

**Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie II**

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Karschin

**Regulation der Capsaicin-Sensitivität von murinen
Spinalganglienzellen durch neurotrophe Faktoren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Ulrich Gößler
aus Lauterbach (Hessen)

Würzburg, Oktober 2003

Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Marlen Petersen

Korreferentin: Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Heterogenität von Spinalganglienzellen und Einteilung von Nozizeptoren	1
1.2	Neurochemische Charakterisierung von Spinalganglienzellen.....	3
1.3	Capsaicin-Sensitivität nozizeptiver Neurone und VR1- Expression	5
1.4	Einfluss der Wachstumsfaktoren NGF und GDNF auf Spinalganglienzellen	6
1.4.1	Wachstumsfaktor NGF	6
1.4.2	Wachstumsfaktor GDNF	8
1.5	Fragestellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Präparation der Spinalganglienzellen	12
2.1.1	Versuchstiere.....	12
2.1.2	Entnahme der Spinalganglien	12
2.2	Zellkultur	13
2.2.1	Vorbereitung der Zellkulturschalen.....	13
2.2.2	Herstellung der Zellsuspension und Aussäen der Zellen.....	13
2.2.3	Zusammensetzung des Nährmediums	14
2.2.4	Dauer und Protokoll der Zellkultur	15
2.3	Mehrfachmarkierung von Spinalganglienzellen	16
2.3.1	Oberflächenmarker IB4 zur Markierung der nicht-peptidergen Neurone.....	16

2.3.2	Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake zur funktionellen Markierung nozizeptiver Spinalganglienzellen.....	16
2.3.3	Immuncytochemische Mehrfachmarkierung der Neurone	17
2.4	Analyse der Zellen	18
3	ERGEBNISSE.....	20
3.1	Der niederaffine Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR} ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Capsaicin-Sensitivität durch NGF	20
3.1.1	Der Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in Spinalganglienzellen von Wildtyp-Mäusen wird dosisabhängig durch NGF reguliert; die Regulation erfolgt in der CGRP-exprimierenden Neuronenpopulation.....	20
3.1.2	Die native Capsaicin-Sensitivität und die native CGRP-Expression in Spinalganglienzellen sind von p75 ^{NTR} unabhängig.....	23
3.1.3	Der NGF-vermittelte Rescue der Capsaicin-Sensitivität und CGRP- Expression lässt sich durch p75 ^{NTR} -blockierende Antikörper verhindern und ist in p75 ^{NTR} -knock out-Mäusen nicht möglich.....	25
3.1.4	Die Blockade von p75 ^{NTR} verschiebt die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und Cobalt-Uptake nach rechts und verhindert den NGF-vermittelten Rescue von CGRP und VR1- exprimierenden Neuronen.....	27
3.2	Die Capsaicin-Sensitivität von Spinalganglienzellen der Maus wird durch den Wachstumsfaktor GDNF reguliert	31
3.2.1	Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake kolokalisiert nicht mit IB4, GFR α 1 oder c-RET in Kurzzeitkulturen	31
3.2.2	GDNF reguliert die Capsaicin-Sensitivität von Spinalganglienzellen	33
3.2.3	GDNF reguliert den Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake dosisabhängig	35

3.2.4	Der c-RET-abhängige Signaltransduktionsweg wird für die Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population benötigt.....	38
3.2.5	SRC-Kinase und GFR α 1-abhängige Signaltransduktion wird für die Transduktion des GDNF-Effektes benötigt	41
3.2.6	Ein Rezeptor für Neurturin (GFR α 2) wird für die c-RET-abhängige Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population benötigt	43
3.2.7	Blockierung der MAP-Kinase beeinflusst den GDNF-Effekt nicht, Blockade der PI3-Kinase partiell	46
4	DISKUSSION	48
4.1	Anmerkungen zur Methodik.....	48
4.2	Funktion von NGF bei der Regulation des Cobalt-Uptakes	49
4.3	Funktion von p75 ^{NTR} bei der Regulation durch NGF	51
4.4	Verteilung der Marker Cobalt-Uptake, IB4, GFR α 1 und c-RET in Kurzzeitkulturen.....	55
4.5	Abhängigkeit der Capsaicin-Sensitivität von weiteren neurotrophen Faktoren.....	56
4.6	Abhängigkeit der Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population von c-RET und GFR α 2	58
4.7	Abhängigkeit der Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der GFR α 1-Population von SRC-Kinasen	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	64

1 EINLEITUNG

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ (Übersetzte Definition der International Association for the Study of Pain 1979)

Schmerzen werden durch mechanische, thermische oder chemische Gewebeschäden (Noxen) ausgelöst. Hierbei werden chemische Substanzen in den Extrazellulärraum freigesetzt, die die Nozizeptoren beeinflussen (Review: Sorkin und Wallace 1999). Diese Substanzen stammen aus den Geweben selbst, z.B. K^+ - und H^+ -Ionen, Serotonin oder Histamin (Review: McHugh und McHugh 2000). Manche Mediatoren - wie z.B. Bradykinin - können aus dem zirkulierenden Blut ins Gewebe eintreten (Review: Cesare und McNaughton 1997). Arachidonsäuremetaboliten - wie Prostaglandine - werden im Gewebe gebildet und spielen eine Schlüsselrolle beim Schmerz unter Entzündungsbedingungen. Sie sind zwar nicht selbst algogen, verstärken aber die schmerzauslösende Wirkung anderer chemischer Stimulantien (Review: Ito et al. 2001).

1.1 Heterogenität von Spinalganglienzellen und Einteilung von Nozizeptoren

Das nozizeptive System umfasst die peripheren und zentralnervösen Strukturen, die mit der Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung noxischer Reize befasst sind. Die Zellkörper der nozizeptiven afferenten Neurone befinden sich in den Spinalganglien. Es handelt sich um pseudounipolare Nervenzellen. Die nackten Endigungen ihrer peripheren Fortsätze dienen der Aufnahme von Reizen. Die zentralen Fortsätze treten über die Hinterwurzeln in das Hinterhorn des Rückenmarks ein und bilden dort mit Interneuronen oder aufsteigenden Neuronen die erste synaptische Verschaltung. Die Axone der

Nozizeptoren sind entweder nichtmyelinisiert (C-Fasern) oder dünn myelinisiert (A δ -Fasern). Neurone mit nichtmyelinisierten C-Fasern projizieren in die Laminae I, II und V des Hinterhorns, während die mit myelinisierten A δ -Fasern in den Laminae I und V enden (Review: Koltzenburg 1998).

In funktioneller Hinsicht können Nozizeptoren anhand ihrer thermischen, mechanischen und chemischen Erregbarkeit untergliedert werden. Der größte Teil der Nozizeptoren ist polymodal, d.h. reagiert auf thermische, mechanische und chemische Stimuli. Andere Nozizeptoren sind nur mechanisch oder mechanisch und thermisch erregbar. Außerdem wurde eine Gruppe von Nozizeptoren mit C-Fasern charakterisiert, die unter physiologischen Bedingungen weder auf thermische noch auf mechanische Stimuli reagiert, jedoch zum Teil unter experimentell erzeugten Entzündungen (Applikation von Capsaicin oder Senföl) chemisch aktiviert werden kann (Schmidt et al. 1995). Diese Untergruppe wird als „silent nociceptors“ bezeichnet.

Das durch algogene Stimuli erzeugte Rezeptorpotenzial wird in Aktionspotenziale umcodiert und über die A δ - oder C-Fasern zum Rückenmark fortgeleitet. Erregung der Neurone mit A δ -Fasern führt zu einem hellen, gut lokalisierbaren Schmerz, während Erregung der Neurone mit C-Fasern zu einem dumpfen, schlecht lokalisierbaren Schmerz führt. Die nozizeptiven primär afferenten Neurone zeigen in sich eine morphologisch-strukturelle Heterogenität. Diese findet sich wieder in der traditionellen morphologischen bzw. histochemischen Unterscheidung in große helle Somata (A-Zellen), die A δ -Fasern besitzen, und kleine dunkle Somata (B-Zellen), die langsam leitende, meist unmyelinisierte C-Fasern besitzen (Lawson 1992).

1.2 Neurochemische Charakterisierung von Spinalganglienzellen

In zahlreichen Studien wurden die Spinalganglienzellen anhand von Neuropeptiden, Rezeptoren oder Oberflächenmolekülen neurochemisch in Untergruppen eingeteilt (Wright und Snider 1995). Hierbei konnten zwei große Subpopulationen gefunden werden, nämlich die peptidergen und die nicht-peptidergen Neurone (Snider und McMahon 1998).

Die Population der peptidergen Neurone umfasst etwa 40% aller Spinalganglienzellen und ist gekennzeichnet durch die Produktion der Neuropeptide Substanz P (SP) und Calcitonin gene related peptide (CGRP). Beide Peptide sind an der Übermittlung nozizeptiver Informationen beteiligt. An der peripheren Nervenendigung sind sie an der Vermittlung des Axonreflexes beteiligt (Pernow 1981), an den zentralen Endigungen fungieren sie als Cotransmitter (Hiura et al. 1998). Die Axone der peptidergen Neurone haben eine Nervenleitgeschwindigkeit sowohl im A δ - als auch im C-Faser-Bereich (Lawson 1992). Viele der CGRP-haltigen Neurone exprimieren in adulten Ratten Rezeptoren für Nervenwachstumsfaktor (NGF), sowohl den hochaffinen Nerve Growth Factor–Rezeptor, Tyrosinkinase A (trkA, Averill et al. 1995), ebenso wie auch den niederaffinen Nerve Growth Factor–Rezeptor, p75^{NTR} (Bergman et al. 1997).

Die Population der nicht-peptidergen Neurone umfasst etwa 35% aller Spinalganglienzellen. Diese Neurone exprimieren keine Neuropeptide, enthalten jedoch spezifische Enzyme, wie z.B. Fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP), auch Thiaminmonophosphatase (TMP) genannt (Nagy et al. 1984, Silverman und Kruger 1990). Diese Subpopulation bindet spezifisch das Isolektin B4 von *Griffonia simplicifolia* (IB4, Silverman und Kruger 1990), ein Pflanzenlektin, das eine hohe Affinität für D-Galactose-Reste von Glykokonjugaten an der Zelloberfläche primär sensorischer Neurone besitzt (Plenderleith und Snow 1990). Diese IB4-bindenden Neurone haben kleine dunkle Somata (B-Zellen) und besitzen somit zum Großteil C-Fasern (Lawson

1992). In adulten Tieren besitzen die IB4-bindenden Neurone keine *trkA*- oder *p75^{NTR}*-Rezeptoren (Bennett et al. 1996).

Bezüglich der Projektion ins Hinterhorn des Rückenmarks unterscheiden sich die nicht-peptidergen von den peptidergen Neuronen ebenfalls. Die nicht-peptidergen IB4-bindenden Zellen projizieren überwiegend in den inneren Teil der Lamina II (Silverman und Kruger 1990), die peptidergen CGRP-enthaltenden und die *trkA*-exprimierenden Neurone dagegen in Lamina I und äußere Abschnitte der Lamina II (Molliver et al. 1995, Abb. 1). Über die funktionellen Eigenschaften der nicht-peptidergen Spinalganglienzellen ist nur wenig bekannt. Neuere Studien zeigen eine starke Koinzidenz von IB4-Bindung und Expression des ATP-Rezeptor-Subtyps P_2X_3 (Vulchanova et al. 1997). Erste elektrophysiologische Experimente zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen. IB4-positive Neurone generieren im Vergleich zu den IB4-negativen Neuronen länger anhaltende Aktionspotenziale. Sie haben eine höhere Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotenzials sowie Tetrodotoxin-resistente Natrium-Einwärtsströme mit einer größeren Amplitude (Stucky und Lewin 1999).

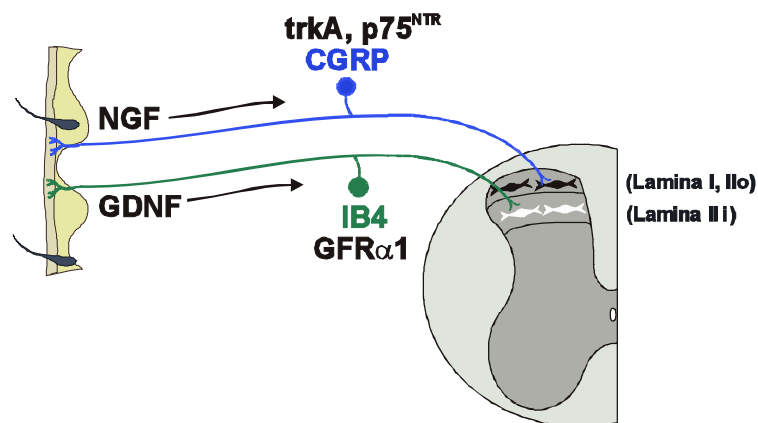


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Projektionsgebiete im Hinterhorn von peptidergen und nicht-peptidergen Spinalganglienzellen (modifiziert nach Boucher und McMahon 2001)

1.3 Capsaicin-Sensitivität nozizeptiver Neurone und VR1-Expression

Capsaicin, der scharfe Inhaltsstoff in Chilipfeffer, gehört zur chemischen Gruppe der natürlich vorkommenden Vanilloide (Review: Szallasi und Blumberg 1999). Beim Menschen führt die Injektion von Capsaicin in die Haut zu einer Schmerzempfindung mit brennendem, „heißem“ Charakter und zu einer Hyperalgesie (Koltzenburg et al. 1992, LaMotte et al. 1992). In zahlreichen elektrophysiologischen Studien stellte sich heraus, dass Capsaicin spezifisch polymodale Nozizeptoren mit Leitgeschwindigkeiten sowohl im Bereich von C- als auch A δ -Fasern erregt (Szallasi und Blumberg 1999, Szolcsányi et al. 1988). In Studien an kultivierten Spinalganglienzellen von Ratten konnte belegt werden, dass Capsaicin direkt einen unspezifischen Kationenkanal öffnet, der für mono- und divalente Kationen permeabel ist (Bevan und Szolcsányi 1990, Wood et al. 1988). Es kommt zu einem Nettoeinwärtsstrom von Natrium- und Calciumionen, der die Zelle depolarisiert und bei Überschreiten der Schwelle zur Bildung von Aktionspotenzialen führt. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass in Capsaicin-sensiblen Neuronen ein Hitze-Stimulus ($>43^{\circ}\text{C}$) zu einem Einwärtsstrom führt (Kirschstein et al. 1997, Kirschstein et al. 1999, Kress und Zeilhofer 1999). Protonen ($\text{pH}<6,2$) können in der gleichen Zellsubpopulation einen langsamen Einwärtsstrom von Kationen auslösen (Bevan und Szolcsányi 1990, Bevan et al. 1992, Bevan und Geppetti 1994). Diese Resultate lassen vermuten, dass Capsaicin, Hitze und Protonen denselben Ionenkanal aktivieren.

Den Beweis hierfür lieferte die Klonierung des Vanilloid Rezeptors 1 (VR1) (Caterina et al. 1997). In transfizierten Zellen konnte dargestellt werden, dass dieser Kationenkanal durch die Stimuli Hitze ($> 42^{\circ}\text{C}$), Protonen ($\text{pH}< 6.2$) und Capsaicin geöffnet wird (Tominaga et al. 1998). Untersuchungen an Mausmutanten mit einem Verlust des VR1-Rezeptors ergaben, dass kultivierte Spinalganglienzellen von diesen Tieren keine Capsaicin-Empfindlichkeit und eine massiv reduzierte Sensibilität für Hitzereize und Protonen aufwiesen (Caterina et al. 2001, Davis et al. 2000).

Die Erregbarkeit primär sensorischer Neurone durch Capsaicin und/oder Protonen ($\text{pH} < 6.2$) ist *in vitro* und *in vivo* durch den NGF-Gehalt des umgebenden Mediums regulierbar (Bevan und Winter 1995, Winter et al. 1988, McMahon et al. 1995).

1.4 Einfluss der Wachstumsfaktoren NGF und GDNF auf Spinalganglienzellen

1.4.1 Wachstumsfaktor NGF

Wachstumsfaktoren stellen eine heterogene Gruppe von Signalstoffen dar, die die embryonale Entwicklung, die Differenzierung, aber auch die Modulierung und Plastizität des zentralen und peripheren Nervensystems beeinflussen (Review: Ibanez 2000).

Im peripheren Nervensystem fördert NGF das Überleben embryonaler sympathischer und sensorischer Nervenzellen (Crowley et al. 1994). Kultivierte Spinalganglienzellen aus dem adulten Tier benötigen zum Überleben kein exogen zugeführtes NGF (Lewin et al. 1993). Vom funktionellen Aspekt her scheinen NGF-abhängige periphere Neurone die Weiterleitung von noxischen Reizen zu vermitteln (Snider und McMahon 1998, McMahon et al. 1995, McMahon und Bennett 1997, McMahon et al. 1997). Im adulten Organismus wird durch die dermale Verabreichung von NGF thermale Hyperalgesie induziert, im Organismus des Menschen und in dem der Ratte (Lewin und Mendell 1993, Lewin et al. 1993, Amann et al. 1996, Andreev et al. 1995, Lewin und Barde 1996, McMahon 1996, Petty et al. 1994). Den Beweis hierfür lieferten Experimente, in denen die Anwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers gegen NGF die durch NGF induzierte Hyperalgesie für Hitze nach Gewebsentzündung verhinderte. NGF scheint also für die Genese von Schmerzen unter Entzündungsbedingungen wichtig zu sein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NGF den Phänotyp sensorischer Nervenzellen beeinflussen kann, *in vitro* wie *in vivo*. *In vitro* regulierte NGF die Expression

des Neuropeptids SP in Spinalganglienzellen (Lindsay und Harmar 1989). Weiterhin steigert NGF die Empfindlichkeit der Neurone gegenüber Capsaicin (Lewin und Mendell 1993, Lewin et al. 1993, Winter et al. 1988), Protonen und Hitze (Bevan and Winter 1995, Shu und Mendell 1999).

NGF bindet an zwei Rezeptoren, zum einen an $p75^{NTR}$ (Battleman et al. 1993, Barrett und Bartlett 1994, Barrett et al. 1998, Curtis et al. 1995, Hempstead et al. 1991, Huber und Chao 1995, Lee et al. 1992, Bothwell 1995), zum anderen an $trkA$. Obwohl multimere Rezeptorkomplexe und funktionelle Interaktionen zwischen beiden Rezeptoren beschrieben wurden, gilt als gesichert, dass NGF auch an jeden Rezeptor einzeln bindet und Wirkungen unabhängig vom anderen Rezeptor auslöst (Bothwell 1996).

Während sehr viel über die Wirkungen von NGF am embryonalen Nervensystem bekannt ist, sind die Effekte im adulten Organismus weniger genau erforscht. Man weiß, dass NGF im Gewebe von Nozizeptoren produziert wird und dass $trkA$ von kleinkalibrigen, nozizeptiven Spinalganglienzellen exprimiert wird (Bennett et al. 1996). Interessant ist, dass bei Ratten systemisch appliziertes 125 Jodmarkiertes NGF im Gehirn akkumulierte, und zwar insbesondere in solchen Zellen, die $p75^{NTR}$ exprimierten (Fabian und Hulsebosch 1993).

Wenig ist bekannt über die Rolle des $p75^{NTR}$ -Rezeptors in Bezug auf die Regulierung des Überlebens und der Funktion von sensorischen Neuronen im adulten Organismus. Transgene Mäuse, denen $p75^{NTR}$ fehlt, besitzen kleinere Spinalganglien und zeigen einen Verlust von 50% der Spinalganglienzellen im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Verlust verteilt sich gleichmäßig auf alle Nervenzellpopulationen. Mit Hilfe von immunohistochemischen Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass die Expression von $trkA$ und CGRP und die Bindung des Lektins IB4 unverändert sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, so dass kein selektiver Verlust einer bestimmten Neuronenpopulation vorlag (Bergmann et al. 1997). In Verhaltensexperimenten ist zu sehen, dass $p75^{NTR}$ knock out-Mäuse vermindert auf noxische thermische und noxische mechanische Stimuli reagieren (Lee et al. 1994). Diese Untersuchungen beweisen, dass NGF eine Rolle bei der Modulation des nozizeptiven Phänotyps

im adulten Organismus spielt. Wie dies geschieht, ist noch nicht vollständig geklärt.

1.4.2 Wachstumsfaktor GDNF

Die Familie des Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF, Lin et al. 1993) stellt eine Gruppe von Wachstumsfaktoren dar, zu der außer GDNF noch folgende Faktoren gehören: Neurturin (NTN, Kotzbauer et al. 1996, Widenfalk et al. 1997), Persephin (PSP, Milbrandt et al. 1998) und Artemin (ART, Baloh et al. 1998). Diese Faktoren stellen eine Subgruppe der TGF β -Familie dar, die neurotrophe Eigenschaften besitzen (Review: Airaksinen et al. 1999).

Der Rezeptor für GDNF besteht aus einem Komplex von zwei Komponenten, auf der extrazellulären Seite der GDNF-family receptor α (GFR α), der die spezifische Bindung vermittelt, und auf der intrazellulären Seite die Rezeptor Tyrosin Kinase (c-RET, Holstege et al. 1998, Trupp et al. 1997, Jing et al. 1996). In dem von Jing vorgeschlagenen Modell bindet ein dimeres GDNF-Molekül an ein entweder monomeres oder dimeres GFR α 1-Rezeptormolekül. Dieser GDNF/GFR α 1-Komplex kann mit c-RET interagieren und dessen Aktivierung auslösen. NTN zeigt Präferenz für die Bindung an GFR α 2, PSP für GFR α 4 und ART für GFR α 3. Kreuzreaktivität (sog. „crosstalk“) zwischen den verschiedenen Rezeptoren scheint möglich (Review: Rosenthal 1999). GDNF-abhängige c-RET-Aktivierung wurde als der Hauptweg für die GDNF-Signalwirkung identifiziert (Review: Airaksinen et al. 1999, Van Weering und Bos 1997). Neuere Ergebnisse zeigen, dass auch andere, c-RET-unabhängige Signalwege besprochen werden können, nämlich die Aktivierung acylierter Tyrosin-Kinasen der SRC-Familie (Trupp et al. 1999). Eine schematische Darstellung der möglichen Signalwege ist in Abbildung 2 dargestellt.

In allen Zellen, in denen GDNF eine Wirkung zeigt, konnte c-RET nachgewiesen werden. In den Spinalganglien wird c-RET von einer Subpopulation unmyelinisierter, IB4-bindender, trkA- und neuropeptid-negativer

Neurone exprimiert (Kashiba et al. 2001). Diese Neurone spielen möglicherweise eine Rolle in der Verarbeitung noxischer Reize (Bennett et al. 1998). Hinweise hierfür ergaben sich aus Experimenten, in denen nach Axotomie eines peripheren Nervens IB4-positive Neurone zu Grunde gingen (Bennett et al. 1998, Molliver et al. 1997).

Für GDNF wurden zahlreiche trophische Effekte auf sensorische Neurone beschrieben sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus (Bennett et al. 1998, Ogun-Muyiwa et al. 1999). So benötigen in Zellkultur gehaltene, nicht-peptiderge IB4-bindende Neurone während der Embryonalentwicklung NGF im Kulturmedium, um zu überleben (Silos-Santiago et al. 1995), nicht jedoch in der postnatalen Zeit. Stattdessen werden diese Neurone durch GDNF beeinflussbar (Molliver et al. 1997).

Die nicht-peptidergen Neurone bleiben im adulten Organismus empfänglich für GDNF, beispielsweise kann nach einer Nervenverletzung durch die Verabreichung von GDNF die Axotomie-induzierte Herunterregulation der IB4-Bindungsfähigkeit und der TMP-Aktivität der Nervenzellen verhindert werden. Weiterhin wird durch GDNF-Verabreichung die Verminderung der Leitungsgeschwindigkeit sowie das „sprouting“ von A δ -Fasern in die Lamina II verhindert (Bennett et al. 1998).

Zusammengenommen machen diese Ergebnisse eine funktionelle Rolle von GDNF im adulten Organismus wahrscheinlich. GDNF könnte bei der Modulation des funktionellen Phänotyps nozizeptiver Neurone eine Rolle spielen.

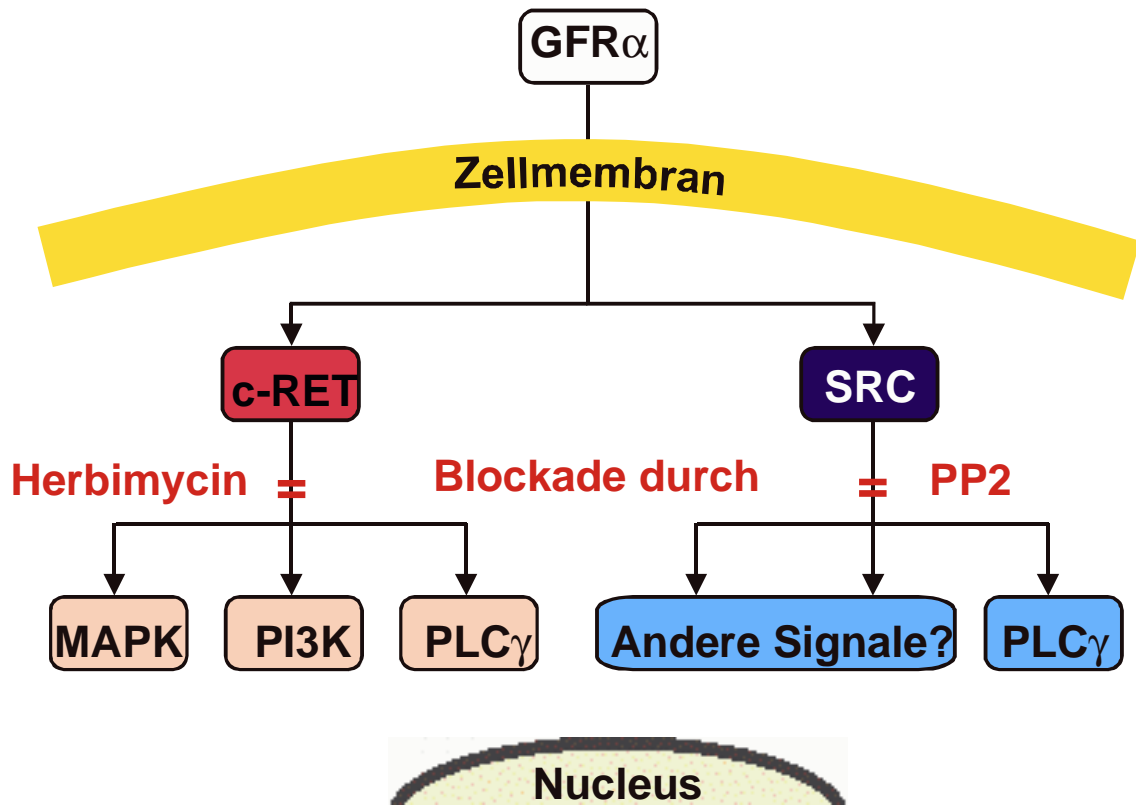


Abbildung 2:
Mögliche Signalwege für GDNF über c-RET und SRC-abhängige Signalwege

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Capsaicin-Sensitivität in Spinalganglienzellen der Maus durch die neurotrophen Faktoren NGF und GDNF reguliert wird und welche Populationen sensorischer Nervenzellen Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake zeigen. Hierzu wurden Spinalganglienzellen adulter BalbC-Mäuse über 6 Stunden und 6 Tage kultiviert in Gegenwart und in Abwesenheit der neurotrophen Faktoren NGF und GDNF. Mit Hilfe einer Kombination von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake mit immunocytoologischen Mehrfachfärbungen gegen IB4, CGRP und VR1 wurden die Zellen in Populationen eingeteilt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob NGF den Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake verändert und welche Subpopulationen von Spinalganglienzellen Capsaicin-sensitiv sind. Die Subpopulationen wurden immunocytoologisch ermittelt durch Färbung gegen IB4 (nicht-peptiderge Neurone) und CGRP (peptiderge Neurone). Weiterhin wurde geprüft, welche Rolle der niederaffine NGF-Rezeptor ($p75^{\text{NTR}}$) für die Regulation der Capsaicin-Sensitivität spielt.

Im zweiten Teil wurde untersucht, ob GDNF den Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake beeinflusst. Die betroffenen Neuronenpopulationen wurden durch immunocytoologische Färbung gegen IB4 und gegen die beiden GDNF-Rezeptoren $\text{GFR}\alpha 1$ und $\text{GFR}\alpha 2$ ermittelt. Komponenten der intrazellulären Signalkaskade (c-RET, SRC-Kinasen, PI3-Kinase, MAP-Kinase) wurden durch Hemmstoffe blockiert, und so konnte ihr Einfluss auf die Signaltransduktion von GDNF untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Präparation der Spinalganglienzellen

2.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden adulte BalbC-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 20-30 g verwendet, wie auch homozygote transgene Mäuse, denen p75^{NTR} fehlt (Lee et. al 1992) mit einem gemischten Hintergrund (BalbC/cJ, 129S3/SvImJ, Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA).

2.1.2 Entnahme der Spinalganglien

Es wurden Spinalganglien von allen Segmenten der Wirbelsäule entnommen. Nach Tötung der Tiere mit CO₂-Gas erfolgte zunächst die Entfernung der Rückenhaut und die Durchtrennung der Wirbelsäule möglichst weit kaudal knapp oberhalb des Schwanzansatzes. Dann wurden nacheinander zunächst beidseits die paravertebrale Muskulatur und die Rippen kranialwärts durchgeschnitten und hiernach wurde durch einen weiteren Schnitt unterhalb des Schädelknochens die Wirbelsäule vollständig vom restlichen Körper abgetrennt. Anschließend wurde sie unter dem Präparationsmikroskop mittels zweier Pinzetten soweit von Binde- und Muskelgewebe befreit, bis vor allem auf der ventralen Seite die Wirbelkörper deutlich zu erkennen waren. Daraufhin erfolgte durch einen zunächst ventral, dann dorsal ausgeführten medianen Schnitt von kranial nach kaudal mit einer an der Spitze abgewinkelten Schere die Teilung der Wirbelsäule in zwei Hälften. Nach Entfernung des Rückenmarks und vorsichtigem Abzupfen des Bindegewebes und der Rückenmarkshäute, die sich über den Ganglien befinden, wurden die Spinalganglien in den Foramina intervertebralia dargestellt und entnommen. Dazu wurde durch leichten Zug an der Nervenwurzel und durch stumpfe Präparation mit einer feinen Pinzette das

Ganglion mobilisiert und von unten herausgeholt. Die Nervenfortsätze wurden nahe an den Ganglien abgetrennt. Die so gewonnenen Spinalganglien wurden in einer Petrischale mit dem Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA) gesammelt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Vorbereitung der Zellkulturschalen

Am Tag vor der Präparation der Ganglien wurden pro Versuchstier 12 runde autoklavierte Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) mehrmals mittels einer Pinzette durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Jedes Deckgläschen wurde in eine Einzelvertiefung einer 12-Multikulturschale gelegt und mit je 50 µl Poly-L-Lysine (70-150 kD; 200 µg/ml; SIGMA) beschichtet. Diese Behandlung gewährleistete eine ausreichend gute Haftung der Zellen. Die Kulturschale wurde dann mit Parafilm sorgfältig verschlossen, um ein Austrocknen der Deckgläschen zu vermeiden. Ihre Aufbewahrung bis zum Aussäen der Zellen erfolgte bei +4°C.

2.2.2 Herstellung der Zellsuspension und Aussäen der Zellen

Die Herstellung der Zellkultur erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Winter (Winter et al. 1988). Nach Entnahme der Ganglien erfolgte unter der sterilen Arbeitsbank mit Abzug zunächst die enzymatische Dissoziation der Zellen mit Collagenase Typ CLS IV (Biochrom Seromed, Berlin, Deutschland) und Trypsin (SIGMA). Dazu wurde das Nährmedium (DMEM) möglichst vollständig mit einer Pasteurpipette entfernt und 5 ml Collagenase (0.28 U/ml, in DMEM gelöst und steril filtriert) auf die Ganglien gegeben. Nach neunzigminütiger Inkubation im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂ (v/v) in Raumluft) wurde die Collagenase-Lösung entfernt, die Ganglien wurden einmal

mit Calcium- / Magnesium-freiem Dulbecco's phosphate buffered saline (CMF-D-PBS, GIBCO) gewaschen und für weitere 10 Minuten im Brutschrank mit 5 ml Trypsin inkubiert (25.000 U/ml, in CMF-PBS gelöst und steril gefiltert). Hierauf wurden nacheinander die Enzymreaktion durch 15 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum (10 %, verdünnt in Ham's F12 Nährmedium; Life Technologies, Gaithersburg, USA) in einem Zentrifugenröhrchen gestoppt, die Ganglien für 2 - 3 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette entfernt. Nach Zugabe von ca. 2 ml DMEM erfolgte die mechanische Dissoziation durch Trituration der Ganglien mit Hilfe von 3 Pasteurpipetten mit absteigendem Durchmesser (0.5 - 1 mm). Die Ausflussöffnung wurde zuvor mittels Hitze einer Bunsenbrennerflamme geglättet (fire polishing). Die resultierende Zellsuspension wurde langsam auf 10 ml einer 80%igen Percoll-Lösung (dies entspricht einer Dichte von 1,10 g/ml; Amersham Pharmacia Biotech, Brüssel, Belgien) geschichtet und 5 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert, um möglichst viele nicht-neuronale Zellen aus der Kultur zu entfernen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen ein weiteres Mal mit DMEM gewaschen, kurz mit der engsten Pasteurpipette trituriert und nochmals für 2-3 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert und schließlich mit 650 µl (bei 12 Deckgläschen) des Mediums resuspendiert. Die so entstandene Zelldichte lag typischerweise bei 3.000 - 4.000 Zellen. Je 50 µl dieser Zellsuspension wurden auf die beschichteten Deckgläschen pipettiert. Nach einer Sedimentationszeit von etwa 10 Minuten wurden die Zellen im Brutschrank aufbewahrt und nach ca. vier Stunden erfolgte die Zugabe von 1 ml Medium pro Vertiefung.

2.2.3 Zusammensetzung des Nährmediums

Dem Basismedium Ham's F12 (Life Technologies) wurden L-Glutamin (20 mM, GIBCO), Penicillin/Streptomycin (5.000 IU / 5.000 µg, GIBCO) und D-(+)-Glucose (40 mM, SIGMA) hinzugefügt und anschließend mittels einer

Spritze und eines Rotrand-Filters (20 µm, Schleicher & Schuell) steril filtriert. Danach wurde hitzeinaktiviertes Pferdeserum (10 %, GIBCO) dazugegeben.

2.2.4 Dauer und Protokoll der Zellkultur

Die Zellen wurden entweder für 6 Stunden (Kurzzeitkultur) oder 6 Tage (Langzeitkultur) in F12-Medium kultiviert.

Die Fütterung der Zellen in der Langzeitkultur erfolgte alle 2 Tage. Hierbei wurden dem Medium entweder keinerlei Wachstumsfaktoren, 7S-NGF (50 ng/ml, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), rekombinant humanes GDNF (rhGDNF, 50 ng/ml, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland) oder NTN (50 ng/ml, Genentech, San Francisco, USA) beigemischt.

In Kontrollexperimenten wurde die Wachstumsfaktor-Wirkung blockiert. Für die Neutralisation von NGF wurde ein anti-NGF-Antikörper (0,1 µg/ml, anti-mouse, Boehringer, Mannheim), für GDNF anti-rhGDNF-Antikörper (100 µg/ml, R&D-Systems) verwendet.

Zur Identifizierung der Rezeptoren, über die die NGF-Wirkung erfolgt, wurde ein funktionsblockierender Antikörper gegen den niederaffinen NGF-Rezeptor p75^{NTR} verwendet (0.1 µg/ml, anti-murine p75^{NTR} polyclonal antibody, Advanced Targeting Systems, Carlsbad, USA, Huber und Chao 1995). Um zu untersuchen, ob möglicherweise intrazelluläre Komponenten der Signalkaskade von GDNF an der GDNF-Wirkung beteiligt sind, kamen folgende blockierende Agenzien zum Einsatz: Herbimycin, um die intrazellulären Kinasen – hauptsächlich c-RET – zu blockieren (100 nM, Research Biochemicals International, Natick, USA; Taniguchi et al. 1993); Wortmannin zur Blockade der PI3-Kinase (25 µM, Biotrend, Köln, Deutschland, Kriegelstein et al. 1998), PP2 zur Blockade der SRC-Kinase (100 nM, Calbiochem) sowie PD98059 als Inhibitor für MAP-Kinase und ERK-Kinase (5 µM, New England Biolabs Inc., Dudley et al. 1995), um eine Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg zu unterdrücken.

2.3 Mehrfachmarkierung von Spinalganglienzellen

2.3.1 Oberflächenmarker IB4 zur Markierung der nicht-peptidergen Neurone

Zur Identifizierung der nicht-peptidergen Neurone wurden die Zellen mit IB4 markiert (Silverman und Kruger 1990). Hierfür wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen einmal 5 Minuten mit Hank's balanced salt solution (HBSS plus Ca^{2+} und Mg^{2+} , GIBCO) gewaschen und mit Fluorescein (FITC)-konjugiertem IB4 (10 $\mu\text{g/ml}$, SIGMA, verdünnt in HBSS) 8 Minuten in einer lichtdichten Färbe-Schale bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Inkubation und alle folgenden Arbeitsschritte mussten aufgrund der Instabilität des Fluoreszenzfarbstoffes unter Lichtschutz durchgeführt werden.

2.3.2 Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake zur funktionellen Markierung nozizeptiver Spinalganglienzellen

Zur funktionellen Markierung Capsaicin-sensitiver Neurone erfolgte eine Färbung nach einem modifizierten Protokoll von Winter (Winter 1987). Nach Inkubation der Zellkultur mit FITC-konjugiertem IB4 wurden die Deckgläschen einmal mit D-PBS und zweimal mit Assaypuffer (Zusammensetzung: 5.0 mM KCl, 4.2 mM MgCl_2 , 12.0 mM Glucose, 9.4 mM HEPES, 137.0 mM Sucrose, 57.8 mM NaCl, 0.9 mM CaCl_2) jeweils 3 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Lösung von Cobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5 mM, gelöst in Assaypuffer, SIGMA) mit Capsaicin (1 μM , in 100 % Ethanol, SIGMA) 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf wurde zweimal mit Assaypuffer gewaschen; sodann erfolgte die Ausfällung der in die Zellen aufgenommenen Cobalt-Ionen mit Ammoniumsulfid (1,2 % vol/vol, in Assaypuffer, SIGMA) für 5 Minuten. Schließlich wurden die Deckgläschen zweimal 3 Minuten mit Assaypuffer gewaschen und 15 Minuten mit 4%iger Paraformaldehydlösung (in PBS, Merck) fixiert.

Bei jeder Kultur wurde ein Kontrollexperiment mit CoCl_2 -Lösung ohne Capsaicin durchgeführt.

2.3.3 Immuncytochemische Mehrfachmarkierung der Neurone

IB4-Markierung und Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake wurden in Kombination mit Mehrfachfärbung durchgeführt (s. Tabelle 1). Nach Durchführung der IB4-Markierung und des Cobalt-Uptakes wurden die Zellen einmal für 5 Minuten mit PBS und zweimal 3 Minuten mit Waschlösung (0.1M PBS mit 0.1% Triton X-100, SIGMA) und Natriumazid (0.1%, Merck) gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Esel-Serum (10%, Chemicon) bei Raumtemperatur.

Zur Markierung der peptidergen Neurone wurde als Primärantikörper verwendet: anti-CGRP aus der Ziege 1:100 (Biotrend, Lindsay et al. 1989). Zur Markierung nozizeptiver Neurone wurde anti-VR1 aus dem Kaninchen 1:1250 (freundlicherweise überlassen von M. Caterina und D. Julius, University of San Francisco, San Francisco) eingesetzt. Zur Erfassung nicht-peptiderger Neurone, die durch GDNF beeinflussbar sind, wurden anti-GFR α 1 aus der Ziege 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) und anti-RET aus der Ziege 1:400 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) verwendet.

Die Sekundärantikörper waren: AMCA-konjugiertes anti-Ziege IgG vom Esel 1:100 (gegen anti-CGRP-Antikörper, Chemicon) in Kombination mit Cy3-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG vom Esel 1:200 bzw. 1:100 (gegen anti-VR1-Antikörper, Chemicon) und Cy3-anti-Ziege IgG vom Esel 1:100 (gegen RET- bzw. GFR α 1-Antikörper, Chemicon).

Färbung 1: IB4-Markierung plus Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake plus

Primärantikörper	Sekundärantikörper
anti-CGRP aus der Ziege 1:100	AMCA-anti-Ziege IgG vom Esel 1:100
anti-VR1 aus dem Kaninchen 1:1250	Cy3-anti-Kaninchen vom Esel 1:100

Färbung 2: IB4-Markierung plus Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake plus

Primärantikörper	Sekundärantikörper
anti-GFR α 1 aus der Ziege 1:200	Cy3-anti-Ziege IgG vom Esel 1:100

Färbung 3: IB4-Markierung plus Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake plus

Primärantikörper	Sekundärantikörper
anti-RET aus der Ziege 1:400	Cy3-anti-Ziege IgG vom Esel 1:100

Tabelle 1:

Übersicht über die verwendeten Kombinationen von Antikörpern in den durchgeführten Mehrfachmarkierungen

2.4 Analyse der Zellen

Die Auswertung der Markierungsexperimente erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 (Zeiss) unter Zuhilfenahme der 3 CCD Color Video Camera DXC-950P (Sony). Im Hellfeld wurden zunächst Gesichtsfelder mit ausreichender Zelldichte ausgewählt, eingestellt und fotografiert. Neurone wurden als Cobalt-positiv gewertet, wenn sie eine deutliche Braunfärbung aufwiesen. Danach erfolgte die Aufnahme derselben Gesichtsfelder mit Immunfluoreszenz, wobei folgende Filter zum Einsatz kamen: UV-Filter, Anregung bei 365 nm für AMCA; Filter mit Anregung bei 546 nm für Cy3; Filter mit Anregung bei 450 - 490 nm für FITC. Diese Aufnahmen wurden mittels Adobe Photoshop 5.5 gespeichert. Pro Versuch wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt.

Desweiteren kamen folgende Software-Programme zur Anwendung: Zur fotografischen Aufnahme der Zellen wurde Scion Image verwendet. Adobe Photoshop 5.5 kam zum Einsatz, um die Fluoreszenzaufnahmen zu bearbeiten und auszuwerten. Microcal Origin 6.0 und Corel Draw 10 wurden zur Erstellung von Grafiken verwendet. Die statistische Auswertung (Mittelwerte, Standardfehler der Mittelwerte) erfolgte mit Statistica 6.0.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der niederaffine Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR} ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Capsaicin-Sensitivität durch NGF

3.1.1 Der Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in Spinalganglienzellen von Wildtyp-Mäusen wird dosisabhängig durch NGF reguliert; die Regulation erfolgt in der CGRP-exprimierenden Neuronenpopulation

Ohne NGF: Zunächst wurde untersucht, ob die Proportion der auf Capsaicin reagierenden Neurone verändert wird, wenn sich kein NGF im Kulturmedium befindet. Hierzu wurden Neurone aus Wildtyp-Mäusen in Abwesenheit von NGF für 6 Tage kultiviert. Die Ergebnisse von Kulturen nach 6 Stunden ohne NGF bildeten den Ausgangswert. Durch Färbung mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und Immunfluoreszenz-Färbung gegen CGRP, VR1 und IB4 wurde untersucht, ob sich der Anteil dieser Neuronenpopulationen veränderte. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

Die Proportion der Cobalt-aufnehmenden Neurone veränderte sich signifikant durch die Abwesenheit von NGF im Medium nach 6 Tagen Zellkultur. Der Anteil Cobalt-gefärbter Neurone sank signifikant von $34 \pm 3 \%$ nach 6 Stunden Zellkultur auf $12 \pm 1 \%$ ab ($p < 0.01$). Der Anteil der IB4-bindenden Neurone wurde in einem Zeitraum von 6 Tagen durch die Abwesenheit von NGF nicht signifikant verändert. Nach 6 Stunden Zellkultur wurden $27 \pm 2 \%$ aller Zellen durch IB4 markiert, nach 6 Tagen Zellkultur waren es $27 \pm 2 \%$ ($p > 0.05$).

Der Anteil CGRP-exprimierender Neurone sank von $23 \pm 1 \%$ nach 6 Stunden auf $13 \pm 3 \%$ nach 6 Tagen ab ($p < 0.01$). Die Proportion der VR1-

exprimierenden Neurone ging signifikant von $26 \pm 3 \%$ nach 6 Stunden auf $15 \pm 2 \%$ nach 6 Tagen zurück ($p < 0.01$).

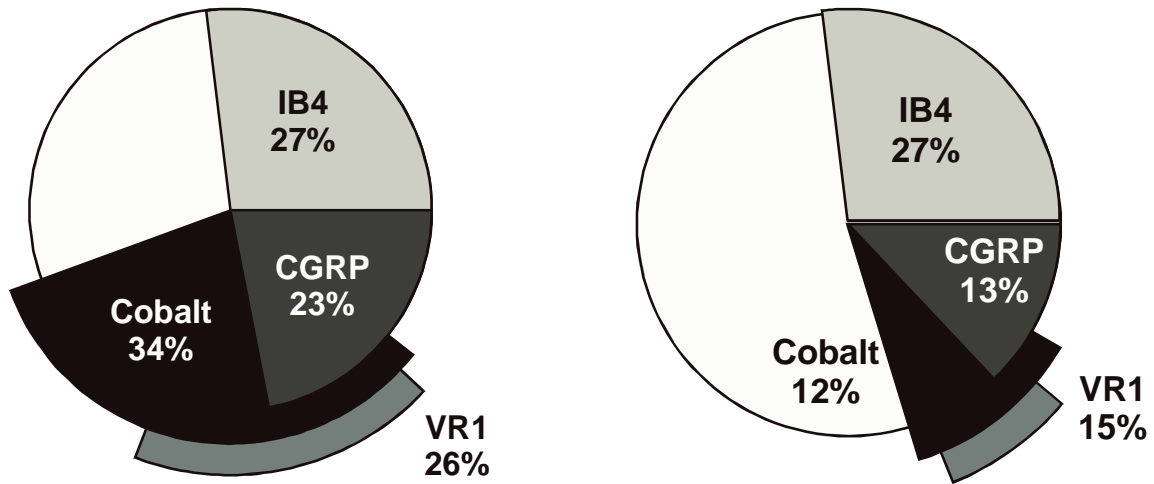


Abbildung 3:

Einfluss von NGF auf die Proportion von Neuronen von Wildtyp-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (schwarz) und die Marker CGRP, VR1 und IB4 nach 6 Stunden (links) und 6 Tagen (rechts) Zellkultur in NGF-freiem Medium

Um auszuschließen, dass kultivierte Zellen selbst NGF produzieren und ins Medium abgeben, erfolgten Cobalt-Uptake-Experimente, bei denen NGF-neutralisierende Antikörper ($0.1 \mu\text{g/ml}$) dem NGF-freien Medium zugesetzt wurden. Der Anteil Cobalt-gefärbter Neurone war nach 6 Tagen Zellkultur unter diesen Bedingungen mit $13 \pm 1 \%$ nicht signifikant unterschiedlich von $12 \pm 1 \%$ in NGF-freiem Medium ohne neutralisierenden Antikörper ($p > 0.05$).

Dosis-Wirkungs-Beziehung: Anschließend wurde untersucht, ob eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der NGF-Konzentration im Medium und der Capsaicin-Sensitivität der Neurone besteht. Hierfür wurden Cobalt-Uptake-Experimente an 6 Tage alten Kulturen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von NGF durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Bei Verwendung von niedrigen NGF-Konzentrationen (0.5 und 5 ng/ml) betrug die Proportion Cobalt-positiver Neurone $20 \pm 4 \%$ bzw. $25 \pm 3 \%$.

Bei höheren Konzentrationen (50 ng/ml und 250 ng/ml) lag der Anteil Cobalt-aufnehmender Nervenzellen bei $30 \pm 1 \%$ bzw. $50 \pm 1 \%$.

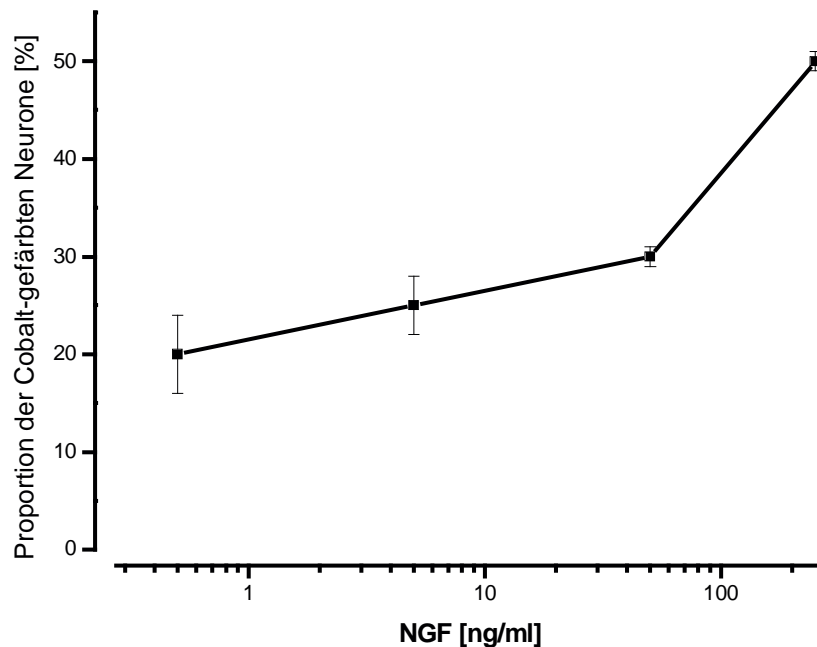


Abbildung 4:

Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der NGF-Konzentration des Mediums und der Proportion Cobalt-gefärbter Neurone nach Stimulation mit Capsaicin ($1 \mu\text{M}$), Neurone waren 6 Tage unter Kulturbedingungen, Wildtyp-Maus (4 Tiere pro Datenpunkt, >800 Neurone pro Datenpunkt)

Einfluss von NGF: Um zu ermitteln, ob sich durch die Anwesenheit von NGF die jeweiligen Anteile der Neurone verändern, die Cobalt-Ionen aufnehmen bzw. CGRP und VR1 exprimieren und IB4 binden, wurden die Neurone für 6 Stunden und 6 Tage in NGF-haltigem Medium (50 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde eine Kombination aus Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und Immunfluoreszenz-Färbung gegen IB4, CGRP und VR1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Es zeigte sich, dass keine der Populationen signifikant beeinflusst wurde. Cobalt-positiv waren $33 \pm 2 \%$ nach 6 Stunden Zellkultur und $30 \pm 1 \%$ nach 6 Tagen ($p > 0.1$). IB4-positiv waren $26 \pm 2 \%$ nach 6 Stunden Zellkultur und $27 \pm 0.4 \%$ nach 6 Tagen ($p > 0.1$). Der Anteil der CGRP-exprimierenden Neurone betrug $23 \pm 1 \%$ nach 6 Stunden, im Vergleich zu $22 \pm 3 \%$ nach 6 Tagen ($p > 0.1$). Die Proportion der

VR1-positiven Neurone veränderte sich ebenfalls nicht signifikant in Anwesenheit von NGF. Nach 6 Stunden Zellkultur exprimierten $26 \pm 3 \%$ aller Neurone VR1, verglichen mit $25 \pm 3 \%$ nach 6 Tagen ($p > 0.05$).

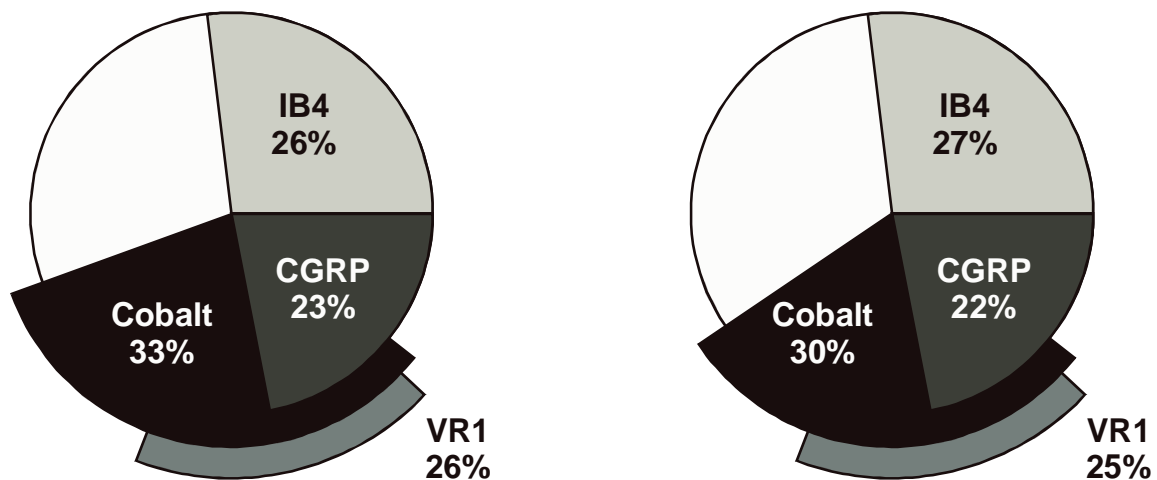


Abbildung 5:

Einfluss von NGF auf die Proportion der Neurone von Wildtyp-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (schwarz) und die Marker CGRP, VR1 und IB4 nach 6 Stunden (links) und 6 Tagen (rechts) Zellkultur in NGF-haltigem Medium (50 ng/ml)

3.1.2 Die native Capsaicin-Sensitivität und die native CGRP-Expression in Spinalganglienzellen sind von p75^{NTR} unabhängig

NGF benutzt ein Zwei-Rezeptor-System, es kann zum einen an den hochaffinen Rezeptor trkA binden, zum anderen an den niederaffinen Rezeptor p75^{NTR} (Bothwell 1995).

Zunächst wurde versucht, trkA mit Hilfe der Substanz k252a zu blockieren. Es zeigte sich jedoch, dass hierdurch die Zellen in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt wurden (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Untersuchung, ob der niederaffine NGF-Rezeptor p75^{NTR} für die

Aufrechterhaltung der konstitutiven Capsaicin-Sensitivität sowie für die konstitutive Expression von CGRP und VR1 benötigt wird. Hierfür wurden Spinalganglienzellen von Wildtyp-Mäusen und p75^{NTR}-knock out-Mäusen nach 6 Stunden Zellkultur mit NGF (50 ng/ml) verwendet. Im Anschluss daran wurden Färbungen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und immunocytoologischen Mehrfachfärbungen gegen CGRP, VR1 und IB4 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 gezeigt.

p75^{NTR}-knock out- Maus: Die Proportion Cobalt-gefärbter Neurone von p75^{NTR}-knock out- Mäusen nach Capsaicin-Stimulation (1µM) unterschied sich nicht signifikant von der in Wildtyp-Mäusen; 31 ± 2 % und 34 ± 3 % (Student's t-test, p > 0.1).

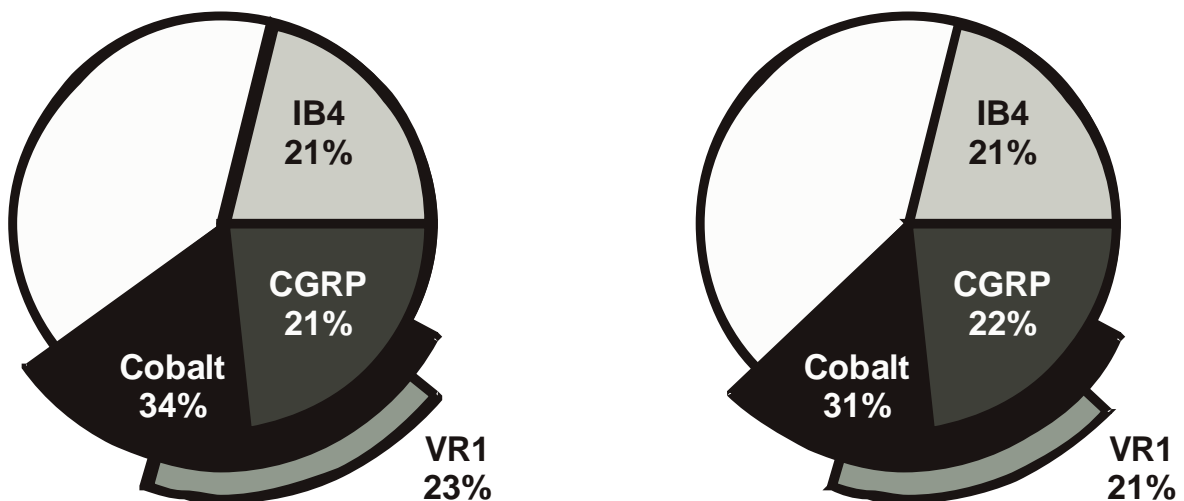


Abbildung 6:

Verteilung der Neurone mit Cobalt-Uptake, IB4-Bindung, CGRP- und VR1-Expression in der Wildtyp-Maus (links) und der p75^{NTR}-knock out-Maus (rechts) nach 6 Stunden Zellkultur mit NGF (50 ng/ml)

Mit Hilfe der Mehrfachfärbung konnte bei Neuronen in Wildtyp- wie in p75^{NTR}-knock out-Mäusen gezeigt werden, dass Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake nur in bestimmten Populationen von Neuronen vorkommt. Capsaicin-

induzierter Cobalt-Uptake findet sich in Neuronen, welche durch Antikörper gegen VR1 und CGRP gefärbt werden, jedoch niemals in IB4-bindenden Neuronen, d.h. nicht-peptidergen Neuronen. Das Lektin IB4 wurde von $21 \pm 2 \%$ in p75^{NTR}-knock out-Mäusen gebunden, ebenso von $21 \pm 2 \%$ in Wildtyp-Mäusen. Der Anteil CGRP-exprimierender Neurone war mit $22 \pm 4 \%$ in p75^{NTR}-knock out-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich von $21 \pm 2 \%$ in Wildtyp-Mäusen ($p > 0.1$). Neurone aus p75^{NTR}-knock out-Mäusen wurden zu $21 \pm 3 \%$ durch Antikörper gegen VR1 gefärbt, verglichen mit $23 \pm 3 \%$ der Neurone aus Wildtyp-Mäusen ($p > 0.1$).

3.1.3 Der NGF-vermittelte Rescue der Capsaicin-Sensitivität und CGRP-Expression lässt sich durch p75^{NTR}-blockierende Antikörper verhindern und ist in p75^{NTR}-knock out-Mäusen nicht möglich

Um zu untersuchen, ob p75^{NTR} für die Regulation der Capsaicin-Sensitivität und der CGRP-Expression durch NGF benötigt wird, wurden Experimente an Neuronen von Wildtyp-Mäusen und p75^{NTR}-knock out-Mäusen durchgeführt. Die Neurone wurden 6 Tage in An- und Abwesenheit von NGF kultiviert. Dem Medium von Wildtyp-Mäusen wurde zusätzlich ein p75^{NTR}-blockierender Antikörper ($0,1 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Eine Kombination von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und immunocytologischer Mehrfachfärbung gegen CGRP, VR1 und IB4 kam zur Anwendung.

Wildtyp-Maus: Nach Capsaicin-Stimulation waren $13 \pm 1 \%$ aller Neurone aus Wildtyp-Mäusen Cobalt-positiv (Abb. 7). Der Anteil Cobalt-gefärbter Neurone wurde durch den p75^{NTR}-blockierenden Antikörper soweit vermindert, dass kein signifikanter Unterschied mehr zu den Ergebnissen in Abwesenheit von NGF bestand: $13 \pm 1 \%$ und $12 \pm 1 \%$ ($p > 0.1$). Der Anteil der CGRP-exprimierenden Neurone war mit $12 \pm 2 \%$ nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen nach 6 Tagen Zellkultur in Abwesenheit von NGF ($13 \pm 3 \%$, $p > 0.1$). Der Anteil der VR1-exprimierenden Neurone war mit $15 \pm 1 \%$ nicht

signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen nach 6 Tagen Zellkultur in Abwesenheit von NGF ($15 \pm 2 \%$, $p > 0.1$).

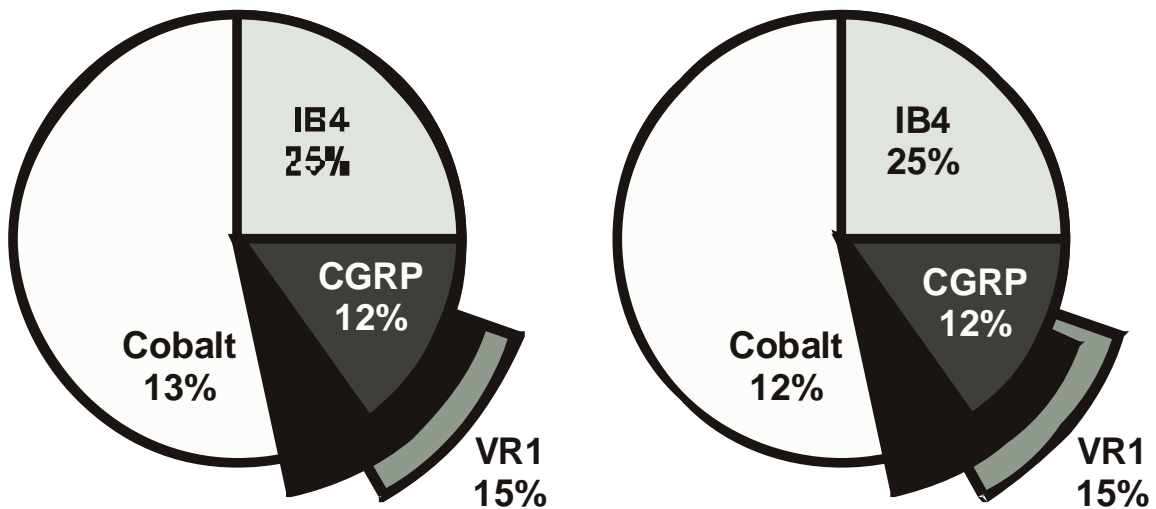


Abbildung 7:

Einfluss der Blockade von $p75^{NTR}$ auf die Proportion der Neurone von Wildtyp-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (schwarz) und die Marker CGRP, VR1 und IB4. Dem Medium wurde ein $p75^{NTR}$ -blockierender Antikörper ($0,1 \mu\text{g/ml}$) beigefügt.

Links: 6 Tage Zellkultur in NGF-haltigem Medium (50 ng/ml)

Rechts: 6 Tage Zellkultur ohne NGF

$p75^{NTR}$ -knock out-Maus: Nach Capsaicin-Stimulation waren $18 \pm 5 \%$ aller Neurone aus Wildtyp-Mäusen Cobalt-positiv (Abb. 8). Es bestand kein signifikanter Unterschied mehr zu den Ergebnissen in Abwesenheit von NGF: $18 \pm 5 \%$ und $12 \pm 4 \%$ ($p > 0.05$). Der Anteil der CGRP-exprimierenden Neurone war mit $12 \pm 1 \%$ nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen nach 6 Tagen Zellkultur in Abwesenheit von NGF ($13 \pm 3 \%$, $p > 0.1$). Der Anteil der VR1-exprimierenden Neurone war mit $13 \pm 1 \%$ nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen nach 6 Tagen Zellkultur in Abwesenheit von NGF ($15 \pm 2 \%$, $p > 0.1$).

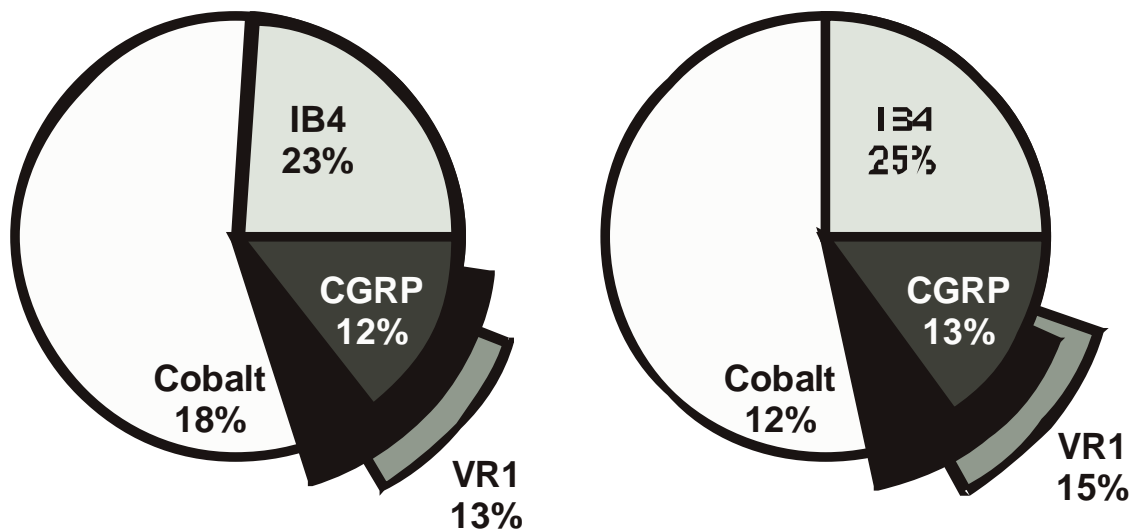


Abbildung 8:

Einfluss der Abwesenheit von $p75^{NTR}$ auf die Proportion der Neurone von $p75^{NTR}$ -knock out-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (schwarz) und die Marker CGRP, VR1 und IB4.

Links: 6 Tage Zellkultur in NGF-haltigem Medium (50 ng/ml)

Rechts: 6 Tage Zellkultur ohne NGF

3.1.4 Die Blockade von $p75^{NTR}$ verschiebt die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und Cobalt-Uptake nach rechts und verhindert den NGF-vermittelten Rescue von CGRP und VR1-exprimierenden Neuronen

Die nächste Frage war, ob die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und dem Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone durch den $p75^{NTR}$ -blockierenden Antikörper verändert wird. Zu dieser Fragestellung wurden Experimente an Neuronen von Wildtyp-Mäusen mit 4 verschiedenen NGF – Konzentrationen (0.5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml) in Gegenwart des $p75^{NTR}$ -blockierenden Antikörpers (0.1 μ g/ml) durchgeführt und die gewonnenen Ergebnisse mit den Ausgangswerten ohne NGF nach 6 Tagen Zellkultur verglichen (Tabelle 3).

Vergleich Cobalt-Uptake: Wurde NGF allein dem Kulturmedium beigelegt, so war bei Konzentrationen von 0.5 ng/ml und 5 ng/ml der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone ($21 \pm 6 \%$ bei 0.5 ng/ml und $24 \pm 5 \%$ bei 5 ng/ml) nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen, bei denen NGF und der p75^{NTR}-blockierende Antikörper im Medium vorhanden waren ($13 \pm 2 \%$ bei 0.5 ng/ml und $15 \pm 1 \%$ bei 5 ng/ml, jeweils $p > 0.1$). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei einer NGF-Konzentration von 50 ng/ml: Hier lag der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone bei $28 \pm 4 \%$ ohne Antikörper, durch die Blockade von p75^{NTR} sank der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone auf $13 \pm 2 \%$ ($p < 0.05$). Ähnliche Ergebnisse lieferten Experimente mit 250 ng/ml und 500 ng/ml NGF im Medium ($48 \pm 1 \%$ bzw. $50 \pm 3 \%$). Durch Blockade von p75^{NTR} sank der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone auf $20 \pm 3 \%$ bzw. $19 \pm 3 \%$ ($p < 0.001$).

NGF-Konzentration	Ohne Blockade von p75 ^{NTR}	Mit Blockade von p75 ^{NTR}
0.5 ng/ml	$21 \pm 6 \%$	$13 \pm 2 \%$
5 ng/ml	$24 \pm 5 \%$	$15 \pm 1 \%$
50 ng/ml	$28 \pm 4 \%$	$13 \pm 2 \%$
250 ng/ml	$48 \pm 1 \%$	$20 \pm 3 \%$
500 ng/ml	$50 \pm 3 \%$	$19 \pm 3 \%$

Tabelle 3:

Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen NGF-Konzentration und dem Anteil der Neurone aus Wildtyp-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake nach 6 Tagen Zellkultur in NGF-haltigem Medium in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) des p75^{NTR}-blockierenden Antikörpers

CGRP-Expression: Um zu untersuchen, ob die Blockade von p75^{NTR} die NGF-abhängige Regulation der CGRP-Expression verhindert, wurden die Neurone in Gegenwart verschiedener NGF-Konzentrationen über 6 Tage kultiviert, und anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Markierung von CGRP vorgenommen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit den

Ausgangswerten nach 6 Tagen Zellkultur ohne NGF verglichen. Die Anwesenheit des p75^{NTR}-blockierenden Antikörpers verhinderte den Rescue der CGRP-positiven Neuronenpopulation mit steigenden NGF-Konzentrationen im Medium: Mit 0.5 ng/ml NGF im Kulturmedium waren 8 ± 1 % aller Neurone CGRP-immunoreaktiv ($p > 0.1$). Die Anwesenheit des p75^{NTR}-blockierenden Antikörpers blockierte auch bei NGF-Konzentrationen von 5 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml eine Regulation des Anteils CGRP-immunoreaktiver Neurone durch NGF: Mit 5 ng/ml NGF im Kulturmedium waren 9 ± 1 % aller Neurone CGRP-immunoreaktiv ($p > 0.1$). Mit 50 ng/ml NGF im Medium waren 11 ± 1 % aller Neurone CGRP-immunoreaktiv ($p > 0.1$). Mit 250 ng/ml NGF im Medium zeigten 10 ± 3 % aller Neurone CGRP-Immunoreaktivität ($p > 0.1$). Waren 500 ng/ml NGF im Medium, betrug der Anteil der CGRP-immunoreaktiven Neurone 8 ± 1 % ($p > 0.1$).

Vergleichswert: % CGRP-positive Neurone ohne NGF	NGF-Konzentration	mit Blockade von p75 ^{NTR}
10 ± 2 %	0.5 ng/ml	8 ± 1 %
	5 ng/ml	9 ± 1 %
	50 ng/ml	11 ± 1 %
	250 ng/ml	10 ± 3 %
	500 ng/ml	8 ± 1 %

Tabelle 4:

Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und dem Anteil der Neurone aus Wildtyp-Mäusen mit CGRP-Expression nach 6 Tagen Zellkultur in NGF-haltigem Medium in Gegenwart des p75^{NTR}-blockierenden Antikörpers

VR1: Eine Regulation der VR1-Expression durch NGF wurde durch die Blockade von p75^{NTR} verhindert: Mit 0.5 ng/ml NGF im Kulturmedium waren 7 ± 2 % aller Neurone VR1-positiv. In Anwesenheit von 5 ng/ml NGF im

Kulturmedium betrug der Anteil VR1-positiver Neurone $11 \pm 0.3 \%$ ($p > 0.05$). Mit 50 ng/ml NGF im Medium waren $10 \pm 0.3 \%$ aller Neurone VR1-positiv ($p > 0.1$). Mit 250 ng/ml NGF im Medium zeigten $10 \pm 3 \%$ aller Neurone VR1-Immunoreaktivität ($p > 0.1$). Waren 500 ng/ml NGF im Kulturmedium vorhanden, wurden $10 \pm 1 \%$ aller Neurone durch einen Antikörper gegen VR1 angefärbt ($p > 0.1$).

Vergleichswert: % VR1-positive Neurone ohne NGF	NGF-Konzentration	mit Blockade von p75 ^{NTR}
$12 \pm 3 \%$	0.5 ng/ml	$7 \pm 2 \%$
	5 ng/ml	$11 \pm 0.3 \%$
	50 ng/ml	$10 \pm 0.3 \%$
	250 ng/ml	$10 \pm 3 \%$
	500 ng/ml	$10 \pm 1 \%$

Tabelle 5:

Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und dem Anteil der Neurone aus Wildtyp-Mäusen mit VR1-Expression nach 6 Tagen Zellkultur in NGF-haltigem Medium in Gegenwart des p75^{NTR}-blockierenden Antikörpers

3.2 Die Capsaicin-Sensitivität von Spinalganglienzellen der Maus wird durch den Wachstumsfaktor GDNF reguliert

Bekannt ist, dass die IB4-bindenden nozizeptiven Spinalganglienzellen Rezeptoren für GDNF exprimieren (Bennett et al. 1998). Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es zu prüfen, ob der Anteil Capsaicin-sensitiver Spinalganglienzellen adulter Mäuse durch GDNF beeinflusst wird.

3.2.1 Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake kolokalisiert nicht mit IB4, GFR α 1 oder c-RET in Kurzzeitkulturen

Um herauszufinden, ob Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake in der nicht-peptidergen Neuronenpopulation vorkommt, wurden die Zellen nach einer Kulturdauer von 6 Stunden in Anwesenheit von 50 ng/ml GDNF mittels einer Farbe-Kombination aus Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake mit immuncytologischer Mehrfachfärbung gegen IB4 und GFR α 1 oder IB4 und c-RET analysiert.

Wurden Spinalganglienzellen nach 6 Stunden unter Kulturbedingungen mit Capsaicin stimuliert, zeigten 31 ± 1 % einen Cobalt-Uptake (Abb. 9 a). Bei Analyse mit Mehrfachfärbung waren 27 ± 1 % aller Neurone GFR α 1-immunoreaktiv und IB4 banden 30 ± 1 %. Eine Kolokalisation von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und GFR α 1 oder IB4 kam nicht vor. Zwei Drittel (65 ± 4 %) der IB4-bindenden Zellen exprimierten gleichzeitig GFR α 1, von den GFR α 1-immunoreaktiven Zellen banden 78 ± 5 % IB4. Expression von c-RET wurde zum größten Teil in der IB4-Population gefunden (Abb. 9 b): 75 ± 5 % der IB4-positiven Neurone exprimierten gleichzeitig c-RET. Sehr wenig Koexpression von c-RET zeigte sich mit CGRP (4 ± 1 %) und Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (3 ± 1 %). Ein kleiner Anteil exprimierte c-RET ohne weitere Marker (9 ± 2 %).

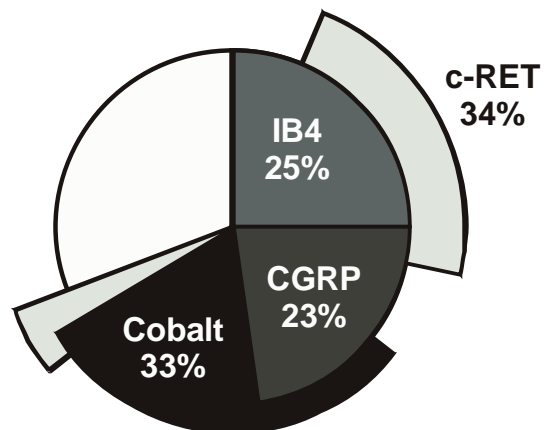
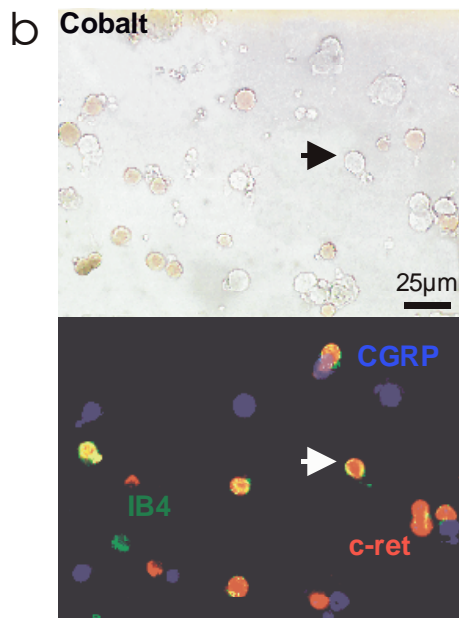
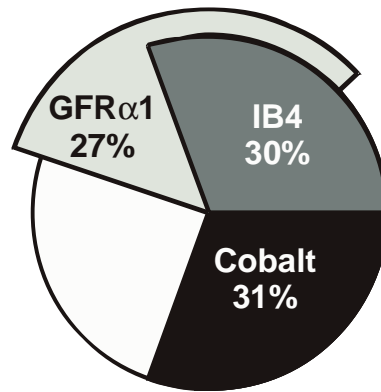
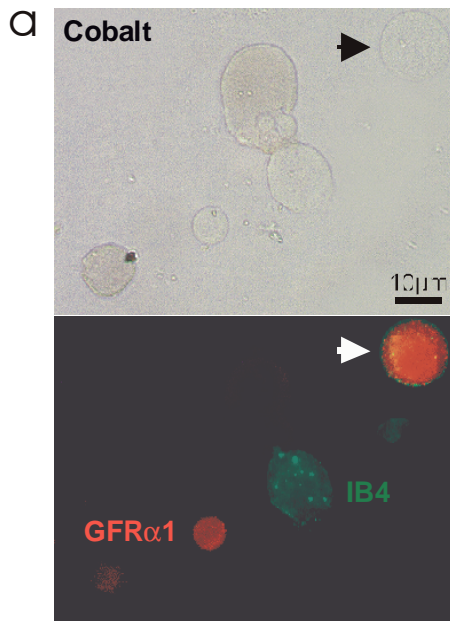


Abbildung 9:

Proportion von Neuronen von Wildtyp-Mäusen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake (schwarz) und Markern für die peptiderge (CGRP, b) und die nicht-peptiderge Neuronenpopulation (IB4, GFRα1, c-RET, a) nach 6 Stunden Zellkultur in GDNF-haltigem Medium (50 ng/ml)

3.2.2 GDNF reguliert die Capsaicin-Sensitivität von Spinalganglienzellen

Zur Prüfung, ob GDNF für die Regulation der Capsaicin-Sensitivität benötigt wird, wurden Experimente an Neuronen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Neurone wurden 6 Tage in Anwesenheit von GDNF (50 ng/ml) kultiviert. Als Kontrolle wurden Experimente an Zellkulturen über 6 Tage ohne GDNF vorgenommen. Um herauszufinden, ob Veränderungen in bestimmten Neuronenpopulationen stattfinden, wurde eine Färbe-Kombination aus Cobalt-Uptake mit Immunfluoreszenz-Markierung von entweder IB4 und GFR α 1 oder CGRP und VR1 durchgeführt.

Cobalt-Uptake: Nach 6 Tagen Zellkultur in Anwesenheit von GDNF kultiviert stieg der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone von 10 ± 1 % ohne GDNF im Medium (Daten nicht gezeigt) auf 39 ± 2 % mit GDNF an ($p < 0.001$).

Neuronensubpopulationen: Die Capsaicin-Sensitivität konnte in Anwesenheit von GDNF in verschiedenen Populationen von Spinalganglienzellen nachgewiesen werden (Abb. 10). Nach 6 Tagen Kultur in GDNF-haltigem Medium zeigten ein Drittel (31 ± 5 %) der IB4-bindenden Neurone Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake (Daten nicht gezeigt). In der Langzeitkultur konnten GFR α 1-exprimierende Neurone gefunden werden, die gleichzeitig Cobalt aufnahmen (39 ± 3 %), jedoch zeigte kaum eine Zelle die 3 Marker Cobalt-Uptake, IB4 und GFR α 1 gleichzeitig (Abb. 10).

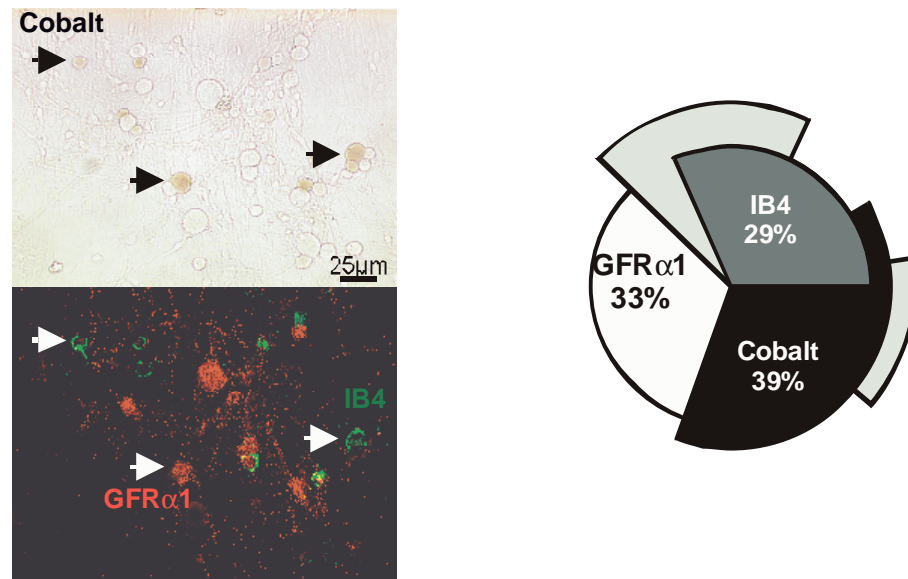


Abbildung 10:

Einfluss von GDNF auf die Proportion von Neuronen mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake, GFRα1 und IB4 in Wildtyp-Mäusen nach 6 Tagen Zellkultur in GDNF-haltigem Medium (50 ng/ml)

NGF und GDNF: Einfluss auf peptiderge und nicht-peptiderge Population: GDNF konnte nach 6 Tagen Zellkultur keinen Rescue der CGRP-Expression bewirken. Der Anteil CGRP-exprimierender Neurone war in GDNF-Anwesenheit ($11 \pm 1 \%$) nicht signifikant unterschiedlich von dem bei Abwesenheit von GDNF ($12 \pm 0.4 \%$, $p > 0.1$). Um herauszufinden, ob NGF und GDNF streng getrennte Neuronenpopulationen beeinflussen, wurden beide Faktoren zusammen in einer Konzentration von je 50 ng/ml dem Kulturmedium beigefügt. Bei Anwesenheit beider Faktoren im Kulturmedium addierten sich die bereits oben beschriebenen Effekte: GDNF induzierte Cobalt-Uptake in der IB4-Population, NGF sorgte für den Rescue der CGRP-positiven Neurone (Daten nicht gezeigt).

Der Anteil Cobalt-gefärbter Neurone stieg nach 6 Tagen Zellkultur signifikant von $39 \pm 1 \%$ in Anwesenheit von GDNF alleine auf $46 \pm 1 \%$ in Anwesenheit beider Wachstumsfaktoren an ($p < 0.01$). Der Anteil CGRP-exprimierender Neurone lag in Anwesenheit von NGF und GDNF bei $19 \pm 4 \%$ aller Zellen, dieser Wert war nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen mit NGF alleine ($22 \pm 3 \%$, $p > 0.1$). Ein Drittel ($31 \pm 5 \%$) der IB4-

bindenden Neurone zeigte Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake, 39 ± 3 % der GFR α 1-exprimierenden Neurone nahmen gleichzeitig Cobalt auf (Daten nicht gezeigt).

Endogene GDNF-Freisetzung: Zur Untersuchung, ob möglicherweise endogen freigesetztes GDNF die Ergebnisse beeinflussen könnte, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: Spinalganglienzellen wurden 6 Tage kultiviert in GDNF-freiem Medium, in GDNF-freiem Medium in Gegenwart eines GDNF-neutralisierenden Antikörpers (0.1 μ g/ml) und in GDNF-haltigem (50 ng/ml) Medium in Gegenwart eines GDNF-neutralisierenden Antikörpers. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake zwischen Kulturen, die in GDNF-freiem Medium (14 ± 1 %) bzw. in GDNF-freiem Medium in Gegenwart eines GDNF-neutralisierenden Antikörpers (14 ± 2 %, $p > 0.1$) bzw. in GDNF-haltigem Medium in Gegenwart eines neutralisierenden Antikörpers (13 ± 2 %, $p > 0.1$) gehalten wurden. In diesen Experimenten fand sich keine Kollokalisierung von Cobalt-Uptake mit IB4 oder GFR α 1.

3.2.3 GDNF reguliert den Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake dosisabhängig

Die Neurone wurden in Gegenwart unterschiedlicher GDNF-Konzentrationen (0.5, 5, 50, 250 ng/ml) für 6 Tage kultiviert und durch Kombination von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake mit Immunfluoreszenzfärbung gegen IB4 und GFR α 1 analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit den Werten nach 6 Tagen Zellkultur ohne GDNF verglichen. In Anwesenheit von 0.5 ng/ml GDNF im Medium erhöhte sich der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone signifikant von 10 ± 2 % ohne GDNF auf 19 ± 1 % ($p < 0.01$, Abb. 11 a). Mit 5 ng/ml GDNF im Medium stieg dieser Prozentsatz signifikant auf 28 ± 3 % ($p < 0.01$), 50 ng/ml GDNF im Medium führten zu 39 ± 2 % Cobalt-aufnehmenden Neuronen ($p < 0.01$). Eine GDNF-

Konzentration von 250 ng/ml steigerte den Anteil an Capsaicin-sensitiven Zellen nicht weiter ($39 \pm 2 \%$, $p < 0.1$).

GFR α 1-Cobalt-Kolokalisation: Die GFR α 1-Cobalt-Kolokalisation wurde durch GDNF dosisabhängig reguliert (Abb. 11 b): Eine GDNF-Konzentration von 0.5 ng/ml induzierte de novo Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake in $5 \pm 3 \%$ der GFR α 1-exprimierenden Neurone ($p < 0.01$). Bei einer GDNF-Konzentration von 5 ng/ml stieg der Anteil der GFR α 1-positiven Neurone, die gleichzeitig Cobalt-positiv waren, auf $20 \pm 6 \%$ an ($p < 0.01$). Waren 50 ng/ml GDNF im Medium vorhanden, betrug dieser $39 \pm 4 \%$ ($p < 0.01$). Bei einer GDNF-Konzentration von 250 ng/ml fand keine signifikante Erhöhung des Anteils der GFR α 1-positiven Neurone, die gleichzeitig Cobalt-Ionen aufnahmen, mehr statt ($40 \pm 3 \%$, $p > 0.1$).

IB4-Cobalt-Kolokalisation: In den IB4-positiven Neuronen ließ sich zeigen, dass GDNF den Anteil der Cobalt-gefärbten Neurone steigert (Abb. 11 c). Kulturen in GDNF-freiem Medium zeigten nach 6 Tagen keinerlei Überlappung zwischen Neuronenpopulationen, die IB4 banden und Cobalt aufnahmen. Bei Zugabe von 0.5 ng/ml GDNF wurde de novo Cobalt-Uptake in $3 \pm 1 \%$ der IB4-positiven Neurone induziert ($p > 0.1$). Die Gegenwart von 5 ng/ml GDNF ließ den Anteil an IB4- und Cobalt-positiven Neuronen auf $20 \pm 2 \%$ ($p < 0.001$), 50 ng/ml GDNF auf $25 \pm 4 \%$ ($p < 0.01$) ansteigen. Eine GDNF-Konzentration von 250 ng/ml GDNF erhöhte den Anteil der IB4-positiven Neurone mit Cobalt-Uptake auf $40 \pm 3 \%$ ($p < 0.01$).

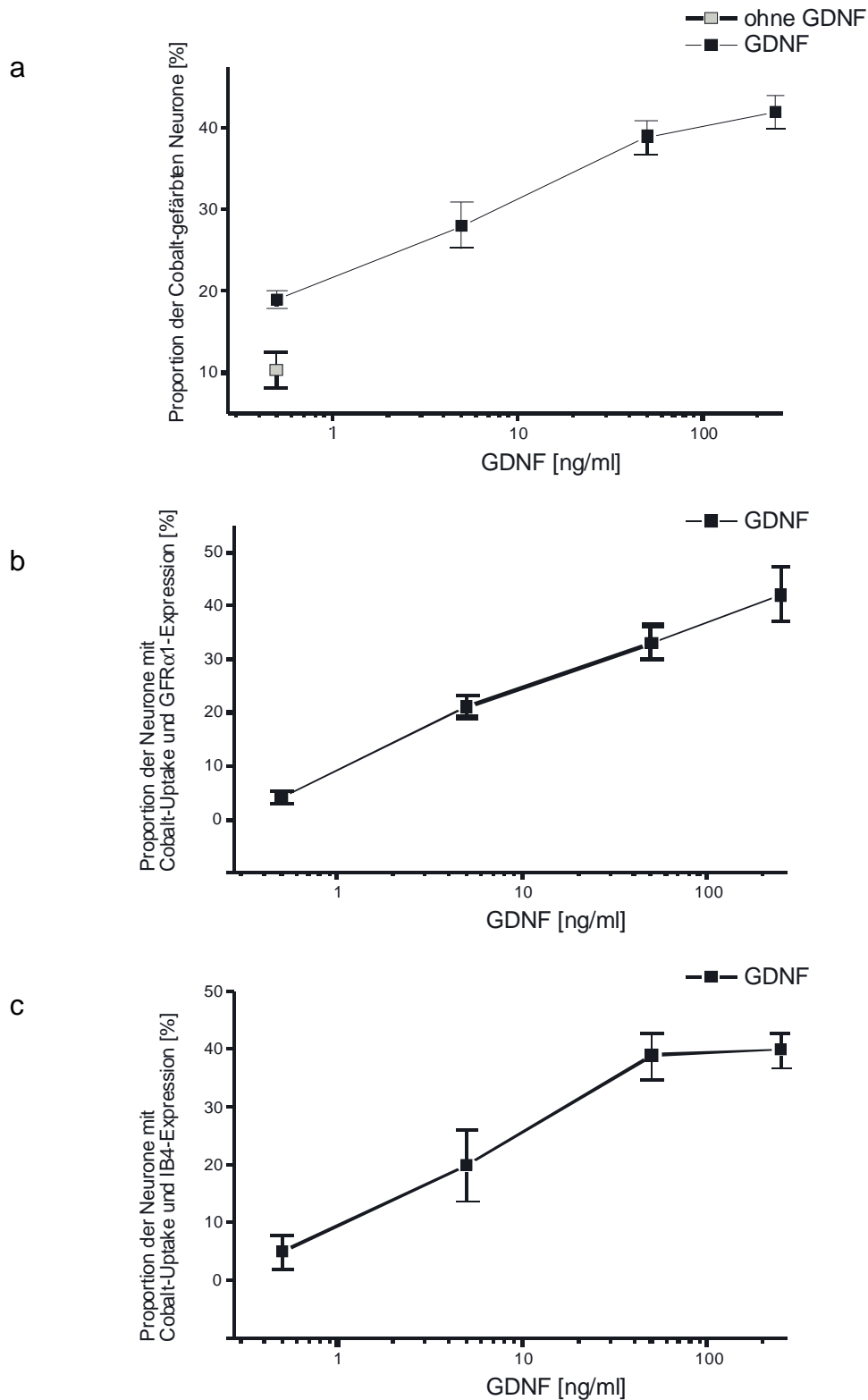


Abbildung 11:

Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der GDNF-Konzentration des Mediums und
 a der Proportion Cobalt-gefärbter Neurone nach Stimulation mit Capsaicin (1 μ M)
 b der GFR α 1-Cobalt-Kolokalisation
 c der IB4-Cobalt-Kolokalisation

Neurone waren 6 Tage unter Kulturbedingungen, Wildtyp-Maus (4 Tiere pro Datenpunkt, >800 Neurone pro Datenpunkt)

3.2.4 Der c-RET-abhängige Signaltransduktionsweg wird für die Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population benötigt

Um zu untersuchen, ob für die Regulation der Capsaicin-Sensitivität durch GDNF und die de novo Induktion von Cobalt-Uptake in der IB4-bindenden Population c-RET benötigt wird, wurden Neurone 6 Tage in Anwesenheit von GDNF (50 ng/ml) kultiviert. Danach folgte eine Färbekombination von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake und einer Immunfluoreszenz-Färbung gegen IB4 und c-RET. Als Bezugswerte dienten zunächst die Ergebnisse nach 6 Stunden Zellkultur mit GDNF. Weiterhin wurden die Werte mit den Ergebnissen nach 6 Tagen Zellkultur ohne GDNF verglichen. In Kontrollexperimenten wurde in 6-Tages-Kulturen in Anwesenheit von GDNF die Wirkung von c-RET durch Herbimycin (100 nM) blockiert.

c-RET-Expression in Anwesenheit von GDNF: In der Gegenwart von GDNF (50 ng/ml) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der c-RET-Expression von 34 ± 5 % nach 6 Stunden Zellkultur auf 47 ± 5 % nach 6 Tagen Zellkultur ($p < 0.01$). Gleichzeitig kam es nach 6 Tagen Zellkultur in Anwesenheit von GDNF zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der c-RET-exprimierenden Neuronenpopulation, von 3 ± 0.3 % nach 6 Stunden Zellkultur auf 17 ± 3 % nach 6 Tagen Zellkultur in Gegenwart von GDNF ($p < 0.01$, Abb. 12 a). Drei Viertel der c-RET-exprimierenden Zellen mit Cobalt-Uptake banden zusätzlich IB4 (13 ± 1 % aller Neurone).

c-RET-Expression in Abwesenheit von GDNF: In Kontrollexperimenten wurden Spinalganglienzellen über 6 Tage in GDNF-freiem Medium kultiviert (Abb. 12 a, rechte Säule). Es fand keine signifikante Veränderung der Expression von c-RET statt: Nach 6 Stunden Zellkultur waren 29 ± 2 % aller Neurone c-RET-positiv, nach 6 Tagen in Abwesenheit von GDNF 30 ± 3 % ($p > 0.1$). Auch gab es keine Doppelfärbung von c-RET-exprimierenden und Cobalt-aufnehmenden Neuronen in Kulturen ohne GDNF.

Blockade von c-RET durch Herbimycin: Um die Wirkung der gesteigerten Expression von c-RET durch GDNF auf den Cobalt-Uptake zu untersuchen, wurde c-RET durch Zugabe von Herbimycin zum GDNF-haltigen Medium blockiert. Herbimycin (100 nM) in GDNF-haltigem Medium (50 ng/ml) reduzierte nach 6 Tagen Zellkultur die Anzahl Cobalt-gefärbter Neurone von 39 ± 2 % in Anwesenheit von GDNF alleine auf 21 ± 1 % ($p < 0.01$, Abb. 12 b). Herbimycin konnte die de novo-Induktion von Cobalt-Uptake in der IB4-bindenden Population signifikant verringern. In Gegenwart von Herbimycin zeigten nur 6 ± 1 % der IB4-bindenden Zellen Cobalt-Aufnahme, im Gegensatz zu 31 ± 5 % in Anwesenheit von GDNF alleine ($p < 0.01$).

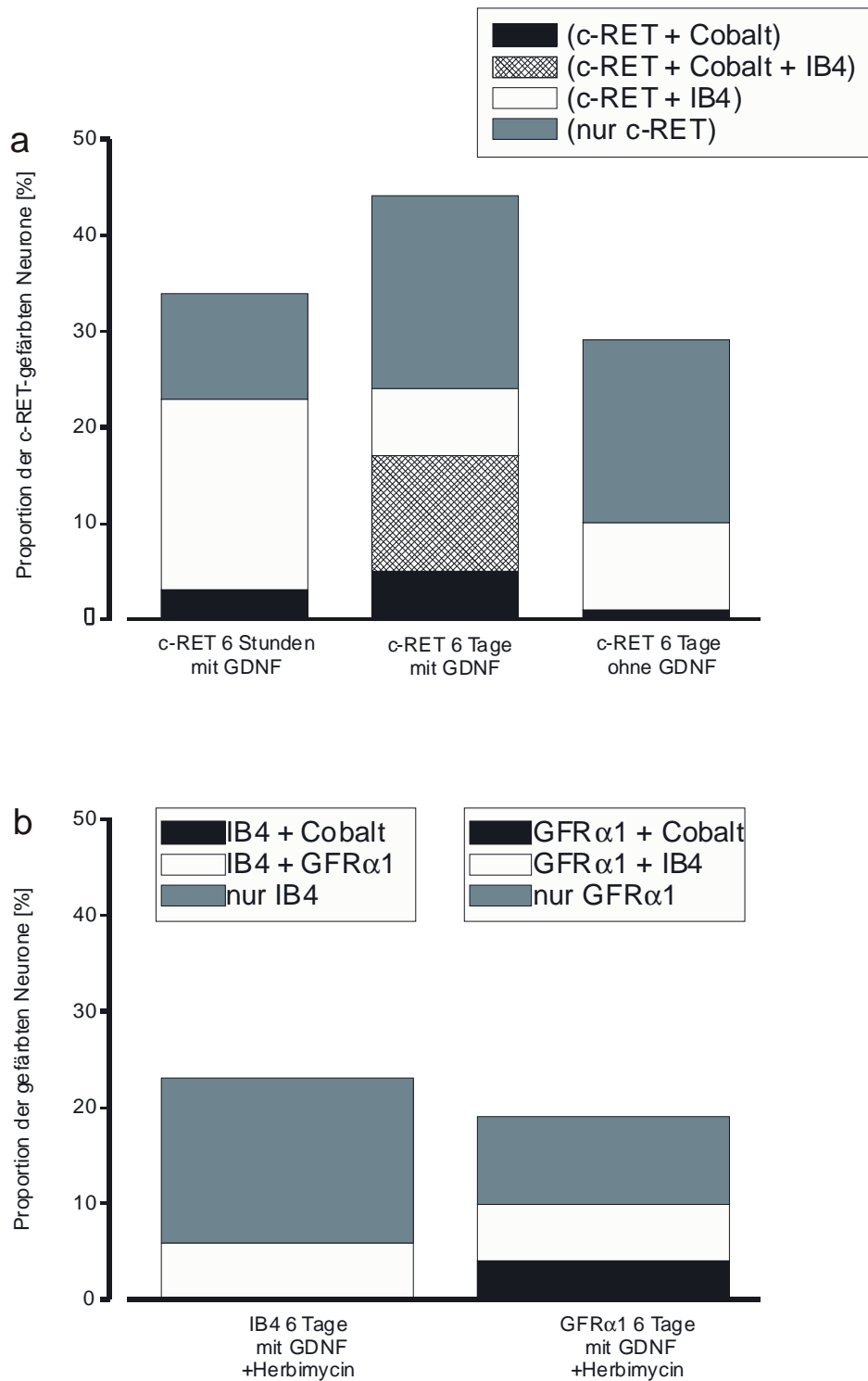


Abbildung 12:

- a Einfluss von c-RET-abhängiger Signaltransduktion auf Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake in der IB4-Population nach 6 Stunden Zellkultur mit GDNF (50 ng/ml, linke Säule), nach 6 Tagen Zellkultur mit GDNF (mittlere Säule), nach 6 Tagen ohne GDNF (rechte Säule) bei Neuronen aus Wildtyp-Mäusen
- b Einfluss der Blockade von c-RET durch Herbimycin (100nM) nach 6 Tagen Zellkultur mit GDNF auf die IB4-Cobalt-Kolokalisation (linke Säule) und auf die GFR α 1-Kobalt-Kolokalisation (rechte Säule)

3.2.5 SRC-Kinase und GFR α 1-abhängige Signaltransduktion wird für die Transduktion des GDNF-Effektes benötigt

Wie im vorherigen Absatz bereits ausgeführt, zeigten bei Blockade von c-RET durch Herbimycin in Gegenwart von GDNF (50 ng/ml) 22 ± 5 % der GFR α 1-exprimierenden Neurone Cobalt-Uptake – verglichen mit 39 ± 3 % der GFR α 1-positiven Neurone in Gegenwart von GDNF ohne Herbimycin ($p < 0.01$). Um zu untersuchen, inwieweit c-RET-unabhängige Wege der Signaltransduktion bei der Induktion des Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptakes in der GFR α 1-Population eine Rolle spielten, wurden Experimente durchgeführt, in denen die SRC-Kinasen durch PP2 (100 nM) in einem GDNF-haltigen Medium (50 ng/ml) über einen Zeitraum von 6 Tagen blockiert wurden. Anschließend folgte eine Mehrfachfärbung gegen GFR α 1 und IB4 in Kombination mit Cobalt-Uptake. Die Ergebnisse wurden mit denen nach 6 Tagen Zellkultur mit GDNF verglichen.

Blockade der SRC-Kinasen durch PP2: Die Anzahl Cobalt-aufnehmender Neurone sank von 39 ± 3 % in GDNF-haltigem Medium auf 25 ± 0.2 % ($p < 0.01$). Die Blockade der SRC-Kinasen führte zu einer signifikanten Reduktion des Anteils der GFR α 1-positiven Neurone mit Cobalt-Uptake (Abb. 13), dieser sank von 39 ± 3 % in GDNF-haltigem Medium auf 17 ± 2 % ($p < 0.01$).

IB4-Cobalt-Kolokalisation: Die GDNF-abhängige de novo Induktion von Cobalt-Uptake in der IB4-Population wurde durch die Blockade der SRC-Kinasen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 13): 24 ± 1 % der IB4-positiven Neurone zeigten Cobalt-Uptake, verglichen mit 31 ± 5 % in Gegenwart von GDNF ohne blockierende Substanzen ($p > 0.1$).

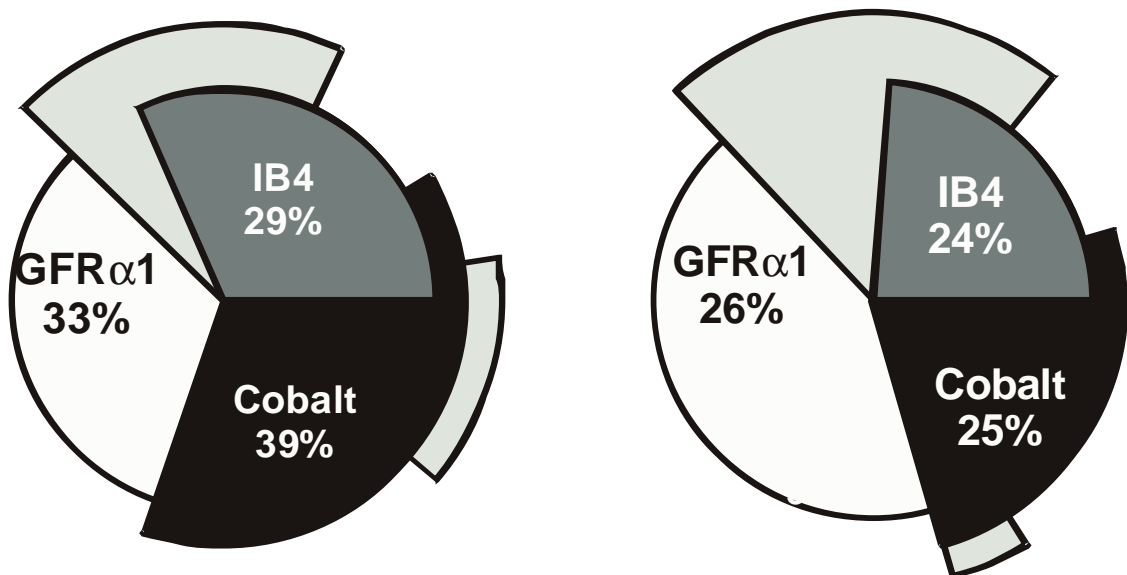


Abbildung 13:

Einfluss von SRC-abhängiger Signaltransduktion auf Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake in der IB4- und GFR α 1-Population nach 6 Tagen Zellkultur mit GDNF (links) und 6 Tagen mit GDNF und PP2 (100 nM) (rechts) bei Neuronen aus Wildtyp-Mäusen

Blockade mit Herbimycin und PP2: Wurden beide blockierenden Substanzen – Herbimycin (100 nM) und PP2 (100 nM) – einem GDNF-haltigen Medium (50 ng/ml) über 6 Tage beigefügt, reduzierte sich der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone von $39 \pm 3 \%$ auf $16 \pm 1 \%$ ($p < 0.01$). In Anwesenheit beider blockierenden Agenzien zeigten weder IB4-positive noch GFR α 1-exprimierende Neurone Cobalt-Uptake. Bei keinem der verwendeten Marker (Cobalt-Uptake, IB4, GFR α 1) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen ohne GDNF im Kulturmedium und den Ergebnissen mit GDNF und beiden blockierenden Agenzien (Daten nicht gezeigt).

3.2.6 Ein Rezeptor für Neurturin (GFR α 2) wird für die c-RET-abhängige Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population benötigt

Wie unter 3.2.2 dargelegt, exprimierten fast keine IB4-positiven Neurone mit Cobalt-Uptake nach Langzeitkultur in GDNF-haltigem Medium GFR α 1. Jedoch waren nach Kurzzeitkultur zwei Drittel der IB4-bindenden Neurone gleichzeitig positiv für GFR α 1. Im Folgenden wurde untersucht, ob der GFR α 2-Rezeptor Einfluss nimmt auf die Induktion von Cobalt-Uptake in IB4-positiven Neuronen. Neurone aus Wildtyp-Mäusen wurden für 6 Tage in einem Medium kultiviert, das Neurturin (NTN) - einen spezifischen Liganden für GFR α 2 - in 4 verschiedenen Konzentrationen enthielt (0.5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml). Anschließend wurde eine Mehrfachfärbung gegen GFR α 1 und IB4 in Kombination mit Cobalt-Uptake durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen nach 6 Tagen Zellkultur mit entsprechenden GDNF-Konzentrationen verglichen.

Dosis-Wirkungs-Beziehung NTN-Cobalt-Uptake: Der Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake wurde durch NTN in Langzeitkulturen dosisabhängig reguliert (Abb. 14 a). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bereits zwischen den beiden niedrigen Konzentrationen 0.5 ng/ml und 5 ng/ml: Hier betrug der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone $12 \pm 3 \%$ bzw. $20 \pm 1 \%$ ($p < 0.01$). Höhere NTN-Konzentrationen konnten diesen Prozentsatz nicht weiter steigern.

IB4-Cobalt-Kolokalisation: Der de novo induzierte Cobalt-Uptake in der IB4-Population wurde dosisabhängig durch NTN reguliert (Abb. 14 b). Wurden 0.5 ng/ml NTN dem Medium zugesetzt, fand sich eine de novo Induktion von Cobalt-Uptake in $5 \pm 2 \%$ der Neurone der IB4-Population. Dies war nicht signifikant unterschiedlich vom Effekt von 0.5 ng/ml GDNF im Medium: $4 \pm 1 \%$ der IB4-bindenden Neurone nahmen Cobalt auf ($p > 0.1$). Hingegen ist in Abb. 14 b zu sehen, dass bei einer NTN-Konzentration von 5 ng/ml $39 \pm 4 \%$ der IB4-bindenden Neurone nach Capsaicin-Stimulus Cobalt-Uptake aufwiesen. 50 ng/ml NTN bewirkten bei $43 \pm 4 \%$ der IB4-positiven Neurone Cobalt-Uptake, während 50 ng/ml GDNF dies bei $33 \pm 3 \%$ der IB4-bindenden Zellen induzierte

($p > 0.05$). Wiederum war kein weiterer Einfluss von höheren Konzentrationen von NTN oder GDNF zu erkennen.

GFR α 1-Cobalt-Kolokalisation: NTN bewirkte keine signifikante Induktion von Cobalt-Uptake in der GFR α 1-Population (Abb. 14 c). Wurden 0.5 ng/ml NTN im Kulturmedium verwendet, nahmen nur 2 ± 1 % der GFR α 1-positiven Zellen Cobalt-Ionen auf, 5 ng/ml konnten diesen Anteil nicht signifikant steigern (6 ± 3 %, $p > 0.1$), auch höhere Konzentrationen beeinflussten – im Gegensatz zu GDNF – die GFR α 1–Cobalt–Coexpression nicht.

NTN (50 ng/ml) induzierte Cobalt-Uptake in 42 ± 10 % der IB4-positiven Neurone (12 ± 1 % aller Neurone). Dies ist nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen mit GDNF-haltigem Medium, wo 31 ± 5 % der IB4-bindenden Neurone Cobalt-Färbung zeigten ($p > 0.1$). Von den Neuronen, die gleichzeitig IB4 banden und Cobalt aufnahmen, exprimierten 60 Neurone zusätzlich noch c-RET, 10 ± 1 % aller Neurone waren positiv für alle drei Marker.

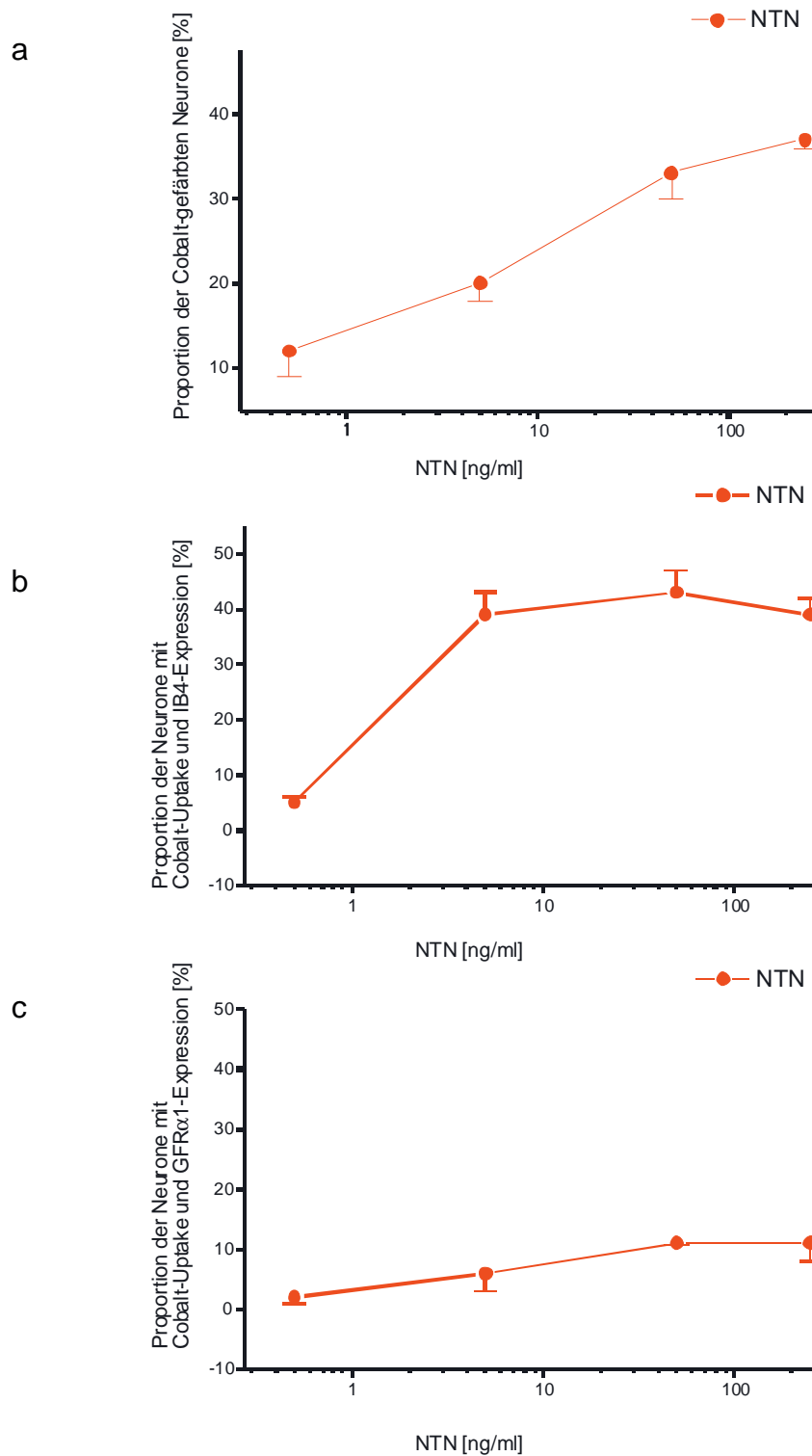


Abbildung 14:

Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen der NTN- und GDNF-Konzentration des Mediums und der Proportion Cobalt-gefärbter Neurone. a:

nach Stimulation mit Capsaicin (1 μ M); b:

der GFR α 1-Cobalt-Kolokalisation; c:

der IB4-Cobalt-Kolokalisation

Neurone waren 6 Tage unter Kulturbedingungen, Wildtyp-Maus (4 Tiere pro Datenpunkt, >800 Neurone pro Datenpunkt)

3.2.7 Blockierung der MAP-Kinase beeinflusst den GDNF-Effekt nicht, Blockade der PI3-Kinase partiell

Die Aktivierung der mitogen-activated protein kinase (MAPK) stellte eine Möglichkeit der Signaltransduktion von GDNF-Rezeptoren dar, weil sie immediate-early-Gene phosphorylieren (z.B. *c-fos* und *c-jun*), jedoch auch delayed-response-Gene wie CREB (Trupp et al. 1999). Diese Transkriptionsfaktoren können schnelle wie langanhaltende Veränderungen in der Genexpression bewirken. Um festzustellen, ob die Blockade der MAPK einen Effekt auf die Induktion der Capsaicin-Sensitivität in der IB4-Population hat, wurde ein blockierendes Agens gegen Komponenten der MAPK-Kaskade benutzt. Für die Inhibition der MAP-Kinase wurde PD98059 benutzt. Die Zellen wurden 6 Tage kultiviert. Die Konzentrationen 100 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM wurden in einem Medium mit GDNF (50 ng/ml) verwendet.

Zwischen den verschiedenen Konzentrationen von PD98059 zeigten sich keine Unterschiede im Anteil der Neurone, die nach Capsaicin-Stimulus Cobalt-Färbung zeigten, so wurde 5 µM als repräsentative Konzentration verwendet (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion stellt die PI3-Kinase dar. Um zu untersuchen, ob die PI3-Kinase benötigt wird, um Capsaicin-Sensitivität GDNF-abhängig in der GFR α 1-exprimierenden oder IB4-bindenden Population zu induzieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen die PI3-Kinase durch Wortmannin (Kirschstein et al. 1997) blockiert wurde.

Die Ergebnisse aus beiden Experimenten wurden mit den Resultaten aus den Experimenten in Anwesenheit von GDNF (50 ng/ml) verglichen.

Blockade der MAPK: Die Blockierung der MAP-Kinase-Kaskade durch PD98059 in Anwesenheit von GDNF veränderte den Anteil von Zellen mit Cobalt-Uptake in der IB4-Population nicht, 36 ± 3 % der IB4-bindenden Neurone nahmen Cobalt auf. Dieses Ergebnis war nicht signifikant unterschiedlich von den Ergebnissen mit GDNF ohne blockierende Substanz im Medium (31 ± 5 %, $p > 0.1$).

Keine signifikante Differenz im Anteil der Zellen mit Cobalt-Uptake zeigte sich zwischen den Experimenten mit GDNF ($39 \pm 2 \%$) und den Ergebnissen mit GDNF und MAPK-Inhibitor in der $5 \mu\text{M}$ -Konzentration ($37 \pm 4 \%$, $p > 0.1$). Der Anteil von Neuronen, der gleichzeitig $\text{GFR}\alpha 1$ exprimierte und Cobalt aufnahm, sank in Gegenwart des MAPK-Inhibitors signifikant von $39 \pm 3 \%$ in Gegenwart von GDNF ohne blockierende Substanz auf $21 \pm 4 \%$ ($p < 0.01$).

Blockade der PI3-Kinase: Die PI3-Kinase wurde durch Wortmannin (Kriegelstein et al. 1998) blockiert. Die Blockade der PI3-Kinase in Gegenwart von GDNF (50 ng/ml) konnte den Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake signifikant von $39 \pm 3 \%$ auf $25 \pm 2 \%$ senken ($p < 0.01$). Die IB4-Cobalt-Kolokalisation wurde von $31 \pm 3 \%$ auf $13 \pm 1 \%$ gesenkt ($p < 0.01$).

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation der Capsaicin-Sensitivität durch neurotrophe Faktoren. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von NGF auf die Empfindlichkeit gegenüber Capsaicin untersucht. Da NGF ein Zwei-Rezeptoren-System (trkA und p75^{NTR}) benutzt, konnte durch Blockierungsversuche und den Einsatz von p75^{NTR}-knock out- Mäusen gezeigt werden, dass der niederaffine p75^{NTR} für die Signaltransduktion durch NGF verantwortlich ist und dass NGF ausschließlich die peptiderge Neuronenpopulation beeinflusst.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Capsaicin-Sensitivität durch GDNF – einen weiteren trophischen Faktor für Nervenzellen - reguliert wird und in welchen Zellpopulationen diese Regulationsvorgänge stattfinden. Hier konnte gezeigt werden, dass GDNF die Capsaicin-Empfindlichkeit reguliert und dabei nur Einfluss auf die nicht-peptidergen Neuronengruppen nimmt. So induziert GDNF in der IB4-bindenden Population einen Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake. Dieser Vorgang ist c-RET-abhängig und bedarf eines Rezeptors für Neurturin (NTN). Weiterhin zeigt sich eine Induktion von Cobalt-Aufnahme in der Population, die den GDNF-Rezeptor GFR α 1 exprimiert. Dieser Vorgang ist nicht c-RET-abhängig, bedarf aber wohl der Transduktion über SRC-abhängige Wege.

4.1 Anmerkungen zur Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell des Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptakes aus folgenden Überlegungen gewählt:

Erstens bietet dieses Modell eine Möglichkeit, nozizeptive Neurone zu identifizieren. Zweitens ermöglicht die Analyse durch Cobalt-Uptake die zuverlässige Erfassung ausreichend großer Zellzahlen auch nach längerfristiger Zellkultur, dies ist durch andere Methoden, wie z.B. patch clamp – Messungen,

sehr viel schwieriger. Als Modell für den Zustand im lebenden Tier wurde das Intervall von 6 Stunden Zellkultur verwendet; diese Zeit war nötig, um den Zellen einerseits Zeit zur Adhäsion auf den Deckgläschen zu geben und andererseits Regulationsvorgänge minimal zu halten. Als Modell für die längerfristigen Regulationsvorgänge kam der Zeitraum von 6 Tagen zur Anwendung. Drittens bietet die Capsaicin-induzierte Cobalt-Aufnahme eine Möglichkeit, funktionell VR1 zu identifizieren und dies mit Immunfluoreszenzmarkierung von verschiedenen Neuronenpopulationen zu koppeln.

4.2 Funktion von NGF bei der Regulation des Cobalt-Uptakes

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass NGF bei Spinalganglienzellen aus adulten Wildtyp-Mäusen in Zellkultur über 6 Tage den Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake dosisabhängig reguliert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Regulation in der CGRP-tragenden Neuronenpopulation erfolgt.

In Kulturen von Spinalganglienzellen adulter Ratten konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass NGF den Phänotyp und die Funktion der Neurone moduliert (Lindsay et al. 1989). Bereits 1989 konnte gezeigt werden, dass NGF die Capsaicin-Sensitivität adulter Spinalganglienzellen in Ratten modulieren kann: Ohne NGF sank der Anteil Cobalt-aufnehmender Zellen unter 10 %, mit NGF stieg der Anteil der Cobalt-aufnehmenden Neurone auf 40 - 50 %. Dieser Wert wurde nach 4 - 6 Tagen erreicht, also nach einem Zeitraum, der für Neusynthese von Proteinen ausreichend ist (Winter et al. 1988). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Capsaicin-induzierten Ströme bei patch clamp–Untersuchungen ohne NGF im Medium nicht vorhanden waren und mit NGF im Medium wieder abgeleitet werden konnten (Bevan und Winter 1995).

Dass NGF zur Aufrechterhaltung der Capsaicin-Sensitivität nötig ist, konnte in den hier durchgeführten Experimenten erstmals in Mäusen bestätigt

werden. NGF kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Capsaicin-Empfindlichkeit zu. War kein NGF im Kulturmedium vorhanden, ging die Capsaicin-Sensitivität nach 6 Tagen Kultur signifikant zurück, von 30 % nach 6 Stunden Zellkultur auf 10 % nach 6 Tagen ohne NGF. Wurde dem Kulturmedium NGF beigefügt, konnte der Anteil Cobalt-aufnehmender Neurone auf dem Niveau, das nach 6 Stunden herrschte, gehalten werden. NGF im Kulturmedium wird also für die Erhaltung der Capsaicin-Sensitivität in bestimmten Neuronenpopulationen benötigt. Durch die Immunfluoreszenzmarkierung war es möglich, die Populationen zu identifizieren, die davon betroffen waren: Ohne NGF zeigte sich gleichzeitig ein signifikanter Rückgang der Neurone, die CGRP besaßen bzw. VR1 exprimierten, jedoch keinerlei Veränderung in der IB4-bindenden Nervenzellpopulation.

Lindsay et al. demonstrierten *in vitro*, dass sich in den ersten 1 - 2 Tagen Zellkultur die Neuropeptide Substanz P und CGRP in An- und Abwesenheit von NGF in ihrer Expression nicht veränderten, jedoch taten sie dies bei längerer Zellkulturdauer: Ohne NGF im Medium sank der Anteil peptid-exprimierender Neurone signifikant ab, in Anwesenheit von NGF wurde der Peptid-Gehalt auf dem Niveau gehalten, wie er im Tier bei Analyse nach 6 Stunden Kultur gefunden werden konnte (Lindsay et al. 1989). Dies spricht dafür, dass NGF die Synthese der Peptide fördert und diese so auf ihrem Niveau hält. Der Abfall der Peptid-Expression nach 1 - 2 Tagen spricht ebenfalls dafür, dass hier eine Regulation der Proteinsynthese stattfindet und nicht schnellere Effekte, wie z.B. die Phosphorylierung von Proteinen.

Interessant war, dass - sowohl in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten als bereits in der früheren Literatur beschrieben - die Peptidexpression nie ganz eliminiert werden konnte weder durch Abwesenheit von Wachstumsfaktoren noch durch blockierende Antikörper. Es scheint also eine Population peptiderger Neurone zu geben, die zwar nozizeptiv tätig sind, in dieser Funktion jedoch nicht durch neurotrophe Faktoren moduliert werden können.

NGF scheint nicht nur eine Rolle bei der Modulation von neurochemischen Eigenschaften von Nervenzellen zu spielen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass NGF auch funktionelle Aspekte zu beeinflussen vermag: NGF spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der nozizeptiven Afferenzen im adulten Organismus (Weskamp und Otten 1987). Die Anwesenheit von trkA-Rezeptoren auf nozizeptiven Afferenzen und die Heraufregulation des Liganden NGF in der Haut bei Entzündung weisen auf eine Rolle von NGF bei entzündungsbedingten Schmerzen hin (Averill et al. 1994, Lewin et al. 1993). Zusätzlich bewirkt die Verabreichung von NGF eine Hyperalgesie auf thermische und mechanische Reize (Lewin et al. 1993). Neben diesen langsamen Effekten, die Stunden bis Tage in Anspruch nehmen, hat NGF auch die Fähigkeit, Zellen unmittelbar zu beeinflussen: Wurden bei patch clamp – Untersuchungen die Zellen für 10 Minuten in einem NGF-haltigen Medium gehalten, zeigte sich eine Vergrößerung der Amplitude der Capsaicin-induzierten Ströme (Shu und Mendell 1999).

NGF ist also in der Lage, die Funktion von Spinalganglienzellen *in vitro* zu modulieren. NGF spielt jedoch nicht nur *in vitro* eine Rolle bei der Modulierung der Zellfunktion. Die Nutzung eines trkA-IgG-Fusionsmoleküls, um endogenes NGF in der lebenden Maus zu neutralisieren, hat aufgezeigt, dass die NGF-Konzentrationen im normalen Tier die funktionellen Eigenschaften nozizeptiver Afferenzen regulieren können: eine NGF-induzierte Hyperalgesie - wie oben beschrieben - konnte verhindert werden. Auch die durch NGF hervorgerufenen Modulationen der neurochemischen Eigenschaften dieser sensorischen Neurone konnten verhindert werden (McMahon et al. 1995).

4.3 Funktion von p75^{NTR} bei der Regulation durch NGF

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der NGF-vermittelte Rescue der Capsaicin-Sensitivität und der CGRP-Expression durch p75^{NTR}-blockierende Antikörper verhindert werden konnte und in der p75^{NTR}-knock out – Maus nicht möglich war. Die Blockade von p75^{NTR} verschob die

Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake nach rechts und verhinderte eine NGF-abhängige Regulation des Anteils der Neurone mit CGRP- und VR1-Expression.

NGF entfaltet seine Wirkungen über ein Zwei-Rezeptor-System, bestehend aus $p75^{\text{NTR}}$ und trkA . Erste Hinweise, durch welchen Rezeptor die Regulation vermittelt wurde, zeigten sich bei der Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NGF-Konzentration und Anteil der Neurone mit Cobalt-Uptake: Bei niedrigen NGF-Konzentrationen fanden nur geringe Veränderungen der Cobalt-Aufnahme statt. Erst hohe Konzentrationen von NGF (ab 50 ng/ml) führten zu signifikanten Veränderungen, wiederum in der peptidergen Population. Dies deutet auf die Mitwirkung eines niederaffinen Rezeptors hin, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der niederaffine NGF-Rezeptor seinen Effekt über eine Modulation der Proteinsynthese entfaltet. Wiederum erscheint hier die Nutzung des niederaffinen Rezeptors sinnvoll, da die Modulation der nozizeptiven Fähigkeiten von Zellen (z.B. die Induktion einer Hyperalgesie) unter Normalbedingungen – und damit sehr niedrigen NGF-Konzentrationen – nicht wünschenswert erscheint. Erst unter traumatischen oder entzündlichen Bedingungen und damit hohen NGF-Konzentrationen sollte eine solche Modulation erfolgen.

Die Rolle von $p75^{\text{NTR}}$ wurde in der vorliegenden Arbeit durch mehrere Experimente klar definiert, da sowohl während der Blockade des Rezeptors durch Antikörper in der Wildtyp-Maus als auch bei der Verwendung der $p75^{\text{NTR}}$ -knock out-Mäuse ein klarer und ähnlicher Effekt zu verzeichnen war: Cobalt-Aufnahme, CGRP und VR1 wurden bei Neutralisierung der $p75^{\text{NTR}}$ -Wirkung auf das Niveau aus den Experimenten ohne jegliche Wachstumsfaktoren herunterreguliert. $p75^{\text{NTR}}$ scheint eine entscheidende Rolle bei der Modulation des nozizeptiven Phänotyps zu spielen, da ohne diesen Rezeptor die gleichen Verhältnisse entstehen wie ohne Neurotrophine im Medium. Diese These wird weiterhin dadurch gestützt, dass exakt die gleichen Veränderungen in denselben Nervenzellpopulationen stattfinden – es bestehen bei keinem der Marker signifikante Unterschiede in den Experimenten ohne NGF in der

Wildtyp-Maus, mit NGF und p75^{NTR}-blockierenden Antikörpern in der Wildtyp-Maus oder den Experimenten mit NGF in der p75^{NTR}-knock out-Maus.

Denkbar ist also unter den im Experiment vorherrschenden Bedingungen, dass NGF über Bindung an p75^{NTR} seine Wirkung entfaltet und die peptiderge Neuronenpopulation beeinflusst. Es bleibt die Frage ob p75^{NTR} alleine in der Lage ist, einen Effekt zu vermitteln, oder ob trkA zusätzlich beteiligt ist.

Mehrere Punkte deuten auf eine Vermittlung des Signals durch p75^{NTR} alleine hin; zunächst die Konzentration von NGF bei bestimmten Prozessen:

Bisher hatte sich in zahlreichen Untersuchungen gezeigt, dass physiologische Antworten von sensorischen Nervenzellen (wie Stimulation der Differenzierung, des Wachstums und des Überlebens) bei niedrigen Konzentrationen von NGF (im picomolaren Bereich) erfolgen, und man ging davon aus, dass der hochaffine NGF-Rezeptor (trkA) dafür verantwortlich war. Es konnte gezeigt werden, dass trkA alleine ausreicht, den hochaffinen Rezeptor für NGF zu bilden (Jing et al. 1992). Zahlreiche weitere Arbeitsgruppen fanden, dass trkA und p75^{NTR} zur Bildung des hochaffinen Rezeptors benötigt werden (Battleman et al. 1993, Hempstead et al. 1991, Mahadeo et al. 1994). Daher wurden mögliche Aktivitäten von p75^{NTR} zunächst in der Präsentation von NGF für trkA im sogenannten Recruitment Model gesehen. Im Recruitment Model der p75-trkA-Interaktion erleichtert p75^{NTR} die NGF-Bindung an trkA dadurch, dass es zuerst NGF bindet und es anschließend trkA präsentiert. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen gegen das Recruitment Model der NGF-Wirkung, da in den p75^{NTR}-knock out- Mäusen kein Rezeptor vorhanden ist, der NGF dem trkA-Rezeptor präsentieren könnte. Dies spricht für die alleinige Wirkung eines niederaffinen Rezeptors - p75^{NTR}.

Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine alleinige Rolle von p75^{NTR} bei der Regulation der Capsaicin-Sensitivität hin. Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu einer Rolle von p75^{NTR} bei funktionellen Prozessen durchgeführt, es gibt jedoch einige Indizien, die darauf hindeuten, dass p75^{NTR} durchaus alleine in der Lage ist, bestimmte Signale zu vermitteln:

In p75^{NTR}-knock out-Mäusen zeigte sich in früheren Experimenten ein 50 %iger Verlust der Spinalganglienzellen (Curtis et al. 1995, Lee et al. 1992) mit einem relativ geringen prozentualen Verlust der kleinen Spinalganglienzellen. Die Analyse der verschiedenen neurochemischen Marker zeigte, dass alle Typen von sensorischen Spinalganglienzellen in p75^{NTR}-knock out-Mäusen gleichermaßen verringert sind (Bergmann et al. 1997), jedoch finden sich elektrophysiologisch alle Typen von primär afferenten Neuronen, die die Haut innervieren (Koltzenburg und Stucky 1996). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten. Die *in vivo*-Verteilung der neuronalen Marker in p75^{NTR}-knock out- Mäusen war nicht signifikant unterschiedlich von der in Wildtyp-Mäusen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass p75^{NTR} keine Rolle bei der Vermittlung von konstitutiven Signalen spielt bzw. dass der niederaffine Rezeptor unter Normalbedingungen bei physiologischen NGF-Konzentrationen nicht oder nur geringfügig zum Einsatz kommt, sondern dass der hochaffine trkA-Rezeptor diese Aufgaben übernimmt. Der Zellverlust in den knock out-Tieren wird begleitet von einer Reduktion der Dichte der epidermalen Innervation. Sensorische Neurone in p75^{NTR}-knock out- Mäusen zeigen eine geringere Sensitivität gegenüber NGF. Dies könnte vermuten lassen, dass p75^{NTR} bei der Interaktion zwischen NGF und trkA von Bedeutung ist (Davies et al. 1993).

Schlussfolgernd lässt sich also vermuten, dass unter *in vivo* – Bedingungen NGF seine konstitutiven Signale in niedrigen Konzentrationen über den hochaffinen Rezeptor trkA vermittelt. Ändern sich jedoch die Umgebungsbedingungen, z.B. bei einer Entzündung oder Axotomie, werden hohe NGF-Konzentrationen erreicht, z.B. über Neusynthese aus sensorischen Nervenzellen oder umgebenden Zellen (Schwann-Zellen etc.), die dann über den niederaffinen Rezeptor durch eine Modulation der Proteinsynthese den Phänotyp und die Verteilung der nozizeptiven Neurone modulieren.

Die Frage, ob p75^{NTR} alleine den gesamten Effekt vermittelt, kann hier nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden, da eine sichere Blockierung des trkA-Rezeptors experimentell nicht möglich war. Eine Möglichkeit könnte sich durch die Herstellung eines NGF-Moleküls ergeben, das selektiv p75^{NTR}

stimuliert und dadurch über alleinige p75^{NTR}-Aktivierung die Capsaicin-Sensitivität erhalten würde.

4.4 Verteilung der Marker Cobalt-Uptake, IB4, GFR α 1 und c-RET in Kurzzeitkulturen

In den Kurzzeitkulturen kolokalisierte Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake niemals mit IB4, GFR α 1 oder c-RET, d.h. es zeigte sich ein klares Bild der Verteilung in die bereits bekannten Subpopulationen von nozizeptiven Neuronen: Durch Capsaicin zum Cobalt-Uptake stimulierbare Nervenzellen zeigten niemals die Fähigkeit, das Lektin IB4 zu binden oder den GDNF-Rezeptor GFR α 1 bzw. c-RET zu exprimieren. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Rezeptoren für GDNF und die Komponenten der Signaltransduktion für GDNF in einer Neuronenpopulation zu finden sind, die von der NGF empfindlichen peptidergen verschieden und von dieser unabhängig ist.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten des ersten Teils der Arbeit, wo verdeutlicht werden konnte, dass die Capsaicin-sensitiven Neurone vorwiegend in der peptidergen Neuronenpopulation zu finden sind und dass diese durch NGF in ihrer Verteilung reguliert werden.

Molliver et al. haben bereits gezeigt, dass IB4-bindende Neurone in der postnatalen Entwicklung GDNF-abhängig sind (Molliver et al. 1997). Sie exprimieren c-RET und auch GFR α 1. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Spinalganglien der Ratte ein Drittel der Neurone IB4 bindet und Komponenten der GDNF-Signalkaskade exprimiert, c-RET und GFR α 1- oder GFR α 2-Rezeptoren (Bennett et al. 1998). GDNF konnte in dieser Population die durch Axotomie hervorgerufene Herabregulation der IB4-Bindung verhindern (Bennett et al. 2001). Weitere Ergebnisse legten dar, dass GFR α 1 und GFR α 2 in zwei nicht überlappenden Populationen von Ganglienzellen

vorkommen, wobei die jeweiligen Zellen c-RET exprimieren können oder auch nicht (Golden et al. 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse untersuchten erstmals die Verteilung dieser Populationen in der Maus. Wie oben angeführt, besteht hier im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen in der Ratte keine Überlappung zwischen den beiden nozizeptiven Populationen: In der Ratte finden sich Neurone, die IB4 binden und gleichzeitig Cobalt-Ionen nach Capsaicin-Stimulus aufnehmen (Schmidt, Koltzenburg, unveröffentlichte Ergebnisse). In der Maus fehlt in den Kurzzeitkulturen diese Cobalt-Aufnahme, es finden sich jedoch Neurone, die VR1 exprimieren und IB4 binden. Stucky und Lewin bewiesen durch patch clamp - Untersuchungen, dass es in IB4-bindenden Neuronen Capsaicin-induzierbare Ströme gibt (Stucky und Lewin 1999). Die Frage nach der Herkunft dieser Ströme muss noch unbeantwortet bleiben.

Immunhistochemische Studien zeigten, dass 80% der IB4-positiven und –negativen Neurone den VR1-Rezeptor exprimierten, jedoch nur 45 % der IB4-positiven und –negativen Neurone auf Hitze funktionell reagierten (Tominaga et al. 1998). Es könnte also sein, dass ein größerer Anteil an auf der Zelloberfläche exprimiertem VR1 für eine funktionelle in patch clamp-Untersuchungen oder im Cobalt-Uptake nachweisbare Antwort notwendig ist als für den rein morphologischen Nachweis durch Immunfluoreszenz.

4.5 Abhängigkeit der Capsaicin-Sensitivität von weiteren neurotrophen Faktoren

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in Wildtyp-Mäusen dargestellt werden, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht zwischen GDNF-Konzentration und Anteil der Zellen mit Cobalt-Uptake bzw. Cobalt-Uptake und IB4-Bindung / GFR α 1-Expression.

War weder NGF noch GDNF im Kulturmedium vorhanden, sank nach 6 Tagen Zellkultur die Anzahl der Capsaicin-sensitiven Neurone signifikant,

während NGF (50 ng/ml) die Anzahl Cobalt-aufnehmender Neurone auf dem Niveau in Kurzzeitkulturen halten konnte. GDNF (50 ng/ml) im Kulturmedium konnte die Anzahl Cobalt-aufnehmender Neurone nicht nur auf dem Niveau halten, sondern den Anteil darüber hinaus erhöhen.

Hier stand zunächst die Frage im Raum, ob die Neurotrophine NGF und GDNF auf die gleichen Neuronenpopulationen Einfluss nehmen. Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass IB4-positive Neurone in der Ratte keinerlei Rezeptoren für NGF exprimieren, daher sollte GDNF auf eine andere Population einwirken als NGF (Bennett et al. 1998). Winter et al. entdeckten, dass GDNF die Capsaicin-Sensitivität per se auf dem ursprünglichen Niveau zu halten vermag (Winter et al. 1988). Die Frage, in welchen Subpopulationen von Nervenzellen dies geschieht, blieb jedoch unbeantwortet.

In der vorliegenden Arbeit konnte experimentell nachgewiesen werden, dass nach 6 Stunden Zellkultur Capsaicin-induzierter Cobalt-Uptake niemals gemeinsam mit IB4, GFR α 1 oder c-RET zu finden ist. Wurden die Nervenzellen jedoch über 6 Tage in Anwesenheit von GDNF kultiviert, ergaben sich vorher nicht dagewesene Überschneidungen mit den Populationen, die IB4 binden oder GFR α 1 bzw. c-RET exprimieren. Es wird dadurch zunächst deutlich, dass GDNF Einfluss auf die nicht-peptiderge Neuronenpopulation nimmt. GDNF induzierte Capsaicin-induzierten Cobalt-Uptake in einer Zellgruppe, die sich von der NGF-Population unterscheidet. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass sich für das Neuropeptid keinerlei Regulation durch die Anwesenheit von GDNF zeigen ließ. CGRP ist ein Marker für die peptiderge Neuronenpopulation und wird durch NGF reguliert. War kein Wachstumsfaktor im Medium vorhanden, ging der Anteil der CGRP-positiven Neurone deutlich zurück. Auch die Anwesenheit von GDNF in verschiedenen Konzentrationen konnte diese Herabregulation nicht verhindern.

Zusätzlich bestand eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der GDNF-Konzentration und dem Anteil der Zellen mit Cobalt-Uptake in der IB4-Population: Die Anwesenheit verschiedener GDNF-Konzentrationen konnte die Zahl der Neurone, die IB4 banden und Cobalt-Aufnahme zeigten, bis zu einer

Konzentration von 50 ng/ml steigern. Höhere Konzentrationen zeigten keinen weiteren Effekt.

Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von NGF und GDNF im Kulturmedium warfen neue Fragestellungen auf: Man hätte erwarten können, dass ca. 70% aller Zellen Cobalt-Uptake zeigten, wenn die beiden Faktoren auf strikt getrennte Populationen Einfluss nähmen und sich nicht gegenseitig beeinflussten. Es kam jedoch nur zu einem Anstieg des Cobalt-Uptakes auf 46%, zwar signifikant höher als mit jedem Faktor alleine, jedoch nicht rein additiv erklärbar. Es offenbarten sich jedoch in Anwesenheit beider Faktoren die Effekte, die für jeden der beiden Faktoren charakteristisch sind: NGF vermochte den CGRP-Gehalt auf seinem Normalniveau zu halten, GDNF induzierte den Cobalt-Uptake in der IB4-Population und der GFR α 1-Population. Jedoch schienen die Faktoren auf irgendeine Weise nicht ihren gesamten Effekt zu erzielen. Würden beide Faktoren strikt getrennte Populationen beeinflussen, wäre mit rund 70% Cobalt-aufnehmender Zellen zu rechnen – es fehlen also etwa 20% an Neuronen, bei denen sich die Effekte der beiden Faktoren überschneiden. Hier kommen beispielsweise die 10% der Nervenzellen in Frage (Lindsay et al. 1989), die auch ohne jeglichen Wachstumsfaktor im Medium Cobalt-Aufnahme zeigen, sie scheinen nicht Neurotrophin-abhängig zu sein.

4.6 Abhängigkeit der Induktion von Capsaicin-induziertem

Cobalt-Uptake in der IB4-Population von c-RET und GFR α 2

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass c-RET- und GFR α 2-abhängige Signaltransduktion für die Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der IB4-Population benötigt wird.

Die Aktivierung von c-RET ist ein Standardschritt in der Signaltransduktion durch GDNF über GFR α -Rezeptoren, sie beinhaltet die Rekrutierung und Phosphorylierung von Adapter und Docking-Proteinen, die Aktivierung der Ras/ERK- und PI3K/Akt-Signalkaskaden, die Phosphorylierung der

Phospholipase C und des Transkriptionsfaktors CREB sowie die vermehrte *c-fos*-mRNA-Expression (Trupp et al. 1999).

Die Anwesenheit von GDNF bewirkte eine Heraufregulation der c-RET-Expression. Nach 6 Tagen Zellkultur fand sich eine vorher nicht dagewesene Cobalt-Aufnahme in c-RET exprimierenden Nervenzellen. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass fast alle Neurone, die IB4-banden und Cobalt aufnahmen, c-RET exprimierten. Da aber diese Neurone nicht den GDNF-Rezeptor GFR α 1 besaßen, konnte GFR α 1 nicht verantwortlich sein für die Induktion von Cobalt-Aufnahme in der IB4-Population. Dieser Vorgang scheint aber abhängig zu sein von der Expression der Tyrosinkinase c-RET.

Für letztere Vermutung sprachen mehrere Dinge: Wie oben bereits angesprochen, konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden für die Induktion von Cobalt-Aufnahme in der IB4-Population. Zusätzlich konnte durch Blockade von Kinasen in den Nervenzellen – und besonders c-RET – durch Herbimycin die Induktion von Cobalt-Uptake in IB4-bindenden Neuronen in Anwesenheit von GDNF verhindert werden.

Die Frage, über welchen Rezeptor die Induktion der Cobalt-Aufnahme in der IB4-Population stattfand, wurde durch einen selektiven Agonisten am GFR α 2-Rezeptor untersucht. Neurturin konnte die Capsaicin-Sensitivität der Spinalganglienzellen in gleicher Weise wie GDNF regulieren. Der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen der NTN- bzw. GDNF-Konzentration und dem Anteil der Neurone mit Cobalt-Uptake in der IB4-Population zeigte, dass der Anteil der Neurone mit Cobalt-Uptake in der IB4-Population bei niedrigeren NTN-Konzentrationen (0.5 ng/ml, 5 ng/ml) deutlich höher war als bei den entsprechenden GDNF-Konzentrationen. Dies legt nahe, dass GFR α 2 der für diese Induktion verantwortliche Rezeptor ist, da NTN selektiv GFR α 2 beeinflusst und GDNF zwar auch an diesen Rezeptor binden kann, jedoch mit niedrigerer Affinität als an GFR α 1 (Airaksinen et al. 1999).

Unterstützt wurden diese Beobachtungen dadurch, dass NTN keinerlei Effekt auf die Induktion von Cobalt-Aufnahme in der GFR α 1-Population hatte. Hier gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen ohne jeden Wachstumsfaktor im Medium.

Für die Induktion der Cobalt-Aufnahme in der IB4-Population über den GFR α 2-Rezeptor und c-RET intrazellulär sprechen also folgende Fakten:

Erstens zeigten sich gleiche Prozentsätze von Zellen mit IB4-Bindung und Cobalt-Aufnahme mit GDNF und NTN.

Zweitens waren alle Zellen, die IB4 banden und Cobalt aufnahmen, gleichzeitig positiv für c-RET.

Drittens ließ sich diese Induktion durch Blockade mit Herbimycin, einem Blocker vor allem von c-RET, verhindern.

Viertens zeigte NTN, ein selektiver Agonist an GFR α 2, bereits in niedrigeren Konzentrationen den vollen Effekt.

Es ist bereits bekannt, dass in der Ratte 60–70% der Spinalganglienzellen c-RET exprimieren (Bennett et al. 1998). GFR α 1 und GFR α 2, die ligandenbindenden Domänen für GDNF und Neurturin, wurden in 45% und 33% aller Zellen gefunden. Die GDNF-Rezeptorkomponenten wurden nur von IB4-bindenden, trk-negativen Populationen von Spinalganglienzellen exprimiert. Fast alle IB4-bindenden Zellen besaßen c-RET, 50% der IB4-positiven Zellen GFR α 1, d.h. 50% der IB4-positiven Zellen exprimierten beide Komponenten gleichzeitig, die andere Hälfte exprimierte c-RET in Abwesenheit von GFR α 1. Dies sprach für eine Beteiligung von GFR α 2 bei der Signalübermittlung.

Dass Neurturin über GFR α 2 c-RET-abhängig Signale vermitteln kann, wurde an Neuronen des sympathischen Nervensystems nachgewiesen (Creedon et al. 1997). Neurturin induzierte Phosphorylierung von c-RET in primären Zellkulturen des Ganglion cervicale superius der Ratte. Ausgehend von dieser Phosphorylierung wurden weitere Signalwege aktiviert, u.a. der MAPK- sowie der PI3K-Weg. Es wurden Experimente mit retrogradem Transport von Neurturin und GDNF durchgeführt, die darlegten, dass die Größenverteilung der Neurone, die Neurturin zu transportieren vermochten, mit der Größenverteilung der Zellen, die GFR α 2 auf ihrer Oberfläche trugen, identisch war. Dasselbe gilt für die Größenverteilungen der Neurone, die GDNF transportierten bzw. GFR α 1 exprimierten (Leitner et al. 1999).

4.7 Abhängigkeit der Induktion von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake in der GFR α 1-Population von SRC-Kinasen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SRC-Kinase und GFR α 1-abhängige Signaltransduktion für die Induktion von Cobalt-Uptake in der GFR α 1-exprimierenden Neuronenpopulation benötigt wurde.

Es ist bekannt, dass GDNF neben c-RET-Aktivierung auch andere Wege der Signaltransduktion beschreiten kann (Airaksinen et al. 1999): Aktivierung der SRC-Kinasen oder der MAP-Kinasen. Dies wurde genauer untersucht durch Blockade der SRC-Kinase und führte zu dem Ergebnis, dass die Blockade der SRC-Kinasen die Induktion von Cobalt-Uptake in der GFR α 1-Population in Anwesenheit von GDNF verhindern kann, die Induktion der Cobalt-Aufnahme in der IB4-Population jedoch unbeeinflusst bleibt.

Trupp et al. fanden 1999, dass in Motoneuronen durch GDNF sowohl c-RET-abhängige wie -unabhängige Signalwege beschriftet werden können. GDNF konnte über die GFR α 1-assoziierte SRC-Kinase Aktivitäten bei folgenden Signalsystemen bewirken: cAMP response elements (CREB) und Heraufregulation von *c-fos*-mRNA. Zusätzlich scheint die SRC-Kinase auch für die Vermittlung von Überlebens-Signalen für Motoneurone wichtig zu sein (Trupp et al. 1999). Wie die Signalweitergabe erfolgt, ist nicht sicher. Eine Möglichkeit wäre eine Verbindung des GPI-verankerten Rezeptors (z.B. GFR α 1) mit den SRC-Kinasen durch einen Transmembran-Co-Rezeptor. Ein Contactin-assoziiertes Transmembran-Protein, das als Kandidat in Frage käme, wurde kürzlich isoliert (p190^{Casp}, Peles et al. 1997). Ein zweites Modell geht davon aus, dass GPI-gebundene Rezeptoren und SRC-Kinasen über Acylierung, Myristylierung oder Palmitoylierung interagieren. Es könnte also sein, dass Proteine mit den GPI-Ankern interagieren durch die Positionierung in den lipid rafts, jedoch ohne direkt an die GPI-Anker zu binden (monolayer coupling, Kollins et al. 1999).

Da durch die Blockade der MAP-Kinase lediglich ein Rückgang des Cobalt-Uptakes in der GFR α 1-positiven Population zu verzeichnen war, wäre

es denkbar, wie von (Trupp et al. 1999) postuliert, dass diese Regulation auf einem von SRC-Kinasen und MAP-Kinasen vermittelten Wege stattfindet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von Zellkulturen von Spinalganglienzellen herausgearbeitet werden, dass die Regulation der Capsaicin-Sensitivität in der Maus von vielen Faktoren abhängig ist: Es ließ sich ein komplexes System der Regulation von Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake als Surrogat-Marker für nozizeptive Neurone herausarbeiten:

Zum einen konnte gezeigt werden, dass NGF dosisabhängig Einfluss auf die peptiderge Neuronenpopulation nimmt und über den niederaffinen NGF-Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$ Capsaicin-Empfindlichkeit, CGRP-Expression und VR1-Expression reguliert. Dieser Rezeptor hat dabei keine Bedeutung für den konstitutiven Cobalt-Uptake, jedoch für die Aufrechterhaltung des Cobalt-Uptakes in der Zellkultur.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass GDNF dosisabhängig den Anteil der Neurone mit Capsaicin-induziertem Cobalt-Uptake reguliert und dosisabhängig parallel in zwei Gruppen von Spinalganglienzellen den Cobalt-Uptake induziert: einerseits über den GDNF-Rezeptor $\text{GFR}\alpha 2$ und die Rezeptortyrosinkinase c-RET in der IB4-Population, andererseits über $\text{GFR}\alpha 1$ und SRC-Kinasen in der $\text{GFR}\alpha 1$ -Population.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Spinalganglienzellen die Sensibilität gegenüber noxischen Reizen selbständig komplex regulieren und damit auf äußere Einflüsse reagieren können. Möglicherweise ergeben sich in Zukunft neue Ansatzpunkte der Therapie dadurch, dass die Neurone direkt beeinflusst werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Amann R, Schuligoi R, Herzeg G, Donnerer J (1996) Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold. *Pain* 64:323-329
2. Andreev NY, Dimitrieva N, Koltzenburg M, McMahon SB (1995) Peripheral administration of nerve growth factor in the adult rat produces a thermal hyperalgesia that requires the presence of sympathetic post-ganglionic neurons. *Pain* 63:109-115
3. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M (1999) GDNF Family Neurotrophic Factor Signaling: Four Masters, One Servant? *Molecular and Cellular Neuroscience* 13: 313-325
4. Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1994) TrkA immunohistochemistry in adult rat dorsal root ganglia. *Soc Neurosci Abstr* 20: 34
5. Averill S, McMahon SB, Clary SB, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunohistochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7: 1484-1494

6. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM, Milbrandt J (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-ret receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302

7. Barrett GL und Bartlett PF (1994) The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6501-6505

8. Barrett GL, Georgiou A, Reid K, Bartlett PF, Leung D (1998) Rescue of dorsal root sensory neurons by nerve growth factor and neurotrophin-3, but not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-4, is dependent on the level of p75 neurotrophin receptor. *Neuroscience* 85: 1321-1328

9. Battleman DS, Geller AI, Chao MV (1993) HSV-1 vector-mediated gene transfer of the human nerve growth factor receptor p75hNGFR defines high affinity NGF binding. *J Neurosci* 13: 941-951

10. Bennett DL, McMahon SB, Shelton DL, Koltzenburg M (1996) NGF sequestration using a trkA-IgG fusion molecule prevents the primary afferent sensitisation to carrageenan inflammation. *Abstr 8th World Congr Pain* 120

11. Bennett DL, Dimitrieva N, Priestley JV, Clary D, McMahon SB (1996) TrkA, CGRP and IB4 expression in retrogradely labelled cutaneous and visceral primary sensory neurons in the rat. *Neurosci Lett* 206: 33-36
12. Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV (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: 3059-3072
13. Bennett DL, Boucher TJ, Armanini MP, Poulsen KT, Michael GJ, Priestley JV, Phillips HS, McMahon SB, Shelton DL (2001) The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 20: 427-437
14. Bergmann I, Priestley JV, McMahon SB, Bröcker EB, Toyka KV, Koltzenburg M (1997) Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 9: 18-28
15. Bergmann I, Reiter R, Toyka KV, Koltzenburg M (1997) Neurogenic inflammation in mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Neurosci Lett* 10: 11-19

16. Bevan S und Szolcsányi J (1990) Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 11: 330-333
17. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107: 544-552
18. Bevan S und Geppetti P (1994) Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci* 17: 509-512
19. Bevan S und Winter J (1995) Nerve Growth Factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons. *J Neurosci* 15: 4918-4926
20. Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* 18: 223-253
21. Bothwell M (1996) p75^{NTR}: a receptor after all. *Science* 272: 506-507
22. Boucher TJ und McMahon SB (2001) Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol.* 1:66-72

23. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824
24. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2001) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313
25. Cesare P und McNaughton P (1997) Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:493-499
26. Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, Fahrner TJ, Heuckeroth RO, Milbrandt J, Johnson EM (1997) Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci* 94:7018-7023
27. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 25:1001-1011

28. Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL, Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF, Lindsay RM, DiStefano PS (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14: 1201-1211
29. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson C, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia *Nature*. 405: 183-187
30. Davies AM, Lee KF, Jaenisch R (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 11: 565-574
31. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 7686-7689
32. Fabian RH und Hulsebosch CE (1993) Plasma nerve growth factor access to the postnatal central nervous system. *Brain Res* 611: 46-52
33. Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM (1999) Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol* 158: 504-528

34. Hempstead BL, Martin ZD, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF-receptor. *Nature* 350: 678-683

35. Hiura A, Nasu F, Ishizuka H (1998) Relationship of substance P- and CGRP-immunoreactive central endings of the primary afferent neurons to GABAergic interneurons in the guinea pig substantia gelatinosa. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998 74:231-235

36. Holstege JC, Jongen JL, Kennis JH, van Rooyen-Boot AA, Vecht CJ (1998) Immunocytochemical localization of GDNF in primary afferents of the lumbar dorsal horn. *NeuroReport* 9: 2893-2897

37. Huber LJ und Chao MV (1995) Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Dev Biol* 167: 227-238

38. Ibanez CF (2000) Neurotrophic factors: versatile signals for cell-cell communication in the nervous system. *Results Probl Cell Differ* 30: 163-188

39. Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T (2001) Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res* 41:299-332

40. Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve Growth Factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9: 1067-1079
41. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmann BW, Fox GM (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124
42. Kashiba H, Uchida Y, Senba E (2001) Difference in binding by isoLectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 18-26
43. Kirschstein T, Busselberg D, Treede RD (1997) Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 231: 33-36
44. Kirschstein T, Greffrath W, Busselberg D, Treede RD (1999) Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J Neurophysiol* 82: 2853-2860
45. Kollins KM, Powell SK, Rivas RJ (1999) GPI-anchored human placental alkaline phosphatase has a nonpolarized distribution on the cell surface of mouse cerebellar granule neurons in vitro. *J Neurobiol.* 39:119-141

46. Koltzenburg M, Lundberg LE, Torebjörk HE (1992) Plasticity of peripheral or central nociceptive processing cause different types of mechanical hyperalgesia in humans. *Pflügers Arch* 420: R45
47. Koltzenburg M und Stucky CL (1996) Receptive properties of cutaneous sensory neurons in mice lacking the neurotrophin receptor p75. *Soc Neurosci Abstr* 22: 300.4
48. Koltzenburg M (1998) Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 11: 515-521
49. Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM, Milbrandt J (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384: 467-470
50. Kress M und Zeilhofer HU (1999) Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol Sci* 20: 112-118
51. Kriegelstein K, Henheik P, Farkas LJ, Jaszai J, Galter D, Krohn K, Uniscker K (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci* 18: 9822-9834

52. LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjörk HE (1992) Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol (Lond)* 448: 749-764
53. Lawson SN (1992) Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In: *Sensory Neurons: Diversity, Development, and Plasticity* (Scott SA, ed, New York: Oxford University Press), 27-59
54. Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69: 737-749
55. Lee KF, Davies AM, Jaenisch R (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* 120: 1027-1033
56. Leitner ML, Molliver DC, Osborne PA, Vejsada R, Golden JP, Lampe PA, Kato AC, Milbrandt J, Johnson EM (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: 9322-9331
57. Lewin GR und Mendell LM (1993) Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 16: 353-359

58. Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM (1993) Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci.* 13: 2136-2148
59. Lewin GR und Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Ann Rev Neurosci* 19: 289-317
60. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132
61. Lindsay RM, Lockett J, Sternberg J, Winter J (1989) Neuropeptide Expression in Cultures of Adult Sensory Neurons: Modulation of Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide Levels by Nerve Growth Factor. *Neuroscience* 33: 53-65
62. Lindsay RM und Harmor AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337: 362-364
63. Mahadeo D, Kaplan DR, Chao MV, Hempstead BL (1994) High-affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk-binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *Journal of Comparative Neurology* 269: 6884-6891

64. McHugh JM und McHugh WB (2000) Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clin Issues* 11:168-178
65. McMahon SB, Bennett DL, Priestley JV, Shelton DL (1995) The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by a trkA-IgG fusion molecule. *Nat Med* 1: 774-780
66. McMahon SB (1996) NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 431-440
67. McMahon SB, Bennett DL, Koltzenburg M (1997) The biological effects of nerve growth factor on primary sensory neurons. In: *Molecular Neurobiology of Pain* (Borssok M, ed), 59-78. Seattle: IASP Press
68. McMahon SB und Bennett DL (1997) Growth Factors and Pain. In: *The Pharmacology of Pain* (Dickenson A, Besson J-M, eds), 135-165. Berlin: Springer Verlag
69. Milbrandt J, deSavauge FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Landlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Cray C, Marces A, Henderson CE, Phillips HS, Johnson EM (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20: 245-253

70. Molliver DC, Radeke MJ, Feinstein SC, Snider WD (1995) Presence or absence of trkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. *J Comp Neurol* 361: 404-416
71. Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19: 849-861
72. Nagy JI, Buss M, LaBella LA, Daddona PE (1984) Immunohistochemical localization of adenosine deaminase in primary afferent neurons of the rat. *Neurosci Lett* 48: 133-138
73. Ogun-Muyiwa P, Helliwell R, McIntyre P, Winter J (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. *NeuroReport* 10: 2107-2111
74. Peles E, Nativ M, Lustig M, Grumet M, Schilling J, Martinez R, Plowman GD, Schlessinger J (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J* 16: 978-983
75. Pernow B (1981) Substance P-containing pathways to avian sympathetic preganglionic neurons: evidence for major spinal-spinal circuitry. *J Neurosci.* 4: 2145-2159

76. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsman M, Sinicropi D, Burton LE, Peroutka SJ (1994) The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 36:244-246
77. Plenderleith MB und Snow PJ (1990) The Effect of Peripheral Nerve Section on Lektin Binding in the Superficial Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord. *Brain Res* 507: 146-150
78. Rosenthal A (1999) The GDNF Protein Family: Gene Ablation Studies Reveal What They Really Do and How. *Neuron* 22: 201-207
79. Schmidt RF, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk HE, Handwerker HO (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15: 333-341
80. Shu XQ und Mendell LM (1999) Neurotrophins and Hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7693-7696
81. Silos-Santiago I, Molliver DC, Ozaki S, Smeyne RJ, Fagan AM, Barbacid M, Snider WD (1995) Non-trkA-expressing small DRG neurons are lost in trkA deficient mice. *J Neurosci* 15: 5929-5942

82. Silverman JD und Kruger L (1990) Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: Relation of Lektin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol* 19: 789-801
83. Snider WD und McMahon SB (1998) Tackling pain at source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20: 629-632
84. Sorkin LS und Wallace MS (1999) Acute pain mechanisms. *Surg Clin North Am* 79:213-229
85. Stucky CL und Lewin GR (1999) Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19: 6497-6505
86. Szallasi A und Blumberg PM (1999) Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Reviews* 51: 159-211
87. Szolcsányi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res* 446: 262-268
88. Taniguchi A, Uehara Y, Matsuyama M, Takahashi M (1993) Inhibition of ret tyrosine kinase activity by herbimycin A. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 208-212

89. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543
90. Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibanez CF (1997) Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* 17: 3554-3567
91. Trupp M, Scott R, Whitemore SR, Ibanez CF (1999) Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* 274: 20885-20894
92. Van Weering DHJ und Bos JL (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces ret-mediated lamellipodia formation. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 249-254
93. Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 36: 1229-1242

94. Weskamp G und Otten U (1987) An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J Neurochem.* 48: 1779-1786
95. Widenfalk J, Nosrat C, Tomac A, Westphal H, Hoffer B, Olson L (1997) Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci* 17: 8506-8519
96. Winter J (1987) Characterization of capsaicin-sensitive neurons in adult rat dorsal root ganglion cultures. *Neurosci Lett* 80: 134-140
97. Winter J, Forbes CA, Sternberg J, Lindsay RM (1988) Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* 1: 973-981
98. Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S (1988) Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci.* 1988 8:3208-3220
99. Wright DE und Snider WD (1995) Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 351: 329-338

Danksagung

- Meinen Eltern, meiner Schwester und Herrn Clemens Karg, die mich während des gesamten Studiums und bei der Promotion unterstützt haben
- Herrn Dr. Klaus Schmidt, der mir bei den Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand
- Frau Prof. Petersen, die freundlicherweise das Referat für diese Arbeit übernommen hat und sie mit großer Ausdauer und konstruktiver Kritik zur Promotion gebracht hat
- Frau Prof. Sommer dafür, dass sie das Coreferat übernommen hat
- Herrn Prof. Toyka für die Möglichkeit der Promotion in der Neurologischen Klinik

Lebenslauf

Name: Ulrich Gößler
Anschrift: Kantstr. 8
D – 68165 Mannheim
Telefon: 0621/3248008
E-mail: ugoessler@web.de

Geburtsdatum: 06.11.1974
Geburtsort: Gießen
Familienstand: ledig
Eltern: Doris Gößler, geb. Brylla, Realschullehrerin,
Dr. Reinhart Gößler, Ltd. Veterinärdirektor
Geschwister: Ute Karg, geb. Gößler, Fremdsprachensekretärin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1981 – 1985 Eichbergschule Grundschule, Lauterbach (Hessen)
1985 – 1994 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Lauterbach,
Abschluss mit Abitur

Zivildienst: 04.07.1994 - 30.09.1995, Klinikum Oberwald, Fachklinik für Gefäß-
und Enddarmkrankungen

Studium: 1995 – 2002 Studium der Humanmedizin an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
26.09.1997 Ärztliche Vorprüfung
27.08.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.04.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24.05.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion: bei Prof. Dr. Marlen Petersen, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Thema: „Regulation der Capsaicin-Sensitivität von Spinalganglienzellen
durch neurotrophe Faktoren“ (Schmerzforschung)
Kongressbeiträge:
18.-21.08.1999 Kloster Seeon, Satellitenmeeting des World Congress
of Pain
06.-08.10.1999 Erlangen Autumn School in Pain Research
05.-16.05.2000 Spring Pain Research Conference, Grand Cayman
04.-28.06.2000 Federation of European Neuroscience Societies
(FENS) Meeting in Brighton, UK (2000)

Praktisches Jahr: 1. Terial: Innere Medizin
23.04.-01.07.2001 University of Chicago
02.07.-18.08.2001 Missionsärztliche Klinik Würzburg
2. Terial: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
19.08.-14.10.2001 University of Toronto,
15.10.-09.12.2001 Universität Würzburg
3. Terial: Chirurgie
10.12.2001-31.03.2002: Missionsärztliche Klinik Würzburg

Arzt im Praktikum seit 01.07.2002 an der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik
Mannheim, Prof. Dr. Karl Hörmann

**Besondere Kenntnisse
und Erfahrungen:** 1998-2002 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
27.07.2000 Erfolgreiches Ablegen des TOEFL-Tests

Datum: Mannheim, den 01. Dezember 2003

