

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K.V. Toyka

**Protonenempfindlichkeit von Spinalganglienneuronen bei
Wildtypmäusen und Mausmutanten mit einem Mangel an
TRPV 1 oder ASIC 3**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Boris Mönter

aus Berlin

Würzburg, August 2003

Referent: Prof. Dr. med. M. Koltzenburg

Koreferent: Prof. Dr. med. L. Hein

Dekan: Prof. Dr.med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2004

Der Promovend ist Arzt.

Gewidmet meinem Großvater Wolfgang

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---------------|
| 1. Einleitung | - 1 - |
| 1.1. Schmerz | - 1 - |
| 1.2. Verschiedene Aspekte der Schmerzphysiologie | - 2 - |
| 1.3. Einteilung von Nozizeptoren | - 3 - |
| 1.4. Nozizeption auf molekularer Ebene | - 5 - |
| 1.4.1. TRPV1 | - 7 - |
| 1.4.2. Acid-sensing-ion-channel 3 | - 10 - |
| 1.5. Fragestellung | - 12 - |
| 2. Methoden | - 13 - |
| 2.1. Versuchstiere | - 13 - |
| 2.2. Präparation und Gewinnung der Zellkultur | - 13 - |
| 2.3. Aufbewahrung und Nutzung der Zellkultur | - 14 - |
| 2.4. Identifizierung von IB4-positiven Neuronen | - 14 - |
| 2.5. Patch-Clamp Technik | - 15 - |
| 2.6. Datenaufzeichnung und –speicherung | - 18 - |
| 2.7. Auswertung der Daten und statistische Tests | - 18 - |
| 2.8. Auswahl der untersuchten Zellen und Qualität der Ableitungsbedingungen | - 18 - |
| 2.9. Applikationsmethode und Versuchsprotokoll | - 19 - |
| 2.9.1. Steuerung der Applikation | - 19 - |
| 2.9.2. Reizung der Zelle mit sauren Lösungen | - 20 - |
| 2.9.3. Beeinflussung der pH-Antworten durch Amilorid | - 20 - |
| 2.9.4. Beeinflussung der pH-Antworten durch natriumfreies Milieu | - 20 - |
| 2.9.5. Identifizierung von TRPV1-positiven Neuronen | - 20 - |
| 2.6. Zusammensetzung der Lösungen | - 21 - |
| 2.7. Beurteilung der Reaktion einer Zelle auf einen Reiz | - 21 - |
| 2.7.1. Messung von Strömen | - 21 - |
| 2.7.2. Beurteilung der Ströme | - 21 - |
| 2.7.2.1. Spitzenamplituden | - 22 - |
| 2.7.2.2. Anhaltende Komponenten | - 22 - |
| 2.7.2.3. Transiente Komponenten | - 22 - |

| | |
|---|---------------|
| 3. Ergebnisse | - 23 - |
| 3.1. Eigenschaften der Neurone | - 23 - |
| 3.2. Protonen-induzierte Ströme steigen mit bei sinkendem pH | - 25 - |
| 3.2.1. Mittlere Spitzenamplituden | - 25 - |
| 3.2.2. Anhaltende Komponenten | - 28 - |
| 3.2.3. Transiente Komponenten | - 31 - |
| 3.3. Prävalenz von transienten Komponenten ist pH-abhängig | - 32 - |
| 3.4. Einfluss von Amilorid auf protoneninduzierte Ströme | - 34 - |
| 3.4.1. Anhaltende Komponenten werden nicht durch Amilorid beeinflusst | - 34 - |
| 3.4.2. Transiente Komponenten werden durch Amilorid reduziert | - 35 - |
| 3.5. Einfluss von natriumfreiem extrazellulärem Milieu auf protoneninduzierte Ströme | - 37 - |
| 3.5.1. Beeinflussung der anhaltenden Komponenten | - 37 - |
| 3.5.2. Beeinflussung der transienten Komponenten | - 39 - |
| 3.6. Protoneninduzierte Ströme in IB ₄ -positiven und IB ₄ -negativen Neuronen | - 39 - |
| 3.6.1. Mittlere Spitzenamplituden der IB ₄ -positiven und IB ₄ -negativen Neurone | - 39 - |
| 3.6.2. Prävalenz von transienten Komponenten | - 41 - |
| 4. Diskussion | - 43 - |
| 4.1. Capsaicinsensibilität | - 44 - |
| 4.2. Protonensensibilität | - 44 - |
| 4.2.1. Anhaltende Komponenten | - 45 - |
| 4.2.2. Transiente Komponenten | - 46 - |
| 4.3. TRPV1 | - 47 - |
| 4.4. ASIC3 | - 49 - |
| 4.5. IB ₄ | - 52 - |
| 4.6. Zusammenfassung und Ausblick | - 53 - |
| 5. Literaturverzeichnis | - 55 - |

1. Einleitung

1.1. Schmerz

"Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird."

Definition von Schmerz der International Association for the study of pain (IASP) (Merskey und Bogduk 1994)

Die Wahrnehmung von Schmerz – Nozizeption – ist einer der bedeutensten Sinne des Menschen und höherentwickelter Tiere, denn der Warncharakter des Schmerzes hilft Noxen zu meiden oder deren Einwirkung zu beenden und damit die Integrität des Organismus aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig können Schmerzen, besonders in chronifizierter Form, aber auch als eigenständiges Krankheitssyndrom auftreten (Schaible und Schmidt 2000). Schmerzen stellen einen der häufigsten Gründe von Menschen dar, einen Arzt aufzusuchen, und ihre Behandlung nimmt einen großen Teil der Ressourcen des Gesundheitssystems in Anspruch. Diese Faktoren machen die Bedeutung von effektiven analgetischen Therapien deutlich.

Die Kenntnis über die molekulare Basis von Schmerz – besonders über die Schlüssel-moleküle, die für die Wahrnehmung und Verarbeitung von Schmerzreizen verantwortlich sind – ist ein wichtiges Element in der Suche nach neuen und besseren analgetischen Medikamenten (McCleskey und Gold 1999).

Anfang des 20. Jahrhunderts forderte Sherrington (1906) die Existenz von speziellen Rezeptoren, die schmerzhafte Reize wahrnehmen und prägte den Begriff des Nozizeptors. Später wiesen Burgess und Perl (1967) nozizeptive Afferenzen im peripheren Nervensystem nach. Seitdem hat die Erforschung des nozizeptiven Systems große Fortschritte gemacht, so dass heute verschiedene Populationen von Nozizeptoren unterschieden werden können, und auch auf molekularer Ebene viel über Aufbau und Funktion wichtiger Strukturen bekannt ist (Snider und McMahon 1998; Julius und Basbaum 2001).

1.2. Verschiedene Aspekte der Schmerzphysiologie

Nozizeptoren sind afferente, sensible Neurone, die durch schmerzhafte Stimuli aktiviert werden. Ihre Dendriten liegen als freie Nervenendigungen im Gewebe. Ihre Einteilung, auf die noch genauer eingegangen wird, berücksichtigt vor allem die Qualität des zu ihrer Erregung führenden Reizes und die Nervenleitgeschwindigkeit.

Wirkt ein Reiz auf einen passenden Nozizeptor ein, so führt dieser durch eine Depolarisation der Membran im Rezeptorbereich zu einem Rezeptorpotential, welches, wenn es groß genug ist, ein Aktionspotential generiert. Dieses setzt sich über die gesamte afferente Nervenfasern bis zum pseudounipolaren Zellkörper des Neurons fort, der sich in entlang der Wirbelsäule lokalisierten Spinalganglion befindet, und wird von dort über das Axon geleitet, das über die Hinterwurzel zum Hinterhorn des Rückenmarks verläuft und hier auf das zweite Neuron projiziert.

Ein Teil dieser Rückenmarkneurone ist in spinale und supraspinale Reflexbögen integriert, die unter anderem mehr und weniger gerichtete Flucht- und Abwehrbewegungen auslösen, andere verlaufen über aufsteigende Bahnen nach weiter zentral. Eine wichtige Bahn verläuft im kontralateralen Seitenstrang (Tractus spinothalamicus lateralis) bis zu verschiedenen Kerngebieten des Thalamus, wo Schmerzreize in grober Form bereits zum Bewusstsein gelangen und projiziert von hier zu sensorischen Kortexarealen der Areae 1 bis 3 im Gyrus postcentralis, wo feine sensorisch-diskriminative Aufgaben erfüllt werden (Duus 1995). Andere Verbindungen im Thalamus erreichen das limbische System und das retikuläre aufsteigende System und sorgen so für die affektive Bewertung von Schmerz und Arousalreaktionen, die mit solchen Reizen einhergehen (Schaible und Schmidt 2000).

1.3. Einteilung von Nozizeptoren

Die Fasern von peripheren Nerven zeigen unterschiedliche Myelinisierungsgrade und damit verbunden, unterschiedliche Leitgeschwindigkeiten. So kann man sie in verschiedene Klassen einteilen, die für die Wahrnehmung verschiedener Modalitäten verantwortlich sind (Koltzenburg et al. 1997; Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001).

Stark myelinisierte A α - und A β -Fasern sind schnell leitende Fasern, die für Propiozeption (A α -Fasern) bzw. die Wahrnehmung von Druck und Berührung (A β -Fasern) verantwortlich sind (Julius und Basbaum 2001). Dünn myelinisierte A δ -Fasern mit einer mittleren Leitgeschwindigkeit und langsam leitende C-Fasern sind überwiegend nozizeptiv (Koltzenburg 1995; Koltzenburg et al. 1997; Snider und McMahon 1998; Koltzenburg 1999). Diese Klassen spiegeln sich auch in der Größe ihrer Zellkörper in Spinalganglien wieder. A β -Fasern gehen von großen (> 35 μ m im Durchmesser) und A δ -Fasern von mittelgroßen (30- 35 μ m) Zellkörpern aus, während C-Fasern von Neuronen mit kleinen (< 30 μ m) Zellkörpern entsendet werden (Harper und Lawson 1985; Lawson und Waddell 1991; Djouhri et al. 1998). Dieses macht man sich bei Experimenten an isolierten Spinalganglienneuronen zu Nutze, um gezielt einzelne Populationen von Neuronen – z.B. Nozizeptoren – zu untersuchen.

Auf dem Boden dieser Einteilung kann man die Neurone nun anhand der Reize, die zu einer Aktivierung führen, weiter unterteilen (Koltzenburg et al. 1997; Raja et al. 1999; Weidner et al. 1999). Eine Übersicht hierüber gibt Tabelle 1. Viele C-Faser-Nozizeptoren sind polymodal, d.h. sie sprechen auf mehrere Reize an, unter anderem mechanische und thermische, und werden als CMH-Fasern (C-Faser Mechano-Heat) bezeichnet. Eine Gruppe von A δ -Fasern, AMH-Fasern, zeigen dieselbe Eigenschaft. Diese polymodalen Nozizeptoren reagieren zumeist auch auf verschiedene chemische Substanzen, die schmerzhaft oder reizend wirken. Daneben findet man Neurone die nur auf mechanische (CM- und AM-Fasern) oder Hitzereize (CH- und AH-Fasern) ansprechen. Ein kleiner Teil der Nozizeptoren spricht auf Kaltreize an. Weiterhin gibt es sogenannte „schlafende“ Nozizeptoren (CM_iH_i-, C-Faser Mechano- und Hitze-unempfindlich), die unter physiologischen Bedingungen auf keinen dieser Reize reagieren (Schmidt et al. 1995). Sie können aber durch Sensibilisierung durch verschiedene chemische Substanzen wie Entzündungsmediatoren unter pathologischen Zuständen auf Hitze- oder mechanische Reize reagieren und spielen daher wahrscheinlich eine Rolle bei entzündlichen Vorgängen (Koltzenburg 1999).

Eine andere Differenzierungsmöglichkeit von Nozizeptoren stützt sich auf unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker. Die Entwicklung und Differenzierung von Neuronen hängt entscheidend von neurotrophen Faktoren ab (Koltzenburg und Lewin 1997; Snider und McMahon 1998). Nozizeptive

| Faser-Typ | Rezeptor | Endigung | Stimulus | Empfindung |
|----------------|--|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| A α | Propriorezeptor | Muskelspindel | Muskelkontraktion Dehnung | Gelenk- Position |
| | | Sehnenorgan | | |
| A β | schnell adaptierende Mechanorezeptor | Guard-Follikel | Haut- oder Haar- Bewegungen | Flattern oder Vibration |
| | | Meißner-Körperchen (RA I) | | |
| A β | langsam adaptierende Mechanorezeptor (SA) | Merkelzellen (SA I) | Hautindentation | Druck |
| | | Ruffini-Körperchen (SA II) | Hautdehnung | Gelenkposition |
| A δ | D-Haar-Rezeptor | Velus-Haarfollikel | Haarbewegung | Haarbewegung |
| A δ , C | Thermorezeptor | freie Nervenendigung | Temperatur | Warm, Kalt |
| A δ , C | Nozizeptor | freie Nervenendigung | Noxen | Schmerz |

Tabelle 1 Einteilung peripherer sensibler somatischer Neurone (modifiziert nach Koltzenburg und Lewin 1997)

Neurone sind während der Embryonalzeit von Nerve-growth-factor (NGF) abhängig und exprimieren die NGF-Rezeptoren trkA und p75 (Lewin und Mendell 1993; Silos-Santiago et al. 1995; Bergmann et al. 1997; Snider und McMahon 1998; Koltzenburg 1999; Stucky et al. 1999). Postnatal differenzieren sie sich in zwei verschiedene Populationen, von denen eine NGF abhängig bleibt, während eine andere die NGF-Rezeptoren verliert und statt dessen Rezeptoren des glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (C-Ret, GFR α 1) exprimiert (Molliver et al. 1997; Bennett et al. 1998). In der Ratte unterscheiden sich diese auch in ihrem Projektionsort im Rückenmark und in der Expression von Neuropeptiden und Oberflächenmarkern (s. Abb. 1) (Bennett et al. 1998; Snider und McMahon 1998; Guo et al. 1999; Michael und Priestley 1999; Amaya et al. 2000). Während NGF-abhängige, peptiderge Spinalganglienneurone die Neuropeptide Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Substanz P enthalten und in die Lamina I und die äußere Lamina II des Rückenmarks projizieren, projizieren die nicht-peptidergen GDNF-abhängigen Neurone in die innere Lamina II und binden das Isolektin B4. Unterschiedliche Expressionsmuster von verschiedenen Membranproteinen weisen auf spezialisierte Funktionen dieser beiden Populationen hin (Bradbury et al. 1998; Fjell et al. 1999; Stucky und Lewin 1999).

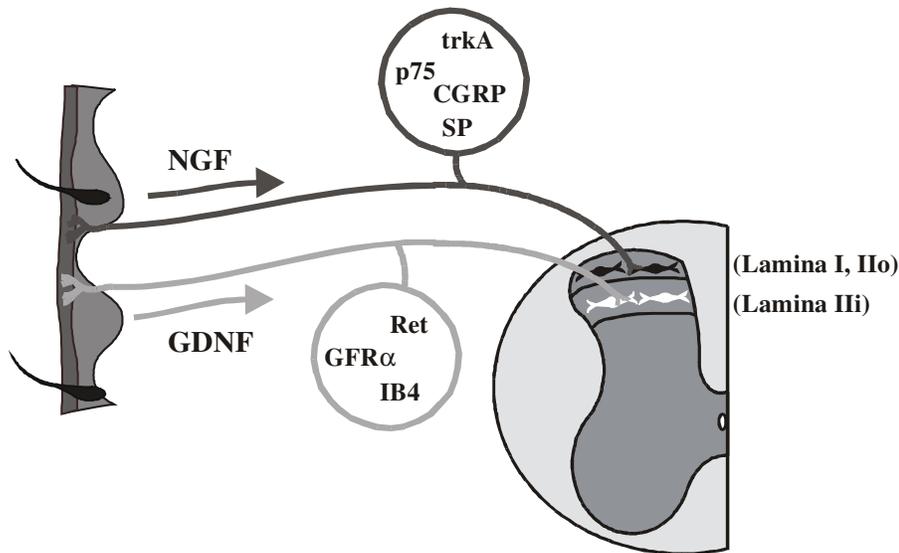


Abb. 1 NGF- bzw. GDNF-abhängige Neurone mit anatomischen und expressionsspezifischen Unterschieden bilden zwei verschiedene Populationen (modifiziert nach Snider und McMahon 1998).

1.4. Nozizeption auf molekularer Ebene

In den letzten Jahren gab es zusätzlich große Fortschritte bei der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen und Rezeptoren, die für die Transduktion noxischer Reize in eine Erregung der Neurone verantwortlich sind. Mechanische Reize decken eine große Palette von qualitativ und quantitativ verschiedenen Empfindungen ab. Es gibt Hinweise, dass amiloridempfindliche Na^+ -Kanäle aus der ENaC/DEG-Superfamilie, unter ihnen der hier näher untersuchte ASIC3, an der Rezeption solcher Reize in Vertebraten und Invertebraten beteiligt sein können (Mano und Driscoll 1999; Price et al. 2000; Price et al. 2001).

Auch für die Transduktion von thermischen Reizen verantwortliche Proteine konnten entschlüsselt werden. Es existieren verschiedene Subpopulationen hitzeempfindlicher Neurone in Spinalganglionen (Reichling und Levine 2000; Julius und Basbaum 2001). Eine Gruppe wird bei ca. 45°C aktiviert, was die Schmerzschwelle von Hitzereizen widerspiegelt (Cesare und McNaughton 1996; Raja et al. 1999), und ist capsaicinempfindlich (Kirschstein et al. 1997; Nagy und Rang 1999; Caterina et al. 2000). Da die Zellkörper dieser Neurone klein sind, repräsentieren sie wahrscheinlich

polymodale Nozizeptoren (CMH- und AMH- II Fasern). Die Aktivierungsschwelle und Capsaicinsensibilität sprechen dafür, dass hier TRPV1 als Rezeptor dient (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; Nagy und Rang 1999). Darauf weist auch die fehlende Capsaicin- und Hitzesensibilität bei 45°C in dissoziierten Spinalganglienneuronen von TRPV1 – Knock-Out Mäusen hin. Eine zweite Population, die erst bei höheren Temperaturen (~51°C) aktiviert und nicht capsaicinempfindlich ist, hat mittelgroße Zellkörper und repräsentiert damit wahrscheinlich mechano-Hitze-sensible A δ -Fasern (AMH II -Fasern) (Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Sie spiegeln Eigenschaften von TRPV2 (VRL-1) wieder, der in heterologen Expressionssystemen ebenfalls bei Temperaturen >50°C aktiviert wird und dessen Expression auf mittelgroße Spinalganglienneurone begrenzt ist (Caterina et al. 1999; Nagy und Rang 1999). Ebenfalls in sensiblen Neuronen exprimiert wird TRPV3, der schon bei niedrigen Temperaturen (> 22-39°C) aktiviert wird (Smith et al. 2002; Xu et al. 2002). Eine kleine Population sensorischer Neurone weist auch Aktivierbarkeit durch Kälte auf (Koltzenburg et al. 1997; Julius und Basbaum 2001; Viana et al. 2002). Durch die Klonierung von TRM8 (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002) und ANKTM1 (Story et al. 2003) konnten auch vielversprechende Kandidaten für die molekulare Basis des Kälteempfindens identifiziert werden.

Verschiedene chemische Substanzen können Schmerz auslösen oder, z.B. während Entzündungsvorgängen, verstärken. Für eine Reihe solcher Stoffe wurden Rezeptoren entdeckt. Hier soll besonders auf die Rolle von Protonen während Schmerzvorgängen eingegangen werden.

Gewebsazidose tritt bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen auf und ist mit Schmerz assoziiert (Reeh und Steen 1996). In entzündlichem Gewebe, bei ischämischen Zuständen, wie bei kardialer Ischämie, in und um maligne Tumore herum und in frakturbegleitenden Hämatomen wurden erniedrigte pH-Werte bis pH 4.7 gemessen (Rang et al. 1991; Steen et al. 1992; Steen et al. 1995b). In verschiedenen in vivo- und in vitro- Experimenten konnte gezeigt werden, dass solche azidotischen Zustände Schmerzen verursachen, bzw. periphere Nozizeptoren erregen (Steen et al. 1992; Steen und Reeh 1993; Steen et al. 1995b; Issberner et al. 1996). Das nozizeptive Spinal- und Trigemininalganglienneurone (Krishtal und Pidoplichko 1981a; Krishtal und Pidoplichko 1981c; Davies et al. 1988; Kovalchuk Yu et al. 1990; Bevan und Yeats 1991) und auch

Neurone im zentralen Nervensystem (Grantyn und Lux 1988; Ueno et al. 1992) auf saure pH-Werte reagieren, hat zu der Annahme von speziellen protonensensiblen Rezeptoren geführt, die eine Rolle bei der Entstehung von Schmerzen (Krishtal und Pidoplichko 1981b; Bevan und Yeats 1991; Reeh und Steen 1996) und der Modulation von synaptischer Erregungsausbreitung spielen (Kovalchuk Yu et al. 1990).

Die Reaktionen von Spinalganglienneuronen auf Protonen sind komplex und uneinheitlich. Es können in elektrophysiologischen Experimenten hauptsächlich zwei in ihrer Kinetik verschiedene Komponenten der durch saure extrazelluläre Lösungen ausgelösten Einwärtsströme unterschieden werden (Bevan und Yeats 1991; Kress und Zeilhofer 1999). Bei anhaltender Reizung können zum einen innerhalb von Sekunden inaktivierende, transiente Komponenten nachgewiesen werden, die für monovalente Ionen permeabel sind und überwiegend von Natrium getragen werden und durch Amilorid geblockt werden können (Krishtal und Pidoplichko 1981a; Krishtal und Pidoplichko 1981c). Zum anderen lassen sich anhaltende, für Kationen nicht selektive, persistierende Komponenten nachweisen, die neben Na^+ auch von Ca^{2+} -Ionen getragen werden und überwiegend in Neuronen auftreten, die auch auf Capsaicin reagieren (Bevan und Yeats 1991). Verschiedene Rezeptor- und Kanalproteine sind hieran beteiligt, von besonderem Interesse sind der „Capsaicin-Rezeptor“ TRPV1 und die Gruppe der Acid-sensing-ion-channels (ASICs).

1.4.1. TRPV1

Nachdem schon seit den 70er Jahren angenommen wurde, dass es spezifische Rezeptoren für Capsaicin und andere Vanilloide gäbe (Jancso et al. 1967; Szolcsanyi und Jancso-Gabor 1975; Szallasi und Blumberg 1999), gelang erst 1997 die Klonierung des „Capsaicin-Rezeptors“ TRPV1 (früher VR1) (Caterina et al. 1997), der der Familie der TRP- (transient receptor potential-) Kanäle zuzuordnen ist (Caterina et al. 1999; Schumacher et al. 2000; Montell et al. 2002). Mäuse mit einer Ausschaltung des TRPV1-Gens zeigen in Verhaltens- und in elektrophysiologischen Experimenten ein völliges Fehlen der Capsaicinsensibilität, weshalb dieser Stoff zur Differenzierung von TRPV1-exprimierenden von nicht TRPV1-exprimierenden Neuronen in Wildtyp-Mäusen herangezogen werden kann (Caterina et al. 2000; Gunthorpe et al. 2000).

TRPV1 ist ein Transmembranprotein mit 838 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 95 kDa und stellt einen nicht-selektiven Kationenkanal dar. Nach Analyse der Primärstruktur lassen sich sechs transmembranöse Segmente und eine hydrophobe Schleife zwischen Segment 5 und 6 annehmen (Caterina et al. 1997), die vermutlich den extrazellulären Kanalporus enthält (Garcia-Martinez et al. 2000). Sowohl der C-, als auch der N-Terminus des Proteins liegen intrazellulär (Caterina et al. 1997) (s. Abb. 2).

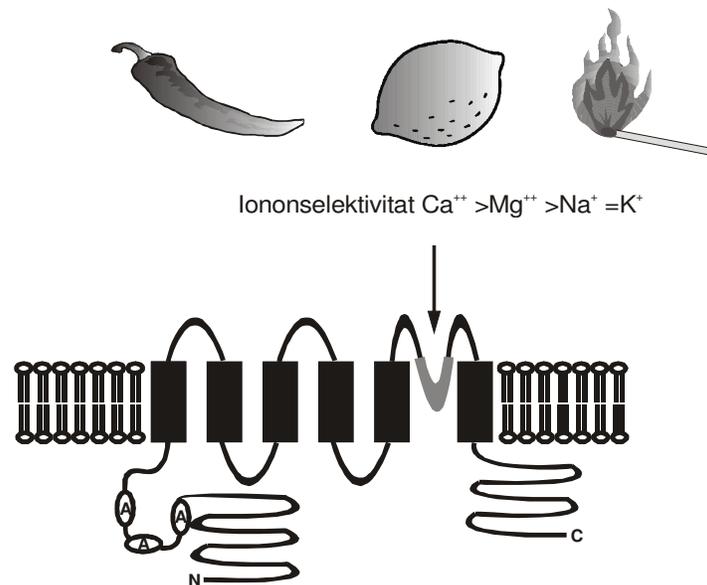


Abb. 2 Cartoon von TRPV1. Die Reaktion des Rezeptors auf verschiedene Reize führt zu einem Kationeneinstrom in die Zelle (Caterina et al. 1997).

Vanilloide entfalten an TRPV1 bzw. an TRPV1-exprimierenden Neuronen verschiedene Wirkungen. Bindung an den intrazellulär gelegenen Bindungsstellen führt zu einer Konformationsänderung und so zu Öffnung des Ionenkanals (Jung et al. 1999; Welch et al. 2000; Jordt und Julius 2002; Jung et al. 2002). Aus dieser Aktivierung resultiert ein anhaltender Einwärtsstrom von Kationen, der zwar nicht selektiv für ein Ion ist, aber für Kalzium eine deutlich höhere relative Permeabilität ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 9,6$) als für andere bivalente Ionen, wie Magnesium ($P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}} = 4,99$) oder monovalente Ionen wie Natrium aufweist (Liu und Simon 1994; Liu et al. 1996; Petersen et al. 1996; Caterina et al. 1997). Später tritt eine Abnahme des Stromes ein, durch

Desensibilisierung bei anhaltender Besetzung des Rezeptors mit Agonisten, bzw. Tachyphylaxis bei wiederholter Applikation (Liu und Simon 1996; Liu und Simon 1998; Szallasi und Blumberg 1999). Herabregulation des Rezeptors bzw. durch TRPV1 vermittelte Neurotoxizität führt ebenfalls zur Veränderung von neuronalen Funktionen (Wood et al. 1988; Szallasi et al. 1995; Caterina et al. 1997). TRPV1 reagiert aber nicht nur auf Vanilloide, sondern auch auf Protonen ($\text{pH} < 5,9$), Hitze ($> 45^\circ\text{C}$) und das Endocannabinoid Anandamid (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; Zygmunt et al. 1999; Jordt et al. 2000). Die Vielfältigkeit der TRPV1-Aktivierung findet sich auch unter anderen TRP-Proteinen, die unter anderem durch Lipide, Phorbolster, Phosphorylierung, Osmolaritätsänderungen und Druck aktiviert werden (Hwang et al. 2000; Smart und Jerman 2000; Clapham et al. 2001; Gunthorpe et al. 2002; Montell et al. 2002). Neben der direkten Aktivierung bei hohen Konzentrationen, sind leicht saure Protonenkonzentrationen in der Lage, den Rezeptor zu sensibilisieren, so dass er bei $\text{pH} 6,1$ schon bei Körpertemperatur aktiviert wird (Tominaga et al. 1998; Baumann und Martenson 2000; Jordt et al. 2000).

Der anhaltende Einwärtsstrom von TRPV1-exprimierenden Zellen im heterologen System spiegelt somit die Reaktion von nativen nozizeptiven Neuronen auf Capsaicin und Hitze und deren anhaltenden protoneninduzierten Strom wieder (Cesare und McNaughton 1996; Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; Jerman et al. 2000).

In der Ratte wird TRPV1 überwiegend von polymodalen, sowohl IB4-bindenden als auch nicht IB4-bindenden Nozizeptoren exprämiert (Tominaga et al. 1998; Guo et al. 1999) und scheint deshalb ein für die Transduktion von schmerzhaften Reizen bedeutendes Molekül zu sein.

Aber auch in anderen neuronalen Geweben, außerhalb des ersten sensiblen Neurons, wie Kortexarealen, Regionen des limbischen Systems und anderen Kerngruppen im Gehirn (Acs et al. 1996; Sasamura et al. 1998; Mezey et al. 2000), konnte die Expression von TRPV1 oder die Bindung von Vanilloiden nachgewiesen werden. Die Funktion ist hier unklar, möglicherweise dienen endogene Vanilloide als Agonisten (Szallasi und Di 2000). Auch über die Bedeutung der Expression von TRPV1 in extraneuronalen Geweben, wie Gliazellen, der Harnblase, der Epidermis oder glatter Muskulatur des Bronchialsystems ist noch wenig bekannt (Ellis et al. 1997; Biro et al. 1998; Birder et al. 2001; Denda et al. 2001).

1.4.2. Acid-sensing-ion-channel 3

Acid-sensing ion channels (ASICs) gehören zu der ENaC/DEG-Familie von amiloridempfindlichen Ionenkanälen, und werden durch einen Abfall des extrazellulären pH aktiviert. Protonen aktivieren ASIC-Kanäle durch Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, die bei neutralen pH-Werten an dem Kanalporus gebunden sind und somit einen Einwärtsstrom blockieren (Immke und McCleskey 2003). Die resultierende Depolarisierung der Zelle ist in der Lage, Aktionspotentiale auszulösen (Varming 1999).

Bis heute wurden vier verschiedene Gene der ASIC-Familie entdeckt, die für sechs verschiedene Untereinheiten codieren, nämlich die Isoformen ASIC1a und 1b und ASIC2a und 2b sowie für ASIC3 und ASIC4 (Nomenklatur nach Waldmann und Lazdunski 1998) (Price et al. 1996; Waldmann et al. 1996; Garcia-Anoveros et al. 1997; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Grunder et al. 2000).

Die Mitglieder der ENaC/DEG-Familie (s. Abb. 3) zeigen eine einheitliche Tertiärstruktur mit intrazellulär gelegenen C- und N-Terminus, zwei Transmembransegmenten und einer dazwischenliegenden langen extrazellulären Schlaufe (Canessa et al. 1994; Renard et al. 1994; Snyder et al. 1994; Waldmann et al. 1996), die an der Bildung des äußeren Kanalporus beteiligt ist, der die Ionenpermeabilität mitbestimmt (Palmer 1990; Kellenberger et al. 1999a; Kellenberger et al. 1999b; Snyder et al. 1999; Sheng et al. 2000; Kellenberger et al. 2001) sowie die Bindungsstellen für verschiedene Liganden, wie Protonen (Adams et al. 1998) oder Amilorid (Schild et al. 1997) enthält. Auch intrazelluläre Domänen beteiligen sich an der Struktur des Kanalporus und der Determinierung pharmakologischer Eigenschaften (Coscoy et al. 1999; Bassler et al. 2001)

In der Zellmembran bilden die Untereinheiten Multimere, dabei können sie sich neben Homomeren auch zu Heteromeren mit anderen ASICs vereinigen, und so ihre funktionellen Eigenschaften verändern (Basilana et al. 1997; Babinski et al. 2000; Benson et al. 2002).

ASIC3 (auch DRASIC) (Waldmann et al. 1997a; Chen et al. 1998; de Weille et al. 1998; Ishibashi und Marumo 1998; Babinski et al. 1999) wird vorherrschend in Spinalganglionneuronen gefunden, und zwar sowohl in großen mechanosensiblen, als

auch kleinen nozizeptiven Neuronen. Durch Studien konnte eine Beteiligung von ASIC3 an der Wahrnehmung mechanischer als auch schmerzhafter Reize in vivo nachgewiesen werden (Price et al. 2001; Chen et al. 2002). Für ASIC3 wird auch eine Rolle bei der Wahrnehmung von kardialer Gewebsazidose, die im Rahmen Ischämien auftritt und als Angina pectoris starke Schmerzen verursacht angenommen (Benson et al. 1999; Sutherland et al. 2001).

Der Rezeptor reagiert auf mit zwei voneinander unterscheidbaren Stromkomponenten auf Protonen, einer schnell inaktivierenden, die der anderer ASIC-Kanäle bei der Ratte ähnelt, schon bei pH >6,5 aktiviert wird, Natrium-selektiv ist und durch Amilorid geblockt wird. Zusätzlich tritt aber auch eine nur langsam inaktivierende Komponente auf, die erst bei wesentlich saureren pH 4 aktiviert, nicht zwischen Na⁺- und K⁺-Ionen diskriminiert und durch Amilorid nicht geblockt wird (Waldmann et al. 1997a; de Weille et al. 1998; Babinski et al. 1999).

Obwohl, wie bereits erwähnt, Homomultimere von ASIC-Untereinheiten in nativem Gewebe nachgewiesen wurden, können diese die Eigenschaften, besonders von Spinalganglionneuronen, nur teilweise erklären. Heteromultimere, die von verschiedenen ASIC-Subtypen gebildet werden, sind in diesen Neuronen nachweisbar und spiegeln die Eigenschaften von Protonen-induzierten Strömen deutlich genauer wieder (Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1999).

ASIC1a (Basilana et al. 1997), ASIC2a (Babinski et al. 2000; Zhang und Canessa 2001) und ASIC3 (Xie et al. 2002) spielen dabei eine übergeordnete Rolle (Benson et al. 2002).

Neben diesem Mechanismus, die Eigenschaften von Neuronen zu verändern, werden ASIC-Kanäle zusätzlich durch eine Reihe von endogenen Substanzen moduliert.

Zum einen gibt es Koaktivatoren, die direkt auf die Rezeptoren wirken. Neuropeptide FF und FRMF-Amide verstärken Ströme von ASIC3 und seinen Heteromeren (Allard et al. 1999; Askwith et al. 2000; Catarsi et al. 2001), Zn²⁺-Ionen modulieren ASIC-Kanäle (Baron et al. 2001), und Laktat kann, indem es extrazelluläre Ca²⁺-Ionen bindet, deren hemmende Wirkung auf die Kanäle vermindern und so lokal Nozizeptoren beeinflussen (Immke und McCleskey 2001).

Die Hochregulation von ASICs durch Entzündungsvorgänge ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung dieser Kanäle für Nozizeption (Voilley et al. 2001; Yiangou et al.

2001; Mamet et al. 2002) und dass einigen nicht-steroidalen Antirheumatika eine hemmende Wirkung auf ASICs nachgewiesen wurde, könnte – neben vielen anderen – ein weiterer Mechanismus von deren analgetischen Wirkung sein (Voilley et al. 2001).

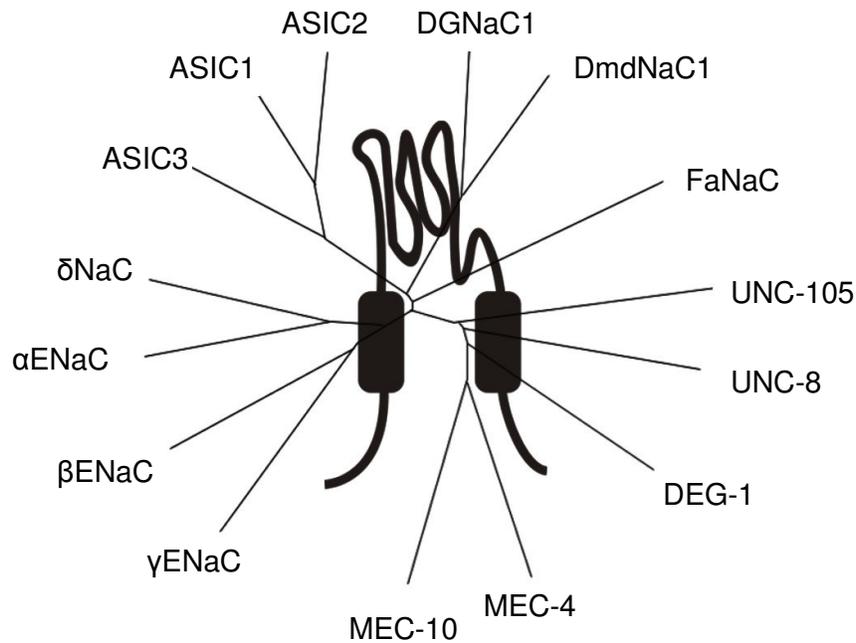


Abb. 3 Zu der Familie der DEG/ENaC gehören auch die ASIC-Kanäle. Sie besitzen zwei Transmembransegmente und eine lange extrazelluläre Schlaufe. (modifiziert nach Waldmann und Lazdunski 1998)

1.5. Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Eigenschaften nozizeptiver Neurone von transgenen Mäusen untersucht werden, denen das Gen für TRPV1 oder für ASIC3 deletiert wurde. Mit der Patch-Clamp Methode konnte die Reaktion der Neurone auf unterschiedlich saure extrazelluläre pH-Werte und die Beeinflussung derselben durch Amilorid sowie durch ein natriumfreies extrazelluläres Milieu bestimmt werden. Weiterhin konnte durch eine IB4-Färbung der untersuchten Neurone zwischen NGF- und GDNF-abhängigen Neuronen unterschieden werden.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an Zellkulturen von Spinalganglienneuronen zwölf adulter C57/Bl6 – Mäuse des Genotyps TRPV1 +/+ ; ASIC3 +/+ (Wildtyp), neun adulter C57/Bl6 – Mausmutanten des Genotyps TRPV1 -/- ; ASIC3 +/+ (TRPV1 - Knock-Out) und drei adulter C57/Bl6 - Mausmutanten des Genotyps TRPV1 +/+ ; ASIC3 -/- (ASIC3 – Knock-Out) durchgeführt.

2.2. Präparation und Gewinnung der Zellkultur

Nach der Tötung des Tieres mit CO₂ wurde diesem die Wirbelsäule von Schädel und Beckenknochen sowie von den Schwanzwirbelkörpern abgetrennt und entnommen. Nach Längsspaltung der Wirbelsäule und Entfernung des Rückenmarkes konnten die freigelegten Spinalganglien herauspräpariert werden. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden diese vor der weiteren Behandlung in D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco, Deutschland) aufbewahrt. Zur Dissoziation der einzelnen Neurone aus den Spinalganglien wurden diese anschließend wie folgt behandelt: Nach Inkubation in Collagenase-Lösung (0,28 U/ml in D-MEM, Biochrom, Deutschland) für 95 min (37°C, 5% CO₂) und einmaligem Waschen mit PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung), erfolgte die Inkubation in Trypsin-Lösung (25000 U/ml in PBS ohne Ca₂₊ und Mg₂₊, beide Sigma) für 9 min (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde die doppelte Menge an pferdeserumhaltigem Nährmedium (Hams-F12 Medium (Gibco) mit 3 mM L-Glutamine (Gibco), 40 mM Glucose (Sigma), 100 U/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 50 ng/ml 2,5S-NGF (Alamone Labs, Israel) und 10% Pferdeserum (Life Technologies)) zugegeben, um die Aktivität des Trypsins zu stoppen und weiteren enzymatischen Abbau zu verhindern. Die so vorbehandelten Spinalganglien wurden in D-MEM überführt und mit an der Spitze verengten Glaspipetten trituriert. Nach einem weiteren Waschschrift in D-MEM konnten die

dissoziierten Neurone in Nährmedium aufgenommen und auf sterilen Glasplättchen (50 µl) (Hartenstein Laborbedarf, Deutschland) ausgesät werden.

Diese waren zuvor mit Alkohol gereinigt und mit Poly-L-Lysin (Sigma) (50 µl/Deckgläschen) beschichtet worden. Nach mindestens 4h wurde das Poly-L-Lysin sorgfältig mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in Kulturschalen (12x, Nunc, Hartenstein Laborbedarf) überführt. In den nächsten vier Stunden konnten sich die Spinalganglienneurone während der weiteren Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ auf den Deckgläschen anhaften, so dass die Zellkulturen dann mit Nährmedium geflutet werden konnten, ohne das Gefahr bestand, dass sich die Neurone von dem Deckgläschen ablösen.

2.3. Aufbewahrung und Nutzung der Zellkultur

Die Zellkultur wurde bei 37°C (5% CO₂) aufbewahrt, das Nährmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Die Neurone wurden innerhalb von 48h für die Experimente genutzt.

2.4. Identifizierung von IB4-positiven Neuronen

Direkt vor den elektrophysiologischen Versuchen wurde eine Vitalfärbung die Zellen gegen Isolektin B4 (IB4) durchgeführt. IB4 ist das Lektin der Pflanze *Bandereia simplicifolia* I und bindet mit hoher Affinität an Glycoproteine mit einer terminalen α -D-Galactosylkette, wodurch eine Subpopulation von Spinalganglienneuronen identifiziert werden kann (s.o.). Hierzu wurden die Zellen für 5 min in mit FITC-konjugiertem IB4 (IB4-FITC, Fluoresceinisothiocyanate, Sigma) inkubiert (10 µg/ml IB4-FITC in Extrazellulärlösung).

Die IB4 positiven Neurone konnten so fluoreszenzmikroskopisch unter UV-Licht identifiziert werden, hierzu wurde ein invertiertes Lichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) unter dem auch die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt wurden, benutzt.

2.5. Patch-Clamp Technik

Mit Hilfe der verschiedenen Patch-Clamp-Techniken können elektrophysiologische Eigenschaften von biologischen Membranen untersucht werden (Hamill et al. 1981; Sakmann und Neher 1995; Hille 2001). An jeweils einem Neuron pro Deckgläschen wurden mit Hilfe der Single-Electrode Whole-cell Patch Clamp Technik der Strom, der über die Zellmembran fließt abgeleitet und aufgezeichnet, während das Membranpotential auf -60 mV gehalten wurde, wodurch elektrische Vorgänge über der Membran der intakten Zelle untersucht werden konnten.

Hierzu wurde ein Deckgläschen in eine Perfusionskammer (RC-25, Warner Instruments, U.S.A.) gelegt, deren offener Boden durch ein weiteres Deckgläschen abgedichtet wurde und die in das Lichtmikroskop eingespannt wurde. So waren die Zellen mikroskopisch beurteilbar. Dieses Bad wurde kontinuierlich mit Extrazellulärlösung gespült und die mittels einer Saugpumpe entfernte überschüssige Lösung verworfen (Abb.4).

Unter mikroskopischer Kontrolle wurde nun eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Mikropipette aus Borosilikatglas (Science Products, Deutschland) an die zu untersuchende Zelle herangeführt, bis die Pipettenspitze gerade die Zellmembran berührte. Die Pipettenspitze war zuvor mit einem Pipetten-Puller (Sutter P-97, Sutter, U.S.A.) auf die erforderliche Größe ausgezogen worden (Durchmesser $0,5 - 1 \mu\text{m}$). Die Pipette war in einen Roboterarm (PatchMan, Eppendorf, Deutschland) eingespannt, der vom Untersucher über einen Joystick in allen drei Raumebenen bewegt werden konnte. In der Pipette befand sich eine chlorierte Silberdrahtelektrode die über einen Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments, U.S.A.) mit den Messgeräten verbunden war. Der Widerstand über der intakten Pipettenspitze betrug ca. $3-5 \text{ M}\Omega$.

Wenn die Mikro-Glaspipette die Zellmembran berührt, beginnt sie sich fest anzuhafte und bildet so eine Abdichtung (Seal) gegenüber dem extrazellulären Raum, während das Pipetteninnere von dem Intrazellulärraum durch die noch intakte Zellmembran getrennt wird, die jetzt die Pipettenspitze verschließt (Patch). Der Seal lässt sich als Widerstand zwischen der Elektrode in der Mikropipette und einer Referenzelektrode messen. Letztere war in ein mit Extrazellulärlösung gespültes Organbad getaucht.

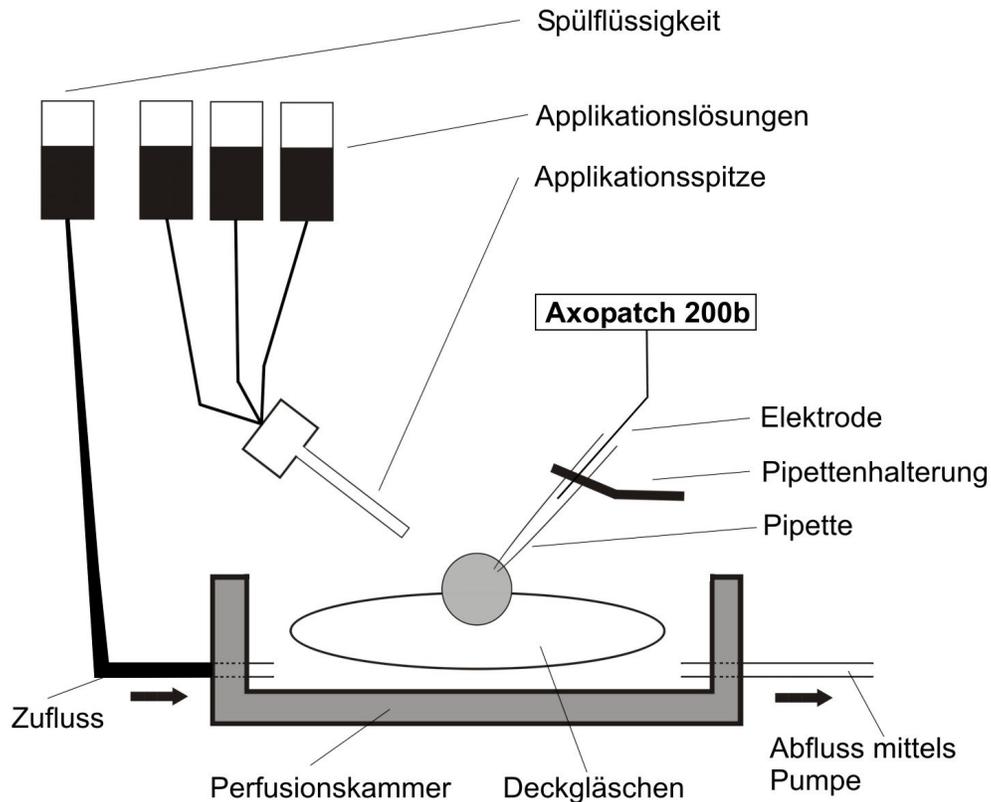


Abb. 4 *Schematische Darstellung des Applikationssystems*

Die Perfusionsskammer, auf dem Mikroskop montiert, wurde kontinuierlich mit einer extrazellulären Lösung durchflutet. Über die Applikationsspitze wurde die Zelle mit den Testlösungen gespült. Das Applikationssystem war mit dem Mess- und Aufzeichnungssystem vernetzt, so dass mit Beginn der Applikation auch die Aufzeichnung startete.

War der Seal groß genug ($R > 1\text{G}\Omega$, Gigaseal), wurde der Patch eröffnet, was mittels eines Unterdruckimpulses in der Pipette erfolgt. Dieser wurde durch kurzes Saugen an einem Schlauch geschaffen, der über den Pipettenhalter an die Elektrolytlösung im Pipetteninneren gekoppelt war. (Abb. 5)

Nun bildete die Elektrolytlösung im Pipetteninneren mit dem Zellinneren einen elektrischen Raum, dessen Eigenschaften mittels der Elektroden abgeleitet werden konnten. Beim Whole-cell patch clamp wird dabei das Potential zwischen den beiden Elektroden gemessen, das dem Membranpotential (V_m) entspricht, und durch Strominjektion in die Zelle auf einem gewählten Wert konstant gehalten wird (V_{mC}). Die Menge des zu injizierenden Stromes entspricht dem Strom, der über die Membran fließt und ist bei konstantem V_{mC} proportional zur Leitfähigkeit der Zellmembran. V_{mC} wurde auf -80 mV eingestellt.

Anschließend wurde durch kurzes Unterbrechen der Strominjektion das von der Zelle selbst aufgebaute Membranpotential (V_{mE}) gemessen, um die Intaktheit der Zellmembran zu bestätigen.

Die Reaktion der Zelle auf einen externen Reiz konnte durch die Veränderung des Stromes über der Zellmembran gemessen und aufgezeichnet werden.

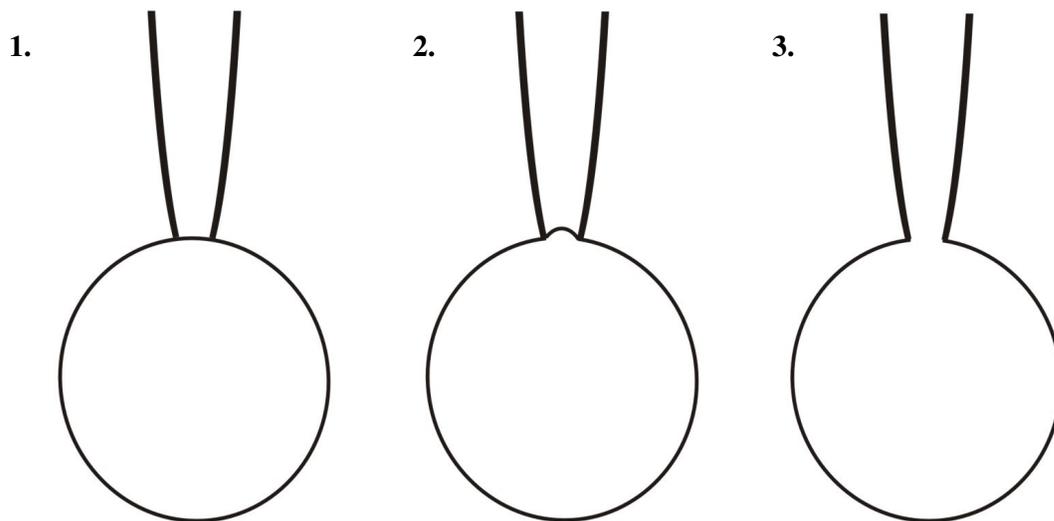


Abb. 5 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Schaffung einer Whole-cell Konfiguration: **1.** Positionierung der Pipette an der Zelloberfläche. Die Anhaftung der Pipette führt zu einer Erhöhung des Widerstandes über der Pipettenspitze. **2.** Ein Unterdruck in der Pipette führt weiteren Abdichtung und zur Ausbildung eines „Gigaseals“ **3.** Durch einen Unterdruckimpuls wird der Membranpatch zerstört, Pipetten- und Zellinneres bilden jetzt einen elektrischen Raum.

2.6. Datenaufzeichnung und -speicherung

Die Einstellung des Membranpotentials und Messungen wurden über den Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments, U.S.A.) vorgenommen. Dieser war über eine Schnittstelle (Digidata 1200B, Axon Instruments, U.S.A.) mit einem PC verbunden, auf dem mit Hilfe der Software pClamp 6.0 und 8.0 (Axon Instruments) die Daten aufgezeichnet und dargestellt wurden. Die Daten wurden mit einer analog-digitalen Umwandlungsrate von 0,2 – 1 kHz aufgenommen und durch einen Breitbandfilter von 5 kHz gefiltert. Die Daten wurden zunächst auf der stationären Festplatte gespeichert und dann auf CD-ROM übertragen.

2.7. Auswertung der Daten und statistische Tests

Die aufgezeichneten Daten wurden von dem Auswertprogramm Clampfit (pClamp Software) gelesen und dargestellt, in dem die Amplituden der Ströme ausgemessen werden konnten. Zur tabellarischen Darstellung und Auswertung dieser Werte kam das Programm Excel (Microsoft, U.S.A.), zur Prüfung der Signifikanz das Programm Statistika (Statsoft, Tulsa, U.S.A.) zum Einsatz. Als statistische Tests wurden der χ^2 -Test, der gepaarte und der ungepaarte t-Test sowie der Anova-Test verwandt. Die Größen der Amplituden werden als Mittelwerte mit Standardfehler der arithmetischen Mittel angegeben, die Signifikanzniveaus wurden als schwach signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$, als signifikant wenn $p < 0,01$ und als hochsignifikant wenn $p < 0,001$ bezeichnet.

Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Origin (Microcal Software, Northhampton U.S.A.).

2.8. Auswahl der untersuchten Zellen und Qualität der Ableitungsbedingungen

Der Durchmesser der ausgewählten Neurone betrug 15 – 30 μm . Die Vitalität der zu untersuchenden Zelle wurde zuerst optisch festgestellt, bevor mit dem Patch-Vorgang begonnen wurde. Hierzu wurden als Kriterien ein klares Zellplasma ohne sichtbare Vakuolen, eine glatte und scharf kontrastierte Zellgrenze und ein vom Zellplasma klar abgegrenzter Zellkern herangezogen. Der Patch einer Zelle wurde erst eröffnet, wenn

der Seal einen Widerstand größer als 1 G Ω („Gigaseal“) erreicht hatte. Die Zelle wurde weiterhin nur für Messungen verwandt, wenn der Pipettenleckstrom nach Eröffnung des Patches kleiner als 200 pA und das unbeeinflusste Membranpotential (V_{mE}) der Zelle negativer als -40 mV waren. Letzteres wurde als Zeichen der Vitalität der Zelle betrachtet.

Die Ableitung wurde abgebrochen, wenn während der Messung der Leckstrom größer als 500 pA bzw. V_m positiver als -30 mV wurden.

2.9. Applikationsmethode und Versuchsprotokoll

2.9.1. Steuerung der Applikation

Zur Messung der Reaktion der Neurone auf verschiedene extrazelluläre pH-Werte, wurde ein gravitationsgetriebenes Applikationssystem eingesetzt, mit dessen Hilfe die untersuchte Zelle mit verschiedenen Lösungen gespült werden konnte (für nähere Beschreibung des Applikationssystems s. (Dittert et al. 1998).

Hierzu konnten über die WAS-Software (**W**indows **A**pplication **S**ystem, (Dittert et al. 1998) millisekundengenau zwölf Ventile angesteuert werden, durch die jeweils eine Lösung durch eine genau auf die Zelle ausgerichtete Glaskapillare gespült wurde. Durch eine Positionierung der Applikationspitze in einem Abstand unter 100 μm von der Zelle entfernt, wurde eine schnelle Applikation und ein schneller Austausch von Testlösungen innerhalb von 300 ms ermöglicht. (Abb. 4) WAS war über einen Triggerimpuls mit pClamp verbunden, so dass gleichzeitig mit dem Applikationsprogramm die Aufzeichnung der Messung gestartet wurde.

Ein Applikationsprogramm dauerte bis zu 120 Sekunden. Dabei wurde jeweils die Reaktion der Zelle auf einen sauren pH-Reiz, sowie anschließend die Beeinflussung dieser durch 100 μM Amilorid (Sigma) oder ein natriumfreies extrazelluläres Milieu ($\text{SIF}_{\text{natriumfrei}}$) untersucht. Zwischen diesen Programmen wurde das Bad jeweils für mindestens 60 Sekunden mit SIF mit einem pH von 7,4 gespült.

Zum Abschluss dieser Untersuchungen wurde getestet, ob die Zelle auf Capsaicinlösung (1 μM , Sigma) reagiert.

2.9.2. Reizung der Zelle mit sauren Lösungen

Um die Reaktion der Zelle auf verschiedene extrazelluläre saure pH-Werte zu untersuchen, wurde nach einer zehneckündigen Applikation von SIF pH 7,4 für zehn Sekunden eine SIF mit dem pH 6,0, 5,0 oder 4,0 appliziert.

Über die zusätzliche Badspülung wurde kontinuierlich mit SIF pH 7,4 gespült.

2.9.3. Beeinflussung der pH-Antworten durch Amilorid

Um die Beeinflussung der Reaktion auf die pH-Reize durch Amilorid zu messen, wurde direkt nach der Applikation der sauren SIF über 60 Sekunden SIF pH 7,4 und daran anschließend mit 100µM Amilorid versetzte SIF (SIF_{Amilorid}) des entsprechenden pH-Wertes 6, 5 oder 4 für ebenfalls zehn Sekunden appliziert. Im Anschluss daran erfolgte zum Abschluss nochmals die Applikation von SIF pH 7,4.

Über die Badspülung wurde bis zum Ende der Applikation von saurer SIF_{Amilorid} mit SIF_{Amilorid} pH 7,4 gespült.

2.9.4. Beeinflussung der pH-Antworten durch natriumfreies Milieu

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Reaktion einer Zelle auf saure pH-Reize durch ein natriumfreies extrazelluläres Milieu wurde nach der Applikation der sauren SIF über 60 Sekunden SIF_{natriumfrei} pH 7,4 und dann zehn Sekunden SIF_{natriumfrei} des entsprechenden pH-Wertes 6,0, 5,0 oder 4,0 appliziert. Anschließend erfolgt wiederum die Applikation von SIF pH 7,4.

Über die Badspülung wurde bis zum Ende der Applikation von saurer SIF_{natriumfrei} mit SIF_{natriumfrei} pH 7,4 gespült.

2.9.5. Identifizierung von TRPV1-positiven Neuronen

Letztlich wurde jede Zelle auf ihre Reaktion auf Capsaicinlösung (1µM) getestet. Dazu wurde nach zehn Sekunden SIF pH 7,4 über zehn Sekunden mit 1mM Capsaicin versetzte SIF (SIF_{Capsaicin}) appliziert. So konnten TRPV1-exprimierende von anderen Neuronen unterschieden werden.

2.6. Zusammensetzung der Lösungen

Die extrazellulären Lösungen (SIF) bestanden aus folgender Zusammensetzung: in mM: NaCl 145, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, Glucose 10 und HEPES 10; Osmolarität ~310 mosm. Die Lösungen wurden mit HCl bzw NaOH (bei SIF_{natriumfrei} KOH) auf ihren pH titriert, bei den Lösungen mit pH 5,0 und pH 4,0 wurde HEPES durch 10 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäuremonohydrat, Gibco) ersetzt.

SIF_{Amlorid} wurden 100µM Amlorid und SIF_{Capsaicin} wurden 1mM Capsaicin zugesetzt, in SIF_{natriumfrei} wurde NaCl durch 145 mM NMGA (N-Methyl-D-Glutamin, Sigma) ersetzt. Die intrazelluläre Lösung in der Mikropipette hatte folgende Zusammensetzung: (in mM) KCl 140, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, EGTA 10, HEPES 10 und MgATP 2; pH 7,4; Osmolarität ~300 mosm.

2.7. Beurteilung der Reaktion einer Zelle auf einen Reiz

2.7.1. Messung von Strömen

Durch den gleichzeitigen Start des Applikationsprogramms und des Aufzeichnungsprogramms konnten Veränderungen des gemessenen Stromes über der Zellmembran mit der Beginn der Applikation einer bestimmten Lösung in zeitlichen Zusammenhang gesetzt werden. Veränderungen <30pA wurden dabei als Rauschen oder unspezifische Fluktuation der Leitfähigkeit der Zellmembran betrachtet und flossen nicht in die Bewertung ein. Ebenso wurden visuell identifizierte Artefakte aus der Bewertung ausgeschlossen.

Die Amplitude eines Stromes wurde bestimmt, indem von dem Wert an dem betrachteten Zeitpunkt t_x der Wert am Zeitpunkt des Beginns des Stromes t_0 subtrahiert wurde.

2.7.2. Beurteilung der Ströme

An den Strömen mit denen die Neurone auf Reize reagierten konnten zwei in ihrer Kinetik verschiedene Komponenten unterschieden werden. Die Amplitude der Ströme bzw. dieser Komponenten wurden jeweils an ihrem Maximum beurteilt.

2.7.2.1. Spitzenamplituden

Unabhängig von transienten und anhaltenden Komponenten wurde die Spitzenamplitude des gesamten Stromes bestimmt.

2.7.2.2. Anhaltende Komponenten

Bei fast allen Strömen konnte eine anhaltende, sich im Zeitverlauf nicht oder nur gering abschwächende Komponente nachgewiesen werden. Diese endete erst mit Ende des Reizes.

2.7.2.3. Transiente Komponenten

Bei einigen Strömen konnten zusätzlich zu der anhaltenden Komponente eine schnelle, am Beginn des Stromes auftretende Komponente nachgewiesen werden, die die anhaltende Komponente überlagerte. Diese transienten Komponenten waren kürzer als die Reizdauer, hatten ihr Maximum in der Regel in der ersten Sekunde und waren nach fünf Sekunden bereits weitgehend inaktiviert.

Inwieweit sich diese Überlagerung additiv auf die Größe der Amplitude der transienten Komponente auswirkte, konnte nicht beurteilt werden. Durch den langsameren Anstieg der anhaltenden Komponenten und der dadurch noch geringen Überlagerung am Maximum der transienten Komponente, wurde dieses Problem als vernachlässigbar erachtet.

3. Ergebnisse

In dieser Studie wurden elektrophysiologische Eigenschaften von kleinen bis mittelgroßen Spinalganglienneuronen aus Mäusen untersucht. Mittels der Patch-clamp-Technik wurde die Reaktion der isolierten Neurone auf den Reiz, den eine Veränderung der extrazellulären Protonenkonzentration darstellt, sowie die Beeinflussung dieser durch Amilorid und natriumfreies extrazelluläres Milieu getestet.

Es wurde das Verhalten von Zellen aus Wildtyp-Mäusen des Stammes C57/B6 mit dem von zwei verschiedenen, transgenen Mäuse-Typen, TRPV1-defizienten (TRPV1 *-/-*, TRPV1-KO-) Mäusen und ASIC3-defizienten (ASIC3 *-/-*, ASIC3-KO-) Mäusen des gleichen Stammes verglichen. Zudem wurde untersucht, ob es dabei Unterschiede zwischen der IB4-positiven und der IB4-negativen Population dieser Neurone gibt.

3.1. Eigenschaften der Neurone

In die Auswertung der Experimente wurden insgesamt 236 protonensensible Neurone einbezogen. Der mittlere Durchmesser der Zellen betrug $22,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (Wildtypneurone $22,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$, $n=103$; TRPV1-KO-Neurone $22,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=88$; ASIC3-KO-Neurone $24,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=45$). Die Expression von TRPV1 kann durch die Vanilloidsensibilität bestimmt werden (Caterina et al. 2000) und wurde hier durch Reizung mit Capsaicin getestet. Die Reaktion von capsaicinempfindlichen und – unempfindlichen Zellen zeigt die Abbildung 6. Von 103 Wildtyp-Neuronen waren 36% ($n=37$) capsaicinempfindlich, exprimierten also TRPV1. Bezüglich der durchschnittlichen Größe zeigten die capsaicinempfindlichen Neurone ($22,5 \pm 0,6 \mu\text{m}$, $n=37$) gegenüber den capsaicinunempfindlichen ($22,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=64$) ähnliche Werte. Die Auswertung der Färbung mit IB4 zeigte 41 % ($n=42$) IB4-positive Zellen.

Von den 88 aus TRPV1-KO-Mäusen stammenden Neuronen reagierte keine auf Capsaicin, 50 % ($n=44$) der Zellen wurden als IB4-positiv identifiziert.

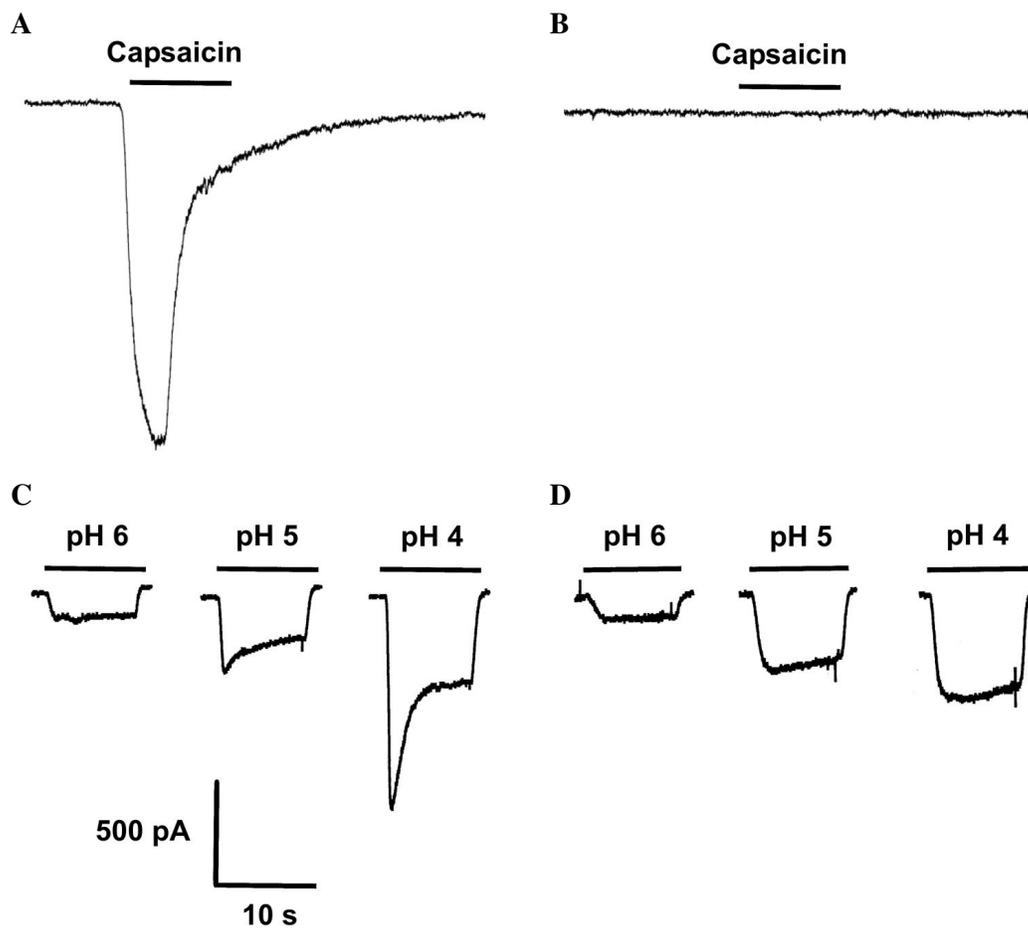


Abb. 6 *Repräsentative Ableitungen von Spinalganglienneuronen*

A. Reaktion einer Capsaicin empfindliche Zelle auf Capsaicin B. Reaktion einer Capsaicin unempfindlichen Zelle auf Capsaicin C. pH-Antworten einer Zelle mit transienter Komponente D. pH-Antworten einer Zelle mit anhaltender Komponente

Von 45 untersuchten ASIC3-KO-Neuronen reagierten 7% (n=3) auf Capsaicin. Die geringe Anzahl der capsaicinempfindlichen Neurone in den Ableitungen ist unerwartet und deutet auf einen Bias hin. 22% (n=10) der ASIC3-KO-Neurone waren IB4-positiv.

3.2. Protonen-induzierte Ströme steigen mit bei sinkendem pH

Die protoneninduzierten Ströme von nozizeptiven Spinalganglienneuronen zeigen unterschiedliche Komponenten, die in dieser Arbeit differenziert betrachtet werden sollen. Die Abbildung 6 zeigt repräsentative Ableitungen von Neuronen, die transiente bzw. anhaltende Komponenten aufweisen. Die Spitzenamplitude eines Stromes stellt eine Möglichkeit dar, die Reaktion eines Neurons unabhängig von diesen Komponenten zu betrachten und repräsentiert somit die Gesamtreaktion der Zelle. Um die Reaktion der Spinalganglienneurone auf unterschiedliche Protonenkonzentration des umgebenden Milieus zu untersuchen, wurden die Neurone mit Lösungen der drei verschiedenen pH-Werte, pH 6,0, pH 5,0 und pH 4,0 gespült.

3.2.1. Mittlere Spitzenamplituden

Es zeigte sich, dass die mittleren Spitzenamplituden (Abb. 7A) der pH-induzierten Ströme in Neuronen von Wildtyp-Mäusen signifikant größer wurden, je niedriger der pH-Wert der applizierten Lösung war. Damit stellt sich eine Abhängigkeit der Reaktion von nozizeptiven Neuronen von der Stärke des pH-Stimulus dar, die protonensensible Kanäle auch in heterologen Systemen zeigen (Waldmann et al. 1997a; Caterina et al. 2000). In der Gesamtpopulation betrug die mittlere Spitzenamplitude pH 6 131 ± 36 pA (n=28), bei pH 5 549 ± 78 pA (n=84) und bei pH 4 783 ± 109 pA (n=79) (Anova, $F_{2,189}=7,3$; $p<0,001$). In der capsaicinempfindlichen Population erreichten diese bei pH 6 171 ± 100 pA (n=10), bei pH 5 1024 ± 171 pA (n=32), bei pH 4 1176 ± 242 pA (n=29) (Anova $F_{2,69}=3,5$; $p<0,05$) und in den capsaicinunempfindlichen Neuronen bei pH 6 110 ± 23 pA (n=16), bei pH 5 241 ± 31 pA (n=50) und bei pH 4 543 ± 90 pA (n=48) (Anova, $F_{2,112}=9,0$; $p<0,001$). Hier zeigt sich, dass die Spitzenamplituden der capsaicinempfindlichen Zellen bei pH 5 (ungepaarter t-test, $p<0,001$) und pH 4 (ungepaarter t-test, $p<0,01$) signifikant größer sind als die der capsaicinunempfindlichen Zellen (Abb. 7B).

Dieses zeigt sich auch in den Neuronen der TRPV1-KO-Mäuse, die bei pH 6 Spitzenamplituden von 116 ± 25 pA (n=44), bei pH 5 von 179 ± 16 pA (n=87) und bei pH 4 von 370 ± 31 pA (n=52) zeigen (Anova, $F_{2,181}=29,8$; $p<0,001$) (Abb. 7C). Vergleicht man diese Ströme mit denen der Wildtyp-Neurone, so zeigt sich, dass die Amplituden gegenüber der Gesamtpopulation bei pH 5 (ungepaarter t-test, $p<0,001$) und pH 4 (ungepaarter t-test, $p<0,01$) signifikant reduziert sind. Gegenüber der capsaicinempfindlichen Population zeigte sich ein ähnliches Bild, auch hier waren die Amplituden der VR1-KO-Neurone bei pH 5 und pH 4 signifikant kleiner (jeweils ungepaarter t-test, $p<0,001$). Anders verhielt es sich allerdings im Vergleich mit den capsaicinunempfindlichen Wildtyp-Neuronen, wo bei keinem der drei verschiedenen pH-Werte das geforderte Signifikanzniveau erreicht wurde (jeweils ungepaarter t-test, $p>0,05$). Diese Reduktion der Reaktion auf pH-Reize zeigt, dass TRPV1 ein wesentlicher, wenn auch nicht der einzige Rezeptor für die Wahrnehmung dieser Stimuli ist (Abb. 7D).

Solch eine Bedeutung für die Rezeption von pH-Reizen kann für den ASIC3-Rezeptor nicht gezeigt werden. Ebenso wie bei den oben beschriebenen Populationen werden auch bei capsaicinunempfindlichen Neuronen von ASIC3-KO-Mäusen die Spitzenamplituden signifikant größer, je niedriger der pH der umgebenden Lösung ist (Anova, $F_{2,92}=15,9$; $p<0,001$) (Abb. 7C). Bei pH 6 erreichten diese 91 ± 28 pA (n=19), bei pH 5 188 ± 18 pA (n=35) und bei pH 4 481 ± 68 pA (n=38). Gegenüber der capsaicinunempfindlichen Population der Wildtyp-Neurone sind diese Werte jedoch nicht signifikant verschieden (jeweils ungepaarter t-Test, $p>0,05$) (Abb. 7D). Der Anstieg in den capsaicinempfindlichen Zellen der ASIC3-KO-Neurone von 52 ± 7 pA (n=2) bei pH 6 auf 156 ± 39 pA (n=3) bei pH 5 und 347 ± 161 pA (n=3) war nicht signifikant (Anova, $F_{2,6}=2,6$; $p>0,05$), hierbei ist jedoch die geringe Anzahl der auf Capsaicin reagierenden Neurone zu beachten.

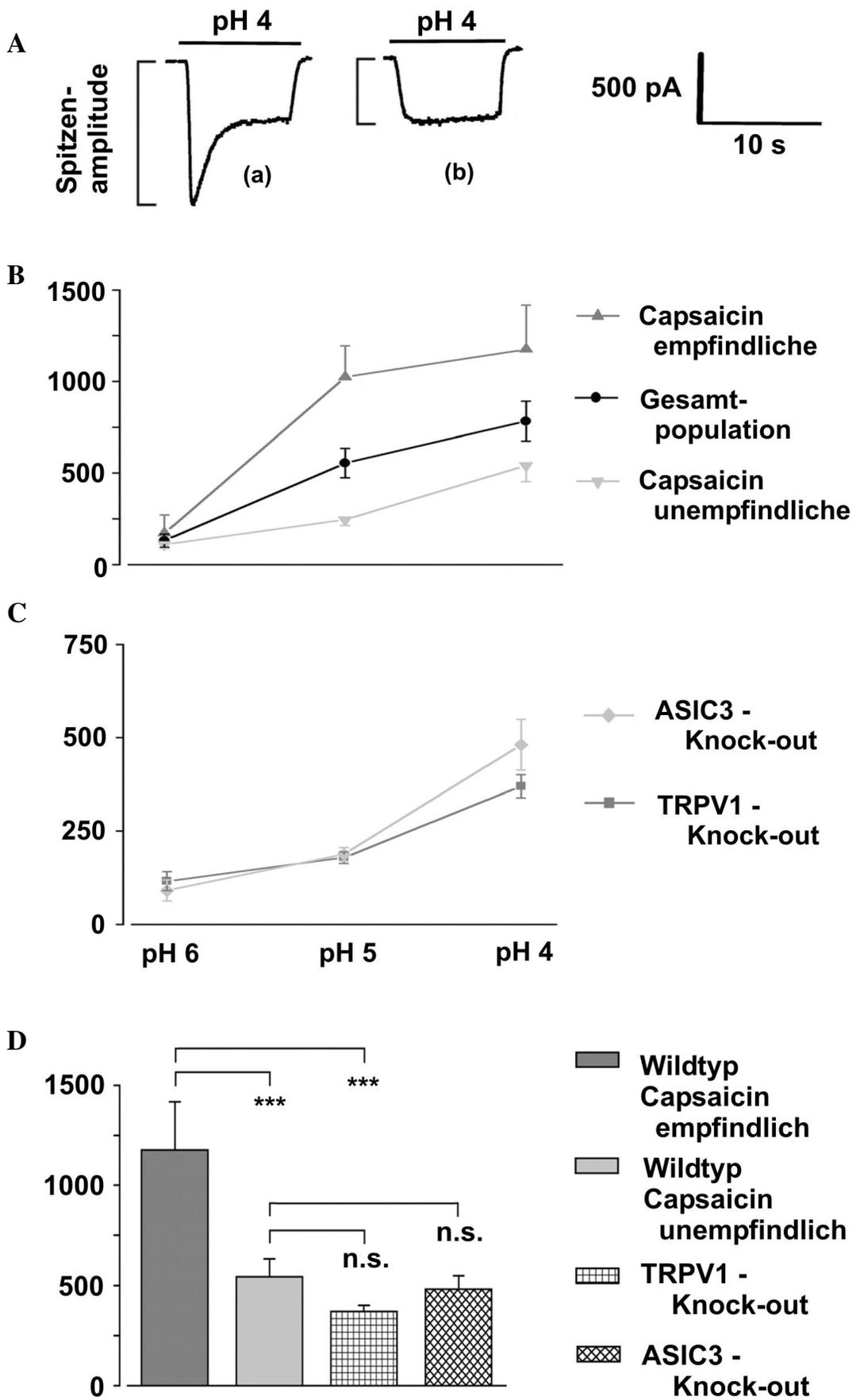


Abb. 7 Mittlere Spitzenamplituden der pH-Antworten verschiedener Populationen

A. Schematische Darstellung der Amplitude bei Zellen, die eine transiente und eine anhaltende (a) oder nur eine anhaltende Komponente (b) aufweisen. **B.** Die mittleren Spitzenamplituden der pH-Antworten der Wildtyp-Neurone und ihrer Capsaicin-sensitiven und -insensitiven Subpopulation steigen mit niedrigerem pH-Wert. **C.** Auch Die mittleren Spitzenamplituden der pH-Antworten der TRPV1-KO-Neurone und der ASIC3-KO-Neurone steigen mit niedrigerem pH-Wert. **D.** Vergleich der Capsaicin-empfindlichen und unempfindlichen Wildtyp-Neurone mit den TRPV1-KO- und den ASIC3-KO-Neuronen. Während die Capsaicin-sensitiven Wildtyp-Neurone signifikant größere Amplituden zeigen als die Capsaicin-insensitiven und die TRPV1-KO-Neurone, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Capsaicin-insensitiven Wildtyp-Neuronen und TRPV1-KO- oder ASIC3-KO-Neuronen.

3.2.2. Anhaltende Komponenten

Wie bereits beschrieben traten in pH-induzierten Strömen unterschiedliche Komponenten auf. Anhaltende Komponenten konnten in fast jedem der aufgezeichneten Ströme registriert werden und waren so häufiger als die von ihnen zu unterscheidenden transienten Komponenten. Sie begannen mit Beginn der Reaktion auf den Reiz, erreichten ihr Maximum in der Regel in den ersten Sekunden des Stromes und hielten sich danach auf einem konstanten Niveau, bevor sie erst mit Beendigung der Reizapplikation endeten (Abb. 8A). Auch ihre Amplitude wurde durch den pH der als Reiz wirkenden Lösung beeinflusst.

Die Abbildungen 8B und 8C zeigen den Anstieg der Amplituden der anhaltenden Komponenten bei abfallendem pH in den Neuronen der Wildtyp und der zwei Knock-Out-Mäuse. Hier lässt sich ein ähnliches Bild wie bei den Spitzenamplituden erkennen.

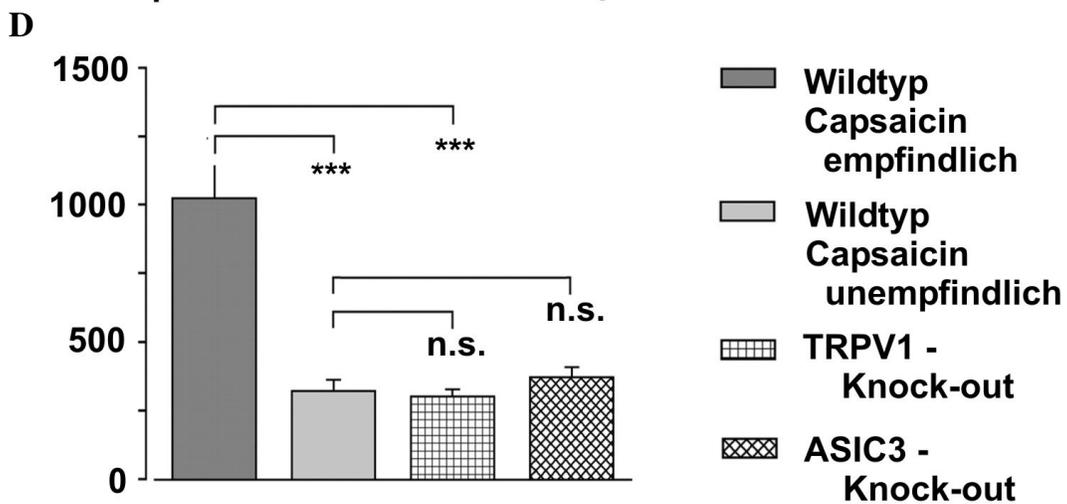
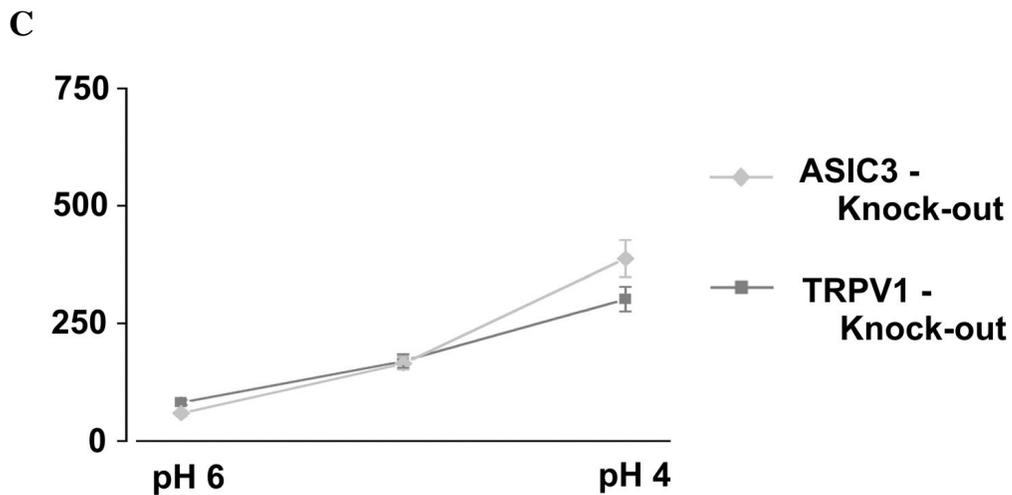
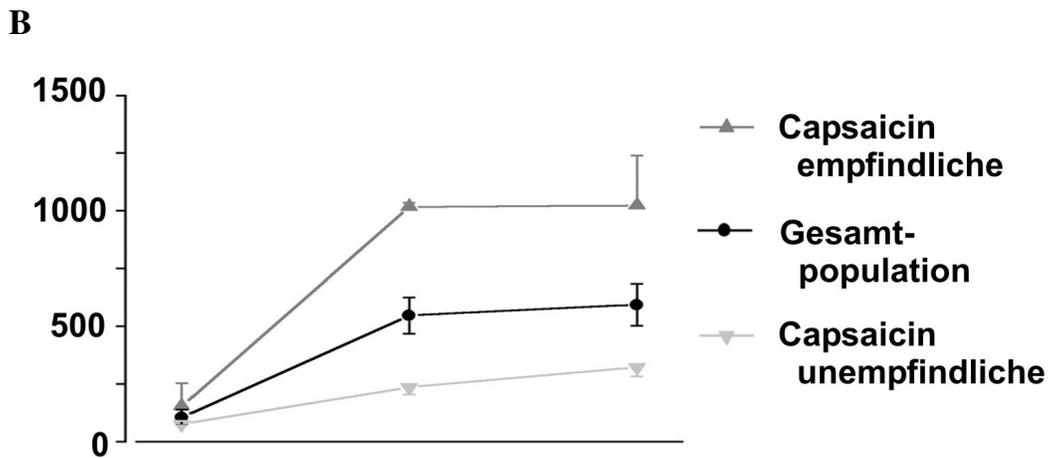
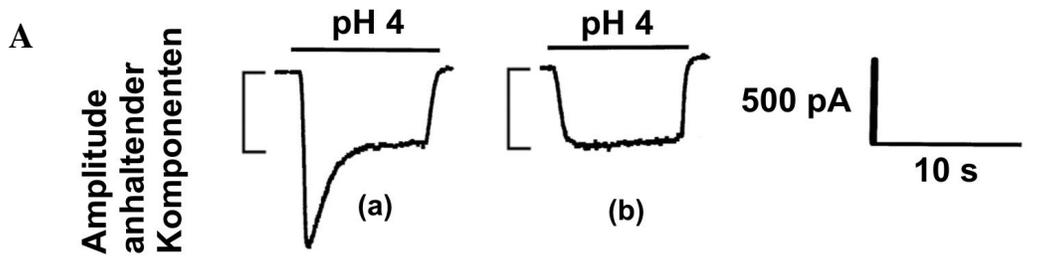


Abb. 8 Amplituden der anhaltenden Komponenten der pH-Antworten verschiedener Populationen

A. Schematische Darstellung der anhaltenden Amplitude bei Zellen, die eine transiente und eine anhaltende (a) oder nur eine anhaltende Komponente (b) aufweisen. **B.** Die mittleren anhaltenden Amplituden der pH-Antworten der Wildtyp-Neurone und ihrer Capsaicin empfindlichen und unempfindlichen Subpopulation steigen mit niedrigerem pH-Wert und zeigen ein ähnliches Bild wie die Spitzenamplituden. **C.** Die mittleren anhaltenden Amplituden der pH-Antworten der TRPV1-KO-Neurone und der ASIC3-KO-Neurone steigen mit niedrigerem pH-Wert. **D.** Während die Capsaicin empfindlichen Wildtyp-Neurone signifikant größere Amplituden der anhaltenden Komponenten zeigen als die Capsaicin unempfindlichen und die TRPV1-KO-Neurone, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Capsaicin unempfindlichen Wildtyp-Neuronen und TRPV1-KO- oder ASIC3-KO-Neuronen.

Die anhaltenden Komponenten sowohl der Gesamtpopulation (Anova, $F_{2,188}=5,2$; $p<0,01$) und der capsaicinempfindlichen (Anova, $F_{2,69}=3,3$; $p<0,01$) und – unempfindlichen (Anova, $F_{2,111}=6,9$; $p<0,01$) Subpopulation der Wildtyp-Neurone, als auch der TRPV1-KO- (Anova, $F_{2,177}=31,1$; $p<0,001$) und der capsaicinunempfindlichen ASIC3-KO-Neurone (Anova, $F_{2,90}=31,4$; $p<0,001$) steigen mit abnehmendem pH signifikant an und erreichen ihre Maxima bei pH 4. Die der capsaicinempfindlichen Population der Wildtyp-Neurone sind dabei bei pH 5 und pH 4 signifikant größer als die der capsaicinunempfindlichen und der TRPV1-KO-Neurone (jeweils ungepaarter t-Test, $p<0,001$). Die Unterschiede der Amplituden der anhaltenden Komponenten der TRPV1-KO-Neurone sowie die der capsaicinunempfindlichen ASIC3-KO-Neurone gegenüber den capsaicinunempfindlichen Neuronen der Wildtyp-Mäuse erreichen hingegen nicht das geforderte Signifikanzniveau (jeweils ungepaarter t-Test, $p>0,05$) (Abb. 8D). TRPV1 ist also in nativen nozizeptiven Neuronen für große anhaltende Komponenten protoneninduzierter Ströme verantwortlich, die dieser Rezeptor auch zeigt, wenn er im heterologen System exprimiert wird. Anders ist die Situation bei ASIC3. Dieser reagiert zwar im heterologen System ebenfalls mit anhaltenden Komponenten auf saure pH-Stimuli (Waldmann et al. 1997a), hier kann jedoch keine Beeinflussung dieser Komponenten in nativen Neuronen nachgewiesen werden.

3.2.3. Transiente Komponenten

Transiente Komponenten unterscheiden sich von den anhaltenden Komponenten durch ihre schnellere Kinetik des Einwärtsstromes. Sie halten kein Plateau aufrecht und sind bereits vor dem Ende der Reizapplikation weitgehend inaktiviert (Abb. 9A). Sie treten im Gegensatz zu den anhaltenden Komponenten nur in einem Teil der Neurone auf.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Amplituden der transienten Komponenten ebenfalls mit Abnahme des pH-Wertes des Protonenreizes in den Wildtyp-, den TRPV1-KO- und den ASIC3-KO-Neuronen zunehmen, jedoch ist diese Steigerung nicht signifikant (Abb. 9B). Dieses mag auch durch das seltene Auftreten und die dadurch geringe Anzahl dieser Komponenten, insbesondere bei den weniger sauren pH-Reizen pH 6 und pH 5, zu erklären sein. Auch der Vergleich der Amplituden zwischen Wildtyp- und TRPV1-KO- und ASIC3-KO-Population zeigt bei pH 4 keine signifikanten Unterschiede (jeweils ungepaarter t-Test, $p > 0,1$). Somit können hier weder für TRPV1 noch für ASIC3 ein wesentlicher Einfluss auf die Amplituden dieser Komponenten nachgewiesen werden.

Die Amplituden der transienten Komponenten in Wildtyp-Neuronen betragen bei pH 6 211 ± 70 pA (n=5), bei pH 5 254 ± 90 pA (n=10) und bei pH 4 711 ± 177 pA (n=32) (Anova $p > 0,1$; $F=1,627$). In der VR1-KO-Population erreichten diese bei pH 6 567 ± 320 pA (n=3), bei pH 5 271 ± 61 pA (n=6) und bei pH 4 427 ± 57 pA (n=22) (Anova $p > 0,1$; $F=1,438$). In den ASIC3-KO-Neuronen nahm die Amplitude von 234 ± 208 pA (n=3) bei pH 6 und 253 ± 66 pA (n=7) bei pH 5 auf 802 ± 226 pA (n=9) bei pH 4 zu (Anova, $p > 0,05$; $F=3,241$).

3.3. Prävalenz von transienten Komponenten ist pH-abhängig

Neben der ansteigenden Amplitude zeigte sich bei Absenkung des pH des Reizes, dass die Anzahl der Zellen, die mit einer transienten Komponente diesen Reiz beantwortete, mit abnehmendem pH zu nimmt. Dies zeigte sich sowohl in den Wildtyp-Neuronen, als auch in TRPV1-KO- und ASIC3-KO-Neuronen. In Wildtyp-Neuronen stieg die Prävalenz von 18% (5/28) bei pH 6 und 12% (10/84) bei pH 5 auf 41% (32/79) bei pH 4, in VR1-KO-Neuronen entsprechend von 7% (3/44) und 7% (6/87) auf 42 % (22/52) und in ASIC3-KO-Neuronen von 13% (3/23) über 18% (7/40) auf 21% (9/43). Dies verdeutlicht die Abhängigkeit der transienten Komponenten von niedrigen pH-Werten. (Abb. 9C)

Weiterhin zeigt sich, dass die Prävalenz dieser Komponenten sich auch in verschiedenen Populationen von Spinalganglien-neuronen unterscheidet. Auffällig ist die Reduktion in den ASIC3-defizienten Neuronen, von denen bei einem pH 4 – Reiz nur 21% mit einer transienten Komponente reagieren gegenüber 41% in der Wildtyp-Population (χ^2 -Test, $p < 0,05$). Die TRPV1-KO-Neurone zeigten hingegen mit einer Quote von 42% transientser Komponenten ähnlich viele wie die der Wildtypen (χ^2 -Test, $p > 0,1$). Auch innerhalb der Populationen von Wildtyp-Neuronen zeigen sich Unterschiede in der Ausprägung dieser Komponenten. Während in der capsaicinunempfindlichen Population 56 % ($n = 27/58$) der Zellen mit einer solchen auf einen pH 4 – Reiz antworteten, taten dies in der capsaicinempfindlichen Population nur 17% ($n = 5/29$, (χ^2 -Test, $p < 0,001$) (Abb. 9D).

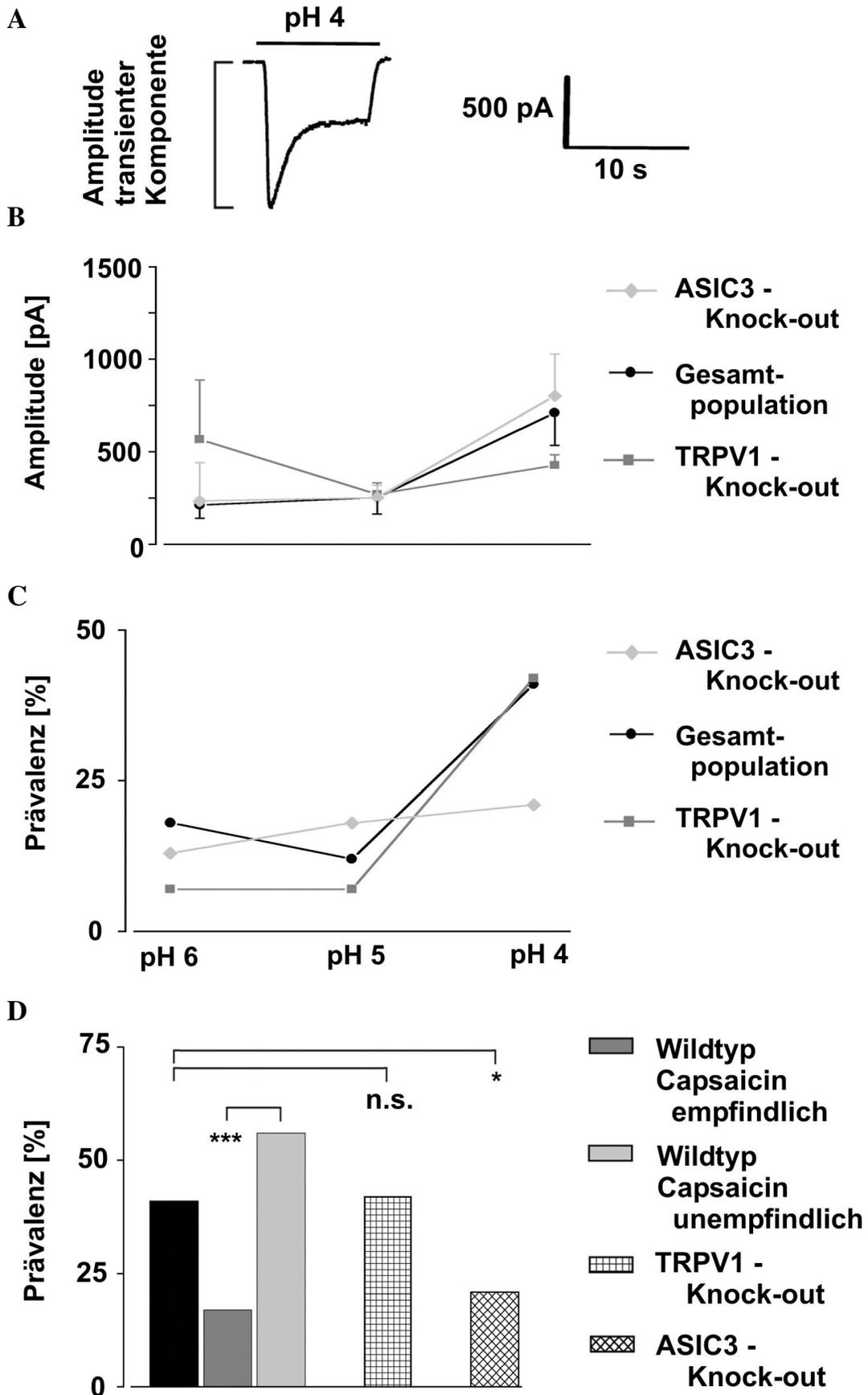


Abb. 9 **Amplituden und Prävalenzen der transienten Komponenten**

A. Ableitung eines Stromes mit transientser Komponente **B.** Die transienten Amplituden der pH-Antworten in Wildtyp-, TRPV1-KO- und ASIC3-KO-Neuronen steigen mit abnehmendem pH. **C.** Die Prävalenz von transienten Komponenten steigt mit abnehmendem pH. **D.** Die Prävalenz der transienten Komponenten bei pH 4 ist in der Capsaicin unempfindlichen Wildtyp-Population größer als in der Capsaicin empfindlichen. Die TRPV1-KO-Neurone zeigen keinen Unterschied gegenüber den Wildtyp-Neuronen, während die ASIC3-KO-Neurone eine verminderte Prävalenz zeigen.

3.4. Einfluss von Amilorid auf protoneninduzierte Ströme

Amilorid, das im klinischen Kontext als Diuretikum eingesetzt wird, ist in der Lage, verschiedene Natriumkanäle, auch solche aus der ASIC-Familie, zu blockieren (Price et al. 1996; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b). Da ASIC-Kanäle an protoneninduzierten Strömen in Spinalganglienneuronen beteiligt ist, soll in dieser Arbeit der Einfluss von Amilorid auf solche Ströme in nativen Spinalganglienneuronen untersucht werden. Dazu wurden während eines pH-Stimulus die Neurone gleichzeitig mit Amilorid gespült. Die maximale Amplitude dieser Reaktion wurde in Verhältnis zu einem Kontrollstrom der gleichen Zelle (100%) gesetzt, der ohne Zusatz von Amilorid registriert wurde. Da die größten Reaktionen bei Reizen von pH 4 auftraten, wurde die Beeinflussung durch Amilorid bei diesen beurteilt. Die transienten und anhaltenden Komponenten der Ströme wurden dabei getrennt beurteilt.

3.4.1. Anhaltende Komponenten werden nicht durch Amilorid beeinflusst

In der Gesamtpopulation der Wildtyp-Neurone zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Amplituden von anhaltenden Komponenten protoneninduzierter Ströme durch Amilorid (gepaarter t-Test, $p > 0,1$). Sie erreichten gegenüber den Kontrollen eine Größe von $107 \pm 7 \%$ ($n=26$). Auch in der capsaicinempfindlichen und der capsaicinunempfindlichen Population konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (jeweils gepaarter t-Test, $p > 0,1$). Die anhaltenden Komponenten erreichten unter diesem Einfluss Werte von $99 \pm 7 \%$ ($n=10$) in der

capsaicinempfindlichen und von 114 ± 12 % (n=14) in der capsaicinunempfindlichen Population.

Ebenso waren die anhaltenden Komponenten von TRPV1-KO-Neuronen unter Amilorideinfluss mit 97 ± 4 % (n=36), wie die der capsaicinunempfindlichen ASIC3-KO-Neurone die 97 ± 3 % (n=30) der Größe der Kontrolle erreichten, nicht signifikant verschieden (jeweils gepaarter t-Test, $p > 0,1$) (Abb. 10A).

3.4.2. Transiente Komponenten werden durch Amilorid reduziert

Anders als bei den anhaltenden Komponenten verhielt es sich bei den transienten Komponenten, die in der Gesamtpopulation der Wildtyp-Neurone und sowohl in den capsaicinempfindlichen als auch in den capsaicinunempfindlichen Zellen durch Amilorid signifikant reduziert wurden. In der Gesamtpopulation erreichten die Amplituden dieser nur eine Größe von 55 ± 6 % (n=13) gegenüber den unbeeinflussten Komponenten (gepaarter t-Test, $p < 0,001$). Die transienten Komponenten der capsaicinempfindlichen Population waren auf 75 ± 2 % (n=2) (gepaarter t-Test, $p < 0,05$) und die der capsaicinunempfindlichen Gruppe auf 51 ± 7 % (n=11) der Ausgangswerte reduziert (gepaarter t-Test, $p < 0,001$).

Auch in den TRPV1-KO-Neuronen zeigte sich eine signifikante Reduktion dieser Komponenten, die 71 ± 12 % (n=12) der Kontrollen erreichten (gepaarter t-Test, $p < 0,05$). Die transienten Komponenten der ASIC3-KO-Neurone waren mit 56 ± 10 % (n=8) sogar nur fast halb so groß, wie die ohne Einfluss des Pharmakons (gepaarter t-Test, $p < 0,01$) (Abb. 10B).

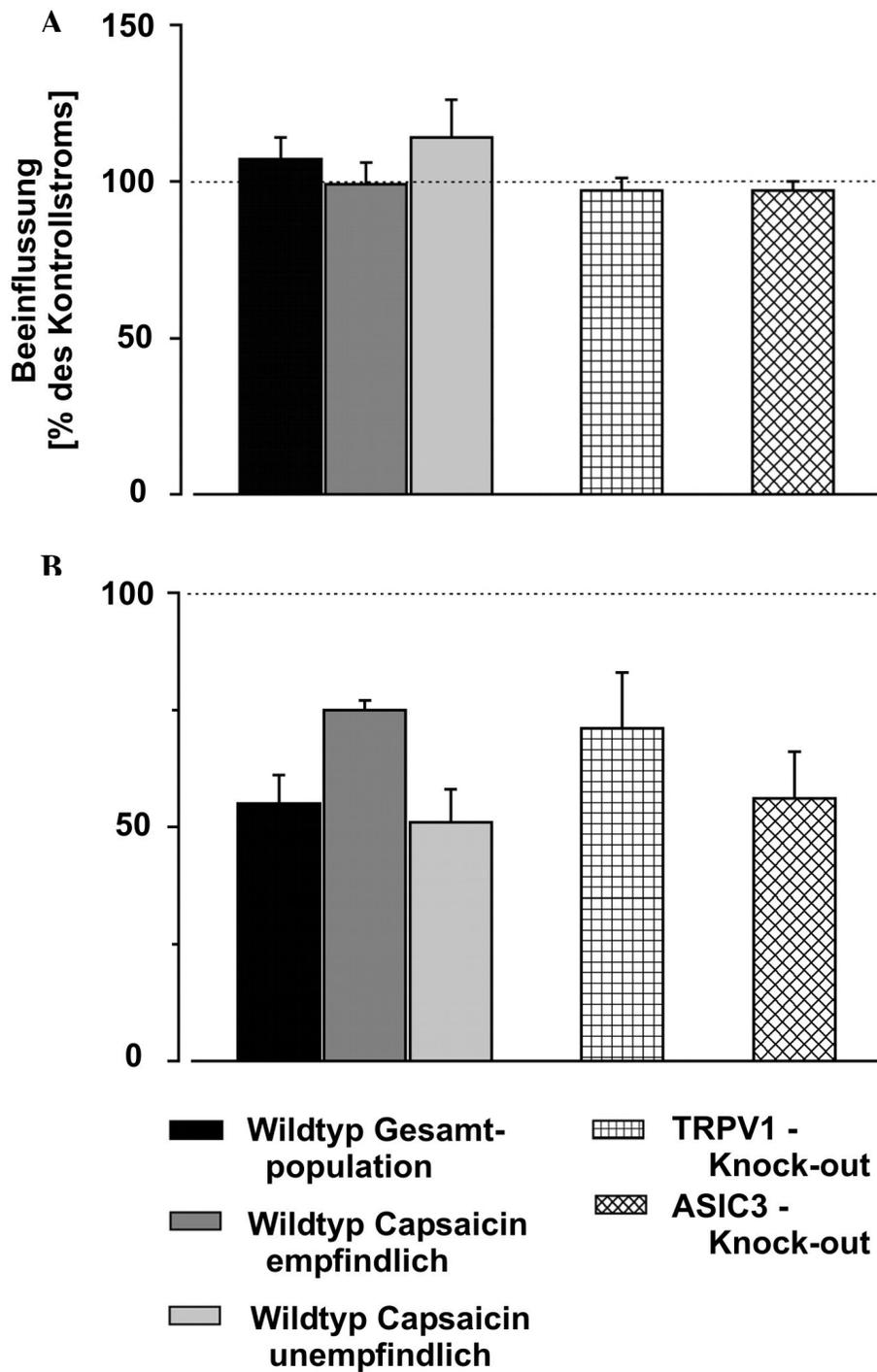


Abb. 10 *Beeinflussung der pH-Antworten durch Amiloride*

A. Die anhaltenden Komponenten werden durch Amilorid nicht blockiert B. Die transienten Komponenten werden durch Amilorid blockiert

3.5. Einfluss von natriumfreiem extrazellulärem Milieu auf protoneninduzierte Ströme

Natriumionen sind in vielen Fällen ein wichtiger Träger des depolarisierenden Einwärtstromes, der für die Erregung von Neuronen verantwortlich ist. Neben der Blockade von Natriumkanälen durch Pharmaka wie Amilorid, stellt die Elimination von Natriumionen aus dem extrazellulären Raum eine Möglichkeit dar, den Einfluss dieses Ions auf transmembranöse Ströme zu untersuchen.

Auch hier wurde die Veränderung der Zellreaktion bei pH 4 getestet und, entsprechend dem Vorgehen bei Beeinflussung durch Amilorid, die Amplitude des Stromes unter Einfluss des natriumfreien Milieus mit der der unbeeinflussten Kontrolle korreliert. Ebenso wurden wieder transiente und anhaltende Komponente getrennt beurteilt.

3.5.1. Beeinflussung der anhaltenden Komponenten

Die anhaltenden Komponenten der protoneninduzierten Ströme waren in der Gesamtpopulation der Wildtyp-Neurone durch natriumfreies extrazelluläres Milieu auf $84 \pm 7 \%$ (n=18) des Ausgangsniveaus geringfügig, jedoch signifikant verringert (gepaarter t-Test, $p < 0,05$). Auch in der capsaicinempfindlichen Population mit $83 \pm 14 \%$ (n=7), wie in der capsaicinunempfindlichen mit $86 \pm 9 \%$ (n=10) war tendenziell eine Verringerung dieser Komponenten auf ähnliche Werte auszumachen. Jedoch zeigten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz (jeweils gepaarter t-Test, $p > 0,1$).

Auf die anhaltenden Komponenten der TRPV1-KO-Neurone hatte das natriumfreie Milieu keinen signifikanten Einfluss (gepaarter t-Test, $p > 0,05$), sie betragen $102 \pm 6 \%$ (n=35) gegenüber den Amplituden der Kontrollen. Die capsaicinunempfindliche Population der ASIC3-KO-Neurone zeigte hingegen eine signifikante Reduktion auf $69 \pm 5 \%$ (n=29, gepaarter t-Test, $p < 0,001$). Hier scheinen also amiloridsensitive Kanäle an der Protonensensitivität beteiligt zu sein (Abb. 11A).

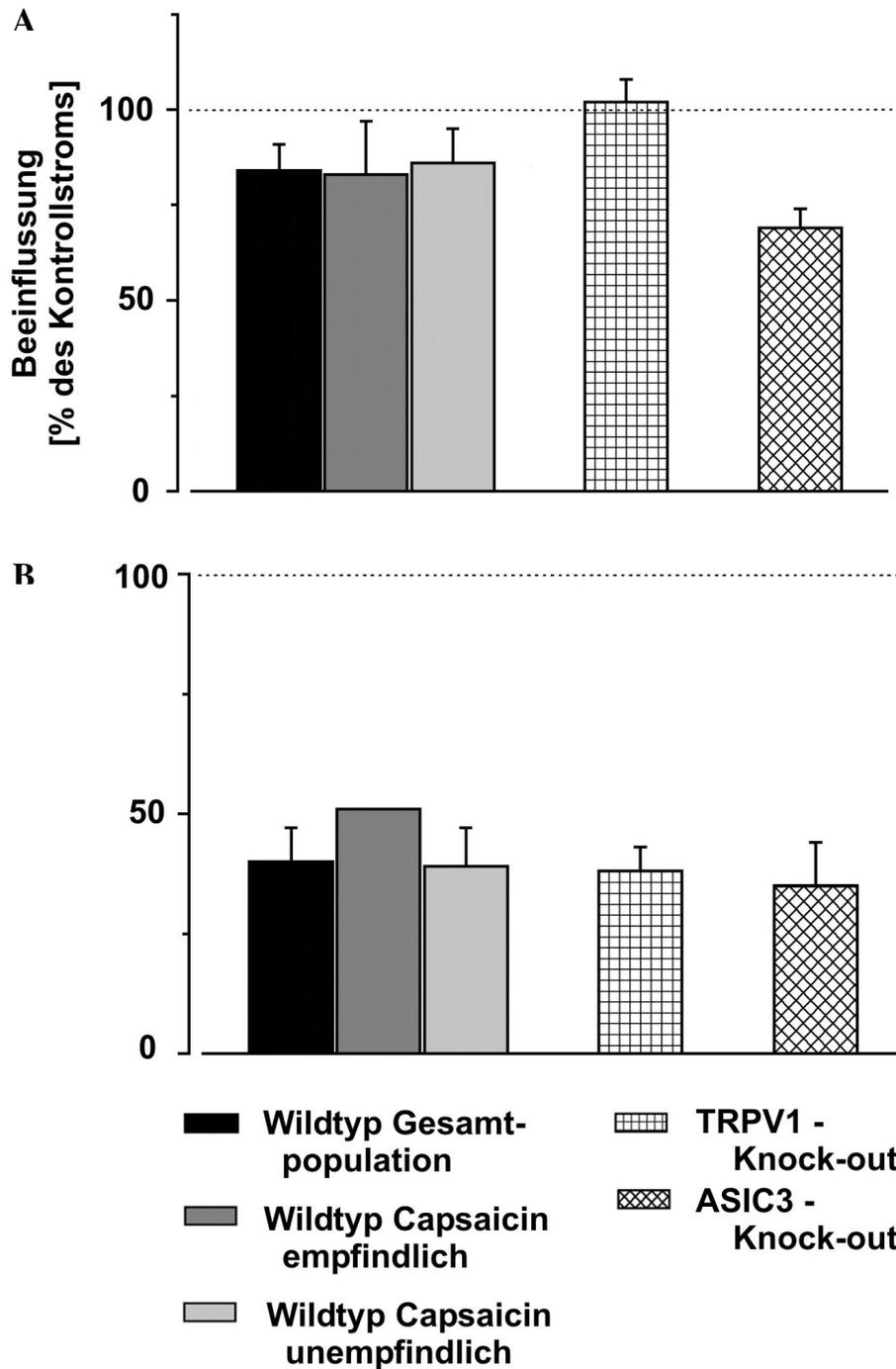


Abb. 11 *Beeinflussung der pH-Antworten durch natriumfreies Milieu*

A. Nur in den ASIC3-KO-Neuronen sind die anhaltenden Komponenten in natriumfreien extrazellulären Milieu deutlich reduziert. **B.** Die transienten Komponenten sind hingegen überall stark reduziert.

3.5.2. Beeinflussung der transienten Komponenten

Auf die transienten Komponenten der protoneninduzierten Ströme der Spinalganglienneurone zeigt das extrazelluläre Fehlen von Natrium einen deutlicheren Einfluss. Diese sind in allen Populationen deutlich reduziert.

In der Gesamtpopulation der Wildtyp-Neurone sinkt die mittlere Amplitude signifikant auf $40 \pm 7 \%$ (n=8) des Kontrollwertes (gepaarter t-Test, $p < 0,001$). In der capsaicinempfindlichen Population konnte nur eine Zelle mit einer transienten Komponente beurteilt werden die mit 51 % der Größe der Kontrolle deutlich reduziert war. Dieses zeigte sich auch in der capsaicinunempfindlichen Gruppe von Wildtyp-Neuronen, in der sich die Amplituden transientser Komponenten gegenüber dem Ausgangsniveau auf $39 \pm 8 \%$ (n=7) signifikant verringern (gepaarter t-Test, $p < 0,001$).

Auch in den TRPV1-KO-Neuronen sind die transienten Komponenten in natriumfreier Umgebung signifikant verkleinert, sie erreichen $38 \pm 5 \%$ (n=10) der Kontrollen (gepaarter t-Test, $p < 0,001$). In den ASIC3-KO-Neuronen erreichen diese Komponenten ebenfalls nur $35 \pm 9 \%$ (n=5) der Kontrollen (gepaarter t-Test, $p < 0,01$) (Abb. 11B).

Diese Werte zeigen, dass die transienten Komponenten von protoneninduzierten Strömen zu einem großen Teil von Natriumionen getragen werden und geben so einen Hinweis darauf, dass z.B. Kanäle der ASIC-Familie diesen zu Grunde liegen könnten.

3.6. Protoneninduzierte Ströme in IB₄-positiven und IB₄-negativen Neuronen

Isolektin B₄ wird auf der Zelloberfläche von nicht peptidergen Spinalganglienneuronen gebunden und kann so zur Identifikation dieser Neurone genutzt werden. Hier wurde untersucht, ob sich IB₄-positive Neurone in ihrer Antwort auf Protonenreize von IB₄-negativen unterscheiden.

3.6.1. Mittlere Spitzenamplituden der IB₄-positiven und IB₄-negativen Neurone

In den Neuronen der Wildtyp-Population kann weder in der Gesamtpopulation, noch in der capsaicinempfindlichen bzw. der capsaicinunempfindlichen Population ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Spitzenamplituden der IB₄-positiven

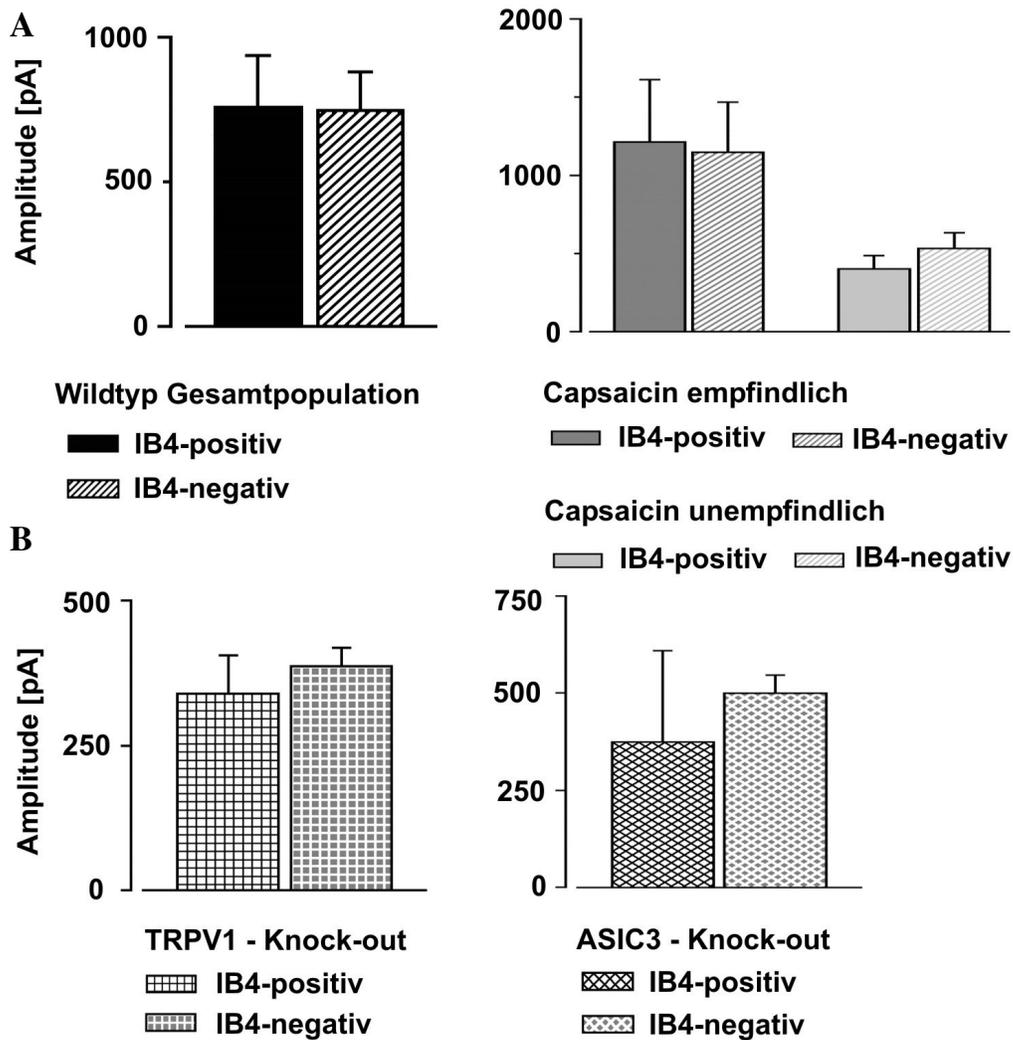


Abb. 12 *H⁺-induzierte Ströme in IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen*
A. Die Amplituden von IB4-positiven und IB4-negativen Wildtyp Neurone unterscheiden sich in der Gesamtpopulation bei pH 4 nicht. **B.** Die Amplituden von IB4-negativen und IB4-positiven Neuronen unterscheiden sich in der Capsaicin empfindlichen und

und der IB₄-negativen Zellen festgestellt werden (jeweils ungepaarter t-Test, $p > 0,1$) (Abb. 12A). In der Gesamtpopulation erreichen die Amplituden der IB₄-positiven Neurone bei pH 4 758 ± 179 pA (n=32) gegenüber 747 ± 132 pA (n=46) in der IB₄-negativen Population. In der capsaicinempfindlichen Population zeigen die IB₄-positiven Neurone Ströme von 1211 ± 401 pA (n=13), die IB₄-negativen Neurone solche von 1148 ± 319 pA (n=16). In der capsaicinunempfindlichen Population erreichen die Amplituden der IB₄-positiven Neurone 402 ± 84 pA (n=17), während die der IB₄-negativen Zellen 533 ± 100 pA (n=30) bei pH 4 erreichen.

Auch in den TRPV1-KO-Neuronen findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Amplituden protoneninduzierter Ströme der IB₄-positiven und der IB₄-negativen Population (jeweils ungepaarter t-Test, $p > 0,05$). Sie erreichen in der IB₄-positiven 340 ± 66 pA (n=19) gegenüber 387 ± 32 pA (n=33) bei pH 4 in der IB₄-negativen Population. Ebenso zeigen die ASIC3-KO-Neuronen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Spitzenamplituden bei Reizen mit pH 4 zwischen der IB₄-positiven mit 376 ± 235 pA (n=10) und der IB₄-negativen Population mit 501 ± 47 pA (n=31) (ungepaarter t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 12B).

3.6.2. Prävalenz von transienten Komponenten

Betrachtet man allerdings die Prävalenz der transienten Komponenten, so zeigt sich, dass diese in den IB₄-negativen Neuronen der Wildtyp-Population mit 54 % (n=25) signifikant höher ist, als in der IB₄-positiven Population mit 19 % (n=6) (χ^2 -Test, $p < 0,01$) (Abb 13A).

In den ASIC3 defizienten Neuronen findet sich bei der kleinen Stichprobe kein signifikanter Unterschied (χ^2 -Test, $p > 0,1$). Hier zeigen 26 % (n=8) der IB₄-negativen Neurone transiente Komponenten gegenüber nur 10 % (n=10) der IB₄-positiven.

Die TRPV1-Knock-Out Neurone zeigen mit jeweils 42 % keinen Unterschied zwischen der IB₄-negativen (n=14) und der IB₄-positiven (n=8) Population (χ^2 -Test, $p > 0,05$) (Abb. 13B).

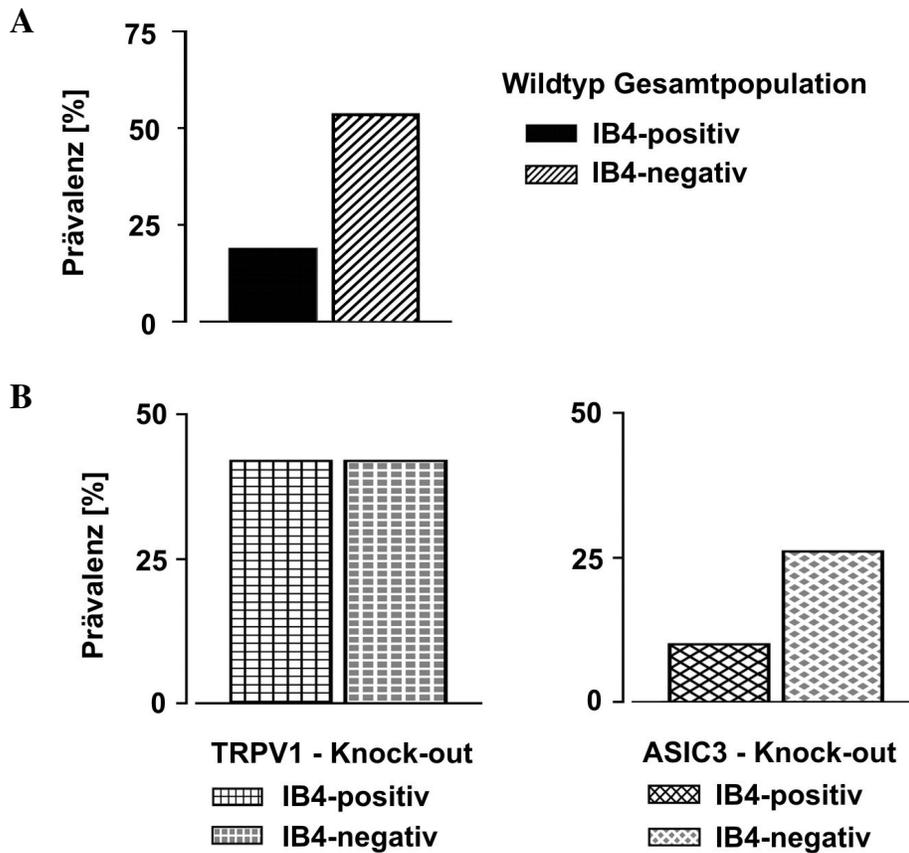


Abb. 13 *Transiente H^+ -induzierte Ströme in IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen*

A. Die IB4-negativen Wildtyp-Neurone zeigen eine höhere Prävalenz transienter Ströme als die IB4-positiven. B. Die Prävalenz transienter Komponenten in den TRPV1-Knock-out Neuronen ist in beiden Populationen nicht verschieden. Die unterschiedlichen Prävalenzen der transienten Komponenten von IB4-positiven und IB4-negativen ASIC3-KO Neuronen sind nicht signifikant verschieden.

4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Einfluss von TRPV1 und ASIC3 auf protoneninduzierte Ströme in Spinalganglienneuronen untersucht. Hierzu wurden Neurone von Wildtyp-Mäusen sowie von TRPV1-defizienten Mäusen und ASIC3-defizienten Mäusen elektrophysiologisch getestet. Durch Testung der Capsaicinsensibilität konnten TRPV1-exprimierenden Neurone identifiziert werden, durch eine Vitalfärbung mit dem Isolektin B4 konnte zusätzlich die IB4-positive von der IB4-negativen Population unterschieden werden. Für die Experimente wurden kleine bis mittelgroße Spinalganglienneurone, die mutmaßlich überwiegend polymodale Nozizeptoren sind, ausgewählt und nur solche Neurone betrachtet, die auf saure Lösungen reagierten.

Die Erforschung des nozizeptiven Systems hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, insbesondere mit der Entdeckung von zellulären Transduktionsmechanismen von nozizeptiven Reizen (Caterina und Julius 1999; McCleskey und Gold 1999). TRPV1 ist hier ein Rezeptor von besonderem Interesse, denn er ist bereits auf molekularer Ebene in der Lage, schmerzhafte Reize verschiedener Modalitäten zu integrieren (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). Die Suche nach vanilloidempfindlichen – dem „Capsaicin-Rezeptor – führte zu seiner Entdeckung, doch TRPV1 spricht auf eine Vielzahl weiterer chemischer Substanzen an (Julius und Basbaum 2001). Schon früh konnte bei Ableitungen von Nozizeptoren die Überlappung von Capsaicinsensibilität mit Protonen- und Hitzesensitivität gezeigt werden, und so überraschte es nicht, dass TRPV1 auch auf diese Reize reagiert. Protonen werden auch durch Ionenkanäle der ASIC-Familie detektiert. Da diese ebenfalls von nozizeptiven Neuronen exprämiert werden, sind auch sie potenziell an Nozizeption beteiligt (Kress und Zeilhofer 1999; Reeh und Kress 2001). Zudem konnte ihnen eine Rolle in der Wahrnehmung von nicht schmerzhaften mechanischen Reizen zugeschrieben werden (Price et al. 2001; Chen et al. 2002).

4.1. Capsaicinsensibilität

Von den Wildtyp-Neuronen waren 37% capsaicinempfindlich, was die in vorherigen Studien gefundenen Proportionen widerspiegelt (Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Auch die gänzlich fehlende Capsaicinsensibilität in den TRPV1-KO-Neuronen entspricht früheren Publikationen.

Anders stellt sich die Situation bei den ASIC3-KO-Neuronen dar. Hier fanden sich in dieser Studie nur 7% capsaicinempfindliche Neurone, deutlich weniger als erwartet. Ein Einfluss von ASIC3 auf TRPV1 ist bisher nicht bekannt und andere Studien zeigen keinen Einfluss von ASIC3 auf die Reaktion von Spinalganglienneuronen (Price et al. 2001) oder veränderte Reaktionen von ASIC3-KO-Mäusen auf Capsaicin (Chen et al. 2002). Technische Fehlerquellen, wie Unwirksamkeit oder fehlerhafte Applikation der Lösung, konnten im Zuge der Experimente ausgeschlossen werden. Die Ursache dieser geringen Capsaicinsensibilität ist, mangels anderer Erklärungen, wahrscheinlich auf die zufällige Auswahl eines besonders großen Anteils capsaicinunempfindlicher Neurone zurückzuführen.

In Folge dieser Verteilung der Subpopulationen der ASIC3-KO-Neurone lassen sich nun die capsaicinempfindlichen Neurone aufgrund ihrer geringen Zahl und der deshalb fraglichen Repräsentativität, nur schlecht beurteilen. Die Diskussion beschränkt sich daher auf den Vergleich der capsaicinunempfindlichen Populationen.

4.2. Protonensensibilität

Die Reaktion von isolierten Spinalganglienneuronen auf Protonen ist nicht homogen, sondern weist verschiedene Komponenten auf, die sich im wesentlichen in ihrer Kinetik unterscheiden (Bevan und Geppetti 1994) aber, wie hier gezeigt wird, auch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften besitzen. Es werden anhaltende Komponenten beobachtet, die während eines Reizes nur langsam desensibilisieren, bzw. erst nach dessen Ende vollständig abklingen (Bevan und Yeats 1991) und schnelle transiente, die innerhalb von Sekunden rückläufig sind (Krishtal und Pidoplichko 1981a).

4.2.1. Anhaltende Komponenten

Dass Ansäuerung des Gewebes zu einem dauerhaften Schmerz führt, lässt eine entsprechend lange Erregung von Nozizeptoren annehmen. Die anhaltenden Komponenten sind wahrscheinlich in der Lage, zu einer dauernden Membrandepolarisation und so zu einer andauernden Produktion von Aktionspotentialen des Neurons zu führen (Bevan und Yeats 1991; Reeh und Steen 1996; Kress und Zeilhofer 1999). Man findet sie bei fast allen auf Protonen ansprechenden Nozizeptoren (Petruska et al. 2000; Petruska et al. 2002). Sie scheinen somit wesentliches Element der Transduktion von Protonenreizen zu sein.

In heterologen Systemen reagieren sowohl TRPV1 als auch verschiedene ASIC-Homo- und Heteromultimere mit einer anhaltenden Komponente auf Protonen (Caterina et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Babinski et al. 2000). Für TRPV1 konnte bereits eine wesentliche Rolle an der Protonensensibilität nachgewiesen werden (Caterina et al. 2000; Gunthorpe et al. 2000), doch auch ASICs sind deshalb attraktive Kandidaten hieran mitzuwirken. In dieser Untersuchung zeigten die anhaltenden Komponenten der Wildtyp-Neurone weder eine Beeinflussung durch Amilorid, noch eine Reduktion durch natriumfreie Lösung. Diese Eigenschaften lassen sich sowohl durch TRPV1 als auch durch verschiedene ASICs, darunter auch ASIC3 erklären, die ebenfalls jeweils amiloridunempfindliche, nicht natriumselektive anhaltende Komponenten zeigen (Kress und Zeilhofer 1999).

Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse ein Auftreten der anhaltenden Komponenten bereits bei pH 6. Die nur noch sehr geringe Zunahme bei pH-Werten saurer als pH 5 lässt darauf schließen, dass in diesem Bereich das Maximum erreicht wird. Dieses gibt einen Hinweis auf die wesentliche Beteiligung von TRPV1 an diesen anhaltenden Komponenten, der sein Halbmaximum bei pH 5,4 erreicht, während ASICs erst bei pH-Werten unter 5 mit einer anhaltenden Komponente reagieren (Caterina et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Babinski et al. 2000; Reeh und Kress 2001).

4.2.2. Transiente Komponenten

Die transienten Komponenten fanden wir in unseren Experimenten deutlich seltener als die anhaltenden Komponenten und vor allem in capsaicinunempfindlichen Neuronen, wo sie in gut der Hälfte der Neurone nachweisbar waren. Der Vergleich der Amplituden der transienten mit denen der anhaltenden Komponenten in dieser Subpopulation weist jedoch auf ihre Bedeutung für diese Neuronen hin, denn sie zeigen hier größere Amplituden als die anhaltenden Komponenten und auch eine andere pH-Abhängigkeit, die sie ihr Maximum erst bei pH 4 erreichen lässt. Dieses schlägt sich auch in den mittleren Spitzenamplituden dieser Neurone nieder, was die Relevanz der transienten Komponenten in diesen Zellen unterstützt.

Ihre funktionelle Bedeutung im Rahmen der Schmerzwahrnehmung ist jedoch noch unklar. Aufgrund ihrer schnellen Kinetik sind sie wahrscheinlich nicht in der Lage, längere Serien von Aktionspotentialen zu generieren und die bisher in Schmerz assoziierten Zuständen gemessenen pH-Werte liegen deutlich höher als der Bereich in dem diese Komponenten ihr Maximum erreichen (Reeh und Steen 1996; Kress und Zeilhofer 1999).

Sie werden häufig von mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen präsentiert (Petruska et al. 2002), die überwiegend nicht nozizeptiv sind, sondern z.B. der Mechanosensibilität dienen. Hier könnten sie im Rahmen von mechanischer Hyperalgesie, die durch Gewebsazidose ausgelöst werden kann, eine modulatorische Rolle spielen (Steen et al. 1992; Steen und Reeh 1993), aber die Beteiligung von ASIC-Kanälen an Mechanosensitivität (Price et al. 2000; Garcia-Anoveros et al. 2001; Price et al. 2001) gibt auch zu Vermutungen Anlass, dass Protonen nicht die einzigen funktionell bedeutsamen Liganden sind.

Die Expression von ASIC-Kanälen im ZNS gibt Hinweise auf die Bedeutung von Protonen (Reeh und Kress 2001). Hier ist auch eine Beteiligung an synaptischer Übertragung vorstellbar, wo durch die Ausschüttung saurer Aminosäuren lokal eventuell zur Aktivierung ausreichende pH-Werte erreicht werden. So könnten die transienten Komponenten Einfluss auf das postsynaptische Membranpotential und den Erregungszustand des Neurons nehmen.

4.3. TRPV1

In der vorliegenden Arbeit wird die pH-Abhängigkeit der Protonensensitivität genauer untersucht.

TRPV1 spielt eine herausragende Rolle für die Protonensensitivität von nozizeptiven Neuronen. Capsaicinunempfindliche Neurone zeigen kleinere protoneninduzierte Ströme und in TRPV1-defizienten Mäusen sind diese deutlich reduziert (Caterina et al. 1997; Caterina et al. 2000; Gunthorpe et al. 2000; Leffler et al. 2000).

Es kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieses durch nicht oder nur langsam desensibilisierende anhaltende Komponenten von depolarisierenden Einwärtsströmen verursacht wird, die die Hauptkomponenten der Ströme von nativen Spinalganglienneuronen darstellen und der durch TRPV1 produzierten Ströme entsprechen.

Aus dem Vergleich der capsaicinempfindlichen (TRPV1 exprämierenden) mit den (nicht TRPV1 exprämierenden) capsaicinunempfindlichen Neuronen von Wildtyp-Mäusen und denen von TRPV1-KO-Mäusen zeigt sich, dass TRPV1 verantwortlich ist für große anhaltende Komponenten von protoneninduzierten Strömen. Die in nicht TRPV1 exprämierenden Neuronen übrig bleibenden anhaltenden Komponenten erreichen gerade einmal ein Drittel der Amplitude von der der TRPV1 exprämierenden Zellen. Es findet in diesen Komponenten keine Reduktion durch Amilorid bzw. natriumfreie Lösung. Die durch TRPV1 produzierten Ströme sind ebenfalls nicht Amilorid sensibel und benutzen Kalzium als tragendes Ion (Caterina et al. 1997) und könnten diese Eigenschaften somit erklären.

Die Reduktion der Gesamtreaktion der Neurone in capsaicinunempfindlichen und TRPV1-Knock-Out Neuronen, gemessen an den Spitzenamplituden, wird wesentlich durch die Reduktion der anhaltenden Komponenten verursacht, was die Wichtigkeit dieser für die gesamte Protonensensitivität unterstreicht.

Auf die ebenfalls zu beobachtenden transienten Komponenten hat TRPV1 dagegen keinen Einfluss, wie die übereinstimmenden Amplituden und Prävalenz in Wildtyp und TRPV1-KO-Neuronen zeigt.

Die Expression von TRPV1 im heterologen System zeigte, dass seine Aktivierung einen Kationeneinstrom in die Zelle zur Folge hat, der zur Depolarisierung der Zellmembran führt. Dieser Mechanismus führt in Neuronen zur Generation von Aktionspotentialen,

solange der Ionenkanal geöffnet ist, also die Membrandepolarisierung anhält (Szallasi und Blumberg 1999). Die in unserer Arbeit nachgewiesenen von TRPV1 produzierten anhaltende Komponenten können so das Neuron über den gesamten Zeitraum, den der Reiz auf die Zelle einwirkt, erregen und so die Schmerzhaftigkeit dieser sauren Reize vermitteln. Protonen aktivieren TRPV1 durch Bindung an die extrazelluläre, den Kanalporus bildende Region des fünften Transmembransegmentes, wahrscheinlich an der Aminosäure 648. Mutationen an dieser Stelle verringert selektiv die Protonensensibilität (Jordt et al. 2000).

Eine Bindung von Protonen an die Aminosäure 600 hingegen vermittelt die Sensibilisierung anderer Reize wie Hitze oder Vanilloide (Jordt et al. 2000), die sich auch in nativen Spinalganglienneuronen *in vitro* und *in vivo* nachweisen lässt (Petersen und LaMotte 1993; Steen et al. 1995b; Kress et al. 1996; Steen et al. 1996). Während bei neutralen pH der Kanal erst bei Temperaturen über 45°C aktiviert, reduziert ein pH von 6,2 diese Schwelle auf die Körpertemperatur von 37°C (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). Dieses entspricht in etwa dem pH, bei dem die Schmerzschwelle von saurer Lösung in *in vivo* Experimenten erreicht wird (Lindahl 1962). TRPV1-defiziente Mäuse zeigen in Verhaltensexperimenten eine Reduktion, jedoch keine Aufhebung der Reaktion auf Protonen (Caterina et al. 2000; Gunthorpe et al. 2000), was den elektrophysiologischen Daten entspricht und auf die Bedeutung weiterer protonensensibler Ionenkanäle hinweist.

Die eindruckliche Bedeutung von TRPV1 für die Amplitude protoneninduzierter Ströme und die Übereinstimmung von pharmakologischen Eigenschaften von TRPV1 und klinischen Schmerzexperimenten (Steen und Reeh 1993; Steen et al. 1995a; Issberner et al. 1996) lässt die Schlussfolgerung zu, dass TRPV1 ein wesentlicher Rezeptor für protoneninduzierten Schmerz ist (Julius und Basbaum 2001).

Die Aktivierung oder Modulation von TRPV1 durch mehrere verschiedene extrazelluläre Reize, wie Protonen, Hitze, Vanilloide oder inflammatorische proalgetische Substanzen wie Bradykinin, zeigt zudem einen Mechanismus auf, wie ein einzelner Rezeptor schon auf peripherer Ebene die komplexen Vorgänge z.B. in entzündetem Gewebe zusammenzuführen vermag (Tominaga et al. 1998; Zygmunt et al. 1999; Hwang et al. 2000; Chuang et al. 2001).

Dieses führt zu der Vermutung, dass TRPV1 eine besondere Rolle bei solchen Schmerzzuständen spielt, in denen die Integration von diesen Reizen wichtig ist. Bei entzündlichen Vorgängen tritt eine Sensibilisierung von Nozizeptoren im Sinne einer thermischen und einer mechanischen Hyperalgesie auf, wofür Entzündungsmediatoren verantwortlich sind, die auch TRPV1 zu sensibilisieren vermögen (Steen et al. 1992; Kress et al. 1997; Vyklicky et al. 1998). In TRPV1-defizienten Mäusen ist die thermische Hyperalgesie herabgesetzt, während die mechanische unverändert ist (Caterina et al. 2000; Gunthorpe et al. 2000). Die Hochregulation von TRPV1 in entzündlichen Zuständen ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung dieses Rezeptors für den Schmerz bei entzündlichen Vorgängen (Itoh et al. 2001). Dieses macht diesen Rezeptor zu einem attraktiven Kandidaten für eine pharmakologische Therapie von solchen Schmerzen.

Tatsächlich werden capsaicinhaltige Medikamente schon lange bei der Behandlung von Schmerzen eingesetzt. Die Wirkung dürfte hier über die Desensibilisierung bzw. Tachyphylaxie der Nozizeptoren bei längerdauernder und wiederholter Applikation dieser Substanz, eventuell auch über die neuromodulatorische Wirkung von Vanilloiden via TRPV1 vermittelt werden (Szallasi und Blumberg 1999). Die reizende Wirkung durch Erregung derselben Rezeptoren limitiert allerdings den Einsatz von Capsaicin (Watson 1994). Mit der Entdeckung von Vanilloidderivaten wie Olvanil (Liu et al. 1997), die, bei gleichzeitig geringer reizender Wirkung, ein hohes Desensibilisierungspotential besitzen, sind bereits Fortschritte in die Richtung gemacht worden, besser verträgliche und wirksamere Medikamente zu entwickeln, die über diesen Weg wirken.

4.4. ASIC3

Mit Hilfe der ASIC3-KO-Mäuse konnten wir in dieser Arbeit den Einfluss dieses Rezeptors auf die Protonensensibilität von Spinalganglienneuronen untersuchen. Zwar fallen die mittleren Spitzenamplituden der protoneninduzierten Ströme bzw. der transienten Komponenten in den capsaicinunempfindlichen ASIC3-KO-Neuronen nicht geringer aus als in den Wildtyp-Neuronen, die Prävalenz von transienten Komponenten in ASIC3-KO-Neuronen ist aber deutlich reduziert. Die anhaltenden Komponenten der capsaicinunempfindlichen ASIC3-KO-Neurone zeigen hingegen keine Reduktion von

Amplitude oder Prävalenz. Daraus lässt sich schließen, dass ASIC3 essentiell für transiente Komponenten in einer Subpopulation von Spinalganglienneuronen ist, in der die Ausschaltung des Rezeptors in Knock-Out-Neuronen zu einem völligen Verlust der transienten Komponenten führt. In anderen Neuronen sind offensichtlich andere Kanäle, wahrscheinlich andere ASICs, für die transienten Komponenten verantwortlich, obwohl eine Beteiligung von ASIC3 an diesen in Wildtyp-Neuronen nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Protonensensitivität von ASICs und deren Expression durch Spinalganglienneurone führen zu der Annahme, dass ASICs zumindest für einen Teil von deren Protonensensitivität verantwortlich sind. In heterologen Systemen exprimiert, zeigen verschiedene Subtypen von ASICs transiente Komponenten mit ähnlichen Eigenschaften, wie die der nativen Neurone (Price et al. 1996; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b; Champigny et al. 1998; Chen et al. 1998). Diese transienten Komponenten sind Amilorid sensitiv, zeigen eine hohe Natriumpermeabilität gegenüber der von anderen Ionen und besitzen eine pH-Abhängigkeit mit Maxima bei sehr niedrigen pH-Werten. In heterologen Systemen konnte dabei die Bildung von Heteromultimeren verschiedener ASICs, deren Reaktionen gegenüber Homomultimeren veränderte Eigenschaften haben, nachgewiesen werden (Basilana et al. 1997; Lingueglia et al. 1997; Babinski et al. 2000; Benson et al. 2002). In Spinalganglienneuronen treten transiente Komponenten von protoneninduzierten Strömen besonders häufig in mittelgroßen bis großen Zellen auf, die an der Mechanosensitivität beteiligt sind (Petruska et al. 2000; Chen et al. 2002; Petruska et al. 2002). Hier können sie auf Heteromultimere von verschiedenen ASICs zurückgeführt werden, und Mäuse, denen verschiedene ASIC-Gene deletiert wurden zeigen eine veränderte Mechanosensitivität (Price et al. 2000; Price et al. 2001; Benson et al. 2002; Xie et al. 2002). Ob ASICs über ihre transienten protoneninduzierten Ströme hieran beteiligt sind ist unklar, möglicherweise sind ASICs auch direkt mechanosensibel. In nozizeptiven Spinalganglienneuronen mit kleinen bis mittelgroßen Zellkörpern können die transienten Komponenten wesentlich seltener nachgewiesen werden, als sie in großen mechanosensitiven vorkommen. Hier sind sie vermutlich ebenfalls auf ASICs zurückzuführen. Die Ergebnisse von Studien zur Bedeutung von ASIC3 für die Nozizeption sind allerdings widersprüchlich. Einerseits wird in extrazellulären

Ableitungen von Nozizeptoren eine reduzierte Reaktion von ASIC3-Knock-Out-Mäusen auf Protonenreize gefunden. Andererseits ist die Reaktion auf Protonenreize niedriger Intensität in Verhaltensexperimenten nicht verändert. Bei Schmerzreizen hoher Intensität unterschiedlicher Modalitäten tritt eine Hyperalgesie auf (Price et al. 2001; Chen et al. 2002). Die genauen Mechanismen, wie ASIC3 die Protonensensitivität von nozizeptiven Neuronen moduliert, sind somit noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von ASIC3 an der Rezeption von Protonen durch kardiale sensible Neurone, die mit besonders großen Einwärtsströmen auf niedrigen pH reagieren. Auslöser könnten Ischämien bei Angina pectoris oder Herzinfarkt sein, die starke Schmerzen verursachen (Benson et al. 1999; Sutherland et al. 2001).

Die fehlende Beeinflussung der Amplituden von anhaltenden Komponenten durch ASIC3 in unseren Experimenten und die Bedeutung für die transienten nur in einer Subpopulation, stützt die Vermutung, dass ASIC3 keine große Rolle für die Protonensensitivität im nozizeptiven System spielt und diese allenfalls zu modulieren vermag. Da ASICs in der Lage sind, Heteromultimere mit verschiedenen Eigenschaften zu bilden, könnten also solche von anderen ASICs für die nicht durch TRPV1 oder ASIC3 produzierten protoneninduzierten Ströme verantwortlich sein. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre ein Heteromultimer aus ASIC2a und ASIC2b, da beide Kanäle in Spinalganglienneuronen nachweisbar sind und somit prinzipiell für ein solches Coassembling in Frage kommen (Lingueglia et al. 1997; Garcia-Anoveros et al. 2001). Diese Heteromultimere zeigen im heterologen System eine anhaltende Komponente, die natriumselektiv ist (Lingueglia et al. 1997; Price et al. 2000; Garcia-Anoveros et al. 2001). Die Reduktion der anhaltenden Komponenten in den ASIC3-KO-Neuronen in natriumfreier Lösung in dieser Arbeit gibt einen Hinweis, dass dies auch in nativen Neuronen der Fall sein könnte. In nativen Spinalganglienneuronen könnte die Beteiligung von ASIC3 an solchen Heteromultimeren die Ionenselektivität so verändern, dass ein nicht von Natriumionen abhängiger Einwärtsstrom resultiert. Einem solchen würde die fehlende Beeinflussung der anhaltenden Komponenten durch natriumfreies Milieu in Wildtyp-Neuronen entsprechen. Doch sind diese anhaltenden Komponenten von ASIC2a/2b auch amiloridempfindlich, was sich in den Ableitungen der vorliegenden Arbeit nicht findet. Zu bedenken ist allerdings, dass in den hier

genannten Studien ASICs von verschiedenen Spezies untersucht wurden, was deren Vergleichbarkeit erschwert, denn es bestehen Differenzen der pharmakologischen Eigenschaften sich entsprechender ASIC-Subtypen und auch nativer Spinalganglienneurone verschiedener Arten (Waldmann et al. 1997a; de Weille et al. 1998; Babinski et al. 1999).

4.5. IB4

Die Fähigkeit das Lektin IB4 zu binden unterscheidet die nicht-peptiderge Subpopulation von Spinalganglienneuronen von der peptidergen, NGF-abhängigen Subpopulation (Snider und McMahon 1998). Funktionelle Unterschiede dieser Populationen könnten durch die unterschiedliche Expression von mehreren Ionenkanälen bedingt sein (Bradbury et al. 1998; Fjell et al. 1999; Stucky und Lewin 1999). In der Ratte wurden ASICs überwiegend in IB4-negativen Spinalganglienneuronen gefunden (Chen et al. 1998; Olson et al. 1998; Akopian et al. 2000). In einer Arbeit von (Dirajlal et al. 2003) werden zudem größere protoneninduzierte Ströme in der IB4-negativen Gruppe gefunden. In dieser Studie finden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede der Amplituden der Einwärtsströme zwischen diesen Subpopulationen. Jedoch ist der Anteil von Neuronen, die transiente Komponenten aufweisen, in der IB4-negativen Gruppe größer als in der IB4-positiven. Dies könnte durch unterschiedliche Expression entsprechend reagierender Rezeptoren zustande kommen und ließe sich durch eine stärkere Expression von ASICs in der IB4-negativen Population erklären. Daten über die genaue Expression von ASICs in Spinalganglienneuronen von Mäusen liegen bis heute aber nicht vor und über die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Expression von ASICs in der IB4-positiven und der IB4-negativen Subpopulation nozizeptiver Spinalganglienneurone ist noch wenig bekannt.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Aufklärung von Mechanismen der Protonensensibilität auf molekularer Ebene gemacht, die ein wesentliches Element der Nozizeption darstellt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von den in diesem Zusammenhang entdeckten Kanälen TRPV1 und ASIC3 auf die Protonensensitivität von nativen Spinalganglienneuronen, sowie Unterschiede zwischen der IB₄-positiven und der IB₄-negativen Population untersucht. Hierzu wurden Patch-Clamp-Studien an isolierten Neuronen von TRPV1-defizienten und ASIC3-defizienten Mäusen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigen dabei die wesentliche Rolle von TRPV1 für die Protonensensibilität. Insbesondere für nicht desensibilisierende Komponenten von protoneninduzierten Strömen, die für die Transduktion extrazellulärer azidotischer Schmerzzustände in eine anhaltende Erregung des nozizeptiven Systems verantwortlich sind, ist TRPV1 von großer Bedeutung. Diese sind in den TRPV1-defizienten Neuronen stark reduziert. Der Einfluss von ASIC3 auf diese Komponenten ist hingegen gering, auch wenn es Hinweise auf eine Beteiligung dieses Rezeptors an diesen Komponenten gibt.

Größere Bedeutung hat ASIC3 für schnell desensibilisierende Komponenten der Reaktion dieser Neurone auf Protonen, die von ASIC3-defizienten seltener als von Wildtyp-Neuronen gezeigt werden. Die Bedeutung dieser transienten Komponenten ist nicht geklärt, wahrscheinlich erfüllen sie eine modulatorische Funktion, nicht nur im nozizeptiven System.

Noch wenig ist über die funktionellen Unterschiede der zwei verschiedenen Subpopulationen nozizeptiver Neurone bekannt, die durch die Bindung des Isolektins B₄ differenziert werden können. Diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass sich diese auch in ihrer Protonensensitivität unterscheiden. Das könnte Ausdruck dafür sein, dass diese an der Wahrnehmung unterschiedlicher Schmerzzustände beteiligt sind.

Die Charakterisierung der Mechanismen des komplexen nozizeptiven Systems auf zellulärer und molekularer Ebene ist Voraussetzung zur Entwicklung von gezielt wirkenden, analgetischen Pharmaka. Die schon lange bekannte Wirksamkeit von Capsaicin – dem wohl bekanntesten Agonisten von TRPV1 – bei verschiedenen schmerzhaften Zuständen und fortschreitende Erkenntnisse über die Bedeutung dieses

und der ASIC-Rezeptoren bei der Wahrnehmung von schmerzassoziierter Gewebsazidose, zeigt Wege auf, über die solche Medikamente ihre Wirkung entfalten könnten.

5. Literaturverzeichnis

- Acs, G., M. Palkovits, P. M. Blumberg (1996). "Specific binding of [3H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations." *Life Sci* **59**(22): 1899-908.
- Adams, C. M., P. M. Snyder, M. P. Price, M. J. Welsh (1998). "Protons activate brain Na⁺ channel 1 by inducing a conformational change that exposes a residue associated with neurodegeneration." *J Biol Chem* **273**(46): 30204-7.
- Akopian, A. N., C. C. Chen, Y. Ding, P. Cesare, J. N. Wood (2000). "A new member of the acid-sensing ion channel family." *Neuroreport* **11**(10): 2217-22.
- Allard, M., P. Rousselot, M. C. Lombard, D. T. Theodosis (1999). "Evidence for neuropeptide FF (FLFQRFamide) in rat dorsal root ganglia." *Peptides* **20**(3): 327-333.
- Amaya, F., I. Decosterd, T. A. Samad, C. Plumpton, S. Tate, R. J. Mannion, M. Costigan, C. J. Woolf (2000). "Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2." *Mol.Cell Neurosci.* **15**(4): 331-342.
- Askwith, C. C., C. Cheng, M. Ikuma, C. Benson, M. P. Price, M. J. Welsh (2000). "Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels." *Neuron* **26**(1): 133-141.
- Babinski, K., K. T. Le, P. Seguela (1999). "Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties." *J.Neurochem.* **72**(1): 51-57.
- Babinski, K., S. Catarsi, G. Biagini, P. Seguela (2000). "Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺." *J.Biol.Chem.* **275**(37): 28519-28525.
- Baron, A., L. Schaefer, E. Lingueglia, G. Champigny, M. Lazdunski (2001). "Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels." *J.Biol.Chem.* **276**(38): 35361-35367.
- Bassilana, F., G. Champigny, R. Waldmann, J. R. de Weille, C. Heurteaux, M. Lazdunski (1997). "The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties." *J.Biol.Chem.* **272**(46): 28819-28822.
- Bassler, E. L., T. J. Ngo-Anh, H. S. Geisler, J. P. Ruppersberg, S. Grunder (2001). "Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b." *J Biol Chem* **276**(36): 33782-7.
- Baumann, T. K., M. E. Martenson (2000). "Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsa." *J.Neurosci.* **20**(11): 80.
- Bennett, D. L., G. J. Michael, N. Ramachandran, J. B. Munson, S. Averill, Q. Yan, S. B. McMahon, J. V. Priestley (1998). "A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury." *J.Neurosci.* **18**(8): 3059-3072.
- Benson, C. J., S. P. Eckert, E. W. McCleskey (1999). "Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation." *Circ.Res.* **84**(8): 921-928.

- Benson, C. J., J. Xie, J. A. Wemmie, M. P. Price, J. M. Henss, M. J. Welsh, P. M. Snyder (2002). "Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2338-43.
- Bergmann, I., J. V. Priestley, S. B. McMahon, E. B. Brocker, K. V. Toyka, M. Koltzenburg (1997). "Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75." *Eur J Neurosci* **9**(1): 18-28.
- Bevan, S., J. Yeats (1991). "Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones." *J. Physiol* **433**: 145-161.
- Bevan, S., P. Geppetti (1994). "Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves." *Trends Neurosci* **17**(12): 509-12.
- Birder, L. A., A. J. Kanai, W. C. de Groat, S. Kiss, M. L. Nealen, N. E. Burke, K. E. Dineley, S. Watkins, I. J. Reynolds, M. J. Caterina (2001). "Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13396-401.
- Biro, T., C. Brodie, S. Modarres, N. E. Lewin, P. Acs, P. M. Blumberg (1998). "Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells." *Brain Res Mol Brain Res* **56**(1-2): 89-98.
- Bradbury, E. J., G. Burnstock, S. B. McMahon (1998). "The Expression of P2X3 Purinoreceptors in Sensory Neurons: Effects of Axotomy and Glial-Derived Neurotrophic Factor." *Mol. Cell Neurosci.* **12**(4/5): 256-268.
- Burgess, P. R., E. R. Perl (1967). "Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin." *J Physiol* **190**(3): 541-62.
- Canessa, C. M., A. M. Merillat, B. C. Rossier (1994). "Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells." *Am J Physiol* **267**(6 Pt 1): C1682-90.
- Catarsi, S., K. Babinski, P. Seguela (2001). "Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF." *Neuropharmacology* **41**(5): 592-600.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-824.
- Caterina, M. J., D. Julius (1999). "Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors." *Curr Opin Neurobiol* **9**(5): 525-30.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, D. Julius (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." *Nature* **398**(6726): 436-441.
- Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, D. Julius (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." *Science* **288**(5464): 306-313.
- Cesare, P., P. McNaughton (1996). "A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**(26): 15435-15439.
- Champigny, G., N. Voilley, R. Waldmann, M. Lazdunski (1998). "Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1." *J. Biol. Chem.* **273**(25): 15418-15422.

- Chen, C. C., S. England, A. N. Akopian, J. N. Wood (1998). "A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**(17): 10240-10245.
- Chen, C. C., A. Zimmer, W. H. Sun, J. Hall, M. J. Brownstein (2002). "A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8992-7.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao, D. Julius (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition." *Nature* **411**(6840): 957-62.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels, C. Strubing (2001). "The TRP ion channel family." *Nat Rev Neurosci* **2**(6): 387-96.
- Coscoy, S., J. R. de Weille, E. Lingueglia, M. Lazdunski (1999). "The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore." *J.Biol.Chem.* **274**(15): 10129-10132.
- Davies, N. W., H. D. Lux, M. Morad (1988). "Site and mechanism of activation of proton-induced sodium current in chick dorsal root ganglion neurones." *J Physiol* **400**: 159-87.
- Davis, J. B., J. Gray, M. J. Gunthorpe, J. P. Hatcher, P. T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P. L. Pugh, D. C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, S. A. Sheardown (2000). "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia." *Nature* **405**(6783): 183-187.
- de Weille, J. R., F. Bassilana, M. Lazdunski, R. Waldmann (1998). "Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel." *FEBS Lett.* **433**(3): 257-260.
- Denda, M., S. Fuziwara, K. Inoue, S. Denda, H. Akamatsu, A. Tomitaka, K. Matsunaga (2001). "Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(5): 1250-2.
- Dirajlal, S., L. E. Pauers, C. L. Stucky (2003). "Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin." *J Neurophysiol* **89**(1): 513-24.
- Dittert, I., V. Vlachova, H. Knotkova, Z. Vitaskova, L. Vyklicky, M. Kress, P. W. Reeh (1998). "A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones." *J.Neurosci.Methods* **82**(2): 195-201.
- Djoughri, L., L. Bleazard, S. N. Lawson (1998). "Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones." *J Physiol* **513 (Pt 3)**: 857-72.
- Duus, P. (1995). *Neurologisch-topische Diagnostik*. Stuttgart, Thieme-Verlag.
- Ellis, J. L., J. S. Sham, B. J. Udem (1997). "Tachykinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(2): 751-5.
- Fjell, J., T. R. Cummins, S. D. Dib-Hajj, K. Fried, J. A. Black, S. G. Waxman (1999). "Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons." *Brain Res Mol Brain Res* **67**(2): 267-82.
- Garcia-Anoveros, J., B. Derfler, J. Neville-Golden, B. T. Hyman, D. P. Corey (1997). "B₁NaC1 and B₂NaC2 constitute a new family of human neuronal sodium

- channels related to degenerins and epithelial sodium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1459-64.
- Garcia-Anoveros, J., T. A. Samad, L. Zuvella-Jelaska, C. J. Woolf, D. P. Corey (2001). "Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons." *J Neurosci* **21**(8): 2678-86.
- Garcia-Martinez, C., C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J. M. Merino, A. Ferrer-Montiel (2000). "Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties." *J.Biol.Chem.* **275**(42): 32552-32558.
- Grantyn, R., H. D. Lux (1988). "Similarity and mutual exclusion of NMDA- and proton-activated transient Na⁺-currents in rat tectal neurons." *Neurosci Lett* **89**(2): 198-203.
- Grunder, S., H. S. Geissler, E. L. Bassler, J. P. Ruppersberg (2000). "A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland." *Neuroreport* **11**(8): 1607-1611.
- Gunthorpe, M. J., M. H. Harries, R. K. Prinjha, J. B. Davis, A. Randall (2000). "Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1)." *J.Physiol* **525 Pt 3**: 747-759.
- Gunthorpe, M. J., C. D. Benham, A. Randall, J. B. Davis (2002). "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **23**(4): 183-91.
- Guo, A., L. Vulchanova, J. Wang, X. Li, R. Elde (1999). "Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites." *Eur.J.Neurosci.* **11**(3): 946-958.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch.* **391**(2): 85-100.
- Harper, A. A., S. N. Lawson (1985). "Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones." *J Physiol* **359**: 31-46.
- Hille, B. (2001). *Ionic Channels in Excitable Membranes*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Hwang, S. W., H. Cho, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, K. H. Min, Y. G. Suh, D. Kim, U. Oh (2000). "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**(11): 6155-6160.
- Immke, D. C., E. W. McCleskey (2001). "Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons." *Nat.Neurosci.* **4**(9): 869-870.
- Immke, D. C., E. W. McCleskey (2003). "Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade." *Neuron* **37**(1): 75-84.
- Ishibashi, K., F. Marumo (1998). "Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis." *Biochem Biophys Res Commun* **245**(2): 589-93.
- Issberner, U., P. W. Reeh, K. H. Steen (1996). "Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia?" *Neurosci Lett* **208**(3): 191-4.
- Itoh, M., I. Takasaki, T. Andoh, H. Nojima, M. Tominaga, Y. Kuraiishi (2001). "Induction by carrageenan inflammation of prepronociceptin mRNA in VR1-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia." *Neurosci Res* **40**(3): 227-33.

- Jancso, N., A. Jancso-Gabor, J. Szolcsanyi (1967). "Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin." *Br J Pharmacol* **31**(1): 138-51.
- Jerman, J. C., S. J. Brough, R. Prinjha, M. H. Harries, J. B. Davis, D. Smart (2000). "Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology." *Br J Pharmacol* **130**(4): 916-22.
- Jordt, S. E., M. Tominaga, D. Julius (2000). "Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**(14): 8134-8139.
- Jordt, S. E., D. Julius (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." *Cell* **108**(3): 421-30.
- Julius, D., A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* **413**(6852): 203-10.
- Jung, J., S. W. Hwang, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, W. B. Kim, D. Kim, U. Oh (1999). "Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel." *J.Neurosci.* **19**(2): 529-538.
- Jung, J., S. Y. Lee, S. W. Hwang, H. Cho, J. Shin, Y. S. Kang, S. Kim, U. Oh (2002). "Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1." *J Biol Chem* **277**(46): 44448-54.
- Kellenberger, S., I. Gautschi, L. Schild (1999a). "A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 4170-5.
- Kellenberger, S., N. Hoffmann-Pochon, I. Gautschi, E. Schneeberger, L. Schild (1999b). "On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel." *J Gen Physiol* **114**(1): 13-30.
- Kellenberger, S., M. Auberson, I. Gautschi, E. Schneeberger, L. Schild (2001). "Permeability properties of ENaC selectivity filter mutants." *J Gen Physiol* **118**(6): 679-92.
- Kirschstein, T., D. Busselberg, R. D. Treede (1997). "Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons." *Neurosci Lett* **231**(1): 33-6.
- Koltzenburg, M. (1995). "Stability and plasticity of nociceptor function and their relationship to provoked and ongoing pain." *seminars in the neurosciences* **7**: 199-210.
- Koltzenburg, M., G. R. Lewin (1997). "Der Einfluss von Neurotrophinen auf den Phänotyp sensorischer Neurone." *Neuroforum* **1**: 27-31.
- Koltzenburg, M., C. L. Stucky, G. R. Lewin (1997). "Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin." *J.Neurophysiol.* **78**(4): 1841-1850.
- Koltzenburg, M. (1999). "The changing sensitivity in the life of the nociceptor." *Pain Suppl* **6**: S93-102.
- Kovalchuk Yu, N., O. A. Krishtal, M. C. Nowycky (1990). "The proton-activated inward current of rat sensory neurons includes a calcium component." *Neurosci Lett* **115**(2-3): 237-42.
- Kress, M., S. Fetzer, P. W. Reeh, L. Vyklicky (1996). "Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat." *Neurosci Lett* **211**(1): 5-8.
- Kress, M., P. W. Reeh, L. Vyklicky (1997). "An interaction of inflammatory mediators and protons in small diameter dorsal root ganglion neurons of the rat." *Neurosci.Lett.* **224**(1): 37-40.

- Kress, M., H. U. Zeilhofer (1999). "Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors." *Trends Pharmacol Sci* **20**(3): 112-8.
- Krishtal, O. A., V. I. Pidoplichko (1981a). "Receptor for protons in the membrane of sensory neurons." *Brain Res* **214**(1): 150-4.
- Krishtal, O. A., V. I. Pidoplichko (1981b). "A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception." *Neuroscience* **6**(12): 2599-601.
- Krishtal, O. A., V. I. Pidoplichko (1981c). "A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception." *Neurosci Lett* **24**(3): 243-6.
- Lawson, S. N., P. J. Waddell (1991). "Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons." *J Physiol* **435**: 41-63.
- Leffler, A., B. Mönter, M. J. Caterina, D. Julius, M. Koltzenburg (2000). "Disruption of the Vanilloid Receptor 1 gene impairs the responses of sensory neurons to protons." *Soc. Neurosci. Abstr.*: 632.1.
- Lewin, G. R., L. M. Mendell (1993). "Nerve growth factor and nociception." *Trends Neurosci* **16**(9): 353-9.
- Lindahl, O. (1962). "Pain: a chemical explanation." *Acta Rheumatologica Scandinavia* **8**: 161-169.
- Lingueglia, E., J. R. de Weille, F. Bassilana, C. Heurteaux, H. Sakai, R. Waldmann, M. Lazdunski (1997). "A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells." *J.Biol.Chem.* **272**(47): 29778-29783.
- Liu, L., S. A. Simon (1994). "A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 738-41.
- Liu, L., S. A. Simon (1996). "Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells." *J Neurophysiol* **75**(4): 1503-14.
- Liu, L., Y. Wang, S. A. Simon (1996). "Capsaicin activated currents in rat dorsal root ganglion cells." *Pain* **64**(1): 191-5.
- Liu, L., Y. Lo, I. Chen, S. A. Simon (1997). "The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide." *J.Neurosci.* **17**(11): 4101-4111.
- Liu, L., S. A. Simon (1998). "The influence of removing extracellular Ca²⁺ in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons." *Brain Res* **809**(2): 246-52.
- Mamet, J., A. Baron, M. Lazdunski, N. Voilley (2002). "Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels." *J Neurosci* **22**(24): 10662-70.
- Mano, I., M. Driscoll (1999). "DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt." *Bioessays* **21**(7): 568-78.
- McCleskey, E. W., M. S. Gold (1999). "Ion channels of nociception." *Annu Rev Physiol* **61**: 835-56.
- McKemy, D. D., W. M. Neuhauser, D. Julius (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." *Nature* **416**(6876): 52-8.
- Merskey, H., N. Bogduk (1994). *Classification of chronic pain*. Seattle, IASP press: 209-214.
- Mezey, E., Z. E. Toth, D. N. Cortright, M. K. Arzubi, J. E. Krause, R. Elde, A. Guo, P. M. Blumberg, A. Szallasi (2000). "Distribution of mRNA for vanilloid receptor

- subtype 1 (VR1), and VR1- like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**(7): 3655-3660.
- Michael, G. J., J. V. Priestley (1999). "Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy." *J.Neurosci.* **19**(5): 1844-1854.
- Molliver, D. C., D. E. Wright, M. L. Leitner, A. S. Parsadanian, K. Doster, D. Wen, Q. Yan, W. D. Snider (1997). "IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life." *Neuron* **19**(4): 849-861.
- Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R. J. Bindels, E. A. Bruford, M. J. Caterina, D. E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu, M. X. Zhu (2002). "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." *Mol Cell* **9**(2): 229-31.
- Nagy, I., H. Rang (1999). "Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons." *Neuroscience* **88**(4): 995-7.
- Olson, T. H., M. S. Riedl, L. Vulchanova, X. R. Ortiz-Gonzalez, R. Elde (1998). "An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats." *Neuroreport* **9**(6): 1109-1113.
- Palmer, L. G. (1990). "Epithelial Na channels: the nature of the conducting pore." *Ren Physiol Biochem* **13**(1-2): 51-8.
- Peier, A. M., A. J. Reeve, D. A. Andersson, A. Moqrich, T. J. Earley, A. C. Hergarden, G. M. Story, S. Colley, J. B. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian (2002). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." *Science* **296**(5575): 2046-9.
- Petersen, M., R. H. LaMotte (1993). "Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells." *Pain* **54**(1): 37-42.
- Petersen, M., R. H. Lamotte, A. Klusch, K. D. Kniffki (1996). "Multiple capsaicin-evoked currents in isolated rat sensory neurons." *Neuroscience* **75**(2): 495-505.
- Petruska, J. C., J. Napaporn, R. D. Johnson, J. G. Gu, B. Y. Cooper (2000). "Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents." *J Neurophysiol* **84**(5): 2365-79.
- Petruska, J. C., J. Napaporn, R. D. Johnson, B. Y. Cooper (2002). "Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion." *Neuroscience* **115**(1): 15-30.
- Price, M. P., P. M. Snyder, M. J. Welsh (1996). "Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel." *J.Biol.Chem.* **271**(14): 7879-7882.
- Price, M. P., G. R. Lewin, S. L. McIlwrath, C. Cheng, J. Xie, P. A. Heppenstall, C. L. Stucky, A. G. Mannsfeldt, T. J. Brennan, H. A. Drummond, J. Qiao, C. J. Benson, D. E. Tarr, R. F. Hrstka, B. Yang, R. A. Williamson, M. J. Welsh (2000). "The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation." *Nature* **407**(6807): 1007-1011.
- Price, M. P., S. L. McIlwrath, J. Xie, C. Cheng, J. Qiao, D. E. Tarr, K. A. Sluka, T. J. Brennan, G. R. Lewin, M. J. Welsh (2001). "The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice." *Neuron* **32**(6): 1071-83.

- Raja, S. N., M. Rinkamp, R. A. Meyer, J. N. Campbell (1999). Peripheral neural mechanisms of nociception. Textbook of pain. R. Melzack. Edinburgh, Churchill Livingstone: 11-57.
- Rang, H. P., S. Bevan, A. Dray (1991). "Chemical activation of nociceptive peripheral neurones." *Br Med Bull* **47**(3): 534-48.
- Reeh, P. W., K. H. Steen (1996). "Tissue acidosis in nociception and pain." *Prog Brain Res* **113**: 143-51.
- Reeh, P. W., M. Kress (2001). "Molecular physiology of proton transduction in nociceptors." *Curr Opin Pharmacol*. **1**(1): 45-51.
- Reichling, D. B., J. D. Levine (2000). "In hot pursuit of the elusive heat transducers." *Neuron* **26**(3): 555-558.
- Renard, S., E. Lingueglia, N. Voilley, M. Lazdunski, P. Barbry (1994). "Biochemical analysis of the membrane topology of the amiloride-sensitive Na⁺ channel." *J Biol Chem* **269**(17): 12981-6.
- Sakmann, B., E. Neher (1995). Single Channel Recording, Kluwer Academic Publishers.
- Sasamura, T., M. Sasaki, C. Tohda, Y. Kuraishi (1998). "Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus." *Neuroreport* **9**(9): 2045-8.
- Schaible, H. G., R. F. Schmidt (2000). Nociception und Schmerz. Physiologie des Menschen. F. Lang. Berlin, Springer-Verlag: 236-250.
- Schild, L., E. Schneeberger, I. Gautschi, D. Firsov (1997). "Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation." *J Gen Physiol* **109**(1): 15-26.
- Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster, M. Ringkamp, E. Torebjork, H. Handwerker (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." *J Neurosci* **15**(1 Pt 1): 333-41.
- Schumacher, M. A., I. Moff, S. P. Sudanagunta, J. D. Levine (2000). "Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes." *J Biol Chem*. **275**(4): 2756-2762.
- Sheng, S., J. Li, K. A. McNulty, D. Avery, T. R. Kleyman (2000). "Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel." *J Biol Chem* **275**(12): 8572-81.
- Sherrington, C. S. (1906). The Integrative Action of the Nervous System. New York, Scribner.
- Silos-Santiago, I., D. C. Molliver, S. Ozaki, R. J. Smeyne, A. M. Fagan, M. Barbacid, W. D. Snider (1995). "Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice." *J Neurosci* **15**(9): 5929-42.
- Smart, D., J. C. Jerman (2000). "Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor." *Trends Pharmacol Sci* **21**(4): 134.
- Smith, G. D., M. J. Gunthorpe, R. E. Kelsell, P. D. Hayes, P. Reilly, P. Facer, J. E. Wright, J. C. Jerman, J. P. Walhin, L. Ooi, J. Egerton, K. J. Charles, D. Smart, A. D. Randall, P. Anand, J. B. Davis (2002). "TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein." *Nature* **418**(6894): 186-90.
- Snider, W. D., S. B. McMahon (1998). "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors." *Neuron* **20**(4): 629-632.

- Snyder, P. M., F. J. McDonald, J. B. Stokes, M. J. Welsh (1994). "Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel." *J Biol Chem* **269**(39): 24379-83.
- Snyder, P. M., D. R. Olson, D. B. Bucher (1999). "A pore segment in DEG/ENaC Na(+) channels." *J Biol Chem* **274**(40): 28484-90.
- Steen, K. H., P. W. Reeh, F. Anton, H. O. Handwerker (1992). "Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro." *J.Neurosci.* **12**(1): 86-95.
- Steen, K. H., P. W. Reeh (1993). "Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin." *Neurosci Lett* **154**(1-2): 113-6.
- Steen, K. H., U. Issberner, P. W. Reeh (1995a). "Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation." *Neurosci Lett* **199**(1): 29-32.
- Steen, K. H., A. E. Steen, P. W. Reeh (1995b). "A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro." *J.Neurosci.* **15**(5 Pt 2): 3982-3989.
- Steen, K. H., A. E. Steen, H. W. Kreysel, P. W. Reeh (1996). "Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis." *Pain* **66**(2-3): 163-70.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, A. Patapoutian (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." *Cell* **112**(6): 819-29.
- Stucky, C. L., M. Koltzenburg, M. Schneider, M. G. Engle, K. M. Albers, B. M. Davis (1999). "Overexpression of nerve growth factor in skin selectively affects the survival and functional properties of nociceptors." *J.Neurosci.* **19**(19): 8509-8516.
- Stucky, C. L., G. R. Lewin (1999). "Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct." *J.Neurosci.* **19**(15): 6497-6505.
- Sutherland, S. P., C. J. Benson, J. P. Adelman, E. W. McCleskey (2001). "Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**(2): 711-716.
- Szallasi, A., S. Nilsson, T. Farkas-Szallasi, P. M. Blumberg, T. Hokfelt, J. M. Lundberg (1995). "Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment." *Brain Res* **703**(1-2): 175-83.
- Szallasi, A., P. M. Blumberg (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." *Pharmacol.Rev.* **51**(2): 159-212.
- Szallasi, A., M. Di, V (2000). "New perspectives on enigmatic vanilloid receptors." *Trends Neurosci.* **23**(10): 491-497.
- Szolcsanyi, J., A. Jancso-Gabor (1975). "Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents." *Arzneimittelforschung* **25**(12): 1877-81.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, D. Julius (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." *Neuron* **21**(3): 531-543.
- Ueno, S., T. Nakaye, N. Akaike (1992). "Proton-induced sodium current in freshly dissociated hypothalamic neurones of the rat." *J Physiol* **447**: 309-27.

- Varming, T. (1999). "Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons." *Neuropharmacology* **38**(12): 1875-81.
- Viana, F., E. de la Pena, C. Belmonte (2002). "Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression." *Nat Neurosci* **5**(3): 254-60.
- Voilley, N., J. de Weille, J. Mamet, M. Lazdunski (2001). "Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors." *J.Neurosci.* **21**(20): 8026-8033.
- Vyklicky, L., H. Knotkova-Urbancova, Z. Vitaskova, V. Vlachova, M. Kress, P. W. Reeh (1998). "Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats." *J.Neurophysiol.* **79**(2): 670-676.
- Waldmann, R., G. Champigny, N. Voilley, I. Lauritzen, M. Lazdunski (1996). "The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*." *J.Biol.Chem.* **271**(18): 10433-10436.
- Waldmann, R., F. Bassilana, J. de Weille, G. Champigny, C. Heurteaux, M. Lazdunski (1997a). "Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons." *J.Biol.Chem.* **272**(34): 20975-20978.
- Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux, M. Lazdunski (1997b). "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." *Nature* **386**(6621): 173-177.
- Waldmann, R., M. Lazdunski (1998). "H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels." *Curr.Opin.Neurobiol.* **8**(3): 418-424.
- Waldmann, R., G. Champigny, E. Lingueglia, J. R. De Weille, C. Heurteaux, M. Lazdunski (1999). "H(+)-gated cation channels." *Ann N Y Acad Sci* **868**: 67-76.
- Watson, C. P. (1994). "Topical capsaicin as an adjuvant analgesic." *J Pain Symptom Manage* **9**(7): 425-33.
- Weidner, C., M. Schmelz, R. Schmidt, B. Hansson, H. O. Handwerker, H. E. Torebjork (1999). "Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin." *J.Neurosci.* **19**(22): 10184-10190.
- Welch, J. M., S. A. Simon, P. H. Reinhart (2000). "The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13889-94.
- Wood, J. N., J. Winter, I. F. James, H. P. Rang, J. Yeats, S. Bevan (1988). "Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture." *J Neurosci* **8**(9): 3208-20.
- Xie, J., M. P. Price, A. L. Berger, M. J. Welsh (2002). "DRASIC contributes to pH-gated currents in large dorsal root ganglion sensory neurons by forming heteromultimeric channels." *J Neurophysiol* **87**(6): 2835-43.
- Xu, H., I. S. Ramsey, S. A. Kotecha, M. M. Moran, J. A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P. S. DiStefano, R. Curtis, D. E. Clapham (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." *Nature* **418**(6894): 181-6.
- Yiangou, Y., P. Facer, J. A. Smith, L. Sangameswaran, R. Eglen, R. Birch, C. Knowles, N. Williams, P. Anand (2001). "Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**(8): 891-6.

- Zhang, P., C. M. Canessa (2001). "Single-channel properties of recombinant acid-sensitive ion channels formed by the subunits ASIC2 and ASIC3 from dorsal root ganglion neurons expressed in *Xenopus* oocytes." *J.Gen.Physiol* **117**(6): 563-572.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, M. Di, V, D. Julius, E. D. Hogestatt (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* **400**(6743): 452-457.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. M. Koltzenburg für die Betreuung während der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit sowie für die vielen außergewöhnlichen Möglichkeiten, die mir in diesem Rahmen geboten wurden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn A. Leffler, für die Heranführung an die Methode und die vielfachen intensiven Diskussionen. Die außerordentlich freundschaftliche Zusammenarbeit mit ihm waren mir häufig eine große Hilfe.

Bei Herrn Dr. K. Schmidt möchte ich mich für die freundschaftliche Unterstützung im Labor und fruchtbare Diskussionen bedanken.

Weiterhin danke ich auch Herrn Prof. Dr. K.V. Toyka für die optimalen Arbeitsbedingungen an seiner Klinik und die Bereitstellung der Labore.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen lieben Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglichten und mir jederzeit mit wertvollem Rat beiseite standen.

Lebenslauf

Personalien

Name : **Boris Henrik Mönter**
Geburtsdatum : 9. 1. 1976 in Berlin
Eltern Anna-Viola Mönter und Dr. Norbert Mönter
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

Grundschule: 1982 - 1988 Erich-Kästner-Grundschule in Berlin
Gymnasium: 1988 - 1995 Arndt-Gymnasium-Dahlem in Berlin
Abschluß mit dem Abitur am 8. 6. 1995

Zivildienst

1995 – 1996 StattBauhof gGmbH Berlin

Studium der Medizin

10/1996 – 10/1998 Vorklinisches Studium (Fachsemester 1-4)
an der Humboldt-Universität zu Berlin
Abschluss mit der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum)
am 10.9.1998

10/1998 – 5/2003 Klinisches Studium (Fachsemester 5-14)
an der Bayerischen Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
Abschluss mit der Ärztlichen Prüfung
am 22.5.2003

Praktisches Jahr 4/02 – 8/02 Spitalzimmerberg (Wädenswil, Schweiz)
8/02 – 11/02 Neurologische Klinik der Universität
Würzburg
11/02 – 3/03 Chirurgische Klinik der Universität
Würzburg

Beruflicher Werdegang

ab August 2003 Pre-Registration House Officer im Crosshouse Hospital
in Kilmarnock, Schottland

Promotion

Jan 2000 – Nov 2000 Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit zum Thema
„Protonenempfindlichkeit von Spinalganglienneuronen bei
Wildtypmäusen und Mausmutanten mit einem Mangel an
TRPV1 oder ASIC3“ bei Prof. Dr. med. M. Koltzenburg.

Veröffentlichungen

(2000) Disruption of the vanilloid receptor 1 gene impairs
the responses of sensory neurones to protons. Society for
Neuroscience Abstracts Vol.26, 632.1; (Poster)

Würzburg, August 2003