deutlichen Anstieg des Anteils gefärbter Somata auf $34,3\% \pm 3,3\%$. Bei einem pH von 5,8 erhöhte sich der Anteil antwortender Somata auf $39,3\% \pm 3,6\%$ (Abb. 16).

Bei der Stimulation mit 40°C bei pH 7,4 antworteten $9,7\% \pm 1,2\%$ der Somata. Bei einem pH von 6,6 färbten sich $15,7\% \pm 1,2\%$ und bei pH 6,2 färbten sich $17,0\% \pm 0,6\%$ der Somata an. Mit diesen Protonenkonzentrationen erhöhte sich der Anteil gefärbter Somata leicht. Die Cobaltfärbung bei einem pH von 5,8 führte im Vergleich zu den Protonenkonzentrationen pH 6,6 und pH 6,2 zu

einem deutlichen Anstieg des Anteils der gefärbten Somata auf $30,3\% \pm 5,9\%$ (Abb. 16).

Bei einer Stimulation mit 44°C zeigte sich eine leichte Erhöhung des Anteils an gefärbten Somata über den gesamten getesteten Bereich im Vergleich zu einer Protonenkonzentration von pH 7,4. Bei einem pH von 7,4 antworteten $5,0\% \pm 1,0\%$ der Neurone. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 6,6 ergab einen Anstieg an gefärbten Somata auf $11,5\% \pm 1,6$. Bei einer Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 6,2 wurden $13,2\% \pm 1,4\%$ und bei einem pH-Wert von pH 5,8 wurden $14,0\% \pm 1,0\%$ der Somata angefärbt (Abb. 16).

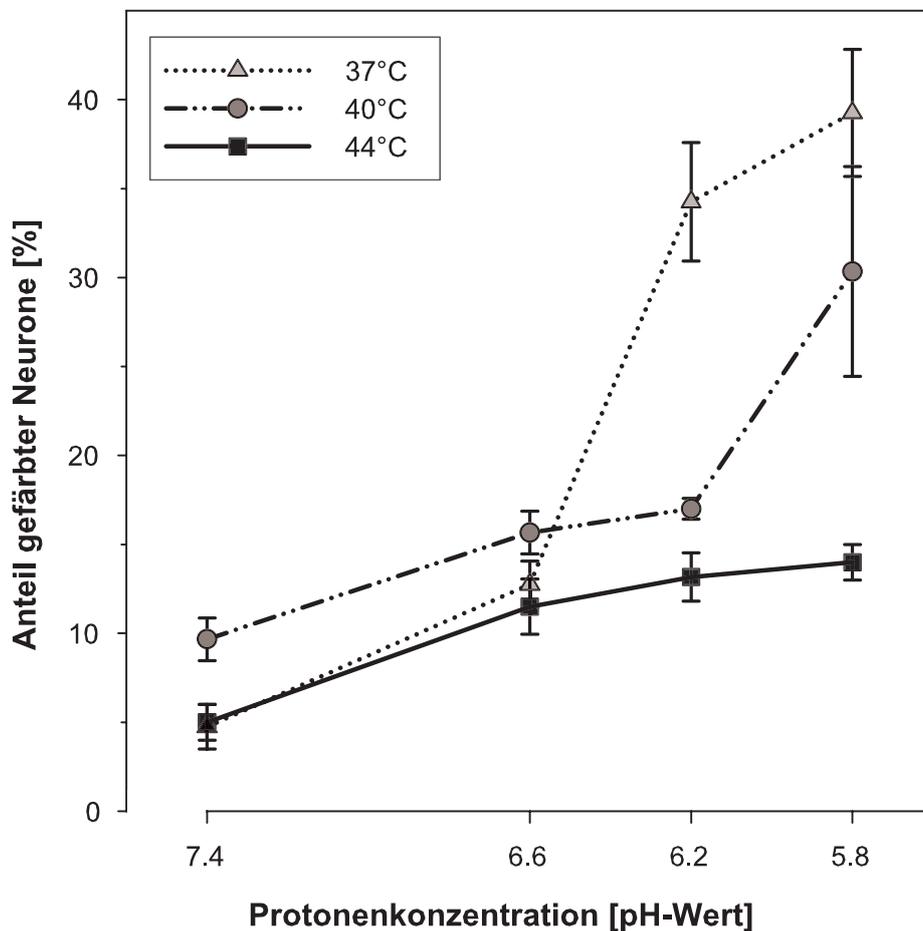


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der durch Cobaltsulfid gefärbten Neurone in Abhängigkeit von der extrazellulären Protonenkonzentration und der Temperatur. Stimulation: 37°C (runde Symbole), 40°C (dreieckige Symbole), 44°C (viereckige Symbole). Protonenkonzentration des cobalthaltigen Assay-Puffers: pH 7,4, pH 6,6, pH 6,2 und pH 5,8. Zeit unter Kulturbedingungen: 1 Tag. Es wurden 3-4 unabhängige Zellkulturen verwendet und pro Datenpunkt jeweils 300-400 Neurone ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

1.3 Einfluss verschiedener Kalzium-Antagonisten

Um zu überprüfen, ob bei den hitzeinduzierten Cobalt-uptake Experimenten Cobaltionen nicht nur durch den TRPV1, sondern möglicherweise auch durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle strömen, wurden Kontrollexperimente mit Kalzium-Antagonisten durchgeführt. Spinalganglienneurone exprimieren spannungsgesteuerte Kalziumkanäle vom L-Typ und T-Typ (Fox et al., 1987; Mintz et al., 1992). Bei den Kontrollexperimenten wurden die Kalziumkanäle vom T-Typ spezifisch mit Nickel-Ionen (Ni^{2+}) und die vom L-Typ spezifisch mit Verapamil blockiert. Die Kalziumkanal-Blocker wurde in der Konzentration von 100 μM eingesetzt. Es wurden einen Tag alte Zellkulturen verwendet und

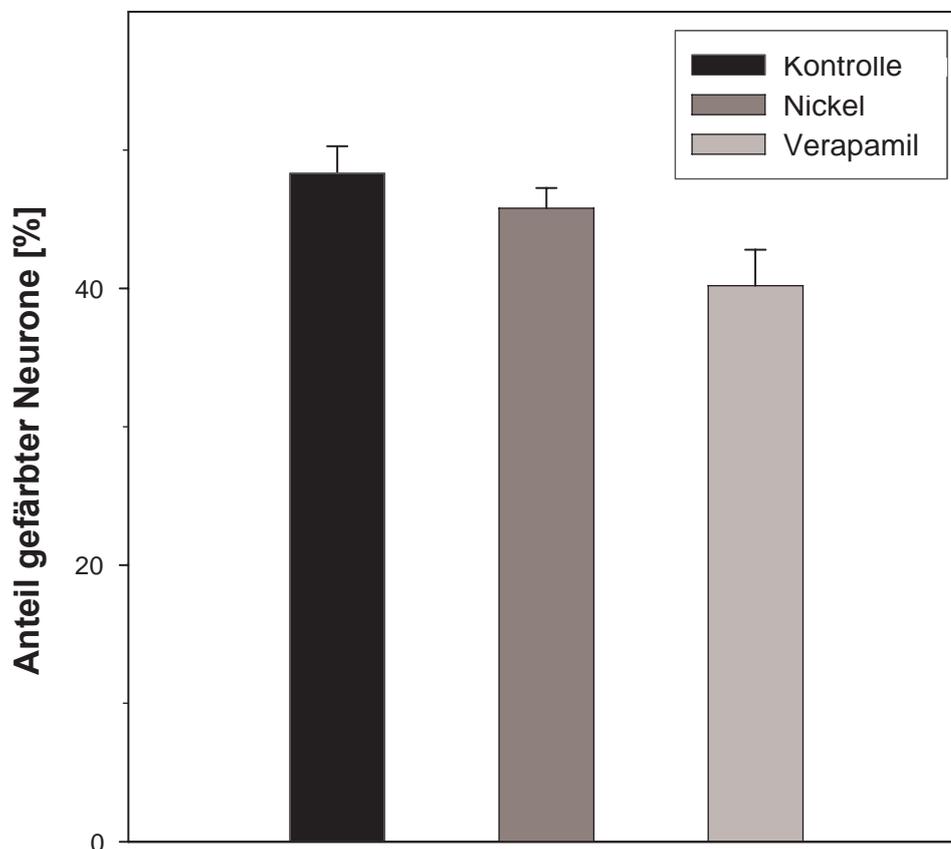


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der durch Cobaltsulfid gefärbten Neurone unter Zusatz der Kalziumkanal-Antagonisten Ni^{2+} und Verapamil. Stimulation: 37°C, pH 6,2 und Ni^{2+} in den Konzentrationen von 100 μM , sowie 37°C, pH 6,2 und Verapamil in den Konzentrationen von 100 μM . Zeit unter Kulturbedingungen: 1 Tag. Es wurden 4-5 unabhängige Zellkulturen verwendet und pro Datenpunkt jeweils insgesamt 400-500 Neurone ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

die Somata mit 37°C und einem pH von 6,2 stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Bei der Stimulation ohne Zusatz von Antagonisten färbten sich $48,3\% \pm 1,9\%$ der Somata an. In Anwesenheit des Antagonisten Ni^{2+} in einer Konzentration von 100 μM wurden $45,8\% \pm 1,5\%$ der Somata gefärbt.

Bei einer Konzentration des Antagonisten Verapamil in einer Konzentration von 100 μM färbten sich $40,2\% \pm 2,6\%$ der Somata an, im Vergleich zu $48,3\% \pm 1,9\%$ ohne den Antagonisten.

2. Patch-clamp Untersuchungen

Mit den Cobalt-uptake Experimenten konnten Aussagen über den prozentualen Anteil an gefärbten Somata gemacht werden. Um Aussagen über Veränderungen des induzierten Einwärtsstroms in einzelnen Zellen treffen zu können wurden Patch-clamp Untersuchungen durchgeführt. Für die Experimente wurde die whole-cell Konfiguration gewählt. Dazu wurden die Somata 1 bis 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden mit Temperaturen bis zu 52°C für 5 Sekunden stimuliert. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein saures Medium den hitzeinduzierten Einwärtsstrom verändert. Hierfür wurde extrazelluläres Medium von pH 6,6, pH 6,2 und pH 5,8 eingesetzt.

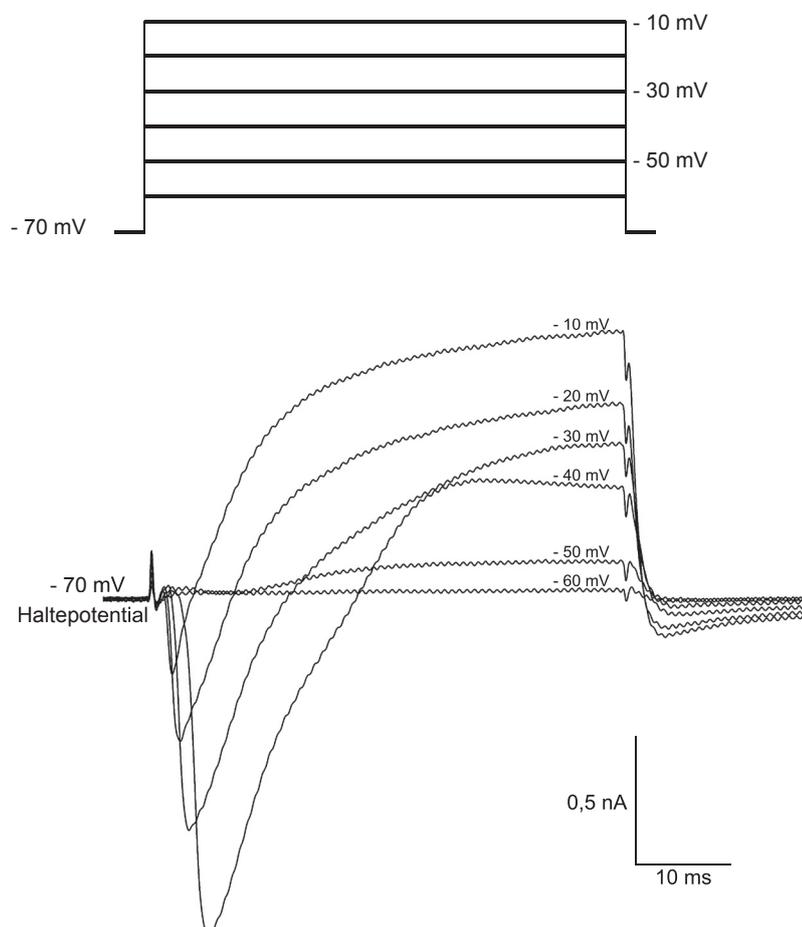


Abbildung 18: Spannungsaktivierte Ströme (unten) eines Spinalganglienneurons in der whole-cell Konfiguration. Ausgehend von der Haltespannung von -70 mV wurden die spannungsaktivierten Ströme durch 6 depolarisierende Spannungssprünge (oben) nacheinander für 50 ms im Bereich von -60 mV bis -10 mV aktiviert.

Spannungsgesteuerte Ströme: Zu Beginn jedes Experiments wurde zunächst überprüft, ob das Soma intakt ist. Hierfür wurden die spannungsgesteuerten Ströme aktiviert. In Abbildung 18 unten ist eine Originalregistrierung der spannungsgesteuerten Ströme eines Somas dargestellt. Die dazu gehörigen depolarisierenden Spannungssprünge sind in Abbildung 18 oben dargestellt. Die Membran wurde jeweils ausgehend vom Haltepotential (-70 mV) für jeweils 50 ms in 10 mV Schritten bis zu -10 mV depolarisiert. Eine Depolarisation auf -60 mV führte zu keiner Aktivierung spannungsgesteuerter Ströme. Bei einer Depolarisation auf -40 mV kommt es zu einem Netto-Einwärtsstrom, getragen von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen, welcher sich in der graphischen Darstellung ausgehend vom Haltepotential nach unten darstellt; es folgt zeitlich der Netto-Auswärtsstrom, getragen von K⁺-Ionen, der sich in der graphischen Darstellung nach oben darstellt. Bei einer Depolarisation auf -10 mV überwiegen die Auswärtsströme. Für die Untersuchung von hitze- und protonenaktivierten Strömen wurden nur solche Somata verwendet, die ausgeprägte spannungsgesteuerte Ströme zeigten.

Hitzeaktivierte Einwärtsströme: In Abbildung 19 ist die Antwort eines Neurons auf einen Hitzereiz dargestellt. Das Neuron wurde ausgehend von der Raumtemperatur (25,4°C) bei physiologischer Protonenkonzentration (pH 7,4) des extrazellulären Mediums stimuliert. Der obere Graph der Abbildung zeigt den Verlauf des Stimulus, der untere zeigt die dazu gehörige Antwort des Neurons. Der Hitzestimulus erfolgte ausgehend von 25,4°C rampenförmig auf 52,3°C. Diese Temperatur wurde für etwa 2 Sekunden gehalten und fiel anschließend wieder auf Raumtemperatur ab. Mit kurzer Verzögerung folgte die Antwort des Somas. Das Maximum der Zellantwort wurde ebenfalls kurz nach der Maximaltemperatur erreicht und fiel im gleichen Maße wieder ab.

Um zu untersuchen, ob der hitzeinduzierte Einwärtsstrom temperaturabhängig ist, wurden nacheinander zwei Hitzereize mit unterschiedlicher Temperatur gegeben. Abbildung 20 zeigt die Antwort eines Somas auf einen Hitzereiz von 52,3°C (links) und 51,3°C (rechts). Die Zeit zwischen den Reizen betrug etwa 3 Minuten. Bei einem Stimulus auf 52,3°C

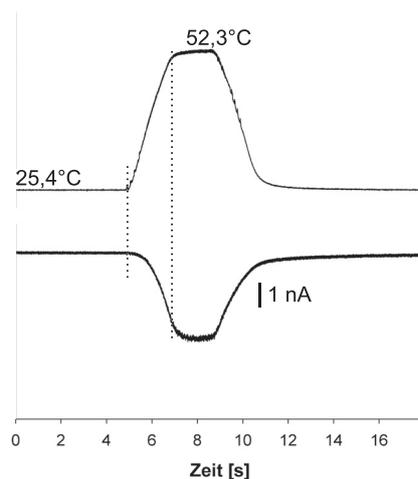


Abbildung 19: Zeitverlauf des hitzeinduzierten Einwärtsstroms eines Somas. Der zeitliche Verlauf des Hitzereizes ist in der Abbildung oben, der dazu gehörige Einwärtsstrom in der Abbildung unten dargestellt. Zeit in Kulturbedingungen: 1 Tag. Stimulation: 52,3°C bei pH 7,4. Haltepotential: -70 mV.

betrug die maximale Amplitude des Einstroms 3,62 nA, bei 51,3°C 2,75 nA. Dieses Experiment weist darauf hin, dass die Amplitude des hitzeinduzierten Einwärtsstroms temperaturabhängig ist.

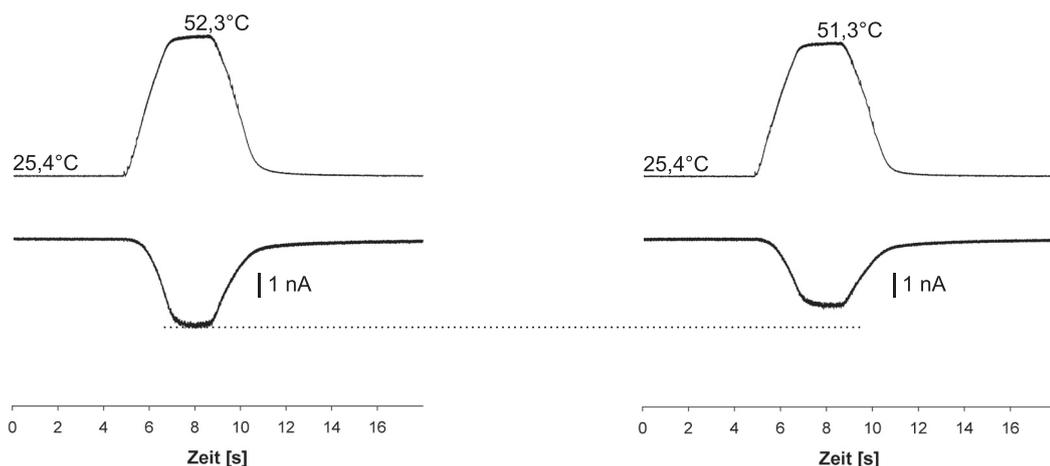


Abbildung 20: Zeitverlauf zweier hitzeinduzierter Einwärtsströme. Das Soma wurde ausgehend von 25,4°C mit einem Hitzereiz von 52,3°C (links) bzw. 51,3°C (rechts) stimuliert. Der Hitzereiz wurde jeweils oben, der dazugehörige Einwärtsstrom unten dargestellt. Zeit in Kulturbedingungen: 1 Tag. Stimulation: 52,3°C bzw. 51,3°C bei pH 7,4. Haltepotential - 70 mV.

Protoneninduzierte Einwärtsströme: Weiterhin wurde untersucht, ob die Neurone auf ein saures Medium mit einem Einwärtsstrom reagieren. Das Soma wurde bei Raumtemperatur mit einer Protonenkonzentration von pH 5,8 stimuliert. Die Antwort eines Somas auf ein saures extrazelluläres Medium ist in Abbildung 21 dargestellt. Die erste Antwort der Zelle erfolgte mit einer Verzögerung von etwa einer Sekunde. Die Zelle antwortet mit einem Einwärtsstrom, der trotz anhaltender Stimulation mit dem sauren Medium schnell inaktiviert. Dieser Strom wurde zuerst von Krishtal und Pidoplichko beschrieben (Krishtal und Pidoplichko, 1980). Dieser Antwort folgt ein anhaltender Einwärtsstrom, der erst nach Stimulationsende inaktiviert. Der anhaltende Einwärtsstrom beruht auf der Aktivierung eines unspezifischen Kationenkanals und ist in seiner Amplitude sehr viel kleiner als die erste Komponente. Der zuerst von Bevan und Yeats beschriebene anhaltende Einwärtsstrom beruht vermutlich auf der Aktivierung des hitzesensitiven Kanals (Bevan und Yeats, 1991). Dieses Experiment bestätigte, dass Somata auf Protonen mit einem anhaltenden und einem vorübergehenden Einwärtsströmen antworten.

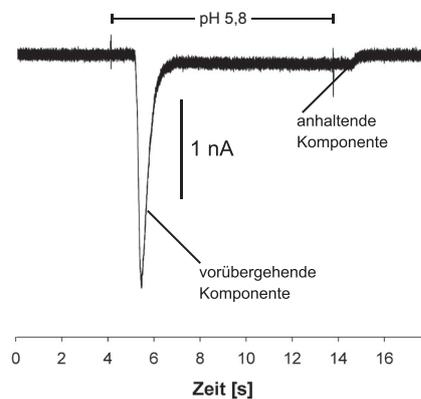


Abbildung 21: Zeitverlauf von protoneninduzierten Einwärtsströmen. Das Soma wurde ausgehend von pH 7,4 mit einem sauren Medium pH 5,8 bei Raumtemperatur stimuliert. Die Dauer der Protonenstimulation ist graphisch oben als horizontale Linie und der protoneninduzierte Einwärtsstrom unten im zeitlichen Verlauf dargestellt. Zeit unter Kulturbedingungen: 1 Tag.

Hitze- und protoneninduzierte Einwärtsströme: Um zu untersuchen, ob der hitzeinduzierte Einwärtsstrom durch Protonen sensibilisiert werden kann, wurden die Somata mit Lösungen verschiedener Protonenkonzentrationen und unterschiedlichen Temperaturen stimuliert. Abbildung 22 zeigt die Antwort eines Somas ausgehend von Raumtemperatur ($25,4^{\circ}\text{C}$) bis auf einen Hitzereiz von $51,3^{\circ}\text{C}$ unter physiologischen Protonenkonzentrationen (links) und einen Hitzereiz von $51,1^{\circ}\text{C}$ bei einer Protonenkonzentration des extrazellulären Mediums von pH 6,6. Im oberen Teil der Abbildung ist der Verlauf des Hitze-Stimulus, darunter ist die Applikationsdauer des sauren extrazellulären Mediums, und im unteren Teil des Bildes die Zellantwort gezeigt. Bei einem Stimulus von $51,3^{\circ}\text{C}$ betrug die maximale Amplitude des Einwärtsstroms $2,75\text{ nA}$. Nach Stimulation mit einer Protonenkonzentration des Mediums von pH 6,6 und einem Stimulus von $51,1^{\circ}\text{C}$ erhöhte sich die maximale Amplitude des Einstroms auf $3,93\text{ nA}$. Dieses Experiment legt nahe, dass Protonen zu einer Sensibilisierung des hitzeinduzierten Einwärtsstrom führen.

Um die Vermutung der Sensibilisierung des hitzeinduzierten Einwärtsstroms durch Protonen zu bestätigen wurden weitere Versuche durchgeführt. Diese

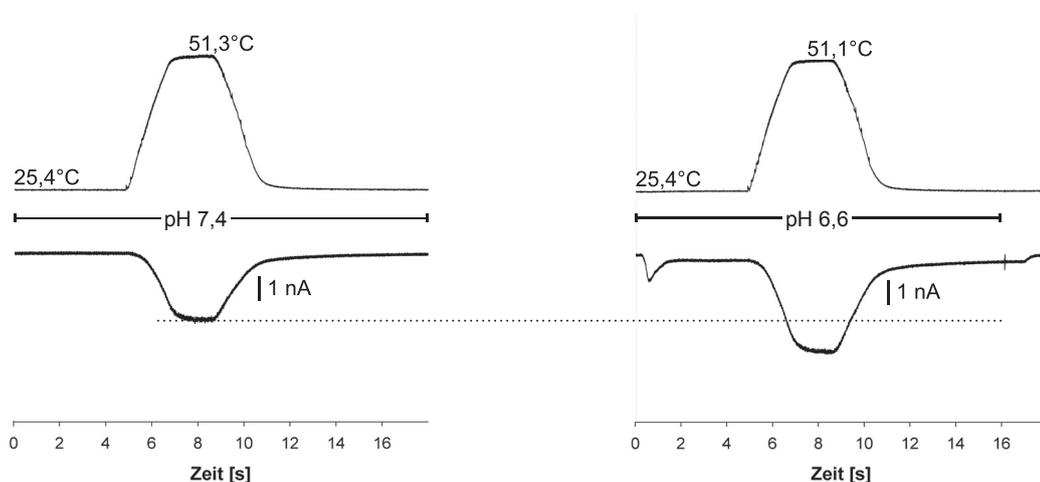


Abbildung 22: Zeitverlauf eines hitzeinduzierten Einwärtsstroms (links) und eines hitze- und protoneninduzierten Einwärtsstroms (rechts) eines Somas. Das Soma wurde ausgehend von $25,4^{\circ}\text{C}$ mit einem rampenförmigen Hitzereiz von $51,3^{\circ}\text{C}$ bei einer Protonenkonzentration von pH 7,4 (links) bzw. $51,1^{\circ}\text{C}$ bei einer Protonenkonzentration von pH 6,6 (rechts) stimuliert. Der Hitzereiz wurde jeweils oben graphisch dargestellt. Der jeweilige hitze- und/oder protoneninduzierte Einwärtsstrom wurde dazu im zeitlichen Verlauf (unten) dargestellt. Zeit in Kulturbedingungen: 1 Tag. Stimulation: $51,3^{\circ}\text{C}$ bei pH 7,4 bzw. $51,1^{\circ}\text{C}$ bei pH 6,6.

sind graphisch nicht dargestellt. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 5,8 führte zu keiner weiteren Sensibilisierung des Somas gegenüber Hitze, da die Zellantwort bei vergleichbarer Hitze-Stimulation nicht anstieg. Dies legt nahe, dass bei einer Protonenkonzentration zwischen pH 6,6 und pH 5,8 eine maximale Sensibilisierung des Somatas gegenüber Hitze vorliegt.

D. DISKUSSION

1. Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der hitzesensitive Rezeptor TRPV1 der Nozizeptoren von Küken durch Protonen sensibilisiert wird. Die Untersuchungen wurden an isolierten Somata primärer Afferenzen, die 1-3 Tage kultiviert waren, durchgeführt. Die Experimente wurden an Neuronen von Tieren eines ähnlichen Alters beziehungsweise einer ähnlichen Gewichtsklasse durchgeführt.

1.1 *In vitro* Bedingungen

Als Modell für die peripheren Endigungen von Nozizeptoren wurden die Untersuchungen an den isolierten Somata dieser Neurone unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt. Dieses war möglich, da Hitzerezeptoren nicht ausschließlich auf den peripheren Endigungen exprimiert sind, sondern auch auf den Somata der Neurone (Marin-Burgin et al., 2000). Ihre physiologische Funktion an den Somata ist bisher noch nicht bekannt. Auf zellulärer Ebene sind aus technischen Gründen Untersuchungen an den Endigungen nicht möglich, sehr wohl aber an den isolierten Somata, die leicht zu isolieren und unter Kulturbedingungen zu halten sind (Vyklícky und Knotkova-Urbancova, 1996).

Ein Vorteil gegenüber Untersuchungen unter *in vivo* Bedingungen ist, dass definierte extrazelluläre Bedingungen gewählt werden können. So kann z.B. vermieden werden, dass unkontrolliert irritierende und inflammatorische Substanzen aus dem umgebenden Gewebe während des Experiments freigesetzt werden und das Ergebnis möglicherweise beeinflussen. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Modell der isolierten Somata für die peripheren Endigungen wurde bereits erfolgreich für Untersuchungen der Sensibilisierung der Hitzerezeptoren an Ratten und Mäusen eingesetzt. So z.B. für Protonen (Petersen und LaMotte, 1993), Prostaglandin E2 (Lopshire und Nicol, 1998), Bradykinin (Chuang et al., 2001), Adenosintriphosphat (ATP) (Kwak et al., 2000; Tominaga et al., 2001) und für den Wachstumsfaktor NGF (Shu und Mendell, 1999). Ein weiterer Vorteil der *in vitro* Versuchsbedingungen ist, dass eindeutig eine zelluläre Antwort des Nozizeptors auf spezifische Reize wie z.B. Protonen und Hitze isoliert nachgewiesen werden kann. Weiterhin lässt sich die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Patch-clamp Technik unter *in vitro*

Bedingungen einsetzen, nicht jedoch unter *in vivo* Bedingungen.

Es muss jedoch auch beachtet werden, dass bei der Isolierung der Somata notgedrungen die Axone abgerissen werden, was einer Axotomie *in vivo* entspricht. Diese Tatsache muss bei der Bewertung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

1.2 Thermische Reize, Protonen und Kalzium-Antagonisten

Die Somata wurden beim Einsatz der Cobalt-uptake Methode mit Reizen bis zu 44°C stimuliert. Es können auch Reize bis zu 46°C verwendet werden (Marin-Burgin et al., 2000); bei Verwendung noch höherer Temperaturen können die Neuronen jedoch thermisch geschädigt werden und es kommt zu unspezifischen Anfärbungen. Die Cobalt-uptake Methode erforderte eine Stimulationszeit von etwa 8 min; diese lange Dauer beschränkte die Anwendung hoher Temperaturen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten 44°C sind ein deutlich überschwelliger thermischer Stimulus für den Hitzerezeptor TRPV1 (Catarina et al., 1997), verursachen jedoch keine Schädigung der Zelle. Im Gegensatz zur Cobalt-uptake Methode wurden bei den Patch-clamp Untersuchungen Hitzereize von bis zu 52°C verwendet. Dies war möglich, da hier die Hitzestimulation nur sehr kurz, für maximal 2 Sekunden, erfolgte.

Des Weiteren wurden die Hitzereize in Medien mit unterschiedlichen Protonenkonzentrationen von pH 7,4 bis pH 5,8 durchgeführt. Eine Protonenkonzentration von etwa pH 7,4 liegt im physiologischen Bereich. Werte zwischen pH 7,4 und etwa pH 5,8 können unter Entzündungsbedingungen im Gewebe vorliegen (Waldmann et al., 1997); Konzentrationen höher als pH 5,8 werden unter pathophysiologischen Bedingungen selten erreicht. Da die hitzesensitiven Somata über Aktivierung eines kalziumpermeablen Kationenkanals detektiert wurden (Bevan und Szolcsanyi, 1990), musste die Beteiligung von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen geprüft werden. Eine Beteiligung dieser Kanäle und damit ein falsch positives Ergebnis wurde durch eine Kontrolle mit den Kalziumkanal-Antagonisten Verapamil und Nickelchlorid ausgeschlossen.

1.3 Cobalt-uptake Experimente

Die Population der Spinalganglien ist hinsichtlich vieler Parameter sehr heterogen. Funktionell betrachtet enthält sie neben den Nozizeptoren auch Neurone für Thermoperzeption sowie verschiedene nicht nozizeptive,

mechanosensitive Neurone. Die Sensitivität für Hitze ($> 42^{\circ}\text{C}$) ist eine Eigenschaft der Nozizeptoren. Diese hitzesensitiven Somata wurden histochemisch mit der Cobalt-uptake Methode detektiert und untersucht (Hogan, 1983; Winter, 1987). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Neurone identifizieren, die funktionelle TRPV1 Rezeptoren exprimieren. Der Rezeptor muss hierzu aktiviert werden, damit Cobaltionen in die Zelle einströmen können, um eine Anfärbung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu steht die Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Mit dieser Methode werden Rezeptoren detektiert, die in der Membran eingebaut sind, jedoch nicht funktionell sein müssen. Das bedeutet, dass die Ergebnisse, die man mit Hilfe der Cobalt-uptake Methode bekommt, eine größere Aussagekraft haben, da nur funktionelle Rezeptoren detektiert werden.

Die Cobalt-uptake Methode wurde zur Untersuchung des hitzesensitiven TRPV1 bereits vielfach eingesetzt (Winter, 1987; Marin-Burgin et al., 2000; Wach et al., 2003; Wendland et al., 2003). Grundsätzlich kann diese Methode zur Untersuchung unspezifischer kalziumpermeabler Kationkanäle eingesetzt werden. Im Vergleich zur Patch-clamp Methode hat die Cobalt-uptake Methode den Vorteil, dass eine Vielzahl von Neuronen gleichzeitig untersucht werden kann und somit eine quantitative Aussage über die Proportion der antwortenden Neurone gemacht werden kann.

Um bei der Auswertung der cobaltgefärbten Neurone nur die vitalen Somata zu berücksichtigen, wurde die Cobalt-uptake Methode mit der Trypanblau-Färbung kombiniert. Diese ermöglichte eine optische Identifizierung toter Somata aus der Auswertung und verhinderte somit eine falsch positive Bewertung. Das Kriterium für ein hitze positives Neuron war eine eindeutige Braunfärbung. Die Auswertung erfolgte visuell. Um einen subjektiven Einfluss auszuschließen, wurden die Objektträger vor der Auswertung geblindet.

1.4 Patch-clamp Technik

Zusätzlich zur Cobalt-uptake Methode wurde die Patch-clamp Technik in der whole-cell Konfiguration eingesetzt (Neher und Sakmann, 1976). Mit dieser Methode konnten Ionenströme einzelner Somata auf Hitze reize und/oder auf Stimulierung mit sauren Lösungen registriert werden. Mit Hilfe der Patch-clamp Technik kann im Gegensatz zur Cobalt-uptake Methode jeweils nur eine einzelne Zelle pro Experiment untersucht werden. Die Patch-clamp Technik wurde eingesetzt, um die Antwortstärke auf Hitze und die Sensibilisierung durch Protonen an einer einzelnen Zelle quantifiziert zu bestimmen. Diese Methode ist technisch sehr viel aufwendiger als die Cobalt-uptake Methode. Sie wurde

bereits bei einer Vielzahl von Untersuchungen der Hitzerezeptoren an der Ratte wie auch am Kücken eingesetzt (Petersen et al., 1996; Petersen et al., 1998; Wach et al., 2003). Da der Experimentator die zu untersuchenden Neurone auswählt, kann über den Anteil der sensitiven Zellen in der Gesamtpopulation keine Aussage getroffen werden, im Gegensatz zur Cobalt-uptake Methode. Da die Somata der Nozizeptoren beim Kücken überwiegend klein bis mittelgroß sind (Marin-Burgin et al., 2000) wurden bevorzugt Somata dieser Größe für die Versuche ausgewählt. Sowohl die Experimente mit der Cobalt-uptake Methode als auch die Experimente mit der Patch-clamp Technik erfassen den Hitzerezeptor funktionell, wobei die Patch-clamp Untersuchungen den Vorteil haben, dass im Gegensatz zur Cobalt-uptake Methode, unter anderem eine Aussage über die einzelnen Membranströme im zeitlichen Verlauf zum Stimulus gemacht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit war eine Hitzestimulation bei den Patch-clamp Experimenten mit identischen Temperaturen aus technischen Gründen nicht möglich. Hierdurch wurde ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Neuronen erschwert. Weiterhin muss die Möglichkeit einer Sensibilisierung des Rezeptors auf sich wiederholende Hitzereize während einer Untersuchungsreihe in Betracht gezogen werden. Dies kann durch eine mehrmalige Stimulation mit identischen Reizen untersucht werden. Verändert sich die Antwort des Somas innerhalb dieser Versuchsreihe nicht, kann davon ausgegangen werden, dass eine Sensibilisierung auf diesen Stimulus nicht vorliegt.

2. Ergebnisse

2.1 Anteil der hitzesensitiven Neurone in Abhängigkeit von der Dauer in Zellkultur und von der Protonenkonzentration des Mediums

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil hitzesensitiver Kückenneurone innerhalb der ersten 3 Tage unter Kulturbedingungen erhöht. Dieses wurde für eine Temperatur von 44°C gezeigt und bestätigt vorliegende Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe für den physiologischen pH Wert von 7,4 (Wach et al., 2003). Der Anstieg des prozentualen Anteils hitzesensitiver Kückenneurone mit der Zeit unter Kulturbedingungen steht im Gegensatz zum Verlauf bei Neuronen von Ratten. Bei Spinalganglienneuronen von Ratten bleibt der Anteil positiver Neurone über 6 Tage annähernd gleich (Wach et al., 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen Ratte und Kücken ist, dass bei der Ratte der Ausgangswert unter gleichen Kulturbedingungen und gleichen

Stimulusbedingungen höher ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass diese Hochregulation des Hitzerezeptors unabhängig von der Protonenkonzentration ist. In den vorliegenden Versuchen wurden Protonenkonzentrationen von pH 7,4 bis pH 5,8 verwendet. Protonenkonzentrationen von pH 7,4 entsprechen physiologischen Bedingungen. Höhere Konzentrationen entsprechen pathologischen Bedingungen und spielen neben anderen Entzündungsmediatoren eine Schlüsselrolle bei Schmerzzuständen. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration wurden zum Beispiel unter Bedingungen eines Krampfes, einer Hypoxie oder einer Entzündung gemessen. Untersuchungen dentogener Abszesse ergaben Protonenkonzentrationen von bis zu pH 6,2 (Wiese et al., 1999).

Neben der Erhöhung der Protonenkonzentration ist bei Entzündungszuständen auch der NGF Gehalt erhöht (Donnerer et al., 1992; Oddiah et al., 1998; Woolf et al., 1994). Bei der Ratte wird die Expression des hitzesensitiven TRPV1 durch NGF reguliert. Unter Bedingungen, bei denen der NGF Gehalt reduziert ist, verringert sich der Anteil der Neurone, die TRPV1 exprimieren. Damit einhergehend ist eine Abnahme der Hitze- und Capsaicinsensitivität (Winter, 1988; Wach et al., 2003). Unter *in vivo* Bedingungen ist dies der Fall z.B. bei Kompression oder Durchtrennung eines peripheren Nerven (Wach et al., 2003; Wendland et al., 2003). Aufgrund dieser Befunde wurde als mögliche Ursache für den Anstieg des Anteils hitzesensitiver Neurone beim Küken bereits der Einfluss von NGF untersucht und kein Zusammenhang festgestellt (Wach et al. 2003).

2.2 Anteil hitzesensitiver Neurone in Abhängigkeit von der Stimulustemperatur und von der Protonenkonzentration des Mediums

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Raumtemperatur mit steigender Protonenkonzentration der Anteil der gefärbten Neurone zunimmt. Bei pH 7,4 waren es 3,3%, bei pH 5,8 betrug der Anteil 35,0%. Vergleicht man den Effekt von Protonen bei Raumtemperatur mit dem bei 37°C (Körpertemperatur, Kulturtemperatur) (Abb. 15 und 16) so zeigt sich, dass die Kurve nach links verschoben ist, d.h. niedrigere Protonenkonzentrationen bewirken bereits einen Anstieg des Anteils positiver Neurone. Der größte Effekt war zwischen pH 6,6 und pH 6,2 zu beachten. Bei 40°C war der größte Anstieg zwischen pH 6,2 und pH 5,8. Bei 44°C war zu beobachten, dass der Anstieg des Anteils hitzesensitiver Neurons, also die Sensibilisierung der Hitzesensitivität durch Protonen, nicht

mehr ausgeprägt war.

Die Rekrutierung von positiven Neuronen mit zunehmender Steigerung von Temperatur und Protonen stehen im Einklang mit Daten von Rattenneuronen in der Literatur (Tominaga et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit an Kükenneuronen konnte dieses aber nur für Temperaturen bis 40°C beobachtet werden. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist auf der Basis vorliegender Experimente nicht eindeutig möglich, da Subpopulationen von Nozizeptoren verschiedene hitze- und protonensensitive Membranrezeptoren exprimieren und diese zum Teil durch beide Reize aktiviert und moduliert werden. So verfügen Spinalganglienneurone (i) über den temperatursensitiven niederschweligen TRPV1 und hochschweligen TRPV2 Kanal (Clapham et al., 2001) und (ii) über protonensensitive Kanäle, als ASIC`s bezeichnet (Waldmann et al., 1997). Weiterhin wurde (iii) eine Sensibilisierung des hitzesensitiven Kanals TRPV1 durch Protonen bei der Ratte beschrieben (Petersen und LaMotte, 1993). Bei einem pH-Wert von 7,4 liegt die Schwelle für den TRPV1 bei 43°C; diese Schwelle sinkt aber im sauren Umgebungsmilieu (s. Rev. Caterina und Julius, 2001). Das bedeutet, dass der Anstieg, den man bei 37°C und 40°C sieht, möglicherweise ein Resultat der Sensibilisierung des Hitzerezeptors ist. Die Tatsache, dass man bei 44°C, also bei einem überschwelligen Wert für den TRPV1, diese Sensibilisierung nicht mehr beobachtet, könnte ihren Grund darin haben, dass die TRPV1 Kanäle unter diesen Bedingungen durch Protonen blockiert sind. Die protonensensitiven ASIC`s Kanäle sind aktivierbar bei Schwellenkonzentrationen die höher liegen als für die Sensibilisierung TRPV1. Eine Beteiligung der ASIC`s an der Hitzeantwort bei erhöhten Protonenkonzentrationen ist also möglich und müsste für eine Interpretation der Ergebnisse weiter spezifisch untersucht werden.

2.3 Beteiligung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle

Spinalganglienneurone von Küken exprimieren spannungsgesteuerte Kalziumkanäle vom T- und L-Typ (Carbone und Lux, 1987; Petersen und LaMotte, 1991). Da in der vorliegenden Arbeit hitzesensitive Neurone über einen Cobalteinstrom nachgewiesen werden, musste ausgeschlossen werden, dass Cobaltionen nicht auch durch Kalziumkanäle in die Zelle gelangen und damit ein falsch positives Ergebnis ergeben würden. Die Ergebnisse zeigen, dass Nickelchlorid, ein Antagonist spannungsgesteuerter Kalziumkanäle vom T-Typ, und die organische Verbindung Verapamil, ein Antagonist der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle vom L-Typ (Fox et al., 1987;

Mintz et al., 1992), keine Reduzierung des Anteils hitzesensitiver Somata hervorrufen, also nicht am Cobalteinstrom beteiligt sind. Die eingesetzte Konzentration von jeweils 100 μM ist pharmakologisch betrachtet ausreichend hoch. Für Verapamil wurde gezeigt, dass es bereits in Konzentrationen von 10 μM die Kalziumkanäle von embryonalen sensorischen Neuronen blockiert (Ai et al., 1998). Für Nickelionen wurde gezeigt, dass diese Kalziumkanäle in sensorischen Neuronen bei einer Konzentration von 100 μM blockieren (Gotoh und Takahashi, 1999).

2.4 Patch-clamp Untersuchungen

Mit Hilfe der Patch-clamp Technik konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Amplitude des hitzeinduzierten Einwärtsstromes abhängig von der Reiztemperatur ist. Dieses ist ähnlich wie bei Rattenneuronen (Tominaga et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es bei einer wiederholten Applikation von noxischen thermischen Reizen nicht zu einer Desensibilisierung der Antwort kommt. Eine Tachyphylaxie wie bei Stimulation mit Capsaicin an Spinalganglienneuronen der Ratte (Petersen und LaMotte, 1993) liegt also bei Stimulation mit Protonen nicht vor. Vergleichbar zu Rattenneuronen verhält sich der TRPV1 der Küken bezüglich der Sensibilisierung der Hitzeantwort durch Protonen. So führt im Vergleich zu einem Hitzereiz mit physiologischer Protonenkonzentration Applikation einer sauren Lösung mit einem vergleichbar hohen Hitzereiz zu einer deutlichen Erhöhung der Amplitude.

Die Versuche bei denen die Somata mit Protonen bei Raumtemperatur stimuliert wurden zeigten, dass auch in Kükenneuronen unterschiedliche protonensensitive Kanäle exprimiert werden. So können bei einer langsamen Superfusion der Somata mit saurem Medium der schnell desensibilisierende protonensensitive Na^+ -selektive Ionenkanal aktiviert werden wie auch der nicht desensibilisierende protonensensitive Kanal (s. Abb. 21). Beide wurden in Rattenneuronen beschrieben (Kristhal und Pidoplichko, 1980; Konnerth et al., 1987; Bevan und Geppetti, 1994; Bevan und Yeats 1991).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aus vorherigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass der TRPV1 Hitzerezeptor im Vogel sich vom TRPV1 der Säugetiere hinsichtlich der Capsaicinsensitivität und der Regulation der Expression durch NGF unterscheidet. Unterschiede in den Eigenschaften zwischen beiden Hitzerezeptorsubtypen könnten Rückschlüsse auf funktionelle Strukturen des Säugetier TRPV1 erlauben. In der vorliegenden Arbeit war die übergreifende Fragestellung, ob sich beide Hitzerezeptorsubtypen auch hinsichtlich ihrer Protonensensitivität unterscheiden.

Für die Untersuchungen wurden Spinalganglienneurone von Küken isoliert und kultiviert. Mit Hilfe der Cobalt-uptake Methode wurde der Anteil der Neurone bestimmt, die funktionell den Hitzerezeptor TRPV1 exprimieren. Diese Experimente wurden nach 1, 2 und 3 Tagen unter Kulturbedingungen durchgeführt, um eine mögliche Veränderung mit der Zeit zu erfassen. Weiterhin wurde untersucht, ob durch Protonen der Anteil hitzesensitiver Neurone beeinflusst wird. Hierfür wurden die Somata nach einem Tag unter Kulturbedingungen in Kombination von Hitze und Protonen stimuliert. Um eine Sensibilisierung der Hitzeantwort durch Protonen in einzelnen Neuronen zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Patch-clamp Technik in der whole-cell Konfiguration die Amplitude von Hitze- und protoneninduzierten Gesamteinwärtsströmen untersucht.

Zunächst wurde mit der Cobalt-uptake Methode untersucht, ob der Anteil hitzesensitiver Neurone durch Protonen von der Zeit unter Kulturbedingungen beeinflusst wird. Bei einer Temperatur von 44°C stieg der Prozentsatz hitzesensitiver Neurone innerhalb der ersten 3 Tage unter Kulturbedingungen an, unabhängig von der Protonenkonzentration (pH 7,4, pH 6,6 und pH 5,8). Die nächste Frage war, wie hoch der Anteil protonensensitiver Neurone bei Raumtemperatur ist. Hierfür wurden die Zellen nach einem Tag in Zellkultur mit einem Medium von pH 7,4, pH 6,6, pH 6,2 oder pH 5,8 stimuliert. Es zeigte sich ein Anstieg von 3,3% ± 0,5% bei pH 7,4 auf 35,0% ± 4,0% bei pH 5,8. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob dieser Anstieg temperaturabhängig ist. Hierfür wurden entsprechende Experimente bei 37°C, 40°C und 44°C nach einem Tag unter Kulturbedingungen durchgeführt. Im Vergleich war bei 37°C der Anteil positiver Neurone bereits bei pH 6,2 so hoch wie bei Raumtemperatur bei pH 5,8. Mit weiter zunehmender Temperatur verringerte sich jedoch der Anteil

positiver Neurone mit steigendem pH. So war bei 44°C und pH 5,8 nur noch ein geringer Anstieg zu verzeichnen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der Patch-clamp Technik hitze- und protoneninduzierte Einwärtsströme gemessen. Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Amplitude des hitzeinduzierten Einwärtsstroms temperaturabhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Amplitude des hitzeinduzierten Einwärtsstroms bei einem Medium von pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 deutlich ansteigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Kücken TRPV1 ähnlich wie der der Säugetiere durch Protonen in Konzentrationen, die im entzündlichen Gewebe vorkommen, sensibilisiert werden kann. Es kommt sowohl zu einer Rekrutierung von weiteren hitzesensitiven Neuronen also auch zu einer verstärkten Antwort bereits hitzesensitiver Neurone.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Ai, X., MacPhedran, S.E., Hall, A.K. (1998). Depolarization stimulates initial calcitonin gene-related peptide expression by embryonic sensory neurons in vitro. *J Neurosci*, **18**, 9294-9302.

Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (Hrsg.) (2002). Benninghoff Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. Urban&Schwarzenberg, München.

Bevan, S., Szolcsanyi, J. (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 330-333.

Bevan, S., Yeats, J. (1991). Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, **433**, 145-61.

Bevan, S. Geppetti, P. (1994). Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci*, **17**, 509-512.

Brannstrom, M., Linden, L.A., Astrom, A. (1967). The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res*, **1(4)**, 310-7.

Carbone, E., Lux, H.D. (1987). Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J Physiol*, **386**, 571-601.

Caterina, M.J., Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 487-517. Review.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436-441.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.

Chaudhary, P., Martenson, M.E., Baumann, T.K. (2001). Vanilloid receptor expression and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. *J Dent Res*, **80**, 1518-1523.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*, **411**, 957-962.

Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, **2(6)**, 387-96. Review.

Cortright, D.N., Crandall, M., Sanchez, J.F., Zou, T., Krause, J.E., White, G. (2001). The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 1183-1189.

Dittert, I., Vlachova, V., Knotkova, H., Vitaskova, Z., Vyklicky, L., Kress, M., Reeh, P.W. (1998). A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods*, **82**, 195-201.

Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C. (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience*, **49(3)**, 693-8.

Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W. (1987). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol*, **394**, 173-200.

Gotoh, H., Takahashi, A. (1999). Mechanical stimuli induce intracellular calcium response in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, **92**, 1323-1329.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391(2)**, 85-100.

Harteneck, C., Plant, T.D., Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*, **23(4)**, 159-66. Review.

Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., Barton, A.J., Medhurst, A.D., Smith, G.D., Topp, S., Murdock, P., Sanger, G.J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C.D., Randall, A.D., Gloger, I.S., Davis, J.B. (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, **88**, 205-215.

Hogan, P.G. (1983). Expression of markers for pain sensory neurons in cell culture. PhD dissertation, Harvard University, Cambridge, MA, USA.

Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8134-8139.

Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol*, **1(3)**, 165-70.

Konnerth, A., Lux, H.D., Morad, M. (1987). Proton-induced transformation of calcium channel in chick dorsal root ganglion cells. *J Physiol Lond*, **386**, 603-633.

Kristhal, O.A., Pidoplichko, V.I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience*, **5**, 2325-2327.

Kwak, J., Wang, M.H., Hwang, S.W., Kim, T.Y., Lee, S.Y., Oh, U. (2000). Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J Neurosci*, **15**, 20(22):8298-304.

Lässig, H.E., Müller, R.A. (1983). Die Zahnheilkunde in Kunst- und Kulturgeschichte. DuMont Reiseverlag, Ostfildern.

Lopshire, J.C., Nicol, G.D. (1998). The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci*, **15**, 18(16):6081-92.

Marin-Burgin, A., Reppenhagen, S., Klusch, A., Wendland, J.R., Petersen, M. (2000). Low-threshold heat response antagonized by capsazepine in chick sensory neurons, which are capsaicin-insensitive. *Eur J Neurosci*, **12(10)**, 3560-6.

Merskey, H. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*, **6**, 249-252.

Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, **9(1)**, 85-95.

Neher, E., Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **29**, 260(5554):799-802.

Numberger, M., Draguhn, A. (1996). Patch-clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Oddiah, D., Anand, P., McMahon, S.B., Rattray, M. (1998). Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. *Neuroreport*, **11**, 9(7):1455-8.

Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. (2002). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, **14**, 296(5575):2046-9.

Petersen, M., Klusch, A., Eckert, A. (1998). The proportion of isolated rat dorsal root ganglion neurones responding to bradykinin increases with time in culture.

Neurosci Lett, **14**, 252(2):143-6.

Petersen, M., LaMotte, R.H. (1991). Relationships between capsaicin sensitivity of mammalian sensory neurons, cell size and type of voltage gated Ca-currents. *Brain Res*, **561**(1), 20-6.

Petersen, M., LaMotte, R.H. (1993). Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells. *Pain*, **54**, 37-42.

Petersen, M., LaMotte, R.H., Klusch, A., Kniffki, K.D. (1996). Multiple capsaicin-evoked currents in isolated rat sensory neurons. *Neuroscience*, **75**, 495-505.

Sann, H., Harti, G., Pierau, F.K., Simon, E. (1987). Effect of capsaicin upon afferent and efferent mechanisms of nociception and temperature regulation in birds. *Can J Physiol Pharmacol*, **65**(6), 1347-54.

Schmidt, R.F., Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*. 26. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York.

Shu, X., Mendell, L.M. (1999). Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci Lett*, **29**, 274(3):159-62.

Szolcsanyi, J., Jancso-Gabor, A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung*, **25**(12), 1877-81.

Szolcsanyi, J., Sann, H., Pierau, F.K. (1986). Nociception in pigeons is not impaired by capsaicin. *Pain*, **27**, 247-260.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **21**, 531-543.

Tominaga, M., Wada, M., Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **5**, 98(12):6951-6.

Vyklicky, L., Knotkova-Urbancova, H. (1996). Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res.*, **45**(1), 1-9. Review.

Wach, J., Marin-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**(3), 513-9.

Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*, **22**, 272(34):20975-8.

Wendland, J.R., Schmidt, K.H., 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)**, 1-6.

Wiese, K.G., Merten, H.A., Wiltfang, J., Luhr, H.G. (1999). Klinische Untersuchungen zur Pathophysiologie dentogen bedingter Abszesse. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **3(5)**, 242-6. Review.

Winter, J. (1987). Characterization of capsaicin-sensitive neurones in adult rat dorsal root ganglion cultures. *Neurosci Lett*, **80**, 134-140.

Winter, J., Forbes, C.A., Sternberg, J., Lindsay, R.M. (1988). Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron*, **1**, 973-981.

Woolf, C.J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q.P., Crilly, P., Winter, J. (1994). Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*, **62(2)**, 327-31.

G. ANHANG

Auf den folgenden Seiten sind Unterlagen zur Erstellung der Ergebnisse sowie Ergebnisse einzelner Teiluntersuchungen dargestellt.

Ergebnisse zum Teilversuch:
Protonensensitivität in Abhängigkeit zur Kulturdauer
Küken; 44°C; pH 5,8-7,4; F12+NGF

Dateiname	pH-Wert	Zeit	gefärbte Neurone
a2302-2	7,4	1d	8%
a2702-a	7,4	1d	9%
a0103-h	7,4	1d	16%
a1203-i	7,4	1d	10%
a2603-f	7,4	1d	7%
a0103-f	7,4	2d	18%
a1203-h	7,4	2d	22%
a1503-g	7,4	2d	26%
a2603-d	7,4	2d	23%
a0103-c	7,4	3d	30%
a1303-d	7,4	3d	30%
a1503-b	7,4	3d	27%
a1903-b	7,4	3d	30%
a2603-g	7,4	3d	35%
a2302-1	6,6	1d	13%
a2702-e	6,6	1d	12%
a0103-e	6,6	1d	18%
a1203-a	6,6	1d	17%
a2603-b	6,6	1d	5%
a2702-c	6,6	2d	21%
a0103-b	6,6	2d	23%
a1203-f	6,6	2d	16%
a1503-i	6,6	2d	26%
a2603-a	6,6	2d	24%
a0103-d	6,6	3d	23%
a1203-c	6,6	3d	31%
a1503-d	6,6	3d	33%
a2603-c	6,6	3d	39%
a2302-3	5,8	1d	8%
a2702-b	5,8	1d	14%
a0103-i	5,8	1d	20%
a1203-e	5,8	1d	24%
a2603-h	5,8	1d	14%
a0103-g	5,8	2d	23%
a1203-b	5,8	2d	24%
a1503-a	5,8	2d	29%
a2603-i	5,8	2d	29%
a0103-a	5,8	3d	24%
a1203-g	5,8	3d	34%
a1903-a	5,8	3d	30%
a2603-e	5,8	3d	41%

Ergebnisse zum Teilversuch:

Protonensensitivität in Abhängigkeit zur Temperatur

Küken; Raumtemperatur (RT); pH 5,8-7,4; F12+NGF

Dateiname	pH-Wert	Temperatur	gefärbte Neurone
a0505-f	7,4	RT	2%
a0905-a	7,4	RT	3%
a2805-b	7,4	RT	4%
a0206-i	7,4	RT	4%
a0505-e	6,6	RT	10%
a0905-c	6,6	RT	6%
a2805-i	6,6	RT	11%
a0206-e	6,6	RT	4%
a0706-b	6,2	RT	11%
a1806-e	6,2	RT	9%
1906-b	6,2	RT	22%
a2006-a	6,2	RT	22%
a0505-b	5,8	RT	41%
a0905-b	5,8	RT	22%
a2805-e	5,8	RT	32%
a0206-b	5,8	RT	45%
a0706-f	5,8	RT	35%

Ergebnisse zum Teilversuch:
Protonensensitivität in Abhängigkeit zur Temperatur
Küken; 37°C-44°C; pH 5,8-7,4; F12+NGF

Dateiname	pH-Wert	Temperatur	gefärbte Neurone
a0505-d	7,4	37°C	2%
a1505-a	7,4	37°C	5%
a0206-a	7,4	37°C	8%
a0706-c	7,4	37°C	4%
a0505-c	6,6	37°C	15%
a1505-b	6,6	37°C	9%
a2805-d	6,6	37°C	14%
a0206-d	6,6	37°C	13%
a0706-a	6,2	37°C	38%
1906-a	6,2	37°C	34%
a2006-d	6,2	37°C	25%
x2706-b	6,2	37°C	40%
a0505-a	5,8	37°C	48%
a1505-e	5,8	37°C	37%
a2805-h	5,8	37°C	31%
a0206-h	5,8	37°C	41%
a2406-b	7,4	40°C	12%
a3006-a	7,4	40°C	9%
a0507-c	7,4	40°C	8%
x2706-a	6,6	40°C	14%
a3006-d	6,6	40°C	15%
a0507-a	6,6	40°C	18%
x2706-c	6,2	40°C	18%
a3006-c	6,2	40°C	17%
a0507-d	6,2	40°C	16%
a2406-a	5,8	40°C	26%
a3006-b	5,8	40°C	42%
a0507-b	5,8	40°C	23%
a1505-c	7,4	44°C	4%
a2805-f	7,4	44°C	4%
a0206-g	7,4	44°C	7%
a1505-d	6,6	44°C	7%
a2805-g	6,6	44°C	14%
a0206-c	6,6	44°C	12%
a0706-d	6,6	44°C	13%
a1806-f	6,2	44°C	11%
a1906-f	6,2	44°C	15%
a2006-b	6,2	44°C	14%
a1505-f	5,8	44°C	12%
a2805-c	5,8	44°C	15%
a0206-f	5,8	44°C	15%

Hitzestimulation kultivierter Neurone

Ligatur	Datum:	Art:	Stelle:
	Zeitraum:	Gewicht:	Nakoren:
Entnahme	Datum:	Gewicht:	Nakoren:
	Eingangsnr.:	Ausgangsnr.:	
Zellkultur	Zeit in Collagenase:	Zeit in Trypsin:	Zeit in Zellkultur:
	Ganglien/Ansatz:	Medium:	
Besonderheiten			

Datum der Hitzestimulation:

1. Waschen mit Assay-Puffer (37°C) 2 x dippen, danach 2 Min.
2. Hitzestimulation in CoCl_2
 Temperatur (Lufttemp. vorne im Brutschrank) _____ Zeit _____
3. Waschen mit Assay-Puffer 2 x dippen, danach 2 Min.
4. Ammoniumsulfid 2 Min.
5. Waschen mit PBS 2 x dippen, danach 2 Min.
6. Trypan-Blau 0,1% 10 Min.
7. Waschen mit PBS 3 x dippen
8. Fixieren mit 4% Paraformaldehyd 15 Min.
9. Waschen mit PBS 2 x dippen, danach 2 Min.
10. Waschen mit ddH_2O 2 x dippen, danach 2 Min.
11. Eindeckeln mit DABCO

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. M. Petersen für die Bereitstellung des interessanten Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen, die wertvollen Ratschläge beim Schreiben des Manuskripts und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn A. Klusch danke ich für die technische Unterstützung insbesondere für die hervorragende Einarbeitung in die Patch-clamp Technik, Literaturrecherche und Datenverarbeitung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau T. Martini für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ein besonderer Dank gilt den Doktorandinnen und Doktoranden Sabine Engert, Stefan Reppenhagen, Julia Wach und Jens Wendland für die kooperative und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Für die Unterstützung bei sämtlichen computertechnischen Fragen möchte ich mich bei Marco Gaida, Tobias Witzel und Frank Plechschmidt bedanken.

Bei Carsten Viefeld möchte ich mich für die langjährige Freundschaft und die Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern widmen, die mir meine akademische Ausbildung ermöglicht haben und mich stets mit Rat und Tat unterstützten.

Schließlich danke ich ganz herzlich Eva Hild, die mir stets mit Ihrer unendlichen Geduld zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Schmalfuß
Vorname: Andreas
Wohnort: 95168 Marktleuthen, Martin-Luther Str. 27
Geburtsdatum: 14. Dezember 1976
Geburtsort: Marktredwitz
Familienstand: ledig

Schule: 1983 - 1987 Grundschule Marktleuthen
1987 - 1988 Hauptschule Marktleuthen
1988 - 1997 Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
Abitur im Juni 1997

Studium: Okt. 1997 Immatrikulation an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg für das Fach
Zahnmedizin
Okt. 1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Okt. 2000 Zahnärztliche Vorprüfung
Jun. 2003 Zahnärztliche Prüfung

Beruf: 01.11.03 - 31.01.04
Ausbildungsassistent bei Dr. E. Schmalfuß, Marktleuthen
02.02.04 - 23.04.04
Norwegisch Sprachkurs an der Berlitz-Sprachschule Berlin
seit 02.05.04
Zahnarzt der „Tannklinikk Båtsfjord“, Båtsfjord; Norwegen

Famulaturen: 19.02.02 - 28.03.02
Famulatur in einer Behandlungsstation des Zahnärztlichen
Hilfsprojekts Brasilien e.V., Porto de Galhinas, Brasilien
12.09.03 - 28.11.03
Famulatur in einer Behandlungsstation des Zahnärztlichen
Hilfsprojekts Brasilien e.V., Recife, Brasilien

Båtsfjord, den 08.09.2006

