

Aus dem Institut für Physiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Andreas Karschin

Über den Zusammenhang von Galaninexpression und
Capsaicinempfindlichkeit in Spinalganglionneuronen von Ratten mit
experimentellen Nervenverletzungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Jens Robert Wendland

aus Bremen

Würzburg, Juni 2003

Referentin: Professor Dr. rer. nat. Marlen Petersen

Korreferentin: apl. Professor Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2003

Der Promovend ist Arzt.

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1	EINLEITUNG	1
1.1	Neuropathischer Schmerz	1
1.2	Capsaicin und sein Rezeptor	3
1.3	Galanin und seine Rezeptoren	5
1.4	Die neurotrophen Wachstumsfaktoren „nerve growth factor“, „glial cell line-derived neurotrophic factor“ und „leukemia inhibitory factor“	8
1.5	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Nervenligatur	13
2.3	Entnahme der Spinalganglien	15
2.4	Zellkultur	16
2.5	Zytochemische Färbungen	17
2.6	Mikroskopie, quantitative Auswertung und Statistik	20
3	ERGEBNISSE	22
3.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung für Capsaicin	22
3.2	Neurone unverletzter Ratten in Kurzzeitkultur	23
3.3	Neurone von Ratten mit experimenteller Axotomie	27

3.4	Neurone von Ratten mit experimenteller „chronic constriction injury“	33
3.5	Neurone unverletzter Ratten in Langzeitkultur ohne Wachstumsfaktoren	36
3.6	Neurone unverletzter Ratten in Langzeitkultur mit Wachstumsfaktoren	39
4	DISKUSSION	42
4.1	Die Kobaltaufnahmemethode dient dem funktionellen Nachweis von Capsaicinempfindlichkeit	42
4.2	Die Capsaicinempfindlichkeit sinkt nach Axotomie und in Kultur aufgrund eines Mangels an neurotrophen Faktoren	43
4.3	Galanin unterliegt ebenfalls dem Einfluß neurotropher Faktoren, wird jedoch nach Axotomie und in Kultur hochreguliert	44
4.4	Eine „chronic constriction injury“ verändert weder Capsaicinempfindlichkeit noch Galaninexpression	45
4.5	Die Kollokalisationsuntersuchungen lassen auf einen Zusammenhang zwischen Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression schließen	45
4.6	Schlußfolgerungen und Ausblick	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	51

1 EINLEITUNG

1.1 Neuropathischer Schmerz

Bei der Erforschung peripherer neurobiologischer Grundlagen des Phänomens Schmerz grenzt man die physiologische Nozizeption von pathophysiologischen Zuständen der Nozizeption ab. Die physiologische Nozizeption vermittelt dem Organismus im Zusammenhang mit dem unangenehmen Sinneserlebnis Schmerz Informationen über eingetretene oder drohende Gewebeschädigung (Merskey und Bogduk, 1994). Unter den pathophysiologischen Zuständen versteht man neben dem Entzündungsschmerz vor allem den sogenannten neuropathischen Schmerz (Abb. 1.1). Während der Entzündungsschmerz als ein durch Mediatoren wie z. B. Prostaglandine bewirkter überempfindlicher Zustand der physiologischen Nozizeption verstanden werden kann, ist der neuropathische Schmerz insofern prinzipiell andersartig, als dabei das Neuron selbst primär krankhaft verändert ist (Merskey und Bogduk, 1994). Diese Andersartigkeit spiegelt sich in den klinischen Charakteristika neuropathischer Schmerzsyndrome ebenso wider wie in den therapeutischen Strategien zur Behandlung solcher Schmerzen.

Typische Beispiele für neuropathische Schmerzen sind die postherpetische Neuralgie, die Trigeminusneuralgie, die diabetische Polyneuropathie und das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS), unter welchem die obsoleten Begriffe Kausalgie und sympathische Reflexdystrophie bzw. Sudeck-Syndrom subsumiert werden. Die Mechanismen, die zu einer Schädigung von Neuronen und konsekutiv zu neuropathischen Schmerzen führen, sind vielfältig und im einzelnen nicht alle geklärt. Der gemeinsame Pathomechanismus besteht in einer Generierung von Aktionspotentialen an abnormen Stellen des Neurons in Form von ektopen Entladungen oder durch inadäquate Reize (Wall und Gutnick, 1974). Tierexperimente haben gezeigt, daß diese ektopen Entladungen spontan auftreten und durch Nervenkompression oder durch Neurome, die sich als Regenerationsknötchen nach Nervendurchtrennung bilden, verursacht werden können (Xie *et al.*, 1993; Amir und Devor, 1993; Koltzenburg *et al.*, 1994; Tal und Eliav, 1996; Chen und Devor, 1998).

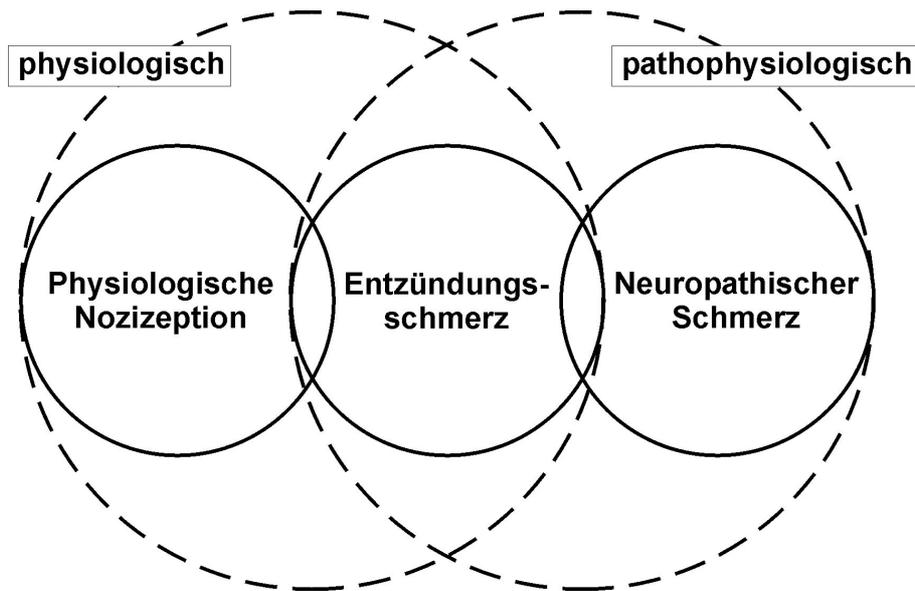


Abbildung 1.1. Einteilung der verschiedenen Formen der Nozizeption anhand unterschiedlicher neurobiologischer Mechanismen. Nach Devor und Seltzer (Devor und Seltzer, 1999).

Neuropathische Schmerzen sind mit für Patienten sehr unangenehmen Sensibilitätsstörungen assoziiert, etwa Hyper- oder Hypästhesie, Dysästhesie, mechanische oder thermische Hyperalgesie und Allodynie. Der Charakter neuropathischer Schmerzen ist sehr uneinheitlich und wird von Patienten meist als brennend, schneidend oder elektrisierend beschrieben (Bader und Gallacchi, 2001). Es gibt sowohl chronische als auch paroxysmale Formen neuropathischer Schmerzen, ferner ist eine Unterteilung in fokale und generalisierte neuropathische Schmerzen üblich.

Die klassischen Medikamente zur Behandlung von Schmerzen, Cyclooxygenasehemmer und Opioide, sind bei der neuropathischen Form nur selten ausreichend wirksam. So muß meistens auf sogenannte Koanalgetika, deren schmerzlindernde Wirkweise unklar ist, zurückgegriffen werden. Die wichtigsten Substanzen hierbei sind das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin in subthymoleptischer Dosierung bei chronischen neuropathischen Schmerzen und die Antikonvulsiva Carbamazepin, Gabapentin und Phenytoin bei paroxysmalen neuropathischen Schmerzen. Allerdings kann selbst bei kombiniertem Einsatz dieser nebenwirkungsreichen Koanalgetika längst nicht jeder Patient ausreichend analgetisch behandelt werden, und die Behandlung von neuro-

pathischen Schmerzen ist noch immer größtenteils empirisch und oft unbefriedigend (Fields und Basbaum, 1999). Eine bessere Kenntnis der Funktion von Nozizeptoren unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen könnte diese Situation verbessern; die vorliegende Arbeit möge einen Beitrag dazu leisten.

1.2 Capsaicin und sein Rezeptor

Eine wichtige Rolle in der Erforschung der Nozizeption spielen Capsaicin und sein Rezeptor. Capsaicin (N-Vanillyl-8-methyl-6-nonenamid) ist der scharf schmeckende Inhaltsstoff aus Paprikapflanzen der Gattung *Capsicum annum L.* Diese stark lipophile Substanz hat einen spezifischen Effekt auf Nozizeptoren, so daß mit ihrer Hilfe aus der heterogenen Menge von primär afferenten Neuronen im Spinalganglion selektiv diejenigen markiert werden können, die an der Nozizeption beteiligt sind (Szolcsányi, 1977). An solchen Neuronen bewirkt Capsaicin die direkte Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals. Unter physiologischen Bedingungen strömen dann Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ in das Neuron hinein und K^+ aus ihm hinaus (Marsh *et al.*, 1987; Winter, 1987; Wood *et al.*, 1988; Bevan und Szolcsányi, 1990). In höheren Dosierungen und bei langfristiger Verabreichung werden Neurone durch Capsaicin funktionell desensibilisiert (Winter *et al.*, 1995; Szallasi und Blumberg, 1996). Dies macht man sich in der Behandlung chronischer Schmerzsyndrome zunutze (Watson 1994; Übersicht in Rains und Bryson, 1995). In extrem hoher Dosierung ist Capsaicin neurotoxisch: So führt die intravenöse Verabreichung von Capsaicin an neugeborenen Ratten zu einem spezifischen nekrotischen Untergang der Nozizeptoren, und in Zellkulturen bewirkt Capsaicin ab einer Konzentration im mikromolaren Bereich einen Untergang capsaicinempfindlicher Neurone durch osmotische Dysregulation und Aktivierung kalziumabhängiger Proteasen (Jancsó *et al.*, 1977; Jancsó *et al.*, 1978; Holzer *et al.*, 1979; Wood *et al.*, 1988; Chard *et al.*, 1995; Winter *et al.*, 1995).

Die selektive Wirkung von Capsaicin auf Nozizeptoren ist bedingt durch eine Bindung an einen spezifischen Rezeptor. Der Capsaicinrezeptor wurde durch Expressionsklonierung mit Hilfe einer cDNA-Datenbank von sensorischen Rattenneuronen entdeckt (Caterina *et al.*, 1997). Es stellte sich heraus, daß dieser Rezeptor nicht nur die Wirkung von Capsaicin vermittelt, sondern auch

durch noxische Hitzereize ab einem Schwellenwert von etwa 42°C und durch Protonen unterhalb eines pH-Werts von 5,9 aktiviert wird (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Dieser Capsaicinrezeptor wurde „vanilloid receptor subtype 1“ (VR1) genannt, da auch andere Vanilloide nebst Capsaicin an diesen Rezeptor binden (Helliwell *et al.*, 1998). Da der VR1 zu der Familie der „transient receptor potential (TRP) ion channels“ gehört, wird er auch TRPV1 genannt. Der Rezeptor ist ein 838 Aminosäuren langes Polypeptid mit sechs vorhergesagten Transmembrandomänen, welcher als Homotetramer in die Zytoplasmamembran eingebaut wird (Caterina *et al.*, 1997; Kedei *et al.*, 2001). Die Bindungsstelle für Capsaicin liegt intrazellulär an einem aromatischen Rest zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (Jung *et al.*, 1999; Jordt und Julius, 2002). Inzwischen sind weitere Rezeptoren postuliert oder kloniert worden, die durch noxische Hitzereize aktiviert werden; diese Rezeptoren sind jedoch allesamt capsaicinunempfindlich (Marín-Burgin *et al.*, 2000; Übersicht in Gunthorpe *et al.*, 2002).

Bei tierexperimentell induzierten neuropathischen und inflammatorischen Zuständen kommt es in den primären afferenten Neuronen zu einer Veränderung der Capsaicinempfindlichkeit. Nach einer Axotomie peripherer Nerven wird eine Abnahme der Capsaicinempfindlichkeit und der VR1 mRNA in den entsprechenden Neuronen beobachtet (Hu-Tsai *et al.*, 1996; Michael und Priestley, 1999). Bei einer Entzündung hingegen erhöht sich der Anteil VR1-positiver Neurone in den entsprechenden Spinalganglien (Amaya *et al.*, 2003). Dies untermauert die Erkenntnis, die aus Mäusen ohne das VR1-Gen gewonnen wurde, daß dieser Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der entzündlichen thermischen Hyperalgesie spielt (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Die Regulierung der Expression von VR1 auf Transkriptionsebene und somit auch der Capsaicinempfindlichkeit geschieht durch bestimmte neurotrophe Wachstumsfaktoren wie z. B. „nerve growth factor“ (NGF) und „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF), auf diese wird im Abschnitt 1.4 näher eingegangen. Zusätzlich bewirkt NGF kurzfristig eine Erhöhung der Capsaicinempfindlichkeit, wie dies auch für Protonen, Prostaglandin E2, Bradykinin, Adenosintri-phosphat und den Tumornekrosefaktor α gezeigt wurde (Petersen und LaMotte, 1993; Nicol *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998; Shu und Mendell, 1999; Premkumar und Ahern, 2000; Tominaga *et al.*, 2001; Kwong und Lee, 2002). Diese kurzfristige Modulation der Capsaicinempfindlichkeit wird intrazel-

lulär durch die α - und ε -Isoform der Proteinkinase C vermittelt (Premkumar und Ahern, 2000; Numazaki *et al.*, 2002; Olah *et al.*, 2002).

Während inzwischen eine Vielzahl von Faktoren bekannt ist, welche die Capsaicinempfindlichkeit regulieren, so gibt es über die funktionellen Charakteristika der Neurone, die ihre Capsaicinempfindlichkeit verlieren, nur wenige Erkenntnisse. Beispielsweise ist nicht klar, ob diese Neurone überhaupt noch eine Funktion als Nozizeptoren ausüben. Zudem mangelt es an einem Indikatormolekül oder Marker, mit dem ehemals capsaicinempfindliche Neurone nach Nervenverletzung identifiziert werden können. Als ein solcher Marker könnte sich das Neuropeptid Galanin herausstellen.

1.3 Galanin und seine Rezeptoren

Galanin ist ein Neuropeptid, dem vor allem unter pathophysiologischen Zuständen der Nozizeption eine wichtige Rolle beigemessen wird (Liu und Hökfelt, 2002). Es wurde 1983 im Schweinedarm entdeckt, und der Name dieses 29 Aminosäuren langen Oligopeptids – nur beim Menschen sind es 30 – leitet sich ab von der ersten Aminosäure, Glycin, üblicherweise mit G abgekürzt, und der letzten, Alanin (Tatemoto *et al.*, 1983). Galanin ist im autonomen, zentralen und peripheren Nervensystem von Ratten weit verbreitet und wird neben seiner Rolle in der Nozizeption in Zusammenhang gebracht mit Fressverhalten, Kognition, Sexualverhalten, dem Endokrinium und der embryonalen Entwicklung des Nervensystems (Marti *et al.*, 1987; Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1992; Bartfai *et al.*, 1993; Merchenthaler *et al.*, 1993; Crawley, 1996; Xu *et al.*, 1996 a; Bloch *et al.*, 1998; Ögren *et al.*, 1998). Wegen seiner potenten antikonvulsiven Eigenschaften werden zudem Galaninagonisten als mögliche Antiepileptika erforscht (Mazarati *et al.*, 1998; Kokaia *et al.*, 2001; Saar *et al.*, 2002).

Galanin vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren. Bislang sind drei Rezeptoren für Galanin kloniert, welche allesamt G-Protein-gekoppelt sind (Habert-Ortoli *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997 a, b; Iismaa und Shine, 1999; Branchek *et al.*, 2000). Eine Übersicht über die Galaninrezeptoren und ihre Transduktionsmechanismen zeigt Abbildung 1.2. Die Rezeptorsubtypen 1 und 3 bewirken eine Membranhypolarisation durch Öffnung eines K^+ -Kanals und eine Inhibition der Adenylat-Cyclase. Der Galaninrezeptor

vom Subtyp 2 inhibiert ebenfalls die Adenylat-Cyclase und stimuliert außerdem die Phospholipase C, wodurch nach intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung und erhöhtem Diacylglycerin wiederum die Proteinkinase C aktiviert wird (Abb. 1.2).

Im peripheren Nervensystem adulter Ratten wurde Galanin mit immunohistochemischen Methoden in weniger als 5% aller Neurone eines Spinalganglions und zusammen mit Glutamat, Substanz P und calcitonin gene-related peptide nachgewiesen. (Ch'ng *et al.*, 1985; Ju *et al.*, 1987). Dabei handelt es sich meist um kleine, peptiderge C-Faser Neurone (Hökfelt *et al.*, 1987; Villar *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1993). In Ultrastrukturanalysen durch elektronenmikroskopische Immunzytochemie wurde gezeigt, daß Galanin in etwa der Hälfte aller primär afferenten Nervenfasern vorkommt (Klein *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993). Galanin bindet postsynaptisch im zentralen Nervensystem an Hinterhornzwischenneurone in den Laminae I und II (Kar und Quirion, 1994; Zhang *et al.*, 1995 a, b), was dem Projektionsgebiet nozizeptiver Afferenzen entspricht (Swett und Woolf, 1985; Maslany *et al.*, 1992). In diesen Gebieten finden sich überwiegend Galaninrezeptoren vom Subtyp 1 und nur zu einem geringen Anteil die Rezeptorsubtypen 2 und 3 (Parker *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 1999; Waters und Krause 2000). An den Spinalganglionneuronen selbst wurden ebenfalls alle drei Rezeptorsubtypen nachgewiesen (O'Donnell *et al.*, 1999; Waters und Krause, 2000).

Nach einer Durchtrennung des *N. ischiadicus* von Ratten kommt es in den entsprechenden Spinalganglien zu einer starken Hochregulation von Galanin in etwa der Hälfte aller Neurone; dies geschieht in Neuronen aller Größen und ist bereits 24 h nach einer Axotomie nachweisbar (Hökfelt *et al.*, 1987; Villar *et al.*, 1989). Diese Hochregulation ist abhängig von der Unterbrechung des retrograden axonalen Transports und der Synthetisierung neurotropher Faktoren am Ort der Läsion; auf die einzelnen an dieser Regulation beteiligten Faktoren wird im Abschnitt 1.4 näher eingegangen. In den Hinterhornzwischenneuronen wird die Expression von Galanin durch Axotomie nicht beeinflusst (Zhang *et al.*, 1998; Hökfelt *et al.*, 1999). Auch die Expression von Galaninrezeptoren nach Axotomie in den Hinterhornzwischenneuronen bleibt unbeeinflusst, und in den Neuronen der Spinalganglien erfolgt lediglich eine geringe Herunterregulation der Rezeptorsubtypen 1 und 2 (Xu *et al.*, 1996 b; Shi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998; Hökfelt *et al.*, 1999). Eine Hochregulation von Galanin wurde nicht nur nach einer Axotomie nachgewiesen, sondern auch für die Tier-

modelle zur Erforschung des neuropathischen Schmerzes nach Bennett, Seltzer, Chung und Gazelius (Nahin *et al.*, 1994; Ma und Bisby, 1997; Shi *et al.*, 1999; Fukuoka *et al.*, 1998).

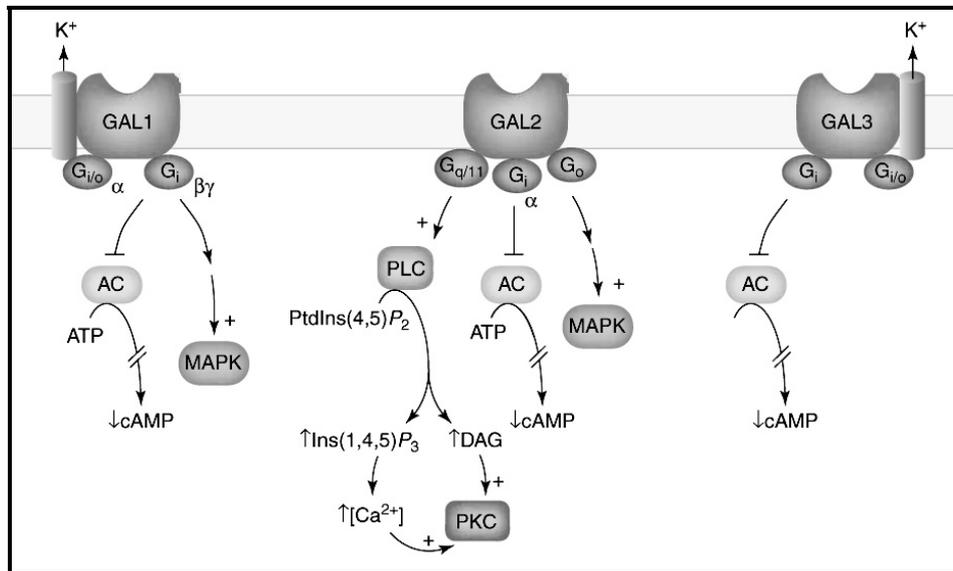


Abbildung 1.2. Galaninrezeptoren und ihre Transduktionsmechanismen. Alle drei Rezeptorsubtypen (GAL1 bis GAL3) sind gekoppelt an G-Proteine. Nähere Erläuterungen im Text. Abkürzungen: AC, Adenylat-Cyclase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; ATP, Adenosintri-phosphat; DAG, Diacylglycerol; Ins(1,4,5)P₃, Inositol-1,4,5-trisphosphat; MAPK, mitogenaktivierte Proteinkinase; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Modifiziert nach Liu und Hökfelt (Liu und Hökfelt, 2002).

In Ratten, die neonatal mit Capsaicin behandelt wurden, kommt es zu einem selektiven Untergang von C-Faser-Neuronen in den sensiblen Ganglien (Jancsó *et al.*, 1977; Holzer *et al.*, 1979). Unter solchen Bedingungen wurde beobachtet, daß die normalerweise vorhandene starke Hochregulation von Galanin im trigeminalen Ganglion nach intraventrikulärer Verabreichung von Colchicin stark vermindert ist (Skofitsch und Jacobowitz, 1985). Dieses Erkenntnis hat zu der Hypothese geführt, daß Galanin in Nozizeptoren nach einer Nervenverletzung hochreguliert wird (Skofitsch und Jacobowitz, 1985; Holmes *et al.*, 2000), und dabei wird impliziert, daß es sich um capsaicinempfindliche Neu-

rone handelt. Jedoch wurde bis heute keine gleichzeitige Untersuchung von Galaninexpression und Capsaicinempfindlichkeit oder VR1-Expression durchgeführt.

Durch die Generierung von Mäusen mit gezielter Ausschaltung des Galaninens bzw. des Gens für die Rezeptorsubtypen 1 und 2 konnte die Funktion von Galanin unter physiologischen und pathophysiologischen Umständen eingehender untersucht werden (Holmes *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2000; Blakeman *et al.*, 2003; Mahoney *et al.*, 2003). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man davon aus, daß Galanin zwar unter physiologischen Umständen für die Nozizeption nur eine untergeordnete Rolle spielt; jedoch nach Nervenverletzung durch Hochregulation und vermehrte postsynaptische Bindung an den inhibitorischen Galaninrezeptor vom Subtyp 1 in exzitatorischen, glutamatergen Hinterhornzwischenneuronen stark antinozizeptiv wirkt (Liu und Hökfelt, 2002). Auch eine Mitwirkung Galanins in Verbindung mit dem Rezeptorsubtyp 2 an der Regeneration von Neuronen nach Nervenverletzungen wird diskutiert (Holmes *et al.*, 2000; Mahoney *et al.*, 2003).

Bis heute ist nicht klar, durch welche Stimuli Galanin ausgeschüttet wird. Die Daten von Mäusen ohne das Galanin deuten zwar darauf hin, daß es sich bei galaninergen Neuronen um Nozizeptoren handeln könnte, jedoch herrscht Ungewißheit über die genaue Funktion derjenigen Neurone, die Galanin synthetisieren, und über die Art und Weise seiner Freisetzung (Holmes *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2000).

1.4 Die neurotrophen Wachstumsfaktoren „nerve growth factor“, „glial cell line-derived neurotrophic factor“ und „leukemia inhibitory factor“

Unter neurotrophen Wachstumsfaktoren versteht man solche endogenen Substanzen, die die Entwicklung, das langfristige Überleben oder die differenzierte Funktion einer bestimmten Population von Neuronen beeinflussen (McMahon und Bennett, 1999). So ist beispielsweise die Expression von Galanin oder VR1 an das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter neurotropher Wachstumsfaktoren gebunden. Diese Faktoren werden vom innervierten Zielgewebe oder auch von Schwann-Zellen sezerniert und binden an spezifische Rezeptoren der Fort-

sätze von Neuronen. Anschließend werden sie als internalisierter Rezeptor-Liganden-Komplex über den retrograden axoplasmalen Transport zum Perikaryon geführt, wo sie den Zellphänotyp beeinflussen (Landreth, 1999). Mit dieser als „neurotrophen Hypothese“ bekannten Theorie läßt sich die funktionelle und morphologische Vielfalt der Neuronenpopulationen erklären (Davies, 1996). Da es unter pathophysiologischen Zuständen der Nozizeption häufig zu einer Veränderung lokaler Konzentrationen von Wachstumsfaktoren kommt, spielen sie in der Erforschung neuropathischer und entzündungsbedingter Schmerzen eine wichtige Rolle. Zu denjenigen Wachstumsfaktoren, die die Expression von VR1 und Galanin beeinflussen, gehören „nerve growth factor“ (NGF), „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF) und „leukemia inhibitory factor“ (LIF).

Als erster neurotropher Wachstumsfaktor überhaupt wurde NGF entdeckt (Levi-Montalcini, 1966). NGF gehört zur Familie der Neurotrophine und bindet an einen niedrigaffinen Rezeptor, „p75“ genannt, und einen hochaffinen „Tyrosinkinaserzeptor A“, üblicherweise mit *trkA* abgekürzt. (Chao *et al.*, 1986; Kaplan *et al.*, 1991). Es wird in innerviertem Zielgewebe primärer Afferenzen wie z. B. der Haut produziert und spielt sowohl für die Capsaicinempfindlichkeit als auch für die Expression von Galanin eine Schlüsselrolle. In Zellkulturen von Spinalganglionneuronen ist NGF notwendig zur Aufrechterhaltung der Capsaicinempfindlichkeit (Winter *et al.*, 1988; Winter *et al.*, 1993; Bevan und Winter, 1995). Dies erklärt die nach einer Axotomie *in vivo* ebenfalls beobachtete nachlassende Capsaicinempfindlichkeit sowie die herunterregulierte Expression von VR1 in Spinalganglionneuronen, da nach einer Durchtrennung der Nervenfortsätze auch kein NGF mehr aus der Peripherie retrograd axonal transportiert werden kann (Heumann *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1987; Raivich *et al.*, 1991; Hu-Tsai *et al.*, 1996; Michael und Priestley, 1999). Mit dem Einfluß von NGF auf die Galaninexpression verhält es sich hingegen anders: NGF verhindert die Hochregulation von Galanin, die üblicherweise mit zunehmender Dauer in Zellkultur ohne Faktoren und nach einer Axotomie beobachtet wird. Demnach kann NGF als ein Zytokin gelten, das unter physiologischen Bedingungen durch seinen stetigen Transport aus der Peripherie zu dem niedrigen Anteil galaninergener Neurone in den Spinalganglien beiträgt (Verge *et al.*, 1995; Kerekes *et al.*, 1997).

Ein Faktor mit ähnlichen Wirkungen auf die Capsaicinempfindlichkeit und Expression von VR1 ist GDNF, welcher zur „transforming growth factor β “ Superfamilie gehört. Wie NGF wird er im innervierten Zielgewebe synthetisiert

und retrograd transportiert (Lin *et al.*, 1993; Leitner *et al.*, 1999). GDNF bindet an einen Rezeptorkomplex aus einer mit RET abgekürzten Rezeptortyrosinkinase und der ligandenspezifischen Untereinheit $\alpha 1$ oder $\alpha 2$, üblicherweise mit GFR $\alpha 1$ bzw. GFR $\alpha 2$ abgekürzt (Durbec *et al.*, 1996; Jing *et al.*, 1996; Treanor *et al.*, 1996; Baloh *et al.*, 1997). Neurone mit GFR $\alpha 1$ - und / oder GFR $\alpha 2$ -Rezeptoren exprimieren gleichzeitig ein Glykopeptid auf ihrer Glykokalix, welches an das Isolektin B4 aus *Griffonia simplicifolia* bindet, was den Nachweis GDNF-abhängiger Neurone *in vitro* methodisch erleichtert (Silverman und Kruger, 1988; Bennett *et al.*, 1998). In kultivierten Neuronen aus Spinalganglien wurde für GDNF gezeigt, daß es die Capsaicinempfindlichkeit und VR1-Expression aufrecht erhalten kann (Ogun-Muyiwa *et al.*, 1999). Da sich die Populationen von GFR $\alpha 1$ /GFR $\alpha 2$ - und trkA-exprimierenden Neuronen in Spinalganglien nur minimal überschneiden, kann man somit die capsaicinempfindlichen Nozizeptoren in zwei Gruppen einteilen: Für die eine Gruppe ist NGF, für die andere ist GDNF notwendig zur Aufrechterhaltung der Expression von VR1 (Averill *et al.*, 1995; Molliver *et al.*, 1997). Beide Faktoren vermitteln ihren Effekt über eine Aktivierung der Ras-GTPase (Bron *et al.*, 2003). Auf die Expression von Galanin wurde bislang kein Effekt von GDNF nachgewiesen.

Im Gegensatz zu NGF und GDNF wird LIF im peripheren Nervensystem nicht vom innervierten Zielgewebe produziert, sondern von Schwann-Zellen nach einer Nervenschädigung oder von Satellitenzellen unter Kulturbedingungen (Banner und Patterson, 1994). Es bindet an einen Komplex aus dem Glykoprotein gp130 und der LIF-Rezeptor β -Untereinheit und wird wie NGF und GDNF als internalisierter Rezeptor-Liganden-Komplex retrograd axonal transportiert (Gearing *et al.*, 1991; Gearing *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1997). Während bislang kein Effekt auf die Expression von VR1 für LIF gezeigt werden konnte, gilt dieser Faktor als potenter Induktor einer Galaninexpression in sensorischen Neuronen nach Axotomie *in vivo* und unter Kulturbedingungen (Rao *et al.*, 1993; Corness *et al.*, 1996; Sun und Zigmond, 1996).

Zusammenfassend läßt sich zur Regulation der Expression von VR1 und Galanin unter physiologischen und bestimmten pathophysiologischen Zuständen folgendes feststellen: Im unverletzten Zustand werden konstitutiv geringe Mengen an NGF und GDNF im innervierten Zielgewebe wie z. B. der Haut produziert. Sie binden an ihre spezifischen Rezeptoren und halten im Spinalganglionneuron die Expression von VR1 aufrecht, während durch NGF eine Ga-

laninsynthese fast vollständig unterdrückt wird. Nach Nervenverletzungen, die den retrograden axonalen Transport verhindern, führt das Fehlen von NGF und GDNF zu einer Herunterregulation der Synthese von VR1 und damit auch der Capsaicinempfindlichkeit. Gleichzeitig wird LIF am Ort der Läsion von Schwann-Zellen produziert, welches im Zusammenspiel mit der fehlenden Inhibition durch NGF zu einer starken Hochregulation von Galanin führt (Abb. 1.3).

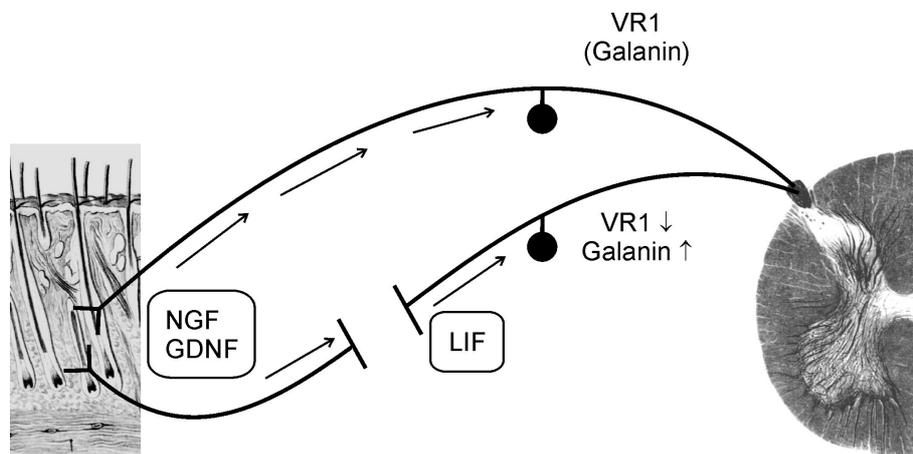


Abbildung 1.3. Der Einfluß der neurotrophen Wachstumsfaktoren NGF, GDNF und LIF auf die Expression von VR1 und Galanin unter physiologischen Bedingungen (oben) und nach einer Axotomie (unten). Nähere Erläuterungen im Text. Die Microphotographien der Haut und des Rückenmarks sind einem Anatomie-Atlanten entnommen (Putz und Pabst, 1993).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression gibt. Der die Capsaicinempfindlichkeit vermittelnde VR1 ist ein unter physiologischen Umständen konstitutiv exprimiertes Rezeptorprotein, welches an den peripheren Nervenendigungen von Nozizeptoren noxische Hitzereize in Generatorpotentiale umwandelt und an inflammatorischen, nicht jedoch neuropathischen pathophysiologischen Zuständen der Nozizeption beteiligt ist. Galanin hingegen wird unter physiologischen Bedingungen nur von sehr wenigen Neuronen eines Spinalganglions synthetisiert und nach einer Nervenverletzung stark hochreguliert. Über verschiedene Rezeptorsubtypen übt es dann sowohl einen antinozizeptiven als auch regenerativen Effekt aus. Sowohl Galanin als auch VR1 werden – wenn auch in gegensätzlicher Weise – in ihrer Expression durch NGF reguliert, und beide sind an der Nozizeption beteiligt. Es gibt zudem die Vermutung, daß die Hochregulation von Galanin nach Nervenverletzung in capsaicinempfindlichen Neuronen stattfindet (Skofitsch und Jacobowitz, 1985), jedoch wurde bislang kein Nachweis einer gleichzeitigen Expressierung von Galanin und VR1 in einzelnen Neuronen erbracht. Es wurde daher in dieser Arbeit geprüft, ob unter physiologischen und neuropathischen Bedingungen einzelne Neurone gleichzeitig capsaicinempfindlich und galaninerg sind. Dabei erfolgte der Nachweis durch eine Doppelfärbung, bei der capsaicinempfindliche Neurone funktionell und galaninerge Neurone immunzytochemisch dedektiert wurden. Es wurden Neurone unverletzter Ratten unter verschiedenen Kulturbedingungen mit Neuronen von Ratten mit Nervenläsionen unterschiedlicher Art und Dauer verglichen. Die Ergebnisse mögen zum besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Ratten der Rasse Sprague-Dawley (Charles River, Sulzfeld) waren allesamt männlich, ausgewachsen und wogen zwischen 180 und 320 g. Sie wurden einzeln oder in Gruppen von bis zu vier Tieren in 20 x 40 x 20 cm³ großen Käfigen gehalten. Es wurden insgesamt 53 Tiere verwendet. Die Experimente waren zuvor von der Regierung von Unterfranken in Bayern genehmigt worden.

2.2 Nervenligatur

Zur Ligatur des *N. ischiadicus* wurden die Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von Na⁺-Pentobarbital (Narcoren®; Rhône Mérieux, Laupheim) in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht in Narkose versetzt, die nach ca. 5 min einsetzte. Die Narkosetiefe wurde mittels kräftigen Drückens in eine Interdigitalfalte der Hinterpfote bestimmt und dann für tief genug gefunden, wenn das Tier auf diesen Stimulus hin keine Reaktion wie Zuckungen o. ä. mehr zeigte.

Die Operation erfolgte in drei Schritten: Freilegung des *N. ischiadicus*, Ligatur des Nerven (fest oder locker) und Schließen des Operationssitus. Die Ligatur wurde stets unilateral rechts vorgenommen. Die Freilegung des *N. ischiadicus* begann mit einer dorsalen Hautinzision in Höhe des tastbaren proximalen Oberschenkelknochens. Nach Präparation der Muskelfaszien ließen sich zwei durch einen Bindegewebestrang getrennte Muskelpakete durch stumpfes Präparieren auseinanderdrücken. In der Tiefe dieses Muskelspalts liegt der *N. ischiadicus*, der anschließend von der Trifurkation in *N. tibialis* und *Nn. fibulares profundus et superficialis* aus etwa 5 – 8 mm nach proximal dargestellt wurde. Unmittelbar proximal dieser Trifurkation wurde der Nerv dann vorsichtig mit Pinzetten stumpf von einbettendem Bindegewebe befreit, und anschließend wurden drei Seidenfäden (Braun, Melsungen) von 1,3 mm Durchmesser um den Nerven gelegt. Eine Photographie eines solchen Operationssitus zeigt Abbildung 2.1.



Abbildung 2.1. *Photographie eines Operationssitus bei der Ligatur des rechten N. ischiadicus. In der Tiefe zwischen zwei Muskelpaketen liegt der hell erscheinende Nerv, unter den drei Seidenfäden gelegt wurden.*

Es kamen zwei Verletzungsarten zum Einsatz: (1) die lockere Ligatur, die der „chronic constriction injury“ (CCI) nach Bennett und Xie entspricht (Bennett und Xie, 1988), und (2) die feste Ligatur, die im wesentlichen einer Axotomie entspricht. Bei der lockeren Ligatur wurden die drei Seidenfäden nur soweit festgezogen, bis der Blutstrom der oberflächlichen Gefäße reduziert, nicht jedoch komplett unterbunden wurde. Als Indikator diente ein leichtes, kurzes Zucken der vom *N. ischiadicus* innervierten Muskulatur. Bei der festen Ligatur hingegen wurden alle drei Fäden so fest wie möglich in dieser Reihenfolge zugezogen: zuerst der proximal gelegene, dann der mittlere und zuletzt der distale Faden. Schließlich wurde der Nerv wieder in die Tiefe des Muskelspalts gelegt und die Haut mit drei bis fünf Stichen zugenäht. Nach dem Zünähen der Wunde wurden die Ratten bis zum Aufwachen auf ein Wärmekissen gelegt und beobachtet. Anschließend wurden sie in den Tierstall zurückgebracht und jeden Tag inspiziert hinsichtlich eines möglichen Autotomieverhaltens (Wall *et al.*, 1979; Coderre *et al.*, 1986; Bennett und Xie, 1988; Blumenkopf und Lipman, 1991) und Aufbeißen der Wunde. Bei keinem der Versuchstiere kam es zu solchen oder anderen Komplikationen.

2.3 Entnahme der Spinalganglien

Es wurden Spinalganglien (SG) von unverletzten Ratten und von solchen mit einer Nervenligatur isoliert. Die SG von Ratten mit einer CCI wurden 6, 10 oder 14 d nach der Ligatur, solche von Ratten mit einer Axotomie nach 30 h oder 2, 4, 6, 10 oder 14 d untersucht.

Für die Entnahme der SG wurden die Ratten zunächst in eine tiefe Narkose versetzt (s. 2.1 Nervenligatur) und nach der Entnahme mit einer Überdosis Narcoren® getötet. Zur Isolierung der lumbalen SG wurde der *N. ischiadicus* am Ort der Ligatur dargestellt und nach proximal freipräpariert, indem mit einer Knochenzange das oberflächliche Bindegewebe und das *Os illii* entfernt wurden. Die Darstellung erfolgte bis zum *Plexus lumbosacralis*, anschließend wurde in Höhe des Übergangs von der Lendenwirbelsäule zum *Os sacrum* mit der Knochenzange der Spinalkanal eröffnet, ohne das Rückenmark zu beschädigen. Nun wurde von kaudal nach rostral der Spinalkanal weiter eröffnet und die zu den lumbalen Segmenten 4 und 5 (L4/5) gehörigen SG identifiziert: Der *N. ischiadicus* entstammt aus einem feinen Ast aus L6, einem dicken aus L5 und einem etwas dünneren aus L4 (Janjua und Leong, 1984). Die Entnahme der L4 und L5 SG erfolgte mit Hilfe eines Binokulars unter fünf- bis zehnfacher Vergrößerung mit einer feinen Pinzette und einer feinen Augenschere. Auf gleiche Weise wurden die L6 SG für eine Methodenkontrolle entnommen. Es wurde auf einen schonenden Umgang mit den SG und besonders auf eine Vermeidung von Quetschungen geachtet. Für Kontrollversuche wurden zusätzlich die entsprechenden SG der kontralateralen Seite entnommen.

Bei Ratten ohne Nervenverletzung wurden SG aus allen segmentalen Ebenen entnommen. Dabei erfolgte nach Darstellung der Wirbelsäule eine Entnahme derselben *in toto*. Nach der sich anschließenden Teilung der Wirbelsäule in der Medianebene wurden die SG aus den Foramina intervertebralia unter fünf- bis zehnfacher Vergrößerung mit einer feinen Augenschere entnommen.

2.4 Zellkultur

Die Herstellung der Zellkultur erfolgte ähnlich wie von Petersen und Mitarbeitern beschrieben (Petersen *et al.*, 1998). Die SG wurden sofort nach Entnahme in das gekühlte Nährmedium „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (D-MEM; Sigma, Steinheim) gegeben, welches zusätzlich 250 µg/l Gentamicin (Life Technologies, Eggenstein) enthielt. Anschließend wurden die SG unter zwanzigfacher Vergrößerung mit einer feinen Augenschere und Pinzette von umgebendem Bindegewebe entfernt. Ab diesem Schritt erfolgte die weitere Behandlung der SG unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Die SG wurden dann für 90 – 130 min, abhängig von dem Gewicht der Ratten, in 2 ml vorgewärmter Kollagenaselösung (Typ CLS IV, 260 U/mg; Biochrom, Berlin; gelöst in D-MEM) inkubiert. Die standardisierten Inkubationsbedingungen waren 37°C, 3,5% CO₂ und 100% Wasserdampfsättigung. Nach der Hälfte der Inkubationszeit in Kollagenaselösung wurde 1 ml Lösung durch frische ersetzt.

Nach der Inkubation in Kollagenaselösung wurde das Medium mit den SG in ein steriles 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, der Überstand abgezogen, und die SG wurden mit „phosphate-buffered saline“ (PBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Es erfolgte nun eine Inkubation für 11 min mit Trypsinlösung (9.820 U/ml; Sigma; gelöst in D-MEM), wodurch das Bindegewebe zwischen den Neuronen verdaut wurde. Erneut wurde der Überstand abgezogen und die SG mit D-MEM gewaschen. Nach diesem Schritt wurden 3 ml D-MEM auf die SG gegeben. Mit einer Pasteurpipette, deren Öffnung zuvor durch Hitze geglättet und verjüngt war, wurde das Medium mit den SG langsam mehrfach aufgesaugt und wieder ins Röhrchen gegeben, um einen vollständigen Zerfall der SG in einzelne, nicht mehr durch Bindegewebe verbundene Neurone zu bewirken. Um die isolierten Neurone vom Bindegewebe zu trennen, wurde diese Zellsuspension vorsichtig auf eine Lösung mit höherer Viskosität (23,5% Percoll®; Amersham Biosciences, Freiburg; gelöst in PBS) gegeben und anschließend bei 1180 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, so daß im Sediment größtenteils Neurone übrigblieben.

Das Sediment wurde danach mit dem serumfreien Kulturmedium TNB 100 (Biochrom) aufgenommen. Dieses war angereichert mit einem Lipid-Pro-

teinkomplex (2,5%; Biochrom) sowie mit Streptomycin (10 µg/ml; Life Technologies) und Penicillin (10.000 U/ml; Life Technologies). Ein Medium ohne Serum wurde benutzt, um den möglichen Einfluß von im Serum befindlichen Zytokinen auszuschalten. Erneut wurde zentrifugiert für 10 min bei 570 g. Danach wurde der Überstand verworfen, und die Neurone wurden auf Deckgläschen, die mit Poly-L-Lysin (Molekulargewicht > 300 kD; Sigma) beschichtet waren, ausgesät. Die Kulturen von Ratten ohne Nervenverletzung wurden 6 h, 30 h, 2 oder 4 d bebrütet und stammten entweder aus den lumbalen Segmenten L4/5 oder aus allen segmentalen Ebenen. Kulturen von nervenverletzten Ratten wurden 6 h in Kultur gehalten. Bei Zellkulturen, die länger als 6 h inkubiert wurden, wurden am nächsten Morgen 2 ml des Kulturmediums in die Petrischälchen mit den Deckgläschen geben, und von nun an wurde das Medium jeden Tag zur Hälfte ausgewechselt.

In einigen Experimenten wurden die Neurone aus allen segmentalen Ebenen von unverletzten Ratten 4 d in Kultur gehalten unter Zugabe von den Wachstumsfaktoren NGF 7S (50 ng/ml; Calbiochem, Darmstadt) und / oder GDNF (50 ng/ml; Calbiochem). In diesen Experimenten wurde das Medium nur einmal nach 2 d durch frisches ersetzt.

2.5 Zytochemische Färbungen

Es wurden bis zu vier Eigenschaften der Neurone untersucht, was durch Kombination von Zwei- oder Dreifachfärbung und Größenmessung der Neurone erfolgte: (1) die Empfindlichkeit gegenüber dem Vanilloid Capsaicin; (2) die Expression des Neuropeptids Galanin; (3) die Bindung des Lektins IB4 aus *Griffonia simplicifolia* und (4) die Querschnittsfläche der Perikarya als Maß für die Größe der Neurone.

Zum Nachweis der Capsaicinempfindlichkeit wurde die von P. G. Hogan und J. Winter (Hogan, 1983; Winter, 1987) entwickelte Kobaltaufnahmemethode angewandt. Deren Prinzip ist folgendermaßen: Die Generierung von Aktionspotentialen in Neuronen durch Capsaicin oder durch Hitze (> 42°C) wird initiiert durch eine direkte Aktivierung eines ligandengesteuerten, nicht-selektiven Kationenkanals. Die Öffnung dieses Kanals führt zu einem Kationeneinstrom mit konsekutiver Membrandepolarisation und Generierung eines

Aktionspotentials. Ladungsträger sind mono- und divalente Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ und Na^+ (Bevan *et al.*, 1990). Unter physiologischen Bedingungen strömen Ca^{2+} und Na^+ in die Zelle und K^+ aus ihr heraus. Zytochemische Experimente haben gezeigt, daß dieser Kanal auch für Co^{2+} -Ionen permeabel ist (Winter, 1987). Diese Permeabilität wird methodisch genutzt, um die capsaicinempfindlichen Neurone innerhalb der heterogenen Population der Spinalganglionneurone zu identifizieren. Stimulation mit Capsaicin oder Hitze führt in diesen Neuronen zur Aufnahme von Co^{2+} in diese Zellen. Anschließende Inkubation mit Ammoniumsulfid führt zur Präzipitation des intrazellulären Co^{2+} zu Kobaltsulfid. Dieses ist schwer wasserlöslich, braun gefärbt und lichtmikroskopisch erkennbar (Abb. 2.2 A).

Der Nachweis von Galanin erfolgte immunzytochemisch. Der Erstantikörper stammte aus Kaninchen (Peninsula Laboratories, Belmont, Kalifornien, USA) und war spezifisch gegen Galanin aus Ratten. Der mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) markierte Zweitantikörper stammte aus Eseln und war spezifisch gegen Immunglobuline aus Kaninchen. Zum Nachweis von IB4-Affinität wurden die Neurone mit fluoreszierendem Farbstoff FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markiertem IB4 (Sigma) inkubiert.

Der Ablauf der Färbung verlief wie folgt: Die Deckgläschen mit den Neuronen wurden 3 min in Assay-Puffer (0,75 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 12 mM Glukose, 10 mM HEPES, 137 mM Saccharose und 58 mM NaCl, pH 7,4) in „cell wells“ gelegt, um das Kulturmedium auszuwaschen. Zunächst erfolgte die IB4-Färbung. Hierzu wurden die Neurone auf eine Parafilm®-Plastikfolie gelegt und mit 50 μl FITC-markiertem IB4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma; gelöst in „Hank's balanced salt solution“) für 8 min inkubiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtschutz, damit die Fluoreszenzmoleküle nicht ausbleichen. Anschließend wurde wieder mit Assay-Puffer gewaschen.

Als nächster Schritt erfolgte die Stimulation mit Capsaicin (Sigma). Dazu wurden die Deckgläschen 8 min in kobaltchloridhaltigen (5 mM) Assay-Puffer gelegt, der je nach Experiment Capsaicin in einer Konzentration von 10 nM bis 10 μM enthielt. Diese Capsaicinlösungen wurden aus einer 5,4 mM ethanolischen Stocklösung hergestellt. Danach wurden die Deckgläschen wieder mit Assay-Puffer gewaschen und 2 min in Assay-Puffer mit 1 Vol-%

Ammoniumsulfid inkubiert. Erneut wurde mit Assay-Puffer gewaschen, und danach wurden die Neurone in 4% Paraformaldehyd 20 min fixiert. Hierdurch behielten die Neurone ihre Form und Stabilität.

Als letzter Färbeschritt folgte nun die Immunzytochemie gegen Galanin. Nach der Behandlung im Fixans wurden die Neurone dreimal 5 min in PBS gewaschen und anschließend dreimal 5 min in PBS mit 1 Vol-% Triton X-100 (Sigma) und 1 Vol-% Na⁺-Azid (von nun an Waschlösung genannt). Durch den Zusatz von Triton wurde die Lipidmembran der Neurone porös, so daß in den folgenden Schritten die Antikörper gegen Galanin *per diffusionem* in die Zelle gelangen konnten. Die Deckgläschen wurden zur Absättigung unspezifischer Protein-Protein-Bindungsstellen mit 10 Vol-% Eselserum (Jackson ImmunoResearch) in Waschlösung 15 min inkubiert. Hierdurch erhöhte sich die Spezifität der Antikörperfärbung gegen Galanin. Schließlich wurden die Deckgläschen auf Parafilm[®]-Plastikfolie in einer Plastikkiste, deren Ecken mit tropfnassen Papiertüchern ausgekleidet waren („feuchte Kammer“), über Nacht bei 4°C mit 50 µl Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in Waschlösung mit 1 Vol-% Eselserum inkubiert. Die feuchte Kammer stellte dabei sicher, daß die Deckgläschen nicht austrockneten. Nach ca. 16-20 h wurden die Deckgläschen dreimal 5 min in Waschlösung gewaschen und anschließend 2 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:600 mit 1 Vol-% Eselserum inkubiert. Schließlich wurde nochmals dreimal gewaschen, die Deckgläschen wurden dann 3 min in destilliertes Wasser gelegt, anschließend mit Vecta Shield[®] (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) eingedeckelt und auf Objektträgern mit handelsüblichem Nagellack fixiert. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung kühl gelagert.

Um unspezifischen Kobalteinstrom und unspezifische Antikörper- oder Lektinbindung auszuschließen, durchlief als Methodenkontrolle in jedem Experiment ein Kontroll-Deckgläschen mit Neuronen aus allen segmentalen Ebenen oder aus L6 dieselbe Färbeprozedur mit folgenden drei Ausnahmen: (1) Anstelle der Inkubation mit FITC-IB4 wurden die Kontroll-Deckgläschen nur mit „Hank's balanced salt solution“ inkubiert; (2) statt kobaltchloridhaltigem Assay-Puffer mit Capsaicin wurde kobaltchloridhaltiger Assay-Puffer ohne Capsaicin benutzt; und (3) statt des Primärantikörpers in Waschlösung mit 1 Vol-% Eselserum wurde dieselbe Waschlösung mit Eselserum ohne Antikörper verwendet.

Die Neurone auf diesen Kontroll-Deckgläschen waren in allen Experimenten ungefärbt.

2.6 Mikroskopie, quantitative Auswertung und Statistik

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135; Carl Zeiss, Jena). Bei zweihundertfacher Vergrößerung wurden zwei bzw. drei digitale Mikrophotographien gefertigt, die später am Computer mit Bildbearbeitungssoftware qualitativ und quantitativ ausgewertet wurden. Diese Photographien waren: (1) ein Hellfeldbild zur Messung der Perikaryongröße und zum Nachweis kobaltsulfidgefärbter capsaicinempfindlicher Neurone; (2) ein kongruentes Fluoreszenzbild zur Bestimmung der Cy3-Immunfluoreszenz gegen Galanin und gegebenenfalls (3) ein weiteres, ebenfalls kongruentes Fluoreszenzbild zum Nachweis von FITC-Immunfluoreszenz zur Identifizierung IB4-positiver Neurone. Das Cy3-Molekül hat eine Absorptionswellenlänge von 514 nm und Emissionswellenlänge von 566 nm und benötigt einen Filtersatz Nr. 20 (Carl Zeiss), FITC hat eine Absorptionswellenlänge von 490 nm und Emissionswellenlänge von 520 nm und benötigt einen Filtersatz Nr. 10 (Carl Zeiss). Ein Beispiel einer Mehrfachfärbung zeigt Abbildung 2.2: Im linken Teil (A) sind im Hellfeldbild insgesamt 9 Neurone zu sehen, von denen zwei durch Kobaltsulfid dunkel erscheinen. Das mittlere Bild (B) zeigt die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme mit Immunzytochemie gegen Galanin. Drei mit Pfeilen markierte Neurone waren positiv. Diese drei Neurone waren nicht capsaicinempfindlich. Im rechten Bild (C) sind zwei fluoreszenzmarkierte, IB4-bindende Neurone zu sehen, die gleichzeitig capsaicinempfindlich waren. Da IB4 an ein Glykopeptid der Glykokalix bindet, erscheint bei den IB4-positiven Neuronen nur der Rand hell fluoreszierend.

Mit der Software Adobe Photoshop[®] wurden diese drei einzelnen Bilder so übereinandergelegt, daß alle Färbereigenschaften eines Neurons auf einen Blick sichtbar waren. Mit der Software Scion Image[®] wurde durch Umfahren der einzelnen Neurone mit Hilfe einer Computermaus die Querschnittsfläche der Perikarya im Hellfeldbild als Maß für die Neuronengröße bestimmt.

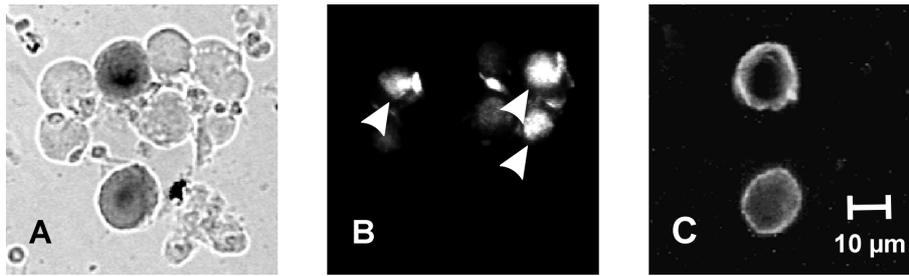


Abbildung 2.2. Hellfeld- (A) und Fluoreszenz- (B, C) Mikrophotographien einer 6 h alten Zellkultur von L4/5 Neuronen aus einer Ratte nach Axotomie von 10 d. (A) Kobaltsulfidfärbung nach Stimulation mit 300 nM Capsaicin: Zwei capsaicinempfindliche Neurone sind dunkel gefärbt. (B) Immunzytochemie gegen Galanin: Drei mit Pfeilen markierte galaninerge Neurone erscheinen hell. (C) Lektinzytochemie zum Nachweis der IB4-Bindung: Zwei Neurone binden IB4 an ihre Oberfläche.

Die quantitative Auswertung geschah wie folgt: Mindestens 3 Ratten wurden für jeden einzelnen Datenpunkt verwendet; pro Deckgläschen wurden 80 – 200 Neurone ausgewertet und in einer mit Microsoft Excel[®] erstellten Tabelle jedem einzelnen die Eigenschaften capsaicinempfindlich, galaninerg, IB4-bindend sowie die Größe als Querschnittsfläche in μm^2 zugewiesen. Nach längerer Zeit in Kultur waren teilweise Fibroblasten über die Neurone gewachsen und erschwerten die Auswertung, aus diesem Grund wurden grundsätzlich nur freiliegende Neurone ausgewertet.

Statistische Tests wurden mit dem Softwareprogramm Statistica[®] durchgeführt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($p < 0,05$) gleichgesetzt wurde mit Signifikanz und zur Feststellung „nicht signifikant“ $p > 0,1$ sein mußte. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung für Capsaicin

In einer ersten Versuchsreihe wurde die optimale Capsaicinkonzentration für die späteren Mehrfachfärbungen ermittelt. Ziel war es, alle VR1-exprimierenden Neurone durch Kobaltaufnahme zu erfassen und gleichzeitig die Capsaicinkonzentration so gering zu halten, daß die neurotoxische Wirkung nicht zum Tragen kommt (Chard *et al.*, 1995). Hierzu wurde das Antwortverhalten auf Capsaicin von Neuronen aus allen segmentalen Ebenen unverletzter Tiere nach 6 h in Kultur analysiert. Insgesamt wurden 20 Zellkulturen von 5 Ratten untersucht. Es wurden Konzentrationen von 10 nM bis 10 μ M Capsaicin verwendet. Abbildung 3.1 zeigt die ermittelten Daten als Anteil gefärbter Neurone an der gesamten untersuchten Population in Abhängigkeit von der Capsaicinkonzentration. Mit steigender Dosis erhöhte sich der Anteil gefärbter Neurone und näherte sich einem Sättigungswert. Die Einzelwerte sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

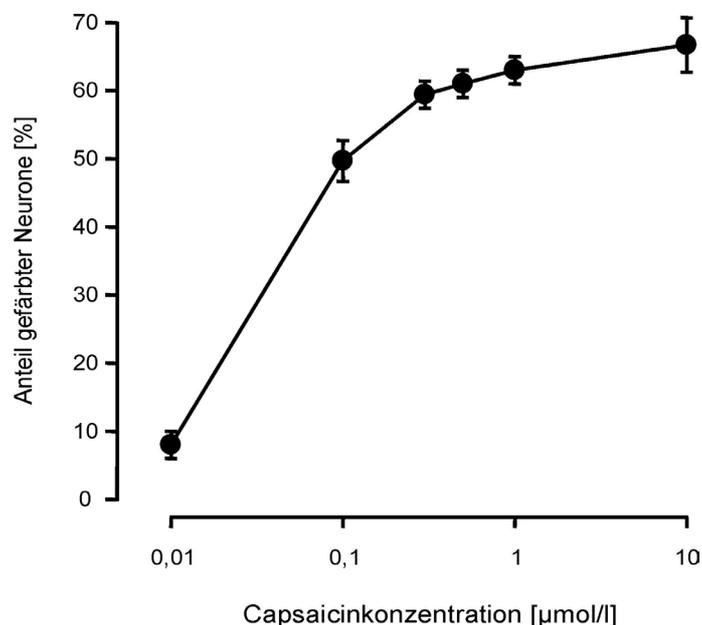


Abbildung 3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung für Capsaicin in halblogarithmischer Darstellung. Neurone aus SG aller Ebenen von unverletzten Ratten nach 6 h in Kultur.

Bei der Stimulation mit 10 μM Capsaicin waren 10% aller Neurone nekrotisch zerfallen, in niedrigeren Konzentrationen hingegen fanden sich nur vereinzelt solche Neurone. Für die weiteren Experimente wurde eine Capsaicinkonzentration von 300 nM als Stimulus verwendet, da diese Konzentration einerseits im Sättigungsbereich lag, andererseits nicht neurotoxisch war.

<i>Capsaicin- konzentration [$\mu\text{mol/l}$]</i>	<i>Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern</i>	<i>Anteil gefärbter Neurone [%]</i>
0,01	3 (300)	8 \pm 2
0,1	3 (300)	50 \pm 3
0,3	5 (500)	59 \pm 2
0,5	3 (300)	61 \pm 2
1	3 (300)	63 \pm 2
10	3 (300)	67 \pm 4

Tabelle 3.1. *Abhängigkeit des Anteils kobaltsulfidgefärbter Neurone an der Gesamtpopulation von der Capsaicinkonzentration. Neurone aus SG aller Ebenen von unverletzten Ratten nach 6 h in Kultur. Diese Daten liegen der Abbildung 3.1 zugrunde.*

3.2 Neurone unverletzter Ratten in Kurzzeitkultur

In diesen Versuchen wurden die Eigenschaften Capsaicinempfindlichkeit, Galaninexpression, Zellgröße und zum Teil das IB4-Bindungsverhalten von Neuronen unverletzter Ratten ermittelt. Diese Ergebnisse dienten als Kontrollwerte für die späteren Versuche mit Nervenverletzung. Es wurden Neurone unverletzter Ratten der Segmente L4/5 nach 6 h Kultur untersucht. Insgesamt wurden 7 unabhängige Zellkulturen von 7 Ratten für die Doppelbestimmung Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression analysiert; bei dreien dieser Kulturen erfolgte zusätzlich der Nachweis des IB4-Bindungsverhaltens durch Dreifachfärbung.

Betrachtet man nur eine Eigenschaft, so waren knapp zwei Drittel der Neurone capsaicinempfindlich, ein Drittel band IB4, und nur ein Bruchteil exprimierte Galanin (Abb. 3.2 und Tab. 3.2). Capsaicinempfindliche Neurone waren von kleinem bis mittlerem Durchmesser, galaninerge Neurone waren mittelgroß bis groß, und IB4-bindende Neurone gehörten zu den mittelgroßen Zellen. Dies spiegelt sich in der mittleren Querschnittsfläche der Neurone (Tab. 3.2) und in den Größenverteilungshistogrammen wider (Abb. 3.3).

Die Population von capsaicinempfindlichen Neuronen konnte anhand der Mehrfachfärbung in zwei annähernd gleich große Untergruppen eingeteilt werden: Von allen capsaicinempfindlichen Neuronen waren $40 \pm 3\%$ IB4-positiv und $60 \pm 3\%$ IB4-negativ (Abb. 3.2). Die doppeltgefärbten Neurone hatten eine mittlere Größe von $820 \pm 18 \mu\text{m}^2$, während die IB4-negativen capsaicinempfindlichen Neurone im Durchschnitt $662 \pm 22 \mu\text{m}^2$ maßen.

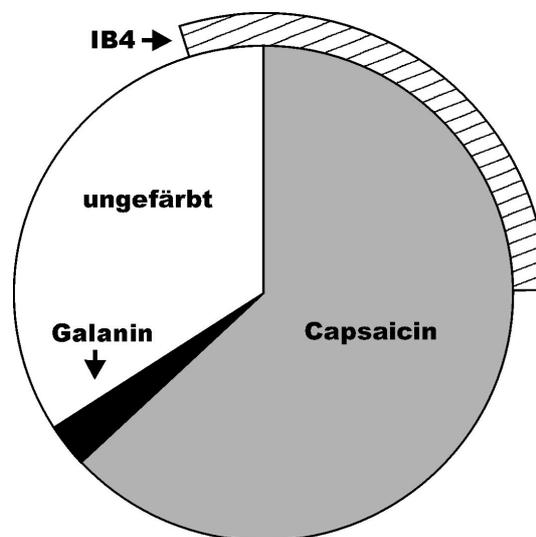


Abbildung 3.2. Charakterisierung von Neuronen unverletzter Ratten. Die Eigenschaften Capsaicinempfindlichkeit (grau unterlegt) und Galaninexpression (schwarz unterlegt) schließen sich gegenseitig aus. Ein Großteil der IB4-bindenden Neurone (schraffiert) ist capsaicinempfindlich. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 von unverletzten Ratten nach 6 h in Kultur.

<i>Eigenschaft</i>	<i>Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern</i>	<i>Anteil gefärbter Neurone [%]</i>	<i>Querschnitts- fläche [μm^2]</i>
Capsaicin- empfindlichkeit	7 (755)	63 \pm 3	702 \pm 12
Galanin- expression	7 (755)	3 \pm 1	1517 \pm 123
IB4-Bindung	3 (300)	30 \pm 1	779 \pm 33

Tabelle 3.2. Anteil capsaicinempfindlicher, galaninexprimierender und IB4-bindender Neurone an der Gesamtpopulation und deren mittlere Querschnittsflächen. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 von unverletzten Ratten nach 6 h in Kultur. Diese Daten liegen den Abbildungen 3.2 und 3.3 zugrunde.

Bei der Untersuchung der Doppelfärbung bezüglich Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression fiel auf, daß kein einziges Neuron gleichzeitig capsaicinempfindlich und galaninerg war. Die Gesamtpopulation der Neurone konnte somit in folgende drei sich nicht überlappende Gruppen unterteilt werden: capsaicinempfindlich, galaninexprimierend und weder capsaicinempfindlich noch galaninexprimierend (Abb. 3.2). Auch gab es keine Überschneidung der IB4-bindenden und der galaninexprimierenden Populationen. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 2.1.

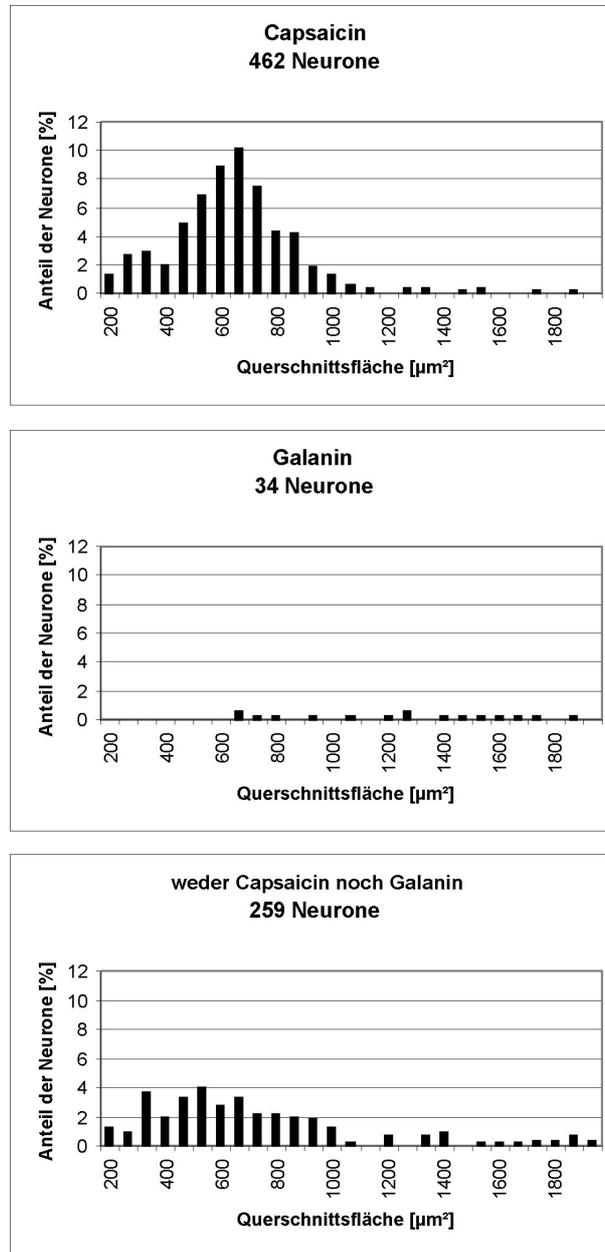


Abbildung 3.3. Größenverteilungshistogramme für capsaicinempfindliche (oben), galaninexprimierende (mitte) und weder capsaicinempfindliche noch galaninexprimierende (unten) Neurone aus SG der Ebenen L4/5 von unverletzten Ratten nach 6 h in Kultur.

3.3 Neurone von Ratten mit experimenteller Axotomie

Die Eigenschaften Capsaicinempfindlichkeit, Galaninexpression und Zellgröße wurden in diesen Versuchen nach unterschiedlicher Axotomiedauer untersucht. Hierzu wurden Neurone der verletzten ipsi- und der unverletzten kontralateralen L4/5 SG aus 21 unabhängigen Kulturen von insgesamt 21 Ratten mit einer Axotomie analysiert. Die Dauer der Axotomie betrug 30 h, 2, 4, 6, 10 und 14 d. Alle Neurone dieser Versuchsreihe waren 6 h in Kultur.

Den Verlauf von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression in Abhängigkeit von der Zeit mit Axotomie gibt Abbildung 3.4 wieder, die zugehörigen Daten sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Die Werte für „0 d Axotomie“ entstammen Neuronen von unverletzten Ratten aus den Experimenten in 3.2 und gelten als Kontrolle. Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression in Neuronen der kontralateralen Seite unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollwerten (*post hoc* LSD-Test) und werden daher nur als Teil von Abbildung 3.4 präsentiert.

Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone der ipsilateralen Seite verringerte sich in linearer Form von 63% in unverletzten Ratten auf ein stabiles Niveau von 24%, welches bereits 6 d nach Axotomie erreicht wurde (Abb. 3.4). Dieser Abfall war ab dem vierten Tag hochsignifikant sowohl gegenüber dem Ausgangswert als auch gegenüber dem Wert der kontralateralen Seite zur jeweils entsprechenden Zeit ($p < 0,001$, *post hoc* LSD-Test). Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone der kontralateralen Seite veränderte sich über den untersuchten Zeitraum nicht signifikant gegenüber den Kontrollwerten (*post hoc* LSD-Test).

Der Anteil galaninerger Neurone der ipsilateralen Seite erhöhte sich ab dem zweiten Tag in linearer Form von 3% auf ein Maximum von 36% nach 10 d und sank anschließend auf 25% (Abb. 3.4). Dieser Anstieg war ab dem vierten Tag hochsignifikant gegenüber dem Kontrollwert ($p \ll 0,001$, *post hoc* LSD-Test) und auch gegenüber der kontralateralen Seite zur jeweils entsprechenden Zeit. Der Anteil der galaninerger Neurone der kontralateralen Seite veränderte sich über den untersuchten Zeitraum nicht signifikant gegenüber den Kontrollwerten (*post hoc* LSD-Test).

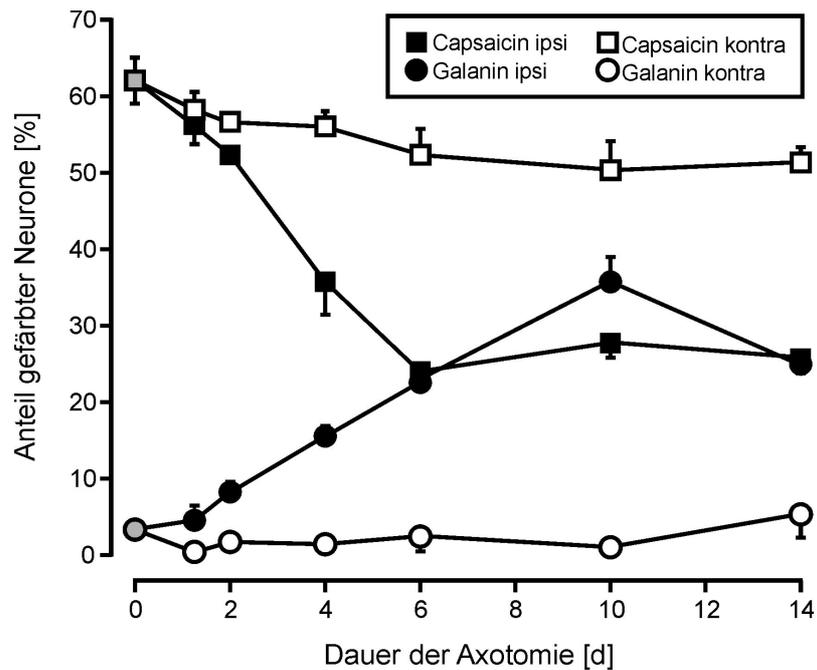


Abbildung 3.4. Zeitverlauf von Capsaicinempfindlichkeit (Quadrate) und Galaninexpression (Kreise) nach 30 h bis 14 d Axotomiedauer. Die ausgefüllten Symbole beziehen sich auf die verletzte ipsilaterale Seite, die offenen Symbole auf die unverletzte kontralaterale Seite. „0 d“ Axotomie bezieht sich auf Neurone unverletzter Ratten und dient als Kontrolle, die entsprechenden Symbole sind grau unterlegt. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur.

<i>Dauer der Axotomie [d]</i>	<i>Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern</i>	<i>Anteil capsaicinempfindlicher Neurone ipsilateral [%]</i>	<i>Anteil galaninerner Neurone ipsilateral [%]</i>
0 (Kontrolle)	7 (755)	63 ± 3%	3 ± 1%
1,25	3 (300)	58 ± 3%	4 ± 2%
2	3 (300)	51 ± 3%	8 ± 2%
4	3 (300)	36 ± 4%	15 ± 2%
6	3 (300)	24 ± 2%	22 ± 1%
10	6 (600)	27 ± 3%	36 ± 3%
14	3 (300)	26 ± 2%	25 ± 2%

Tabelle 3.3. Anteil capsaicinempfindlicher und galaninexprimierender Neurone an der Gesamtpopulation nach 30 h bis 14 d Axotomiedauer. „0 d“ bezieht sich auf unverletzte Ratten und dient als Kontrolle. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur. Diese Daten liegen den Abbildungen 3.4 und 3.6 zugrunde.

Die mittlere Querschnittsfläche der ipsilateralen capsaicinempfindlichen Neurone veränderte sich nach Axotomie nicht gegenüber den Kontrollwerten (Tab. 3.4). Hingegen nahm die mittlere Querschnittsfläche der ipsilateralen galaninergen Neurone deutlich ab von 1508 μm^2 am Tag „0“ auf 473 μm^2 nach bereits 2 d (Tab. 3.4). Die Querschnittsflächen der kontralateralen capsaicinempfindlichen und galaninergen Neurone veränderten sich nicht gegenüber den Kontrollwerten (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 3.5 sind die Größenverteilungshistogramme für capsaicinempfindliche, galaninerge und ungefärbte Neurone aus Kontrollratten denen nach 10 d Axotomiedauer gegenübergestellt. Nach der Axotomie sinkt der relative Anteil der capsaicinempfindlichen Neurone über den gesamten Größenbereich. Das Verteilungsprofil der galaninergen Neurone verändert sich nach Axotomie deutlich: Unter Kontrollbedingungen sind die galaninergen Neurone in ihrer überwiegenden Mehrheit größer als 1000 μm^2 , während nach 10 d Axotomiedauer die deutliche Mehrheit kleiner als

1000 μm^2 ist (Abb. 3.5). Das Größenverteilungshistogramm der ungefärbten Population nach Axotomie ist dem unter Kontrollbedingungen sehr ähnlich.

<i>Dauer der Axotomie [d]</i>	<i>Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern</i>	<i>Querschnittsfläche capsaicinempfindlicher Neurone ipsilateral [μm^2]</i>	<i>Querschnittsfläche galaninerger Neurone ipsilateral [μm^2]</i>
0 (Kontrolle)	7 (755)	665 \pm 54	1508 \pm 123
1,25	3 (300)	605 \pm 13	842 \pm 144
2	3 (300)	606 \pm 15	473 \pm 24
4	3 (300)	645 \pm 23	623 \pm 44
6	3 (300)	593 \pm 32	565 \pm 26
10	6 (600)	644 \pm 40	628 \pm 18
14	3 (300)	600 \pm 27	647 \pm 46

Tabelle 3.4. *Mittlere Querschnittsflächen von capsaicinempfindlichen und galaninergen Neuronen nach Axotomiedauer von 30 h bis 14 d. „0 d“ bezieht sich auf unverletzte Ratten und dient als Kontrolle. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur. Diese Daten liegen der Abbildung 3.5 zugrunde.*

Eine Doppelfärbung für Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression gab es weder in den Neuronen der ipsi- noch der kontralateralen Seite zu irgendeinem der untersuchten Zeitpunkte. Die Neurone dieser Versuchsreihe können hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt werden: capsaicinempfindlich, galaninerg oder ungefärbt. Die Unterteilung der Gesamtpopulation in diese drei sich nicht überschneidenden Gruppen ist somit nicht nur für Neurone aus unverletzten Ratten, sondern auch für Neurone aus Ratten mit experimenteller Axotomie möglich, gleichwohl sinkt der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone nach Axotomie zugunsten des Anteils gala-

ninerger Neurone. Ein Beispiel für diese Unterteilung ist für Neurone nach 10 d Axotomie in Abbildung 3.6 rechts gezeigt. Zum Vergleich ist die Verteilung unter Kontrollbedingungen in derselben Abbildung auf der linken Seite zu sehen. Man erkennt, daß der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone nach Axotomie gegenüber dem Kontrollwert deutlich abgenommen hat, während umgekehrt der Anteil galaninerger Neurone gestiegen ist. Dabei ist der Anteil ungefärbter Neurone – oder umgekehrt die Summe der Anteile gefärbter Neurone – unter beiden Bedingungen etwa gleich groß.

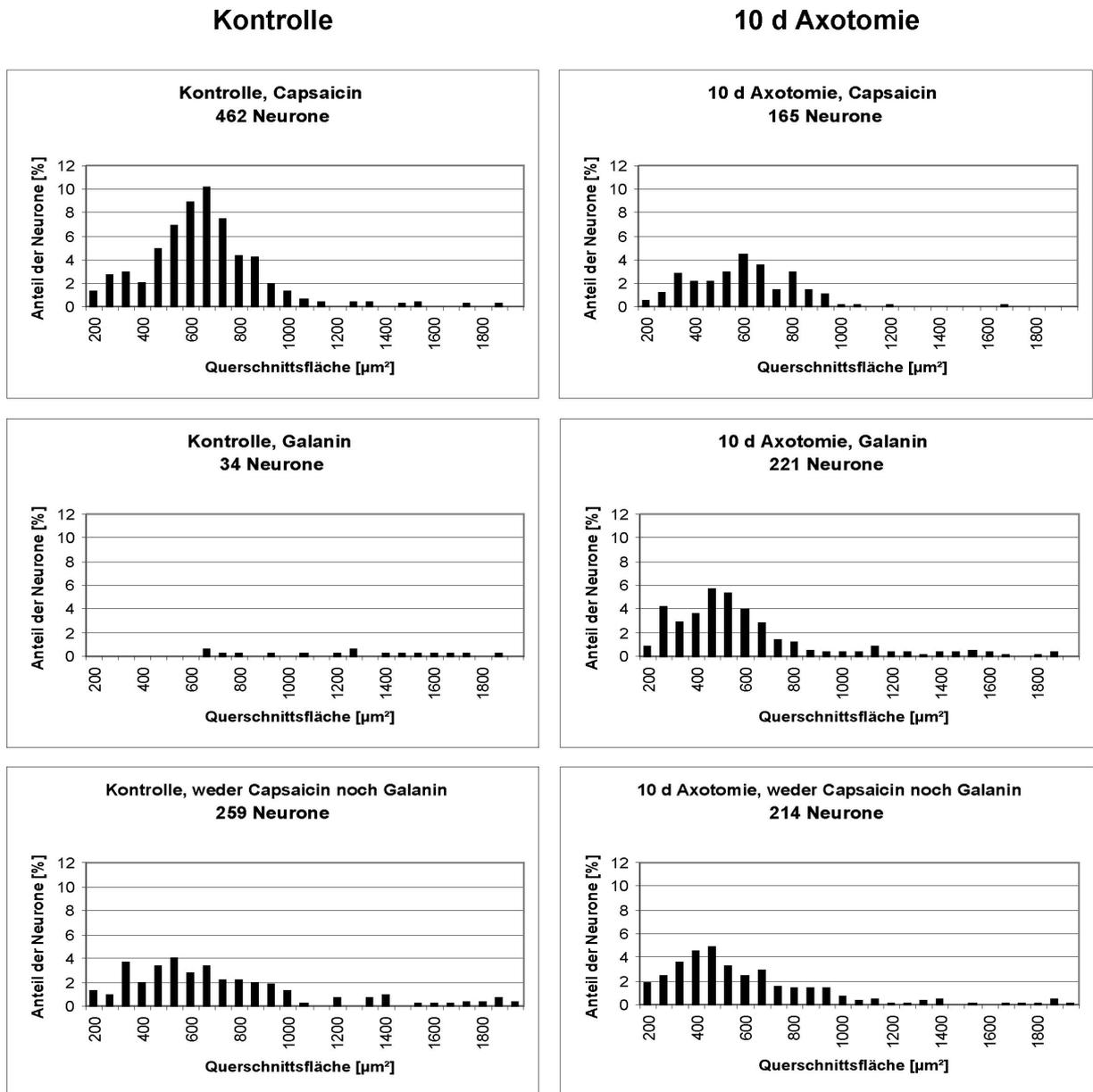


Abbildung 3.5. Größenverteilungshistogramme von Neuronen aus unverletzten Ratten (links) und aus Ratten mit einer Axotomiedauer von 10 d (rechts). Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur.

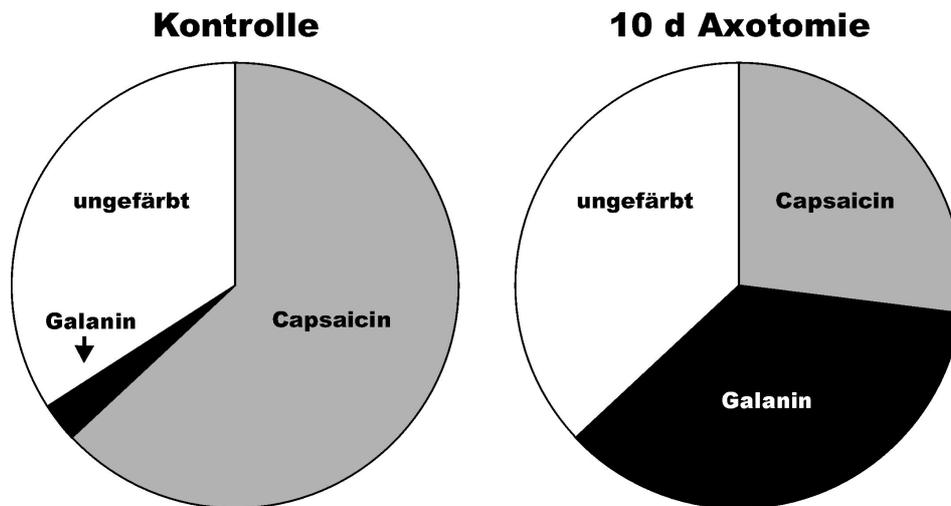


Abbildung 3.6. Charakterisierung der Population von unverletzten Neuronen (links) und von Neuronen nach Axotomiedauer von 10 d (rechts). Die Eigenschaften Capsaicinempfindlichkeit (grau unterlegt) und Galaninexpression (schwarz unterlegt) schließen sich gegenseitig aus. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur.

3.4 Neurone von Ratten mit experimenteller „chronic constriction injury“

Das Ziel dieser Experimente war, den Einfluß einer CCI auf die Eigenschaften Capsaicinempfindlichkeit, Galaninexpression und Zellgröße zu untersuchen. Dazu wurden Neurone aus SG der Ebenen L4/5 der verletzten ipsilateralen Seite aus insgesamt 8 unabhängigen Kulturen von 8 Ratten mit einer CCI untersucht. Die Dauer der CCI betrug 6, 10 und 14 d. Alle Neurone waren 6 h in Kultur. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.7 sowie in den Tabellen 3.5 und 3.6 dargestellt.

Sowohl der Anteil der capsaicinempfindlichen als auch der der galanin-exprimierenden Neurone veränderte sich über den untersuchten Zeitraum nicht signifikant gegenüber den Kontrollwerten unverletzter Ratten (*post hoc* LSD-Test). Auch die mittleren Zellgrößen der capsaicinempfindlichen Neurone nach CCI unterschieden sich nicht von den Kontrollwerten, diejenigen der galaninergen Neurone waren nach 6 und 10 d Dauer der CCI, nicht jedoch nach 14 d

verschieden vom Kontrollwert (Tab. 3.6). Es gab keine Überschneidung der capsaicinempfindlichen und der galaninergen Populationen.

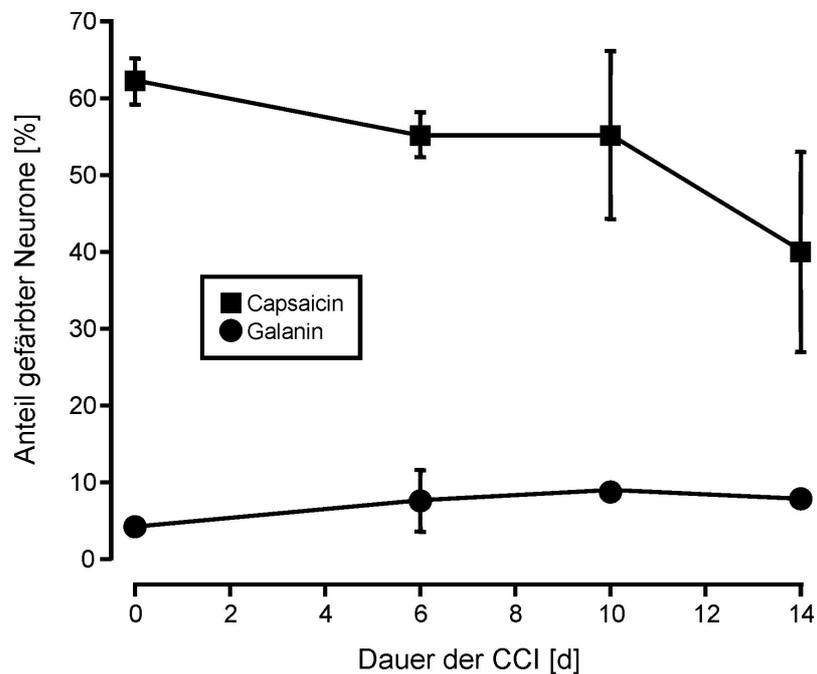


Abbildung 3.7. Zeitverlauf von Capsaicinempfindlichkeit (Quadrate) und Galaninexpression (Kreise) nach 6 bis 14 d Dauer einer CCI. „0 d“ Axotomie bezieht sich auf Neurone unverletzter Ratten und dient als Kontrolle. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur.

Dauer der CCI [d]	Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern	Anteil capsaicinempfindlicher Neurone ipsilateral [%]	Anteil galaninerger Neurone ipsilateral [%]
0 (Kontrolle)	7 (755)	63 ± 3	3 ± 1
6	3 (300)	57 ± 3	7 ± 4
10	2 (200)	57 ± 11	8 ± 1
14	3 (300)	40 ± 13	7 ± 1

Tabelle 3.5. Anteil capsaicinempfindlicher und galaninexprimierender Neurone an der Gesamtpopulation nach 6 bis 14 d Dauer einer CCI. „0 d“ bezieht sich auf unverletzte Ratten und dient als Kontrolle. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur. Die Daten liegen der Abbildung 3.7 zugrunde.

Dauer der CCI [d]	Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern	Querschnittsfläche capsaicinempfindlicher Neurone ipsilateral [μm^2]	Querschnittsfläche galaninerger Neurone ipsilateral [μm^2]
0 (Kontrolle)	7 (755)	665 ± 54	1508 ± 123
6	3 (300)	660 ± 15	828 ± 138
10	2 (200)	708 ± 24	863 ± 139
14	3 (300)	655 ± 20	1276 ± 155

Tabelle 3.6. Mittlere Querschnittsflächen von capsaicinempfindlichen und galaninexprimierenden Neuronen nach 6 bis 14 d Dauer einer CCI. „0 d“ bezieht sich auf Neurone unverletzter Ratten und dient als Kontrolle. Neurone aus SG der Ebenen L4/5 nach 6 h in Kultur.

3.5 Neurone unverletzter Ratten in Langzeitkultur ohne Wachstumsfaktoren

Da die Isolierung der Neurone zur Herstellung einer Zellkultur stets einen Verlust der Axone mit sich bringt und insofern einer Axotomie *in vivo* ähnelt, wurde als nächstes untersucht, ob der gegenseitige Ausschluß von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression in Kurzzeitkultur und nach Axotomie auch in Neuronen unverletzter Ratten, die längere Zeit in Kultur gehalten wurden, beobachtet werden kann. Es wurden Neurone aus allen segmentalen Ebenen auf Capsaicinempfindlichkeit, Galaninexpression und Zellgröße hin untersucht. Neurone aus insgesamt 15 unabhängigen Kulturen aller segmentalen Ebenen von 15 Ratten wurden analysiert. Die Kulturdauer betrug 6, 30, 48 und 96 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 sowie in den Tabellen 3.7 und 3.8 wiedergegeben.

Mit zunehmender Dauer in Kultur veränderten sich die Anteile capsaicinempfindlicher und galaninerger Neurone ähnlich wie unter Axotomiebedingungen: Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone ging in linearer Weise zurück, und zwar von 61 % nach 6 h auf 14% nach 96 h. Hingegen verzehnfachte sich der Anteil galaninerger Neurone von 2 % auf 20 % in diesem Zeitraum. Ab dem zweiten Tag waren sowohl die Abnahme der capsaicinempfindlichen als auch der Anstieg der galaninergen Population signifikant gegenüber den entsprechenden Ausgangswerten nach 6 h Kultur (*post hoc* LSD-Test). Die mittlere Querschnittsfläche der capsaicinempfindlichen Neurone sank mit zunehmender Dauer in Kultur von 613 μm^2 auf 402 μm^2 , die der galaninergen Neurone von 895 μm^2 auf 383 μm^2 .

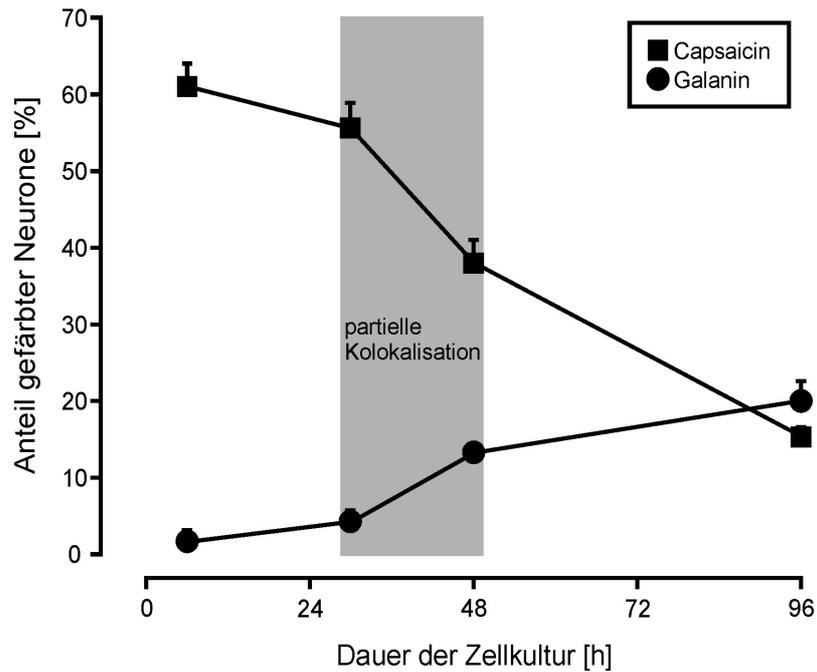


Abbildung 3.7. Anteil der capsaicinempfindlichen (Quadrate) und galaninergen (Kreise) Neurone an der Gesamtpopulation mit zunehmender Dauer in Kultur. Nach 30 und 48 h war ein Teil der Neurone doppeltgefärbt (grau unterlegt). Neurone aus SG aller segmentalen Ebenen von unverletzten Ratten ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren.

Kulturdauer [h]	Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern	Anteil capsaicinempfindlicher Neurone [%]	Anteil galaninergener Neurone [%]
6	3 (300)	61 ± 3	2 ± 1
30	6 (600)	56 ± 2	4 ± 1
48	3 (300)	38 ± 3	13 ± 1
96	3 (300)	14 ± 1	20 ± 3

Tabelle 3.7. Anteil capsaicinempfindlicher und galaninexprimierender Neurone an der Gesamtpopulation mit zunehmender Dauer in Kultur. Neurone aus SG aller segmentalen Ebenen von unverletzten Ratten ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Diese Daten beziehen sich auf Abbildung 3.7.

Kulturdauer [h]	Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern	Querschnittsfläche capsaicinempfindlicher Neurone [μm^2]	Querschnittsfläche galaninerner Neurone [μm^2]
6	3 (300)	613 \pm 19	895 \pm 140
30	6 (600)	653 \pm 14	576 \pm 33
48	3 (300)	525 \pm 20	503 \pm 34
96	3 (300)	402 \pm 34	383 \pm 15

Tabelle 3.8. *Mittlere Querschnittsflächen von capsaicinempfindlichen und galaninergen Neuronen mit zunehmender Dauer in Kultur. Neurone aus SG aller segmentalen Ebenen von unverletzten Ratten ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren.*

Hinsichtlich der Überschneidung der capsaicinempfindlichen und galaninergen Populationen gab es einen Unterschied zu den Neuronen aus unverletzten Ratten in Kurzzeitkultur und denen aus Ratten mit experimenteller Axotomie *in vivo*: Nach 30 und 48 h in Kultur - nicht jedoch nach 6 h oder 96 h - gab es einzelne Neurone, die sowohl capsaicinempfindlich als auch galaninerg waren. Nach 30 h waren 6 \pm 1% der Gesamtpopulation doppeltgefärbt. Dies entsprach 11 \pm 2% aller capsaicinempfindlichen und 49 \pm 9% aller galaninergen Neurone. Diese doppeltgefärbten Neurone hatten eine mittlere Querschnittsfläche von 503 \pm 30 μm^2 . Nach 2 d in Kultur sank der Anteil doppeltgefärbter Neurone an der Gesamtpopulation auf 2 \pm 0%, die mittlere Querschnittsfläche betrug 417 \pm 72 μm^2 .

Da die beobachtete Kolo-kalisation von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression mit Neuronen aller segmentalen Ebenen gemacht wurde, wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe geprüft, ob dieses Phänomen auch in Neuronen aus SG der Ebenen L4/5 auftritt. Hierzu wurden Neurone aus 3 unabhängigen Kulturen von 3 Ratten nach 30 h in Kultur untersucht. Auch hier fand sich eine Doppelfärbung, und zwar in 3 \pm 1% aller Neurone, deren Querschnittsfläche 523 \pm 82 μm^2 betrug (Daten nicht gezeigt).

3.6 Neurone unverletzter Ratten in Langzeitkultur mit Wachstumsfaktoren

In diesen Experimenten wurde analysiert, ob die Regulation von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression in Langzeitzellkulturen durch die Gabe neurotropher Wachstumsfaktoren ins Kulturmedium beeinflusst werden kann. Dazu wurden Neurone aller segmentalen Ebenen aus 15 Kulturen von 3 Ratten auf Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression untersucht. Das Kulturmedium war wahlweise ohne Wachstumsfaktoren oder mit NGF (50 ng/ml), GDNF (50 ng/ml) oder beiden Faktoren angereichert; die Kulturdauer betrug 6 und 96 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 und Tabelle 3.9 dargestellt.

Die Abnahme des Anteils capsaicinempfindlicher Neurone nach 96 h Kultur wurde durch NGF oder GDNF allein etwa gleich stark abgeschwächt, bei gleichzeitiger Präsenz beider Faktoren im Medium war dieser Effekt am stärksten, und in allen drei Fällen war diese Abnahme gegenüber dem Wert nach 96 h ohne Trophine signifikant verschieden (*post hoc* LSD-Test). Der Anteil galaninerner Neurone nach 96 h Kultur war unter dem Einfluß von NGF, GDNF oder beiden Faktoren nicht signifikant verschieden vom Ausgangswert nach 6 h, wohl aber gegenüber dem Wert nach 96 h ohne Trophine (*post hoc* LSD-Test). Eine Kolo-kalisation von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression nach 96 h Kultur war unter NGF in 3, unter GDNF in 2 und unter dem Einfluß beider Trophine in 5 von jeweils 450 ausgewerteten Neuronen zu sehen. Insgesamt war in allen Ansätzen mit Trophinen etwa 1% aller Neurone doppeltgefärbt.

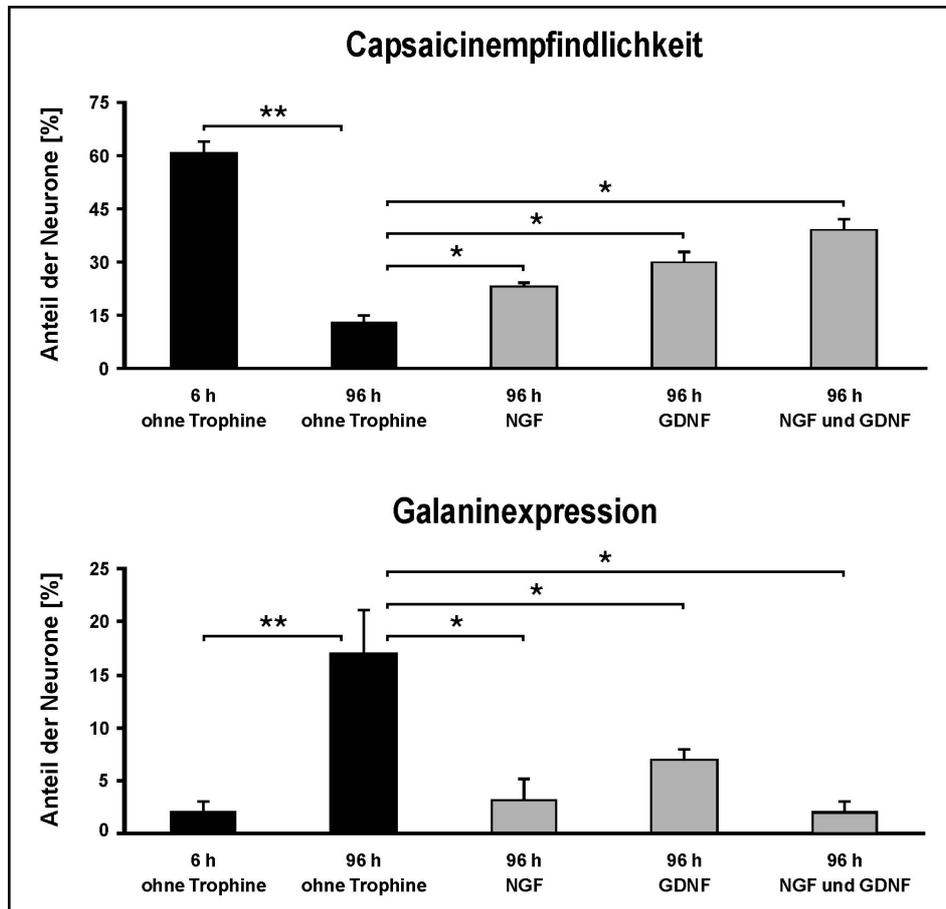


Abbildung 3.8. Anteil capsaicinempfindlicher (oben) und galaninerger (unten) Neurone an der Gesamtpopulation unter verschiedenen Kulturbedingungen. Mit einem Stern gekennzeichnete Werte sind gegenüber denen unter der Kulturbedingung „96 h ohne Trophine“ signifikant verschieden; mit zwei Sternen gekennzeichnete Werte sind gegenüber denen der Kulturbedingung „6 h ohne Trophine“ hochsignifikant verschieden ($p < 0,001$). Neurone aus SG aller Ebenen von unverletzten Ratten.

<i>Kulturbedingungen</i>	<i>Anzahl der Kulturen und Anzahl der Neurone in Klammern</i>	<i>Anteil capsaicinempfindlicher Neurone [%]</i>	<i>Anteil galaninerger Neurone [%]</i>	<i>Anzahl doppeltgefärbter Neurone</i>
6 h ohne Trophine	3 (450)	61 ± 3	2 ± 1	0
96 h ohne Trophine	3 (400)	13 ± 2	17 ± 4	0
96 h NGF	3 (450)	23 ± 1	3 ± 2	3
96 h GDNF	3 (450)	30 ± 3	7 ± 1	2
96 h GDNF und NGF	3 (450)	39 ± 3	2 ± 1	5

Tabelle 3.9. Anteil capsaicinempfindlicher und galaninexprimierender Neurone an der Gesamtpopulation und Anzahl doppeltgefärbter Neurone unter verschiedenen Kulturbedingungen. Neurone aus SG aller Ebenen von unverletzten Ratten. Diese Daten liegen der Abbildung 3.8 zugrunde.

4 DISKUSSION

Durch die bei dieser Arbeit eingesetzte Doppelfärbung konnten an isolierten Neuronen gleichzeitig die Capsaicinempfindlichkeit und die Expression von Galanin untersucht werden. Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone sank nach einer Axotomie, der galaninerge Anteil hingegen stieg. Dabei waren keine Neurone gleichzeitig capsaicinempfindlich und galaninerger. Hingegen wurden *in vitro* Bedingungen gefunden, unter denen ein geringer Anteil der Neurone doppelgefärbt war. Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Größenverteilung und mit Daten aus der Literatur deutet dies darauf hin, daß die *de novo* galaninerge Population nach Axotomie aus derjenigen Population hervorgeht, die ihre Capsaicinempfindlichkeit verliert. Galanin könnte demnach ein geeigneter Marker sein für ehemals capsaicinempfindliche Nozizeptoren, die infolge einer Axotomie VR1 herunterreguliert haben.

4.1 Die Kobaltaufnahmemethode dient dem funktionellen Nachweis von Capsaicinempfindlichkeit

Zum Nachweis von capsaicinempfindlichen Nozizeptoren wird die Kobaltaufnahmemethode eingesetzt (Hogan, 1983; Winter, 1987). Dabei wird durch Aktivierung des membrangebundenen Capsaicinrezeptors VR1 die Capsaicinempfindlichkeit an lebenden Neuronen funktionell dedektiert (Caterina *et al.*, 1997; Helliwell *et al.*, 1998). Mit dieser Methode wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Capsaicin erstellt. Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone stieg mit zunehmender Dosis und näherte sich einem Sättigungsbereich. Bei einer Konzentration von 10 μ M waren maximal zwei Drittel aller Neurone capsaicinempfindlich, die EC_{50} lag bei 100 nM. Dies stimmt mit der Literatur überein: In früheren Untersuchungen nach mehreren Tagen in Kultur war die Hälfte aller Neurone capsaicinempfindlich, die EC_{50} betrug mit dieser und mit der sensitiven „calcium-imaging“-Methode 200 nM (Winter 1987; Wood *et al.*, 1988). Mit der hochspezifischen *in situ*-Hybridisierungsmethode wurde eine Expression der VR1 mRNA in der Hälfte aller Neurone nachgewiesen (Michael und Priestley, 1999). Mit der hier verwendeten Kobaltaufnahmemethode liegt demnach ein sensibles und spezifisches Verfahren vor, welches als funktioneller Nachweis von Capsaicinempfindlichkeit einen Rückschluß auf die

Expression von VR1 in diesen Neuronen sowie auf deren Funktion als Nozizeptoren erlaubt.

4.2 Die Capsaicinempfindlichkeit sinkt nach Axotomie und in Kultur aufgrund eines Mangels an neurotrophen Faktoren

Sowohl nach einer Axotomie als auch in Zellkultur nahm der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone stark ab. Stets gehörten diese Neurone zu den kleinen oder mittelgroßen Zellen. Die Herunterregulation *in vitro* war reversibel, wenn dem Kulturmedium NGF und / oder GDNF hinzugegeben wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein (Winter, 1987; Winter *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1988; Hu-Tsai *et al.*, 1996; Michael und Priestley, 1999; Ogun-Muyiwa *et al.*, 1999). Die Neurone mit GDNF-Rezeptoren konnten durch IB4-Markierung nachgewiesen werden: Etwa ein Drittel der Gesamtpopulation band diesen Marker. Durch Doppelfärbung konnten die capsaicinempfindlichen Neurone in eine etwa gleich große IB4-positive, also GDNF-abhängige, und eine IB4-negative und somit NGF-abhängige Subpopulation aufgeteilt werden. Damit werden ebenfalls frühere Arbeiten bestätigt (Silverman und Kruger, 1988; Bennett *et al.*, 1998). Die in etwa gleiche Größe der NGF- und GDNF-abhängigen Subpopulation erklärt, daß die *in vitro* beobachtete Erhaltung der Capsaicinempfindlichkeit durch NGF annähernd gleich stark war wie durch GDNF und daß beide Faktoren gemeinsam einen additiven Effekt hatten.

Die Capsaicinempfindlichkeit wird in vitro schneller und auf ein niedrigeres Niveau als in vivo herunterreguliert. Ein Vergleich des Zeitverlaufs zur Abnahme der Capsaicinempfindlichkeit nach Axotomie *in vivo* (Abb. 3.4) und in Kultur (Abb. 3.7) zeigt, daß die Herunterregulation *in vivo* nach einer Woche sistierte und etwa ein Viertel aller Neurone capsaicinempfindlich blieb. *In vitro* war dieses Niveau schon nach einigen Tagen erreicht, und auch nach Erreichen dieses Niveaus sank der Anteil weiter ab. Somit war die Abnahme des Anteils capsaicinempfindlicher Neurone *in vitro* schneller und stärker als *in vivo*. Zudem gab es nur *in vivo* einen Anteil capsaicinempfindlicher Neurone, der von der Axotomie unbeeinflusst war. Dies hat anatomische und methodische Gründe: (i) Nicht alle Neurone der untersuchten SG aus L4/5 projizieren in den axotomierten *N. ischiadicus*, sondern lediglich die Hälfte bis zwei Drittel (Devor *et al.*, 1985; Aldskogius *et al.*, 1988). Hingegen werden bei der Herstellung ei-

ner Zellkultur die Fortsätze sämtlicher Neurone abgetrennt. Es wird also eine komplett axotomierte Population *in vitro* mit einer *in vivo* nur teilweise axotomierten Population verglichen. Diejenigen capsaicinempfindlichen Neurone, die von der Axotomie *in vivo* nicht beeinflußt werden, entstammen wahrscheinlich der unverletzten Population. (ii) Die Axotomie *in vivo* geschieht einige Zentimeter vom Perikaryon entfernt, während die Nervenfortsätze bei der Kultur unmittelbar proximal abgetrennt werden. Die verletzten Neurone *in vivo* unterliegen demnach zu Beginn der Axotomie noch dem Einfluß von dem NGF und GDNF, welches sich proximal der Läsion in den Axonen befindet. Dies könnte die beobachtete Latenz zwischen Axotomie und Einsetzen der Herunterregulation *in vivo* erklären. Die Neurone *in vitro* hingegen sind von Beginn an vollständig NGF- und GDNF-depriviert, so daß die beobachtete schnellere Abnahme der Capsaicinempfindlichkeit zu erwarten war.

4.3 Galanin unterliegt ebenfalls dem Einfluß neurotropher Faktoren, wird jedoch nach Axotomie und in Kultur hochreguliert

Der Anteil galaninerner Neurone verzehnfachte sich sowohl nach einer Axotomie als auch in Kultur. Die konstitutiv galaninergen Neurone waren mittelgroß bis groß, die *de novo* galaninergen Neurone klein oder mittelgroß. Berichte anderer Gruppen bestätigen diese Ergebnisse im wesentlichen, wenngleich mit anderen Methoden eine etwas geringere Zellgröße konstitutiv galaninerner Neurone beschrieben wurde (Kerekes *et al.*, 1997; Corness *et al.*, 1998). Auch der beobachtete hemmende Effekt von NGF auf die Hochregulation *in vitro* ist bekannt (Kerekes *et al.*, 1997), nicht jedoch die in dieser Arbeit gefundene, ebenfalls hemmende Wirkung von GDNF. Bemerkenswerterweise waren beide Faktoren allein in der Lage, die Galaninhochregulation praktisch vollständig zu unterdrücken. Die schnellere Hochregulation *in vitro* als *in vivo* läßt sich mit den im oberen Abschnitt bereits näher ausgeführten unterschiedlichen anatomischen und methodischen Bedingungen erklären.

4.4 Eine „chronic constriction injury“ verändert weder Capsaicinempfindlichkeit noch Galaninexpression

In dem untersuchten Zeitraum war kein Einfluß einer CCI auf den Anteil und auf die Zellgröße capsaicinempfindlicher oder galaninerner Neurone zu beobachten. Dieses Ergebnis weicht von Daten aus der Literatur ab, in der von einer leichten, jedoch nicht signifikanten Abnahme der VR1-Expression (Schäfers *et al.*, 2003) und einer starken Zunahme des Anteils galaninerner Neurone berichtet wird (Nahin *et al.*, 1994; Ma und Bisby, 1999). Für diese Diskrepanz sind methodische Unterschiede ursächlich denkbar. In den zitierten Publikationen wurden die CCI-Experimente mit chromiertem und mit Pyrogallol behandeltem Nahtmaterial aus Rinderdarm durchgeführt. Dieses Material ist in Deutschland wegen der bovinen spongiformen Enzephalopathie nicht mehr zugelassen, so daß in der vorliegenden Arbeit stattdessen Seidenfäden benutzt wurden. Untersuchungen belegen jedoch, daß Chromionen und Pyrogallol einen entscheidenden Anteil an der neuropathischen Komponente der CCI haben (Maves *et al.*, 1993). Daher ist es möglich, daß die hier eingesetzte Variante der CCI nicht ausgereicht hat, den retrograden Transport von NGF und GDNF zu unterbinden und die Induktion von LIF zu bewirken. Diese als entscheidend erachteten Veränderungen der Verfügbarkeit neurotropher Faktoren für eine Hochregulation von Galanin und Herunterregulation der Capsaicinempfindlichkeit wären damit nicht gegeben (Winter *et al.*, 1988; Corness *et al.*, 1998; Ogun-Muyiwa *et al.*, 1999).

4.5 Die Kolokalisationsuntersuchungen lassen auf einen Zusammenhang zwischen Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression schließen

Weder nach einer Axotomie noch nach einer CCI fanden sich Neurone, die gleichzeitig capsaicinempfindlich und galaninexprimierend waren. Während die CCI keinen Einfluß auf Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression hatte, führte eine Axotomie zu starken Veränderungen: Der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone sank stark ab, Galanin hingegen wurde vermehrt exprimiert. Von besonderem Interesse war in dieser Arbeit die Frage, aus welcher Population die nach einer Axotomie *de novo* galaninergen Neurone hervorgehen. Formal sind drei Möglichkeiten denkbar, die im einzelnen erörtert werden sollen:

(i) *Vollzieht sich die Hochregulation von Galanin in physiologischerweise nicht-capsaicinempfindlichen Neuronen?* Der maximale Anteil galanin-exprimierender Neurone von einem Drittel ist gleichgroß wie der Anteil nicht-capsaicinempfindlicher Neurone unter physiologischen Bedingungen. Da keine Kolokalisation beobachtet wurde, liegt es nahe, zu vermuten, daß die *de novo* galaninerge Population aus dieser physiologischerweise nicht-capsaicinempfindlichen Population hervorgeht. Dies würde zweierlei bedeuten: zum einen, daß die nicht-capsaicinempfindlichen Neurone dem Einfluß von LIF unterliegen und kein NGF mehr retrograd transportieren; zum anderen, daß aus arithmetischen Gründen Galanin auch in unverletzten nicht-capsaicinempfindlichen Neuronen hochreguliert wird (Devor *et al.*, 1985; Aldskogius *et al.*, 1988). Aus der Literatur ist jedoch bekannt, daß die Rezeptoren für LIF zu einem überwiegenden Anteil auf capsaicinempfindlichen Neuronen vorhanden sind (Thompson *et al.*, 1997). Zudem ist eine Hochregulation von Galanin in unverletzten Neuronen nicht beschrieben worden.

Somit sind die Voraussetzungen für die Hochregulation von Galanin in nicht-capsaicinempfindlichen Neuronen über die einzigen bislang bekannten Mechanismen, nämlich LIF-Induktion und NGF-Deprivation, nicht gegeben: Zum einen müßte Galanin in unverletzten Neuronen hochreguliert werden; diese unterliegen jedoch weiterhin dem Einfluß von NGF. Zum anderen müßte LIF an nicht-capsaicinempfindliche Neurone binden; von diesen bindet jedoch nur eine Minderheit an diesen Faktor.

(ii) *Sterben nicht-galaninerge Neurone selektiv ab?* Der beobachtete Anstieg der galaninergen Population könnte durch einen Untergang nicht-galaninergener Neurone zustandekommen. Dies würde eine relative Erhöhung des Anteils galaninergener Neurone bedingen und impliziert ein selektives Überleben galaninergener Neurone. Dafür spricht die regenerative Wirkung *in vitro* von Galanin in Verbindung mit dem Rezeptorsubtyp 2 und der Nachweis dieses Rezeptors an Neuronen in SG (O'Donnell *et al.*, 1999; Mahoney *et al.*, 2003). Die Voraussetzungen für eine autokrine Regulation sind somit erfüllt. Dagegen sprechen jedoch Untersuchungen zum Absterben von Neuronen nach Axotomie: Eine Abnahme der Neuronenzahl ist in der Literatur frühestens nach 30 d beschrieben worden, und diese Abnahme betrug lediglich zwischen 5 und 26% der gesamten Population (Arvidsson *et al.*, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein Zeitraum von bis zu 14 d untersucht, zudem war die Hochregulation von Galanin bereits nach 4 d signifikant vom Kontrollwert ver-

schieden. Ein Absterben von Neuronen nach einer Axotomie in dem untersuchten Zeitraum erscheint somit unwahrscheinlich.

(iii): *Geschieht die de novo Galaninexpression in ehemals capsaicinempfindlichen Neuronen?* Die Hochregulation von Galanin nach Axotomie könnte sich in denjenigen Neuronen vollziehen, die unter physiologischen Umständen capsaicinempfindlich sind. Wegen der fehlenden Kolo-kalisation wäre dann zu fordern, daß die Herunterregulation der Capsaicinempfindlichkeit im einzelnen Neuron der Hochregulation vorausgeht. Folgende Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und folgende Daten aus der Literatur sprechen für diese Hypothese:

Das Größenverteilungsprofil galaninerner Neurone nach Axotomie ist demjenigen von capsaicinempfindlichen Neuronen unter physiologischen Bedingungen sehr ähnlich. Als Beispiel dienen die Größenverteilungshistogramme in Kontrollexperimenten und nach 10 d Axotomie (Abb. 3.5). Sowohl die galaninergen Neurone nach Axotomie als auch die capsaicinempfindlichen Neurone in Kontrolluntersuchungen gehörten überwiegend zu den kleinen bis mittelgroßen Zellen. Diese morphologische Ähnlichkeit stützt die Hypothese.

Wenn *de novo* galaninerge Neurone zuvor capsaicinempfindlich waren und mit zunehmender Dauer einer Axotomie der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone sinkt, muß die Summe aus dem Anteil capsaicinempfindlicher und dem Anteil galaninerner Neurone folgende Bedingung erfüllen: Sie darf zu keinem Zeitpunkt größer sein als unter Kontrollbedingungen. Ansonsten müßte Galanin auch in solchen Neuronen hochreguliert werden, die physiologischerweise nicht-capsaicinempfindlich sind. In der vorliegenden Arbeit war die Summe der Anteile capsaicinempfindlicher und galaninerner Neurone zu keinem der untersuchten Zeitpunkte größer als unter Kontrollbedingungen (Tab. 3.3, Abb. 3.6).

In Ratten, die neonatal systemisch mit Capsaicin behandelt werden, kommt es zu einer Degeneration von capsaicinempfindlichen Nozizeptoren (Jancsó *et al.*, 1977; Jancsó und Kiraly, 1980; Scadding, 1980). Bei solchen Ratten wurde beobachtet, daß die Hochregulation von Galanin nach chemischer Reizung mit dem Spindelgift Colchicin ausbleibt (Skofitsch und Jacobowitz, 1985). Eine Hochregulation von Galanin erfordert also das Vorhandensein von capsaicinempfindlichen Neuronen. Dies untermauert die vorgeschlagene Hypothese der Hochregulation in ehemals capsaicinempfindlichen Neuronen.

Zusammenfassend gibt es somit mehrere Hinweise dafür, daß ein *de novo* galaninerges Neuron nach einer Axotomie zuvor capsaicinempfindlich gewesen sein muß.

Kolokalisation in isolierten Neuronen unter speziellen Kulturbedingungen. In einem bestimmten Zeitrahmen und unter Zugabe bestimmter neurotropher Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium waren einige Neurone *in vitro* sowohl capsaicinempfindlich als auch galaninerg. In serumfreiem Medium ohne Wachstumsfaktoren waren nach 30 und 48 h, nicht aber nach 6 oder 96 h zwischen 6 und 11% aller Neurone doppeltgefärbt. Wurden dem Medium NGF oder GDNF hinzugefügt, fanden sich auch nach 96 h vereinzelt doppeltgefärbte Neurone. Diese Kolokalisation *in vitro* kann als weiterer Hinweis auf den vorgeschlagenen Mechanismus gelten, daß die Hochregulation von Galanin in physiologischerweise capsaicinempfindlichen Neuronen stattfindet.

4.6 Schlußfolgerungen und Ausblick

In der vorgelegten Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, daß die galaninerge Population nach einer Axotomie aus der physiologischerweise capsaicinempfindlichen Population hervorgeht. Hinweise darauf ergeben sich aus der Verschiebung der Größenverteilung nach Axotomie und aus den *in vitro* Experimenten unter Einsatz von NGF und GDNF. Diese Hypothese wird durch Daten aus der Literatur unterstützt.

Bemerkenswerterweise impliziert die aufgestellte Hypothese im Zusammenhang mit der fehlenden Kolokalisation, daß im einzelnen Neuron die Herunterregulation der Capsaicinempfindlichkeit der Hochregulation von Galanin zeitlich vorausgeht. Dies mag mit der Sensitivität und Spezifität der hier verwendeten Methoden zusammenhängen. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, daß der zeitlichen Trennung von Capsaicinempfindlichkeit und Galaninexpression Mechanismen – etwa auf Transkriptionsebene – zugrundeliegen, die Hinweise auf die Funktion der Neurone geben können. Gerade bei neuropathischen Schmerzzuständen ist nur teilweise klar, welche Neurone und welche Mechanismen an ihrer Entstehung beteiligt sind. In letzter Zeit wurde eine Reihe von Rezeptoren und Kanälen entdeckt bzw. postuliert, die unter neuropathischen Bedingungen eine Rolle spielen könnten und somit potentielle An-

griffspunkte für neue Medikamente zur Behandlung neuropathischer Schmerzen darstellen (Okuse *et al.*, 1997; Coward *et al.*, 2000; Marín-Burgin *et al.*, 2000). Dabei ist die Rolle der ehemals capsaicinempfindlichen Neurone nach Axotomie ungeklärt, jedoch liegt die Vermutung nahe, daß sie nach einer Axotomie ihre Funktion als Nozizeptoren beibehalten und andere, mit neuropathischen Zuständen assoziierte Rezeptoren und Kanäle von gerade diesen Neuronen exprimiert werden. Die vorgestellte Arbeit legt nahe, daß Galanin als einfach nachzuweisendes Neuropeptid ein geeigneter Marker für diese ehemals capsaicinempfindlichen Nozizeptoren ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Plastizität von Nozizeptoren kann eine der Ursachen für neuropathische Schmerzen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der Capsaicinempfindlichkeit und der Galaninexpression in einzelnen Spinalganglionneuronen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Diese Eigenschaften wurden gewählt, weil beide nach experimentellen Nervenverletzungen starken Veränderungen unterliegen und weil beide über „nerve growth factor“ reguliert werden. Neurone von Ratten mit experimenteller Axotomie oder „chronic constriction injury“ des *N. ischiadicus* wurden mit entsprechenden Neuronen von unverletzten Ratten unter Kulturbedingungen verglichen. Der gleichzeitige Nachweis beider Eigenschaften erfolgte in isolierten Neuronen durch eine Doppelfärbung, bei der die Capsaicinempfindlichkeit mittels Kobaltaufnahme und die Galaninexpression immunzytochemisch nachgewiesen wurden.

Mit zunehmender Dauer einer Axotomie und mit zunehmender Dauer in Kultur sank der Anteil capsaicinempfindlicher Neurone. Gleichzeitig kam es zu einer starken Hochregulation von Galanin. Diese Effekte waren *in vitro* durch die Zugabe von „nerve growth factor“ oder „glial cell line-derived neurotrophic factor“ reversibel. Mit zunehmender Dauer einer „chronic constriction injury“ hingegen veränderten sich diese Populationen nicht.

Die Analyse doppeltgefärbter Neurone ergab, daß nach einer Axotomie kein einziges Neuron gleichzeitig capsaicinempfindlich und galaninerg war. Unter bestimmten Kulturbedingungen sah man jedoch vereinzelt eine Doppelfärbung. Die nach einer Axotomie *de novo* galaninergen Neurone hatten ein Größenverteilungsprofil, das demjenigen von unverletzten capsaicinempfindlichen Neuronen stark ähnelte. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Hochregulation von Galanin das Vorhandensein capsaicinempfindlicher Neurone voraussetzt. In dieser Arbeit wird daher die Hypothese aufgestellt, daß die nach einer Axotomie galaninergen Neurone zuvor capsaicinempfindlich gewesen sein müssen. Dies impliziert, daß im einzelnen Neuron die Hochregulation von Galanin erst nach einer Herabregulation der Capsaicinempfindlichkeit geschieht. Ob diese Sequenz eine funktionelle Bedeutung hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Es liegt nahe, daß Galanin als Markerpeptid gelten kann, mit dem in künftigen Untersuchungen neuropathischer Zustände der Nozizeption diejenigen Neurone identifiziert werden können, die zuvor im unverletzten Zustand capsaicinempfindliche Nozizeptoren waren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aldskogius, H., Wiesenfeld-Hallin, Z. und Kristensson, K. (1988) *Selective neuronal destruction by Ricinus communis agglutinin I and its use for the quantitative determination of sciatic nerve dorsal root ganglion cell numbers.* Brain Res **461**(2):215-20.

Amaya, F., Oh-hashii, K., Naruse, Y., Iijima, N., Ueda, M., Shimosato, G., Tominaga, M., Tanaka, Y. und Tanaka, M. (2003) *Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons.* Brain Res **963**(1-2):190-6.

Amir, R. und Devor, M. (1993) *Ongoing activity in neuroma afferents bearing retrograde sprouts.* Brain Res **630**(1-2):283-8.

Arvidsson, J., Ygge, J. und Grant, G. (1986) *Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat.* Brain Res **373**(1-2):15-21.

Averill, S., McMahon, S. B., Clary, D. O., Reichardt, L. F. und Priestley, J. V. (1995) *Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons.* Eur J Neurosci **7**(7):1484-94.

Bader, R. und Gallacchi, G., Hrsg. (2001) *Schmerzkompandium.* Thieme, Stuttgart: 77.

Baloh, R. H., Tansey, M. G., Golden, J. P., Creedon, D. J., Heuckeroth, R. O., Keck, C. L., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Johnson, E. M., Jr. und Milbrandt, J. (1997) *TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret.* Neuron **18**(5):793-802.

Banner, L. R. und Patterson, P. H. (1994) *Major changes in the expression of the mRNAs for cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor and its receptor after injury to adult peripheral nerves and ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15):7109-13.

Bartfai, T., Hökfelt, T. und Langel, U. (1993) *Galanin – a neuroendocrine peptide*. Crit Rev Neurobiol **7**(3-4):229-74.

Bennett, G. J. und Xie, Y. K. (1988) *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*. Pain **33**(1):87-107.

Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., Munson, J. B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S. B. und Priestley, J. V. (1998) *A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury*. J Neurosci **18**(8):3059-72.

Bevan, S. und Szolcsányi, J. (1990) *Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications*. Trends Pharmacol Sci **11**(8):330-3.

Bevan, S. und Winter, J. (1995) *Nerve growth factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons*. J Neurosci **15**(7 Pt 1):4918-26.

Blakeman, K. H., Hao, J. X., Xu, X. J., Jacoby, A. S., Shine, J., Crawley, J. N., Iijima, T. und Wiesenfeld-Hallin, Z. (2003) *Hyperalgesia and increased neuropathic pain-like response in mice lacking galanin receptor 1 receptors*. Neuroscience **117**(1):221-7.

Bloch, G. J., Butler, P. C., Eckersell, C. B. und Mills, R. H. (1998) *Gonadal steroid-dependent GAL-IR cells within the medial preoptic nucleus (MPN) and the stimulatory effects of GAL within the MPN on sexual behaviors*. Ann N Y Acad Sci **863**:188-205.

Blumenkopf, B. und Lipman, J. J. (1991) *Studies in autotomy: its pathophysiology and usefulness as a model of chronic pain*. Pain **45**(2):203-9.

Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C. und Walker, M. W. (2000) *Galanin receptor subtypes*. Trends Pharmacol Sci **21**(3):109-17.

Bron, R., Klesse, L. J., Shah, K., Parada, L. F. und Winter, J. (2003) *Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors*. Mol Cell Neurosci **22**(1):118-32.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. und Julius, D. (1997) *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature **389**(6653):816-24.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. und Julius, D. (2000) *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor*. Science **288**(5464):306-13.

Chao, M. V., Bothwell, M. A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A. A., Buck, C. R. und Sehgal, A. (1986) *Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor*. Science **232**(4749):518-21.

Chard, P. S., Bleakman, D., Savidge, J. R. und Miller, R. J. (1995) *Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases*. Neuroscience **65**(4):1099-108.

Chen, Y. und Devor, M. (1998) *Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis*. Eur J Pain **2**(2):165-178.

Ch'ng, J. L., Christofides, N. D., Anand, P., Gibson, S. J., Allen, Y. S., Su, H. C., Tatemoto, K., Morrison, J. F., Polak, J. M. und Bloom, S. R. (1985) *Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the responses of galanin-containing neuronal pathways to injury*. Neuroscience **16**(2):343-54.

Coderre, T. J., Grimes, R. W. und Melzack, R. (1986) *Autotomy following sciatic and saphenous nerve sections: sparing of the medial toes after treatment of the sciatic nerve with capsaicin*. Exp Neurol **91**(2):355-65.

Corness, J., Shi, T. J., Xu, Z. Q., Brulet, P. und Hökfelt, T. (1996) *Influence of leukemia inhibitory factor on galanin/GMAP and neuropeptide Y expression in mouse primary sensory neurons after axotomy*. Exp Brain Res **112**(1):79-88.

Corness, J., Stevens, B., Fields, R. D. und Hökfelt, T. (1998) *NGF and LIF both regulate galanin gene expression in primary DRG cultures*. Neuroreport **9**(7):1533-6.

Coward, K., Plumpton, C., Facer, P., Birch, R., Carlstedt, T., Tate, S., Bountra, C. und Anandp, P. (2000) *Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states*. Pain **85**(1-2):41-50.

Crawley, J. N. (1996) *Minireview. Galanin-acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease*. Life Sci **58**(24):2185-99.

Davies, A. M. (1996) *The neurotrophic hypothesis: where does it stand?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1338):389-94.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A. und Sheardown, S. A. (2000) *Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia*. Nature **405**(6783):183-7.

Devor, M., Govrin-Lippmann, R., Frank, I. und Raber, P. (1985) *Proliferation of primary sensory neurons in adult rat dorsal root ganglion and the kinetics of retrograde cell loss after sciatic nerve section*. Somatosens Res **3**(2):139-67.

Devor, M. und Seltzer, Z. (1999) *Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain*. Aus: Textbook of Pain, 4. Auflage. Churchill Livingstone, Edinburgh: 130.

Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C. V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M. und *et al.* (1996) *GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase*. Nature **381**(6585):789-93.

Fields, H. L. und Basbaum, A. I. (1999) *Central nervous system mechanisms of pain modulation*. Aus: Textbook of Pain, 4. Auflage. Churchill Livingstone, Edinburgh: 309.

Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T. und Noguchi, K. (1998) *Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model*. Pain **78**(1):13-26.

Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D. und Beckmann, M. P. (1991) *Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130*. *Embo J* **10**(10):2839-48.

Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B. und *et al.* (1992) *The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor*. *Science* **255**(5050):1434-7.

Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A. und Davis, J. B. (2002) *The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels*. *Trends Pharmacol Sci* **23**(4):183-91.

Gustafson, E. L., Smith, K. E., Durkin, M. M., Gerald, C. und Branchek, T. A. (1996) *Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain*. *Neuroreport* **7**(4):953-7.

Habert-Ortoli, E., Amiranoff, B., Loquet, I., Laburthe, M. und Mayaux, J. F. (1994) *Molecular cloning of a functional human galanin receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21):9780-3.

Helliwell, R. J., McLatchie, L. M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S. und McIntyre, P. (1998) *Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia*. *Neurosci Lett* **250**(3):177-80.

Heumann, R. (1987) *Regulation of the synthesis of nerve growth factor*. *J Exp Biol* **132**(133-50).

Hogan, P. G. (1983) *Expression of markers for pain sensory neurons in cell culture*. PhD Dissertation, Harvard Universität, Cambridge, Massachusetts, USA.

Hökfelt, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M. und Melander, T. (1987) *Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy*. *Neurosci Lett* **83**(3):217-20.

Hökfelt, T., Broberger, C., Diez, M., Xu, Z. Q., Shi, T., Kopp, J., Zhang, X., Holmberg, K., Landry, M. und Koistinaho, J. (1999) *Galanin and NPY, two peptides with multiple putative roles in the nervous system*. Horm Metab Res **31**(5):330-4.

Holmes, F. E., Mahoney, S., King, V. R., Bacon, A., Kerr, N. C., Pachnis, V., Curtis, R., Priestley, J. V. und Wynick, D. (2000) *Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21):11563-8.

Holzer, P., Jurna, I., Gamse, R. und Lembeck, F. (1979) *Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment*. Eur J Pharmacol **58**(4):511-4.

Hu-Tsai, M., Woolf, C. und Winter, J. (1996) *Influence of inflammation or disconnection from peripheral target tissue on the capsaicin sensitivity of rat dorsal root ganglion sensory neurones*. Neurosci Lett **203**(2):119-22.

Iismaa, T. P. und Shine, J. (1999) *Galanin and galanin receptors*. Results Probl Cell Differ **26**(257-91).

Jancsó, G., Kiraly, E. und Jancsó-Gabor, A. (1977) *Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones*. Nature **270**(5639):741-3.

Jancsó, G., Savay, G. und Kiraly, E. (1978) *Appearance of histochemically detectable ionic calcium in degenerating primary sensory neurons*. Acta Histochem **62**(2):165-9.

Jancsó, G. und Kiraly, E. (1980) *Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the central nervous system of the rat*. J Comp Neurol **190**(4):781-92.

Janjua, M. Z. und Leong, S. K. (1984) *Organization of neurons forming the femoral, sciatic, common peroneal and tibial nerves in rats and monkeys*. Brain Res **310**(2):311-23.

Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J. C., Hu, S., Altmann, B. W. und Fox, G. M. (1996) *GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF*. Cell **85**(7):1113-24.

Johnson, E. M. Jr., Taniuchi, M., Clark, H. B., Springer, J. E., Koh, S., Tayrien, M. W. und Loy, R. (1987) *Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system*. J Neurosci **7**(3):923-9.

Jordt, S. E. und Julius, D. (2002) *Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers*. Cell **108**(3):421-30.

Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J. A., Frey, P., Elde, R. P. und Brown, J. C. (1987) *Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystikinin-immunoreactive ganglion cells*. Cell Tissue Res **247**(2):417-31.

Jung, J., Hwang, S. W., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Kim, W. B., Kim, D. und Oh, U. (1999) *Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel*. J Neurosci **19**(2):529-38.

Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V. und Parada, L. F. (1991) *The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor*. Science **252**(5005):554-8.

Kar, S. und Quirion, R. (1994) *Galanin receptor binding sites in adult rat spinal cord respond differentially to neonatal capsaicin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy*. Eur J Neurosci **6**(12):1917-21.

Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J. und Blumberg, P. M. (2001) *Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1*. J Biol Chem **276**(30):28613-9.

Kerekes, N., Landry, M., Rydh-Rinder, M. und Hökfelt, T. (1997) *The effect of NGF, BDNF and bFGF on expression of galanin in cultured rat dorsal root ganglia*. Brain Res **754**(1-2):131-41.

Kerr, B. J., Cafferty, W. B., Gupta, Y. K., Bacon, A., Wynick, D., McMahon, S. B. und Thompson, S. W. (2000) *Galanin knockout mice reveal nociceptive deficits following peripheral nerve injury*. Eur J Neurosci **12**(3):793-802.

Klein, C. M., Westlund, K. N. und Coggeshall, R. E. (1990) *Percentages of dorsal root axons immunoreactive for galanin are higher than those immunoreactive for calcitonin gene-related peptide in the rat*. Brain Res **519**(1-2):97-101.

Kokaia, M., Holmberg, K., Nanobashvili, A., Xu, Z. Q., Kokaia, Z., Lendahl, U., Hilke, S., Theodorsson, E., Kahl, U., Bartfai, T., Lindvall, O. und Hökfelt, T. (2001) *Suppressed kindling epileptogenesis in mice with ectopic overexpression of galanin*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24):14006-11.

Koltzenburg, M., Torebjork, H. E. und Wahren, L. K. (1994) *Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain*. Brain **117**(Pt 3):579-91.

Kwong, K. und Lee, L. Y. (2002) *PGE(2) sensitizes cultured pulmonary vagal sensory neurons to chemical and electrical stimuli*. J Appl Physiol **93**(4):1419-28.

Landreth, G. E. (1999) *Growth factors*. Aus: Basic Neurochemistry, 6. Auflage. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pennsylvania, USA: 383.

Leitner, M. L., Molliver, D. C., Osborne, P. A., Vejsada, R., Golden, J. P., Lampe, P. A., Kato, A. C., Milbrandt, J. und Johnson, E. M., Jr. (1999) *Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific*. J Neurosci **19**(21):9322-31.

Levi-Montalcini, R. (1966) *The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells*. Harvey Lect **60**(217-59).

Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. und Collins, F. (1993) *GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons*. Science **260**(5111):1130-2.

Liu, H. X. und Hökfelt, T. (2002) *The participation of galanin in pain processing at the spinal level*. Trends Pharmacol Sci **23**(10):468-74.

Ma, W. und Bisby, M. A. (1997) *Differential expression of galanin immunoreactivities in the primary sensory neurons following partial and complete sciatic nerve injuries*. Neuroscience **79**(4):1183-95.

Ma, W. und Bisby, M. A. (1999) *Ultrastructural localization of increased neuropeptide immunoreactivity in the axons and cells of the gracile nucleus following chronic constriction injury of the sciatic nerve*. Neuroscience **93**(1):335-48.

Mahoney, S. A., Hosking, R., Farrant, S., Holmes, F. E., Jacoby, A. S., Shine, J., Iismaa, T. P., Scott, M. K., Schmidt, R. und Wynick, D. (2003) *The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons*. J Neurosci **23**(2):416-21.

Marín-Burgin, A., Reppenhausen, S., Klusch, A., Wendland, J. R. und 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.

Marsh, S. J., Stansfeld, C. E., Brown, D. A., Davey, R. und McCarthy, D. (1987) *The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro*. Neuroscience **23**(1):275-89.

Marti, E., Gibson, S. J., Polak, J. M., Facer, P., Springall, D. R., Van Aswegen, G., Aitchison, M. und Koltzenburg, M. (1987) *Ontogeny of peptide- and amine-containing neurones in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin*. J Comp Neurol **266**(3):332-59.

Maslany, S., Crockett, D. P. und Egger, M. D. (1992) *Organization of cutaneous primary afferent fibers projecting to the dorsal horn in the rat: WGA-HRP versus B-HRP*. Brain Res **569**(1):123-35.

Maves, T. J., Pechman, P. S., Gebhart, G. F. und Meller, S. T. (1993) *Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man*. Pain **54**(1):57-69.

Mazarati, A. M., Liu, H., Soomets, U., Sankar, R., Shin, D., Katsumori, H., Langel, U. und Wasterlain, C. G. (1998) *Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus*. J Neurosci **18**(23):10070-7.

McMahon, S. B. und Bennett, D. L. H. (1999) *Trophic factors and pain*. Aus: Textbook of Pain, 4. Auflage. Churchill Livingstone, Edinburgh: 105.

Merchenthaler, I., Lennard, D. E., Lopez, F. J. und Negro-Vilar, A. (1993) *Neonatal imprinting predetermines the sexually dimorphic, estrogen-dependent expression of galanin in luteinizing hormone-releasing hormone neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22):10479-83.

Merskey, H. und Bogduk, N., Hrsg. (1994) *Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. 2. Auflage. IASP Press, Seattle: 40-3.

Michael, G. J. und Priestley, J. V. (1999) *Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy*. J Neurosci **19**(5):1844-54.

Molliver, D. C., Wright, D. E., Leitner, M. L., Parsadanian, A. S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q. und Snider, W. D. (1997) *IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life*. Neuron **19**(4):849-61.

Nahin, R. L., Ren, K., De Leon, M. und Ruda, M. (1994) *Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain*. Pain **58**(1):95-108.

Nicol, G. D., Lopshire, J. C. und Pafford, C. M. (1997) *Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons*. J Neurosci **17**(3):975-82.

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H. und Tominaga, M. (2002) *Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues*. J Biol Chem **277**(16):13375-8.

O'Donnell, D., Ahmad, S., Wahlestedt, C. und Walker, P. (1999) *Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1*. J Comp Neurol **409**(3):469-81.

Ögren, S. O., Schott, P. A., Kehr, J., Yoshitake, T., Misane, I., Mannstrom, P. und Sandin, J. (1998) *Modulation of acetylcholine and serotonin transmission by galanin. Relationship to spatial and aversive learning*. Ann N Y Acad Sci **863**(342-63).

Ogun-Muyiwa, P., Helliwell, R., McIntyre, P. und Winter, J. (1999) *Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons*. Neuroreport **10**(10):2107-11.

Okuse, K., Chaplan, S. R., McMahon, S. B., Luo, Z. D., Calcutt, N. A., Scott, B. P., Akopian, A. N. und Wood, J. N. (1997) *Regulation of expression of the sensory neurons-specific sodium channel SNS in inflammatory and neuropathic pain*. Mol Cell Neurosci **10**(3-4): 196-207.

Olah, Z., Karai, L. und Iadarola, M. J. (2002) *Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways*. J Biol Chem **277**(38):35752-9.

Parker, E. M., Izzarelli, D. G., Nowak, H. P., Mahle, C. D., Iben, L. G., Wang, J. und Goldstein, M. E. (1995) *Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells*. Brain Res Mol Brain Res **34**(2):179-89.

Petersen, M. und LaMotte, R. H. (1993) *Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells*. Pain **54**(1):37-42.

Petersen, M., Segond von Banchet, G., Heppelmann, B. und Koltzenburg, M. (1998) *Nerve growth factor regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75*. *Neuroscience* **83**(1):161-8.

Premkumar, L. S. und Ahern, G. P. (2000) *Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C*. *Nature* **408**(6815):985-90.

Putz, R. und Pabst, R., Hrsg. (1993) *Sobotta – Atlas der Anatomie des Menschen. Band 1*. 20. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München: 27 und 336.

Rains, C. und Bryson, H. M. (1995) *Topical capsaicin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis*. *Drugs Aging* **7**(4):317-28.

Raivich, G., Hellweg, R. und Kreutzberg, G. W. (1991) *NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration*. *Neuron* **7**(1):151-64.

Rao, M. S., Sun, Y., Escary, J. L., Perreau, J., Tresser, S., Patterson, P. H., Zigmond, R. E., Brulet, P. und Landis, S. C. (1993) *Leukemia inhibitory factor mediates an injury response but not a target-directed developmental transmitter switch in sympathetic neurons*. *Neuron* **11**(6):1175-85.

Saar, K., Mazarati, A. M., Mahlapuu, R., Hallnemo, G., Soomets, U., Kilk, K., Hellberg, S., Pooga, M., Tolf, B. R., Shi, T. S., Hökfelt, T., Wasterlain, C., Bartfai, T. und Langel, U. (2002) *Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10):7136-41.

Scadding, J. W. (1980) *The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves*. *J Anat* **131**(3):471-82.

Schäfers, M., Geis, C., Svensson, C. I., Luo, Z. D. und Sommer, C. (2003) *Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve*. *Eur J Neurosci* **17**(4):791-804.

Shi, T. J., Zhang, X., Berge, O. G., Erickson, J. C., Palmiter, R. D. und Hökfelt, T. (1998) *Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice*. Regul Pept **75-76**(161-73).

Shi, T. J., Cui, J. G., Meyerson, B. A., Linderoth, B. und Hökfelt, T. (1999) *Regulation of galanin and neuropeptide Y in dorsal root ganglia and dorsal horn in rat mononeuropathic models: possible relation to tactile hypersensitivity*. Neuroscience **93**(2):741-57.

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

Silverman, J. D. und Kruger, L. (1988) *Lectin and neuropeptide labeling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated "nociceptor" thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations*. Somatosens Res **5**(3):259-67.

Skofitsch, G. und Jacobowitz, D. M. (1985) *Galanin-like immunoreactivity in capsaicin sensitive sensory neurons and ganglia*. Brain Res Bull **15**(2):191-5.

Smith, K. E., Walker, M. W., Artymyshyn, R., Bard, J., Borowsky, B., Tamm, J. A., Yao, W. J., Vaysse, P. J., Branchek, T. A., Gerald, C. und Jones, K. A. (1998) *Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels*. J Biol Chem **273**(36):23321-6.

Sun, Y. und Zigmond, R. E. (1996) *Leukaemia inhibitory factor induced in the sciatic nerve after axotomy is involved in the induction of galanin in sensory neurons*. Eur J Neurosci **8**(10):2213-20.

Swett, J. E. und Woolf, C. J. (1985) *The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord*. J Comp Neurol **231**(1):66-77.

Szallasi, A. und Blumberg, P. M. (1996) *Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target*. Pain **68**(2-3):195-208.

Szolcsányi, J. (1977) *A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain*. J Physiol (Paris) **73**(3):251-9.

Tal, M. und Eliav, E. (1996) *Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat*. Pain **64**(3):511-8.

Tatemoto, K., Rokaeus, A., Jornvall, H., McDonald, T. J. und Mutt, V. (1983) *Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine*. FEBS Lett **164**(1):124-8.

Thompson, S. W., Vernallis, A. B., Heath, J. K. und Priestley, J. V. (1997) *Leukaemia inhibitory factor is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers*. Eur J Neurosci **9**(6):1244-51.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. und Julius, D. (1998) *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. Neuron **21**(3):531-43.

Tominaga, M., Wada, M. und 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 **98**(12):6951-6.

Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Phillips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C. E. und Rosenthal, A. (1996) *Characterization of a multicomponent receptor for GDNF*. Nature **382**(6586):80-3.

Verge, V. M., Richardson, P. M., Wiesenfeld-Hallin, Z. und Hökfelt, T. (1995) *Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons*. J Neurosci **15**(3 Pt 1):2081-96.

Villar, M. J., Cortes, R., Theodorsson, E., Wiesenfeld-Hallin, Z., Schalling, M., Fahrenkrug, J., Emson, P. C. und Hökfelt, T. (1989) *Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin*. Neuroscience **33**(3):587-604.

Wall, P. D. und Gutnick, M. (1974) *Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma*. Nature **248**(5451):740-3.

Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. und Tomkiewicz, M. M. (1979) *Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa*. Pain **7**(2):103-11.

Wang, S., Hashemi, T., He, C., Strader, C. und Bayne, M. (1997 a) *Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype*. Mol Pharmacol **52**(3):337-43.

Wang, S., He, C., Maguire, M. T., Clemmons, A. L., Burrier, R. E., Guzzi, M. F., Strader, C. D., Parker, E. M. und Bayne, M. L. (1997 b) *Genomic organization and functional characterization of the mouse GalR1 galanin receptor*. FEBS Lett **411**(2-3):225-30.

Waters, S. M. und Krause, J. E. (2000) *Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues*. Neuroscience **95**(1):265-71.

Watson, C. P. (1994) *Topical capsaicin as an adjuvant analgesic*. J Pain Symptom Manage **9**(7):425-33.

Wiesenfeld-Hallin, Z., Bartfai, T. und Hökfelt, T. (1992) *Galanin in sensory neurons in the spinal cord*. Front Neuroendocrinol **13**(4):319-43.

Winter, J. (1987) *Characterization of capsaicin-sensitive neurones in adult rat dorsal root ganglion cultures*. *Neurosci Lett* **80**(2):134-40.

Winter, J., Forbes, C. A., Sternberg, J. und Lindsay, R. M. (1988) *Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin*. *Neuron* **1**(10):973-81.

Winter, J., Walpole, C. S., Bevan, S. und James, I. F. (1993) *Characterization of resiniferatoxin binding sites on sensory neurons: co-regulation of resiniferatoxin binding and capsaicin sensitivity in adult rat dorsal root ganglia*. *Neuroscience* **57**(3):747-57.

Winter, J., Bevan, S. und Campbell, E. A. (1995) *Capsaicin and pain mechanisms*. *Br J Anaesth* **75**(2):157-68.

Wood, J. N., Winter, J., James, I. F., Rang, H. P., Yeats, J. und Bevan, S. (1988) *Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture*. *J Neurosci* **8**(9):3208-20.

Xie, Y. K., Xiao, W. H. und Li, H. Q. (1993) *The relationship between new ion channels and ectopic discharges from a region of nerve injury*. *Sci China B* **36**(1):68-74.

Xu, Z. Q., Shi, T. J. und Hökfelt, T. (1996 a) *Expression of galanin and a galanin receptor in several sensory systems and bone anlage of rat embryos*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25):14901-5.

Xu, Z. Q., Shi, T. J., Landry, M. und Hökfelt, T. (1996 b) *Evidence for galanin receptors in primary sensory neurones and effect of axotomy and inflammation*. *Neuroreport* **8**(1):237-42.

Zhang, X., Nicholas, A. P. und Hökfelt, T. (1993) *Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the spinal cord--I. Co-existence of galanin with other peptides in primary afferents in normal rats*. *Neuroscience* **57**(2):365-84.

Zhang, X., Ji, R. R., Nilsson, S., Villar, M., Ubink, R., Ju, G., Wiesenfeld-Hallin, Z. und Hökfelt, T. (1995 a) *Neuropeptide Y and galanin binding sites in rat and monkey lumbar dorsal root ganglia and spinal cord and effect of peripheral axotomy*. Eur J Neurosci **7**(3):367-80.

Zhang, X., Nicholas, A. P. und Hökfelt, T. (1995 b) *Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord--II. Co-existence of galanin with other peptides in local neurons*. Neuroscience **64**(4):875-91.

Zhang, X., Xu, Z. O., Shi, T. J., Landry, M., Holmberg, K., Ju, G., Tong, Y. G., Bao, L., Cheng, X. P., Wiesenfeld-Hallin, Z., Lozano, A., Dostrovsky, J. und Hökfelt, T. (1998) *Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation*. Ann N Y Acad Sci **863**:402-13.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte der Autor seiner Betreuerin, Frau Professor Dr. rer. nat. Marlen Petersen, Physiologisches Institut der Universität Würzburg, seinen herzlichen Dank aussprechen. Die Faszination für das Thema, das Erlernen der in dieser Arbeit eingesetzten Methoden, die Beachtung eines jeden Details sowie Hartnäckigkeit, Ausdauer und Genauigkeit beim wissenschaftlichen Arbeiten – all dies ist dem Autor durch sie vermittelt worden. Vor allem jedoch gilt der Dank des Autors dafür, daß durch Frau Professor Petersen eine langanhaltende Begeisterung für die Neurowissenschaften und die weitere Forschung auf diesem Gebiet angeregt wurden.

Ferner möchte der Autor danken: Herrn Andreas Klusch, BA, für die Einführung in computergestützte Datenverarbeitungs- und statistische Methoden; Frau Tanja Martini für die technische Assistenz bei der Herstellung der Zellkulturen; Herrn Dr. med. Klaus H. Schmidt, Neurologische Klinik der Universität Würzburg, für die Hilfe bei immunzytochemischen Methoden und die vielen hilfreichen Hinweise zur Optimierung der Zellkultur und der Färbungen; Herrn Professor Dr. med. Martin Koltzenburg, jetzt am Institute of Child Health, University College London, für die Benutzung des Fluoreszenzmikroskops an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg sowie Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer, Neurologische Klinik der Universität Würzburg, für die Übernahme des Korreferats.

LEBENS LAUF

Jens Robert Wendland

Persönliche Daten

Geburtsdatum 24. Juni 1975

Geburtsort Bremen

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Eltern Dr. phil. Jürgen Wendland, geb. 1937, Studiendirektor;
Heide Wendland, geb. 1941, Sonderschullehrerin und
Sprachheilpädagogin

Geschwister Fr. Dr. jur. Kirsten Wendland, geb. 1969, Volljuristin

Schulbildung

Grundschule

1981 – 1986 Deutsche Humboldt-Schule, San José, Costa Rica

Gymnasium

1986 – 1990 Ökumenisches Gymnasium zu Bremen

1990 – 1992 Deutsche Schule Guatemala-Stadt, Guatemala

1992 – 1993 Interlochen Arts Academy, Michigan, USA
High-School-Abschluß 5/1993

1993 – 1995 Kippenberg-Gymnasium zu Bremen
Abitur 6/1995

Ersatzdienst

1995 - 1996 Altenpflege und -betreuung auf der gerontopsychiatrischen Station der Diakonischen Altenhilfe zu Lilienthal

Universitätsstudium

11/1996 – 6/2003 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

9/1998 Ärztliche Vorprüfung

9/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

6/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Ausbildung

Famulaturen

3/2000 Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg

4/2000 Abteilung für Röntgendiagnostik der Universität

9/2000 Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Dr. med. I. Kleine, Würzburg

3/2001 Schmerzambulanz der Universität Würzburg

9/2001 Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Würzburg

*Medizinisch-
praktisches Jahr*

- 4/2002 – 7/2002 1. Tertial, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
- 8/2002 – 11/2002 2. Tertial, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York, USA
- seit 12/2002 3. Tertial, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Würzburg

Wissenschaftliche Ausbildung

- seit 1998 Promotionsarbeit am Physiologischen Institut der Universität Würzburg

Mitarbeit an demselben Institut über (1) die funktionellen Eigenschaften von Spinalganglionsneuronen von Ratten und Küken unter besonderer Berücksichtigung der thermischen Nozizeption sowie (2) über die unterschiedliche Kolokalisation von Capsaicin- bzw. Hitzesensibilität und Galaninexpression in Ratten zum Nachweis weiterer, bislang nicht bekannter Rezeptoren zur Transduktion noxischer Hitze

- 3/1999 „Neuronales Tracing in Kombination mit Immunzytochemie und konfokaler Laserscan-Mikroskopie“ am Institut für Anatomie der Universität Erlangen

- 2/2001 „Seminar und Praktikum über neuere Arbeiten der Pathologie“ am Institut für Pathologie der Universität Würzburg

Würzburg, 6. Juni 2003

Joas R. Wild