

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. K.V. Toyka

**TRPV1 ist ein polymodaler Rezeptor von
nozizeptiven Spinalganglienzellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Andreas Leffler

aus Göteborg/ Schweden

Würzburg, Juli 2003

Referent: Prof. Dr. med. M. Koltzenburg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Karschin

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1.	Einleitung	01- 10
2.	Material und Methoden	11- 19
2.1	Versuchstiere	11- 11
2.2	Genotypisierung	11- 12
2.3	Zellkultur	12- 13
2.4	IB4-Färbung	13- 14
2.5	Elektrophysiologie	14- 19
2.6	Statistische Auswertung	19- 19
3.	Ergebnisse	20- 40
3.1	Vanilloid-Sensibilität in Nozizeptoren wird allein von TRPV1 vermittelt	20- 28
3.1.1	Vanilloid-induzierte Einwärtsströme in Spinalganglienzellen der Wildtyp Maus	20- 23
3.1.2	Verlust der Sensibilität für Vanilloide in der TRPV1-defizienten Maus	23- 24
3.1.3	Capsaicin-induzierte Einwärtsströme in Spinalganglienzellen von Wildtyp-Mäusen der Inzuchtstämme Balb/C und C57/Bl6	24- 25
3.1.4	Capsaicin-Sensibilität IB4-positiver und IB4-negativer Spinalganglienzellen	25- 28
3.2	Protonen-Sensibilität in Nozizeptoren wird hauptsächlich von TRPV1 vermittelt	29- 33
3.2.1	Die Expression von TRPV1 vermittelt Spinalganglienzellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Protonen	29- 32
3.2.2	Protonen-induzierte Einwärtsströme in IB4-positiven und IB4-negativen Spinalganglienzellen	33- 33
3.3	Hitze-Sensibilität in Nozizeptoren wird hauptsächlich von TRPV1 vermittelt	35- 39

3.3.1	Reduzierte Hitze-induzierte Einwärtsströme in sensorischen Neuronen der TRPV1-/-	35- 39
4.	Diskussion	40- 50
4.1	TRPV1 und Vanilloid-Sensibilität	41- 44
4.2	TRPV1 und Protonen-Sensibilität	44- 46
4.3	TRPV1 und Hitze-Sensibilität	47- 48
4.4	TRPV1 und Pathophysiologie	49- 49
5.	Zusammenfassung und Ausblick	50- 50
	Literaturverzeichnis	51- 66
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen:

ASIC	acid sensitive ion channel
CGRP	calcitonin gene-related peptide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylenediamin tetra-acetat
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR	glial cell line-derived neurotrophic factor receptor
IB4	Isolectin B4
MES	2-Morpholinoethansulfat
NGF	nerve growth factor
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
SP	Substanz P
TMP	thiamin monophosphatase
TRP	transient receptor potential
TrkA	Tyrosinkinase A
VR1	Vanilloid Receptor 1

1. Einleitung

Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz als “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” (Merskey und Bogduk 1994). Aus der Definition geht hervor, dass Schmerz durch Noxen ausgelöst wird, die direkt oder potentiell schädlich sind. Klinisch betrachtet, stellen sowohl akute als auch chronische Schmerzzustände ein substantielles Problem dar. Dabei ist Schmerz eine der häufigsten Gründe für eine Arztkonsultation. In Großbritannien wurde bei einer Befragung von über 5000 Patienten in stationärer Behandlung verschiedener klinischen Fächern festgestellt, dass 61% der Patienten unter akutem Schmerz aufgrund der Erkrankung oder als Folge der Behandlung litten (Bruster et al. 1994). Weiterhin wird geschätzt, dass 7- 11% der britischen Bevölkerung unter chronischen Schmerzen leidet (Department of Health, 2000). Die Folgen dieser hohen Prävalenz von Schmerzzuständen sind immense Kosten für das Gesundheitssystem, aber auch eine starke Beeinträchtigung der Lebensqualität für die Betroffenen. Aus dieser Sicht wird deutlich, dass die Erforschung des Schmerzes von grosser Bedeutung ist.

Schon am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Beziehung von akutem Schmerz und dem Fluchtreflex durch die Behauptung von Sherrington (1900) postuliert: „Pain is the adjunct to protective reflexes“. Dabei besteht der afferente Schenkel des Reflexbogens aus spezialisierten afferenten Neuronen, die als Detektoren für potentiell schädlichen Stimuli dienen. Diese spezialisierten Afferenzen, deren Existenz ebenfalls schon durch Sherrington (1906) postuliert wurde, werden als „Nozizeptoren“ bezeichnet. Nozizeptoren sind Afferenzen mit freien Nervenendigungen, die unter anderem durch Hitze, Kälte, mechanische Reizung oder chemische Substanzen wie z.B. Protonen und Bradykinin aktiviert werden können (Snider und McMahon 1998; Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Psychophysische Untersuchungen an normalen Probanden zeigen, dass die Aktivierung einer definierten Population von dünn myelinisierten und unmyelinisierten sensiblen somatischen Afferenzen zu einer Schmerzentstehung führt. Am Mensch konnte dies durch intraneurale Mikrostimulation bestätigt werden, indem an wachen Probanden einzelne kutane Afferenzen selektiv stimuliert wurden (Torebjörk et al. 1987; Ochoa und Torebjörk 1989; Torebjörk und

Ochoa 1990). Während Reizung von dick myelinisierten Fasern nicht schmerzhaft empfindungen auslöste, führte die Stimulation von dünn myelinisierten und unmyelinisierten Afferenzen regelhaft zu Schmerz- oder Juckempfindungen. Durch eine morphologische und funktionelle Charakterisierung sensibler somatischer Neuronen ist eine Klassifikation des peripheren, nozizeptiven Systems entstanden (Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Dabei dienen Studien an Afferenzen von Nagetieren als ein repräsentatives Modell für die Charakterisierung der Eigenschaften von sensiblen afferenten Neuronen von Primaten, einschließlich des Menschen (Koltzenburg et al. 1997; Cain et al. 2001). Diese Klassifikation der peripheren sensiblen somatischen Neuronen beruht im Wesentlichen auf der Leitungsgeschwindigkeit, der rezeptiven Eigenschaften und auf neurochemischen Charakteristika.

Leitungsgeschwindigkeit und Myelinisierungsgrad

Unter den afferenten sensiblen Nervenfasern findet man myelinisierte $A\alpha$ - und $A\beta$ -Fasern, dünn myelinisierte $A\delta$ -Fasern sowie unmyelinisierte C-Fasern (Tabelle 1). Die schnell leitenden $A\alpha$ -Fasern erfüllen propriorezeptive Aufgaben, während $A\beta$ -Fasern im physiologischen Zustand die Wahrnehmung von Druck und Berührung vermitteln (Julius und Basbaum 2001). Einigkeit herrscht darüber, dass die Mehrheit von C- und $A\delta$ -Fasern nozizeptive Eigenschaften ausüben (Koltzenburg 1995, 1999; Snider und McMahon 1998). Die unmyelinisierten C-Fasern weisen eine langsame Leitungsgeschwindigkeit auf, während die dünn myelinisierten $A\delta$ -Fasern schneller leiten. In der Maus beträgt die Leitungsgeschwindigkeit der C-Fasern $< 1,0 \text{ ms}^{-1}$, für $A\delta$ -Fasern $6-15 \text{ ms}^{-1}$ (Koltzenburg et al. 1997; Cain et al. 2001). Es wird vermutet, dass die Aktivierung von $A\delta$ -Fasern den sogenannte „ersten Schmerz“ vermittelt (Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Damit wird die schnell einsetzende, scharfe und stechende Schmerzempfindung beschrieben, die z.B. den Fluchtreflex auslöst. Die darauf folgende dumpfe und brennende Schmerzempfindung wird demnach auch „zweiter Schmerz“ genannt und wird vermutlich von C-Fasern vermittelt (Raja et al. 1999). Es besteht eine enge Korrelation zwischen Dicke der Myelinscheide der Afferenzen und dem Durchmesser des dazugehörigen Zellkörpers (Harper und Lawson 1985; Lawson und Waddell 1991; Djouhri et al. 1998). C- und $A\delta$ -Fasern entspringen klein- bis mittelgrossen Zellkörpern ($15-30 \mu\text{m}$, (bei Maus und Ratte)), während $A\beta$ -

Fasern Zellkörpern mit einem großen Durchmesser (30-50 μm , (bei Maus und Ratte)) zugerechnet werden können. Diese Kenntnisse macht man sich in vielen *in vitro* Studien zunutze, indem hauptsächlich kleine- bis mittelgroße Spinalganglienzellen als Model eines Nozizeptors untersucht werden (Wood et al. 1988; Kress und Reeh 1996).

Adäquate Stimuli für die Aktivierung von somatischen Afferenzen

In verschiedenen experimentellen Präparationen an Versuchstieren und an Menschen finden sich Populationen von Nozizeptoren mit einem typischen Repertoire von Stimulus-Modalitäten, die zu einer Aktivierung führen (Koltzenburg et al. 1997; Raja et al. 1999; Weidner et al. 1999). Viele C-Fasern und eine kleine Population der A δ -Fasern sind polymodale Nozizeptoren, die durch Hitze, mechanische Reizung und chemische Substanzen aktivierbar sind. Diese werden entsprechend als CMH- (C-fibre mechano-heat) bzw. AMH- (A-fibre mechano-heat) Fasern bezeichnet. Entsprechend finden sich auch Neurone, die nur durch Hitze (CH- bzw. AH-) oder durch mechanische Reizung (CM- bzw. AM-) aktivierbar sind. Die Mehrheit der polymodalen und Hitze-sensiblen Nozizeptoren wird durch Capsaicin, dem scharfen Inhaltsstoff des Chilipfeffers (*Capsicum annuum*), aktiviert (Szolcsányi et al. 1988; Caterina et al. 2000). Capsaicin ist ein Mitglied der chemischen Gruppe der Vanilloide und ist seit langer Zeit als ein Aktivator von nozizeptiven sensorischen Neuronen bekannt. Capsaicin wird oft zur Identifikation dieser interessanten Population von Neuronen verwendet, aber auch eine Vielfalt von weiteren Vanilloid-Analoga, die Capsaicin-sensible Neurone erregen (z.B. Resiniferatoxin), sind beschrieben worden (Szolcsanyi und Jancso-Gabor 1975; Heyman und Rang 1985; Wood et al 1988; Holzer 1991; Szallasi und Blumberg 1999). Resiniferatoxin ist ein Vanilloid, das aus der Kaktuspflanze *Euphorbia resinifera* gewonnen wird und ist bezogen auf das molekulare Gewicht ein weitaus potenterer Aktivator polymodaler Nozizeptoren als Capsaicin (Szallasi und Blumberg 1989, 1990, 1999). Weiterhin werden viele Nozizeptoren von Protonen aktiviert, jedoch sind relativ hohe Konzentrationen (pH <6,0), die z.B. bei einer Entzündung oder einer Ischämie erreicht werden können, notwendig. Es wird vermutet, dass diese lokale Gewebsansäuerung maßgeblich zu einer Schmerzentsstehung beiträgt (Steen und Reeh 1993, 1995; Reeh und Steen 1996; Kress und Zeilhofer 1999). Eine kleine Anzahl der C- und A δ -Fasern sind auch durch Kälte aktivierbar

(Koltzenburg et al. 1997; Viana et al. 2002). Eine weitere Gruppe von sensiblen Neuronen, die zu den Nozizeptoren gezählt werden, sind die sogenannten „schlafenden Nozizeptoren“ oder CM_iH_i-Fasern (C-Faser Mechano- und Hitze-unempfindlich) (Schaible and Schmidt 1988; Schmidt et al. 1995). Diese Neurone sind im physiologischen Zustand weder Druck- noch Hitze-sensibel, aber sie werden durch Entzündungsmediatoren und Capsaicin erregt und sensibilisiert, so dass sie Druck- oder Hitze-sensibel werden. Dieser Gruppe von Neuronen wird eine Bedeutung u.a. bei entzündungsinduzierten Schmerzen beigemessen (Koltzenburg 1999).

Das Antwortverhalten sensorischer Neurone auf mechanische Reizung ist sehr vielfältig, eine Übersicht wird in Tabelle 1 dargestellt. In Abgrenzung zu den A β -Mechanorezeptoren mit einer niedrigen Reizschwelle und korpuskulären Nervenendigungen wie Ruffini- und Meißner-Körperchen, weisen mechanosensible Nozizeptoren (C- und A δ -Fasern) eine deutliche höhere Reizschwelle auf und enden als freie Nervenendigungen (Raja et al. 1999; Koltzenburg et al. 1997; Price et al. 2000). Im Hinblick auf die Hitze-Sensibilität findet man hauptsächlich zwei unterschiedlichen Antwortverhalten in sensorischen Neuronen (Reichling und Levine 2000; Julius und Basbaum 2001). Polymodale Nozizeptoren, C-Fasern und A δ -Fasern Typ 2 (AMH II), werden bei Temperaturen ab 43°C aktiviert, interessanterweise entspricht dieser Temperaturbereich in psychophysischen Untersuchungen der Schmerzschwelle (Robinson et al. 1983; Treede et al. 1992; Cesare et al. 1999). Es findet sich ferner unter den A δ -Fasern (Typ I, AMH I oder HTMR (high threshold mechanoreceptor)) eine kleine Population von Neuronen, die erst ab 53°C aktiviert werden (Treede et al. 1995; Raja et al. 1999; Reichling und Levine 2000).

Faser-Typ	Rezeptor	Endigung	Stimulus	Empfindung
A α	Propriorezeptor	Muskelspindel	Muskelkontraktion	Gelenk- Position
		Sehnenorgan	Dehnung	
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 sensiblen somatischen Neuronen (modifiziert nach Koltzenburg und Lewin 1997).

Neurochemische Charakteristik der Spinalganglienzellen

Eine weitere Einteilung von Nozizeptoren ist durch die Erforschung der Entwicklung und der phänotypischen Differenzierung sensibler Neurone entstanden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene neurotrophe Faktoren den Phänotyp von sensiblen Neuronen maßgeblich beeinflussen (Koltzenburg und Lewin 1997; Snider und McMahon 1998). Im Hinblick auf die nozizeptiven Neuronen konnte gezeigt werden, dass NGF (nerve growth factor) in der Embryonalzeit essentiell sowohl für das Überleben als auch für die Entwicklung dieser Neurone ist (Silos-Santiago et al. 1995; Snider and McMahon 1998; Koltzenburg 1999). Dabei erscheint die Expression des hochaffinen NGF-Rezeptors trkA (Tyrosinkinase A) entscheidend für das Überleben unmyelinisierter- und dünn myelinisierter Neurone zu sein, während der niedrigaffine NGF-Rezeptor p75 für die funktionelle Ausdifferenzierung und das Überleben einer kleineren Neuronenpopulation notwendig zu sein scheint (Lewin und Mendell 1992; Bergmann et al. 1997; Stucky und Koltzenburg 1999). Postnatal verringert sich der Anteil trkA-exprimierender Neurone auf ca. 40%- 45%, eine ähnlich große Gruppe von Neuronen verlieren trkA und p75 und exprimieren postnatal Rezeptoren für neurotrophe Faktoren der GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)-Familie (C-Ret, GFR α 1- GFR α 4 (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor family)) (Molliver et al. 1997; Bennett et al. 1998). Das Ergebnis dieser phänotypischen Umwandlung von

sensorischen Neuronen sind zwei distinkte Populationen von Neuronen im adulten Nervensystem, zwischen denen anatomische und expressionsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden konnten (Abb. 1) (Bennett et al. 1998; Michael und Priestley 1999; Guo et al. 1999; Amya et al. 2000). Neurone, die ihre NGF-Empfindlichkeit beibehalten exprimieren neben *trkA* und *p75* typischerweise Neuropeptide wie Substanz P und CGRP (Calcitonin gene-related peptide). Diesen peptidergen Neuronen wird bei der Entstehung der neurogenen Entzündung sowie bei der sogenannten zentralen Sensibilisierung eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (Woolf und Salter 2001). Diese Neurone terminieren in den Laminae I und IIo (outer) im Hinterhorn des Rückenmarks und bilden dort Synapsen mit Hinterhornneuronen die u.a. den Rezeptor für Substanz P (Neurokinin 1) exprimieren (Snider und McMahon 1998). Afferente Neurone, die Rezeptoren für GDNF exprimieren (30- 40% der Neurone), enthalten typischerweise das Enzym TMP (thiamine monophosphatase) sowie die Bindungsstelle für das Isolectin B4 (IB4, von *Griffonia simplicifolia*) (Silverman und Kruger 1990; Plenderleith und Snow 1993; Molliver et al 1997). Diese IB4-bindenden, „nicht-peptidergen“ Neurone terminieren hauptsächlich in Lamina Iii (inner) des Hinterhorns. Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion dieser zwei Populationen von Nozizeptoren liegen vor, da die Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen, Hitze-aktivierbaren Kanälen und purinergen (ATP-) Rezeptoren in den beiden Populationen unterschiedlich ist (Stucky und Lewin 1998; Fjell et al. 1999; Bradbury et al. 1998).

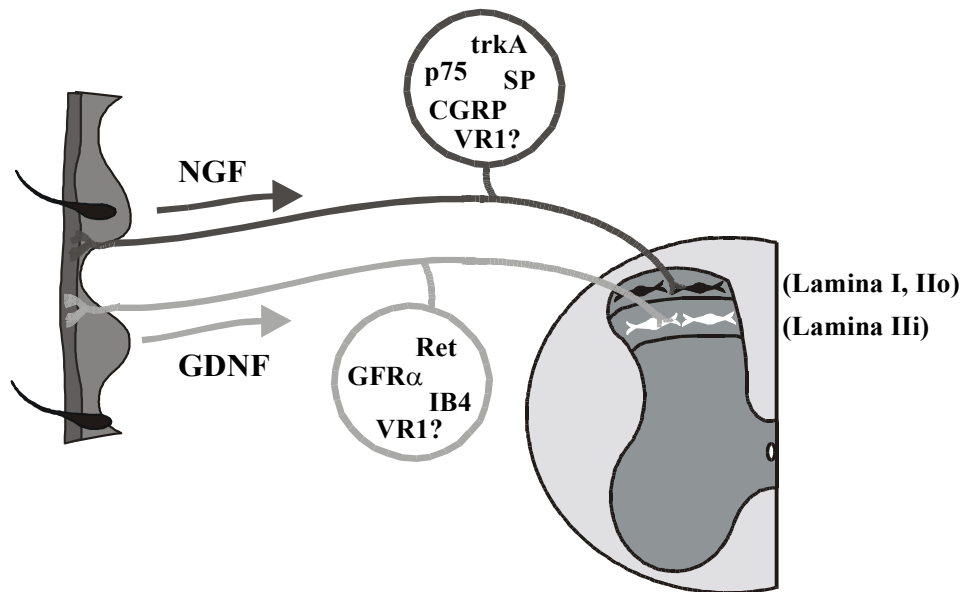


Abb. 1 Zwei Populationen von Nozizeptoren. NGF- bzw. GDNF-abhängige Neurone mit anatomischen und expressionsspezifischen Unterschieden (modifiziert nach Snider und McMahon 1998).

Anhand der Erkenntnisse, die durch neurophysiologische und morphologische Studien gewonnen wurden, konnten somit distinkte Populationen von Nozizeptoren mit spezialisierten funktionellen Eigenschaften identifiziert werden. Es wird daher vermutet, dass die spezialisierte Sensibilität funktionell verschiedenen Gruppen von Nozizeptoren eine molekulare Grundlage hat (Snider und McMahon 1998). Die Kenntnisse über die molekularen Transduktionsmechanismen in den peripheren Afferenzen konnten in den letzten Jahren um ein Vielfaches erweitert werden. Gegenwärtig wird eine Vielfalt von vielversprechenden Genprodukten studiert (Eglen et al. 1999; Wood 2000; Julius und Basbaum 2001). Die vorliegende Arbeit untersucht eines von vielen Proteinen, die durch die modernen molekular-biologischen Techniken identifiziert werden konnten und in der Entstehung von Schmerzen maßgeblich beteiligt zu sein scheinen (Caterina und Julius 2000a, b; Julius und Basbaum 2001). Das Protein, der Vanilloid Receptor 1, TRPV1 (früher VR1), konnte 1997 von der Arbeitsgruppe um Prof. David Julius durch Expressionsklonierung identifiziert werden (Caterina et al. 1997). TRPV1 gehört zu der Untergruppe TRPV der Familie der TRP- (transient receptor potential) Kanäle (Montell

2002). Die TRP-Untereinheiten sind nicht-spannungsabhängige Kationen-Kanäle, bestehend aus sechs transmembranen Segmenten die vermutlich durch eine Gruppierung zu Tetrameren einen funktionellen Kanal bilden. Die sogenannte „pore-loop“ zwischen den Segmenten 5 und 6 bildet die Pore des Kanals aus (Montell et al. 2002). Bei der Aktivierung des Kanals entsteht ein Kationen-Influx, wobei die Permeabilität für Calcium am größten ist (Abb. 2). Die Aktivierung von TRPV-Untereinheiten wird durch mehrere Stimuli erzielt, z.B. durch Hitze, Kälte, Protonen, Endocannabinoide, Lipide, Phorbol, Osmolaritätsänderungen und Druck (Clapham et al. 2001; Gunthorpe et al. 2002; Montell et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TRPV1 bei der Maus nahezu ausschließlich in sensiblen Neuronen exprimiert wird (Caterina et al. 1997). In heterologen Expressionssystemen waren Capsaicin (und andere Vanilloide), Protonen ($\text{pH} < 5,9$) und Hitze ($> 45^\circ\text{C}$) die ersten identifizierten Aktivatoren von TRPV1, dem entsprechend wird TRPV1 auch oft als „Capsaicin-Rezeptor“ ausgesprochen (Caterina et al. 1997). Neben der Eigenschaft als Agonisten bewirken Protonen auch eine Sensibilisierung von TRPV1 bei der Aktivierung durch andere Agonisten, z.B. wird bei moderaten Protonenkonzentrationen ($\text{pH} > 6,0$) eine Aktivierung von TRPV1 bei Körpertemperatur ($\sim 37^\circ\text{C}$) beobachtet (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). Die Aktivierung von TRPV1 durch die Bindung eines Agonisten erzeugt einen unselektiven Kation-Einwärtsstrom ($\text{Ca}^{++} > \text{Na}^+$), der zu einer Depolarization und gegebenenfalls zum Aktionspotential des Neurons führt. Capsaicin bindet an eine intrazellulär lokalisierte Bindungsstelle, während die Aktivierung durch Protonen über eine extrazelluläre Bindungsstelle vermittelt wird (Jung et al. 1999; Jordt et al. 2000). Die Mechanismen die, die Hitze-induzierte Aktivierung von TRPV1 zugrunde liegen, sind bisher weitgehend unbekannt (Jordt et al. 2000; Jordt und Julius 2002; Welch et al. 2000). Die Transduktionsmechanismen und Charakteristika der Einwärtsströme von TRPV1 exprimiert in heterologen Systemen, die bei der Aktivierung durch Capsaicin, Hitze und Protonen beobachtet geworden sind, ähneln denen, die in nativen nozizeptiven Neuronen beschrieben sind (Bevan und Yeats 1991; Kirchstein et al. 1997; Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; Nagy und Rang 1999a, b). Capsaicin-sensible Nozizeptoren sind fast ausschließlich polymodal und werden durch Hitze und mechanische Reizung aktiviert. In extrazellulären Ableitungen besteht eine große Überlappung von Hitze- und Capsaicin-Sensibilität, und in isolierten

Spinalganglienzellen weisen die Transduktionsmechanismen der Capsaicin- bzw. Hitze-Aktivierung ähnliche kinetische und pharmakologische Merkmale auf (Szolcsanyi et. al. 1988; Cesare und McNaughton 1996; Kirschstein et al. 1997; Nagy und Rang 1999a, b). Weiterhin sind viele der Capsaicin- und Hitze-sensiblen Nozizeptoren auch durch Protonen ($\text{pH} < 6,0$) aktivierbar, ferner verursacht eine moderate Erhöhung der Protonenkonzentration eine Sensibilisierung polymodaler Nozizeptoren bei der Aktivierung durch Capsaicin und Hitze (Petersen und LaMotte 1993; Kress et al. 1996; McLatchie und Bevan 2001). TRPV1 scheint somit ein bedeutendes Transduktionselement in Nozizeptoren zu sein und wurde daher seit seiner Entdeckung aus dem Jahr 1997 intensiv studiert.

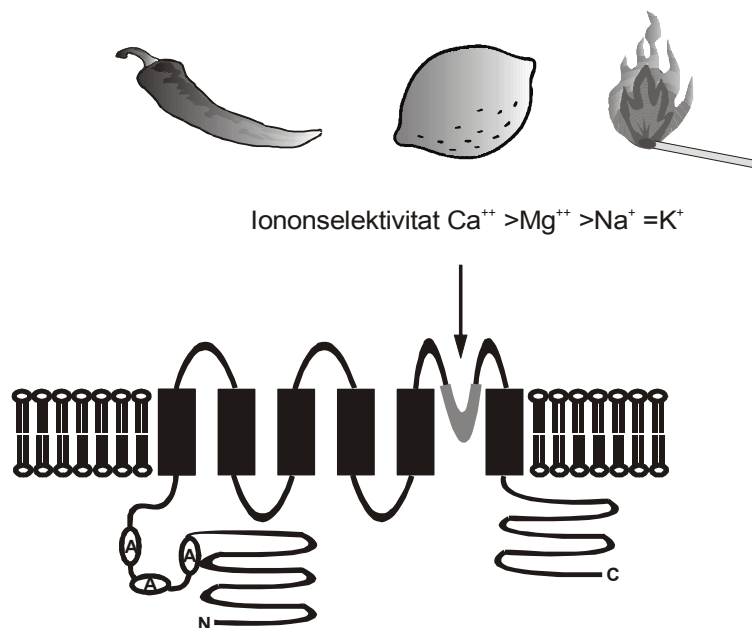


Abb. 2 Cartoon des Vanilloid Rezeptors 1 (TRPV1). Das Gen für TRPV1 kodiert ein Membranprotein (838 Aminosäuren) mit sechs transmembranen Segmenten. TRPV1-Agonisten, Capsaicin, Protonen und Hitze, lösen einen unselektiven Kation-Einwärtsstrom aus (Caterina et al. 1997).

Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eigenschaften sensibler Neurone von transgenen Mäusen zu beschreiben, bei denen das Gen für TRPV1 deletiert wurde (TRPV1^{-/-}). Das Ergebniss wurde mit den Daten von Wildtyp Mäusen (TRPV1^{+/+}) verglichen. Mit der Patch-Clamp Methode wurde auf zellulärer Ebene untersucht, ob TRPV1 ein essentielles Transduktionselement in nativen Spinalganglienzellen für die Aktivierung durch Vanilloide, Protonen und Hitze darstellt. Durch eine IB4-Färbung der untersuchten Neurone konnte die Bedeutung von TRPV1 in NGF- bzw. GDNF-abhängigen Neuronen dargestellt werden. Weiterhin wurden Wildtyp-Daten durch die Untersuchung von zwei Inzuchtstämmen, C57/Bl6 und Balb/C, erhoben. Dadurch sollte untersucht werden, ob vorbeschriebene Unterschiede von nozizeptiven Funktionen in Verhaltenstests durch Unterschiede zellulärer Merkmalen von TRPV1 erklärt werden können (Mogil et. al. 1999; Lariviere et al. 2001).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden im Tierstall der neurologischen Universitätsklinik Würzburg versorgt. Es wurden adulte Tiere beiderlei Geschlechte für die Experimente verwendet. Für einen Teil der Versuche wurden Wildtyp Mäuse des Inzuchtstammes Balb/C genutzt, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Durch Eigenzucht konnten deren Würfe für weitere Untersuchungen genutzt werden. Mäuse mit einer Ausschaltung des TRPV1-Gens wurden gezüchtet, indem heterozygote Mäuse (TRPV1+/-) auf dem Hintergrund des Inzuchtstammes C57/Bl6 durch Eigenzucht Würfe mit erwarteten mendelschen Genotypen produzierten. Die TRPV1-Mutante wurde im Labor von Prof. David Julius (Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco) hergestellt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt (Für Methodik zur Herstellung und Genotypisierung transgenen Tieren siehe Caterina et al. 2000 und www.sciencemag.org/-feature/data/1048712.shl). Die Genotypisierung der Tiere erfolgte im Labor von Prof. Julius. Während heterozygote Tiere wieder als Brutpaare verwendet wurden, wurden homozygote TRPV1-defizienten- (TRPV1-/-) und Wildtyp (TRPV1+/+) Mäuse für die Untersuchungen verwendet. Der Genotyp der zu untersuchenden Maus war dem Untersucher nicht bekannt, dies wurde erst bei der Auswertung der Daten bekannt gegeben. Mindestens sechs Tiere von jedem Genotyp, Balb/C (TRPV1+/+), C57/Bl6 (TRPV1+/+ und TRPV1-/-), wurden für die vorliegende Arbeit verwendet.

2.2 Genotypisierung

Gewebe für die Genotypisierung der transgenen Tiere wurde mittels eines standardisierten Protokolls präpariert. Die Spitze (ca. 1 cm) des Schwanzes der jeweiligen Mäuse wurde nach dem Absetzen vom Muttertier abgetrennt. Um eine spätere Identifizierung zu ermöglichen, wurden die Tiere gleichzeitig mit Ohr-Clips

markiert. Das Gewebe wurde in Eppendorfgefäße transferiert und anschließend zur Lyse in einem Puffer (100 mM TRIS pH 8,0, 5 mM EDTA (Sigma), 0,2% SDS, 5 mM NaCl, 1mg/10ml Proteinase K (Boehringer Mannheim, Deutschland) über Nacht bei 55°C in einem Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das Lysat von Gewebsresten getrennt, anschließend wurde durch Zusatz von Isopropanol die DNA ausgefällt. Mit einer sterilen Pipette wurde die DNA von der Lösung entfernt und nach Lufttrocknung (ca. 10 min.) in ein steriles Eppendorfgefäß transferiert. Die DNA-Proben wurden anschließend in einer Lösung aus 10 mM TRIS (pH 7,5) und 1,0 mM EDTA aufgelöst. Das DNA-Material wurde im Labor von Prof. Julius mittels Southern-Blots analysiert (Caterina et al. 2000).

2.3 Zellkultur

Adulte Mäuse wurden durch CO₂-Gas getötet. Die Rückenpartie des Tieres wurde mit Ethanol (70%) gesäubert, anschließend wurde das Fell über der Wirbelsäule eröffnet. Mit sterilem Präparationsbesteck wurde die gesamte Wirbelsäule freipräpariert und herausgenommen. Anschließend wurde diese in einer sterilen Petrischale mit einer feinen Schere rostro-kaudal in zwei Hälften geteilt. Mit sterilen Pinzetten wurden, nach der Entfernung des Rückenmarkes, die Spinalganglien entlang der gesamten Wirbelsäule einzeln freipräpariert und entnommen. Die Spinalganglien wurden während der Präparation in D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco, Deutschland) gesammelt. Anschließend wurden die Spinalganglien in eine vorgewärmte (5 ml, 37°C) Collagenase-Lösung (0,28 U/ml in D-MEM, Biochrom, Deutschland) transferiert und für ca. 80 min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Collagenase-Lösung entfernt und die Spinalganglien mit 8 ml PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung) (Sigma) gewaschen, um eine weitere enzymatische Digestion durch die Collagenase zu verhindern. Nach dem Absaugen von PBS wurde die Gewebssuspension in 5 ml einer vorgewärmten (37°C) Trypsin-Lösung (25000 U/ml in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, beide Sigma) für 11 min inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach der Inkubation wurde 5 ml Zellmedium (Hams-F12 Medium (Gibco) mit 3,0 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)) der Trypsin-Lösung zugesetzt. Das Serum stoppt die Aktivität des Trypsins und verhindert somit eine weitere enzymatische Verdauung. Die nun vorliegende Suspension mit einzelnen Zellverbänden wurde durch Zentrifugation (400g, 1 min) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 1- 2 ml Zellmedium zugesetzt (Volumen abhängig von Anzahl der Deckgläschen, siehe unten). Mittels steriler Pasteur-Pipetten wurden die Zellverbände dissoziiert. Die Pasteur-Pipetten wurden dazu in einer Gasflamme poliert, so dass die Öffnungsgröße der Pipetten beliebig variiert werden konnte. Mit 3 Pipetten mit abnehmender Öffnungsgröße wurde die Zellsuspension dann vorsichtig durchgemischt („trituriert“) bis diese gleichmäßig trüb wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension auf vorpräparierte Deckgläschen pipettiert (50 µl/Deckgläschen).

Deckgläschen (Hartenstein Laborbedarf, Deutschland) wurden mit Alkohol gereinigt und durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Anschließend wurden sie mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet (50 µl/Deckgläschen). Nach mindestens 4h wurde das Poly-L-Lysin sorgfältig mit PBS gewaschen und die Deckgläschen wurden anschließend in Kulturschalen (12x, Nunc, Hartenstein Laborbedarf) transferiert.

Die Deckgläschen mit Zellsuspension wurden für mindestens 4h inkubiert (37°C, 5% CO₂). In diesem Zeitraum konnten die Zellen sinken und an der Oberfläche der mit Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen haften. Anschließend wurde ca. 1 ml Zellmedium pro Deckgläschen in die Kulturschale gegeben. Die Zellkultur wurde dann bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert und innerhalb von 48h für Experimente verwendet.

2.4 IB4-Färbung

Alle Untersuchungen wurden an einem invertierten Lichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) mit Fluoreszenzausstattung vorgenommen. Eine Vitalfärbung der Zellen mit dem Isolectin B4 (IB4) wurde kurz vor den elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt. IB4 ist das Lectin der Pflanze *Bandereia simplicifolia* I und bindet mit

einer hohen Affinität an Glykoproteine mit einer terminalen α -D-Galactosyl Kette, und somit an einer distinkten Population von Spinalganglienzellen (siehe Einleitung). Eine Vitalfärbung wurde mit einem konjugierten FITC-Produkt, IB4-FITC (Fluorescein-isothiocyanate; IB4-FITC, Sigma) durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min in IB4-FITC (10 μ g/ml in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) inkubiert, anschließend konnten die Spinalganglienzellen mit Fluoreszenzlichtmikroskopie als IB4-positiv bzw. IB4-negativ identifiziert (Abb. 12).

2.5 Elektrophysiologie

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Patch-Clamp Technik einzelne Spinalganglienzellen elektrophysiologisch untersucht. Der Begriff „Patch-Clamp“ (im Deutschen auch als Membranflächen-Klemme bezeichnet) umfasst eine Vielzahl von Methoden, mit denen die elektrophysiologische Eigenschaften biologischer Membranen untersucht werden können (Hamill et al. 1981; Sakmann und Neher 1995; Hille 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte Whole-Cell Konfiguration verwendet, mit dieser Methode können elektrische Vorgänge in der Membran einer intakten Zelle untersucht werden. Die Whole-Cell Konfiguration kann in zwei unterschiedlichen Modi ausgeführt werden, dem Voltage-Clamp und dem Current-Clamp Modus. Im Current-Clamp Modus werden Strompulse an der Zellmembran appliziert. Durch die entstandenen Spannungsänderungen können Eigenschaften von Depolarizationen, Aktionspotentialen und Hyperpolarizationen an einer Zelle studiert werden. Im Voltage-Clamp Modus hingegen wird das Membranpotential der Zelle festgelegt, und es werden Ionenströme untersucht. Somit können Eigenschaften von verschiedenen Ionenkanälen in der Membran einer Zelle studiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Spinalganglienzellen im Voltage-Clamp Modus untersucht.

In der Whole-Cell Konfiguration wird ein direkter Zugang der Elektrode in das Zellinnere erschaffen, indem mittels einer Glaspipette eine Abdichtung (Seal) mit der Zellmembran formiert wird (Abb. 3, 4). Pipetten aus Borosilicat-Glas (Science Products, Deutschland) wurden dafür mit einem Pipetten-Puller (Sutter P-97, Sutter, U.S.A.) auf die erwünschte Größe ausgezogen. Die Öffnung der verwendeten Pipetten

wiesen einen Durchmesser von 0,5- 1,0 μm auf, und besaßen einen elektrischen Widerstand von 3- 5 $\text{M}\Omega$. Die Pipette wurde mit einer intrazellulären Lösung gefüllt (in mM: KCl 140, CaCl_2 1, MgCl_2 2, EGTA 10, HEPES 10 and MgATP 2, pH 7.4; Osmolarität ~ 300 mosm). Mittels eines Micromanipulators (PatchMan, Eppendorf, Deutschland) konnte die Pipette präzise an die Zelle herangeführt werden. Mit einem Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments, U.S.A), der über die Pipettenhalterung mit der Pipette verschaltet war, wurden die Messbedingungen eingestellt und kontrolliert. Der Verstärker war über eine Schnittstelle (Digidata 1200B, Axon Instruments) mit einem PC vernetzt. Mit dem Software-Paket pClamp 6.0 und 8.0 (Axon Instruments, U.S.A) wurden die Daten aufgezeichnet und analysiert. Die Daten wurden mit einer analog-digitalen Umwandlungsrate von 0,2 – 1 kHz aufgenommen und durch einen Breitbandfilter von 5 kHz gefiltert. In sämtlichen Experimenten wurde das Membranpotential auf -80 mV eingestellt; das tatsächliche Ruhemembranpotential wurde elektronisch abgelesen und protokolliert. Zellen mit einem Ruhemembranpotential positiver als -45 mV wurden ebenso verworfen wie Zellen, bei denen initial der Widerstand der Abdichtung zwischen Pipette und Membran unter 1 $\text{G}\Omega$ lag oder ein Leckstrom von mehr als $1,0$ nA während der Messung auftrat (Abb. 4).

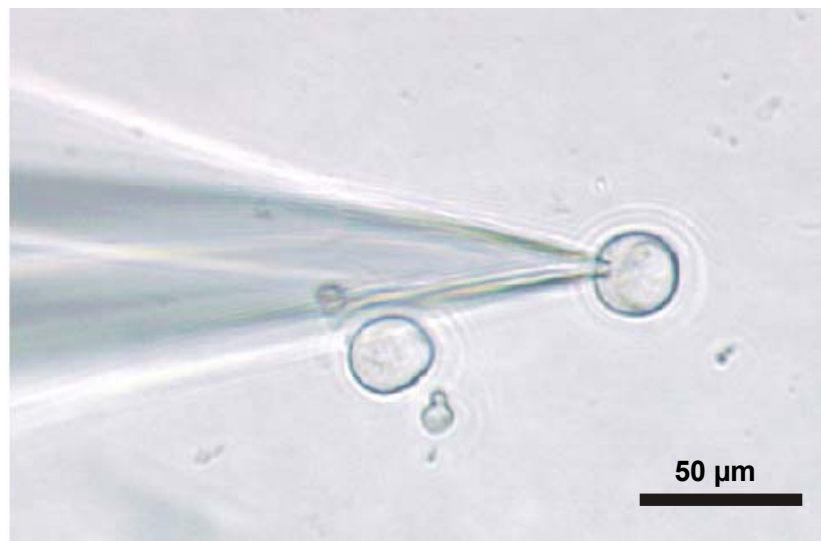
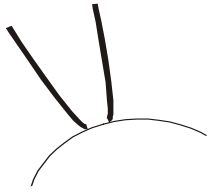
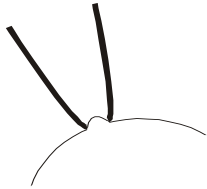


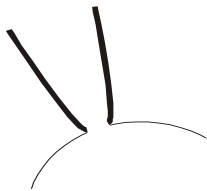
Abb. 3 Foto einer Pipette und einer Spinalganglienzelle im Whole-Cell Modus (40x Vergrößerung).



1. Positionierung der Pipette an die Zelloberfläche, durch einen leichten Überdruck in der Pipette wird eine Eindellung der Zelle sichtbar. Als Zeichen einer Abdichtung (Seal) zwischen Zelle und Pipette kann eine Erhöhung des Widerstandes abgelesen werden.



2. Durch einen Unterdruck in der Pipette wird die Abdichtung verbessert, dies zeichnet sich als eine weitere Erhöhung des Widerstandes aus. Die Formierung der Abdichtung wird durch Absenken des Membranpotentials auf -80mV verbessert, um einen Widerstand $> 1\text{ G}\Omega$ („Gigaseal“) zu erreichen.



3. Nach dem Erreichen des Gigaseals wird durch eine Erhöhung des Unterdruckes in der Pipette die Zellmembran rupturiert. Nach Ruptur der Membran besteht die „Whole-Cell“ Konfiguration. Vor den Untersuchungen wurden der Leckstrom (leak-current), das Ruhemembranpotential und der Widerstand des „Seals“ protokolliert.

Abb. 4 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Erschaffung der Whole-Cell Konfiguration.

Neurone, die elektrophysiologisch untersucht werden sollten, wurden zunächst mit IB4-FITC gefärbt (siehe oben). Anschließend wurde das Deckglaschen in eine Perfusionskammer transferiert (Abb. 5) (RC-25, Warner Instruments, U.S.A). Die Kammer war auf dem Mikroskop montiert und wurde durch Gravitation kontinuierlich mit einer extrazellulären Standardlösung durchflutet (in mM: NaCl 145, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, Glucose 10 und Hepes 10, pH 7,3, Osmolarität 310 mosm). Die Konstruktion der Kammer ermöglicht einen laminaren Fluss der extrazellulären Lösung, hierdurch wurden Chemikalien nach deren Applikation schnell ausgewaschen. Das Applikationssystem bestand aus 12 Kanälen mit einer gemeinsamen Öffnung in Form einer Glaskapillare und über einen Mikroprozessor wurden die elektronischen Ventile bedient. Die Konstruktion des Applikationssystems ermöglichte eine kontrollierte Erhitzung einer Testlösung in der Applikationsspitze (Abb. 6) (Dittert et. al. 1998).

Hitze-induzierte Einwärtsströme wurden untersucht, indem die Applikationslösung von einer Adaptationstemperatur von 30°C innerhalb 11 s auf 55- 60°C erhitzt wurde. Die Positionierung der Applikationsspitze < 100 µm von der Zelle entfernt, erlaubt eine schnelle Applikation einer Testlösung (innerhalb von 300 ms) und eine genaue Steuerung der Hitze-Applikation (Dittert et al. 1998). Durch eine Vernetzung des Applikationssystems mit der Datenaufnahme des PCs konnte die Hitze-Applikation mit elektrophysiologischen Messungen koordiniert werden.

Die Applikation von Capsaicin (1,0 µM), Resiniferatoxin (300 nM) und Protonen (pH 6,0, 5,0 und 4,0) wurde mit dem gleichen System durchgeführt. Die Testlösungen wurden allerdings nicht erhitzt (24°C) und nur für 10 s appliziert. Capsaicin (Sigma) und Resiniferatoxin (Alexis, Grünberg) wurden in 100% Ethanol zu einer Stammlösung 20 mM hergestellt und eingefroren (- 20°C). Am Tag des Experiments wurden diese Lösungen mit der extrazellulären Standardlösung (s.o.) zur erwünschten Konzentration verdünnt. Zur Erstellung der Protonen-Lösungen wurde die extrazelluläre Lösung mit HCl (1,0 M) titriert. Für die Lösungen mit pH 5,0 und 4,0 wurde statt HEPES, 10mM MES (2-Morpholinoethansulfat) (Gibco) als Puffer verwendet. Um eine eventuelle Desensibilisierung oder Tachyphylaxie von TRPV1 zu vermeiden, wurde in allen Experimenten nur eine Zelle pro Deckgläschen untersucht. Die Applikation der verschiedenen Stimuli erfolgte üblicherweise in der Reihenfolge; Protonen, Capsaicin, Hitze und Resiniferatoxin

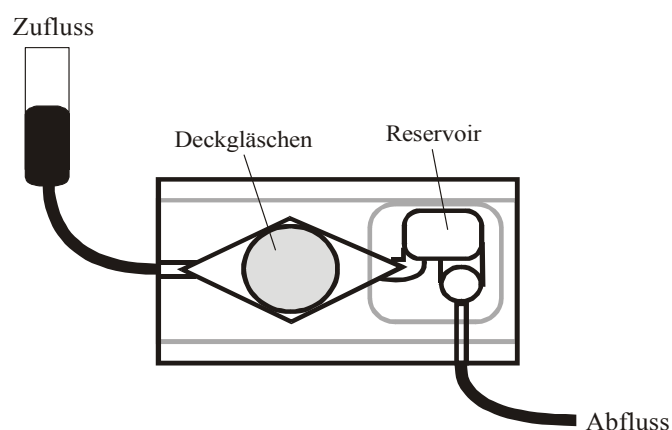


Abb. 5 Die Perfusionsskammer, auf dem Mikroskop montiert, wurde kontinuierlich mit einer extrazellulären Lösung durchflutet.

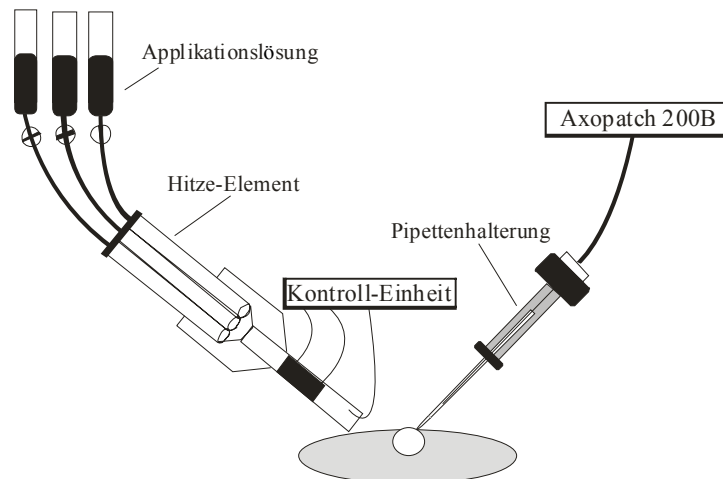


Abb. 6 Schematische Darstellung des Applikationssystems und der Patch-Clamp Konfiguration. Die Applikationslösung wurde durch Gravitation getrieben, die Applikationsspitze war mit einer Kontroll-Einheit zur Erhitzung der Applikationslösung gekoppelt. Die Kontroll-Einheit war mit dem elektrophysiologischen Setup vernetzt, so konnten Erhitzung und elektrophysiologische Messungen mit einer Software (pClamp 6.0) simultan kontrolliert und aufgenommen werden.

Einzelne Spinalganglienzellen wurden lichtmikroskopisch untersucht und es wurden nur kleine bis mittelgroße Zellen für Messungen verwendet (15- 30 μm). Die Größe der Zellen wurde durch eine im Okular integrierte Skala abgelesen. Als eine weitere Angabe der Zellgröße wurde die Kapazität (C; Einheit Farad (F)) bestimmt. Die Kapazität ist ein Maß für die Eigenschaft eines Körpers (Kapazitor), Ladungen (Q) bei Änderungen in einem elektrischen Spannungsfeld speichern zu können ($Q = C \cdot \Delta V$). Die Membran eines Zellkörpers bildet einen effizienten Kapazitor ($\sim 1 \text{ pF/cm}^2$) und in der Whole-Cell Konfiguration kann die Kapazität der Zelle erfasst werden. Die Kapazität ist proportional zu der Oberfläche (A) des Kapazitors und somit theoretisch auch zur dritten Potenz des Radius einer sphärischen Zelle ($A = 4 \cdot \pi \cdot r^2$). Abbildung 7 zeigt diese Beziehung für die Zellen (n= 227), die in dieser Arbeit untersucht wurden (Korrelationskoeffizient, $r = 0,5$, $p < 0,001$). Durch die Bestimmung der Kapazität konnten die einzelnen Stromamplituden auf die Oberflächengröße der jeweiligen Neurone bezogen werden und als Stromdichte (pA/pF) berechnet werden. In der vorliegenden Studie wurden Neuronenpopulationen hinsichtlich ihrer Funktionalität

verglichen, weshalb die Ergebnisse dieser Messungen sowohl als Amplitude (pA) wie auch als Stromdichte (pA/pF) dargestellt wurden.

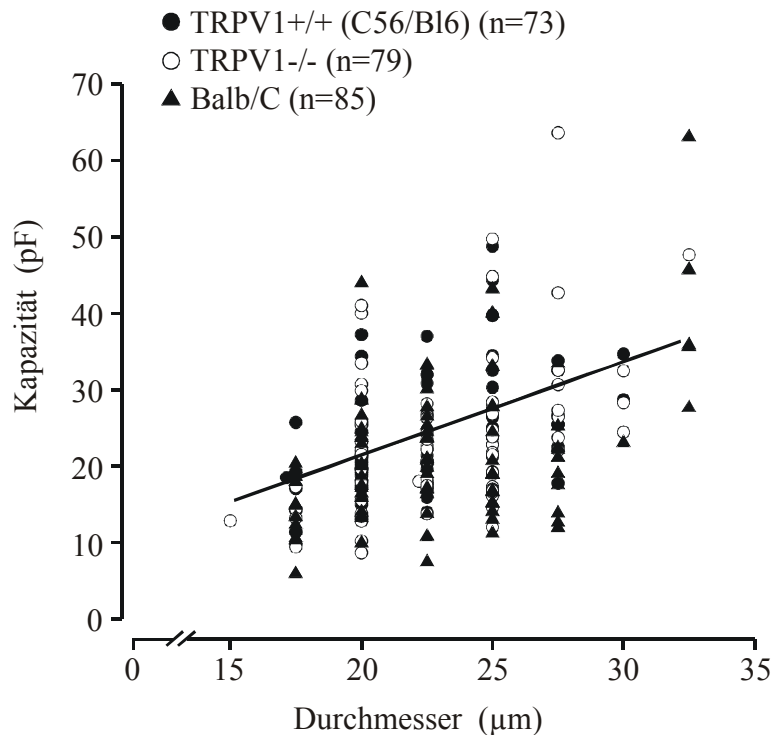


Abb. 7 Beziehung zwischen Durchmesser und Kapazität der untersuchten Zellen.(n= 227; Korrelationskoeffizient, $r = 0,5$, $p < 0,001$). Es besteht kein Unterschied zwischen Neurone der TRPV1-defizienten Maus und die zwei Wildtyp-Stämme.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistica Software Paket (Statsoft, Tulsa, U.S.A.) oder mit dem Microcal Origin Software Paket (Microcal Software, Northampton, U.S.A.). Der ungepaarte t-Test und der Chi-Quadrat-Test wurden verwendet, um Signifikanzen auszurechnen. Bei $p < 0,05$ wurde ein Unterschied als „schwach signifikant“, bei $p < 0,01$ als „signifikant“ und bei $p < 0,001$ als „hoch signifikant“ gewertet. Als Streumaß der Werte wurde der Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 277 Zellen untersucht. Der mittlere Durchmesser aller untersuchten Zellen war $23,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, zwischen den Mäusestämmen fanden sich in dieser Hinsichtlich keine Unterschiede (TRPV1+/+ $22,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$, n= 73; TRPV1-/- $23,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$, n= 79; Balb/C $23,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, n= 133) ($p > 0,1$, ungepaarte t-Tests). Die mittlere Kapazität der untersuchten Zellen in dieser Studie war $23,4 \pm 0,7 \text{ pF}$ (n= 227), zwischen den drei Mäusestämmen fanden sich entsprechend der Grössenverteilung keine Unterschiede hinsichtlich der mittleren Kapazität (TRPV1+/+ $25,0 \pm 1,1 \text{ pF}$, n= 73; TRPV1-/- $22,9 \pm 1,1 \text{ pF}$, n= 79; Balb/C $22,1 \pm 1,4 \text{ pF}$, n= 85) ($p > 0,1$ ungepaarte t-Tests).

3.1 Vanilloid-Sensibilität in Nozizeptoren wird allein von TRPV1 vermittelt

Zunächst sollte die Rolle von TRPV1 für die Vanilloid-Sensibilität von Spinalganglienzellen untersucht werden. Hierzu wurden Neurone von adulten Wildtyp Mäusen (TRPV1+/+) und TRPV1-defizienten Mäusen (TRPV1-/-) mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht. Weiterhin sollte die Vanilloid-Sensibilität von Spinalganglienzellen von Wildtyp Mäusen der Inzuchtstämmen Balb/C und C57/Bl6, untersucht werden. Schließlich wurden IB4-positive und IB4-negative Neurone hinsichtlich ihrer Capsaicin-Sensibilität getrennt ausgewertet.

3.1.1 Vanilloid-induzierte Einwärtsströme in Spinalganglienzellen der Wildtyp Maus

Insgesamt wurden 73 Spinalganglienzellen von TRPV1+/+ Mäusen (C57/Bl6) untersucht. Capsaicin ($1,0 \mu\text{M}$) und Resiniferatoxin (300 nM) induzierten deutliche Einwärtsströme in 31,5% (23/73) der Zellen, während in 68,5% (50/73) der Zellen keine Einwärtsströme beobachtet wurden (Abb. 10). Die Mittelwerte für den Durchmesser und die Kapazität waren ähnlich für Capsaicin-sensible ($21,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ bzw. $27,7 \pm 2,2 \text{ pF}$) und Capsaicin-unempfindliche Zellen ($22,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ bzw. $23,8 \pm 1,3 \text{ pF}$) ($p > 0,1$,

ungepaarte t-Tests). Alle 23 Capsaicin-sensible Neurone zeigten auch Resiniferatoxin-induzierte Einwärtsströme, jedoch keine der 50 Capsaicin-unempfindlichen Neurone. Somit konnte bei der Untersuchung an Neuronen der Wildtyp Maus nicht gezeigt werden, dass Resiniferatoxin eine grössere Neuronenpopulation als Capsaicin zu aktivieren vermag. Abbildung 8 zeigt repräsentative Ableitungen von zwei Zellen, eine Vanilloid-sensible (A, B) und eine Vanilloid-unempfindliche (C, D). Capsaicin-induzierte Einwärtsströme zeigten eine langsame Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung auf. Die maximale Amplitude des Einwärtsstromes lag in den meisten Fällen am Ende der 10 s langen Applikation von Capsaicin vor und der Einwärtsstrom inaktivierte nicht innerhalb der Applikationszeit. Nach Ende der Capsaicin-Gabe inaktivierten die Capsaicin-induzierten Einwärtsströme komplett (Abb. 8A). Resiniferatoxin-induzierte Einwärtsströme hingegen wiesen zwar eine ähnlich langsame Aktivierung auf, eine komplette Inaktivierung nach Abschluss der Stimulation erfolgte jedoch nie (Abb. 8B). Dieses Phänomen wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Caterina et al. 1997; Liu und Simon 1998), aus diesem Grund wurde Resiniferatoxin immer am Ende der Applikationsreihe als Stimulus appliziert. Die einzelnen Spitzenamplituden der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme waren sehr variabel mit Werten von 100 pA bis 5000 pA. Die mittlere Spitzenamplitude betrug $1975,9 \pm 305,9$ pA, dies entspricht einer mittleren Stromdichte von $72,9 \pm 10,6$ pA/pF (Abb. 11). Kinetische Profile einzelner Einwärtsströme waren insgesamt ähnlich, hinsichtlich der Kinetik für Aktivierung oder Inaktivierung wurden aber interindividuelle Unterschiede beobachtet (Fig. 9). In dieser Studie wurde auf eine systematische Charakterisierung kinetischen Parameter verzichtet, es wird hier auf frühere Arbeiten verwiesen (Liu und Simon 1994; Petersen et al. 1996).

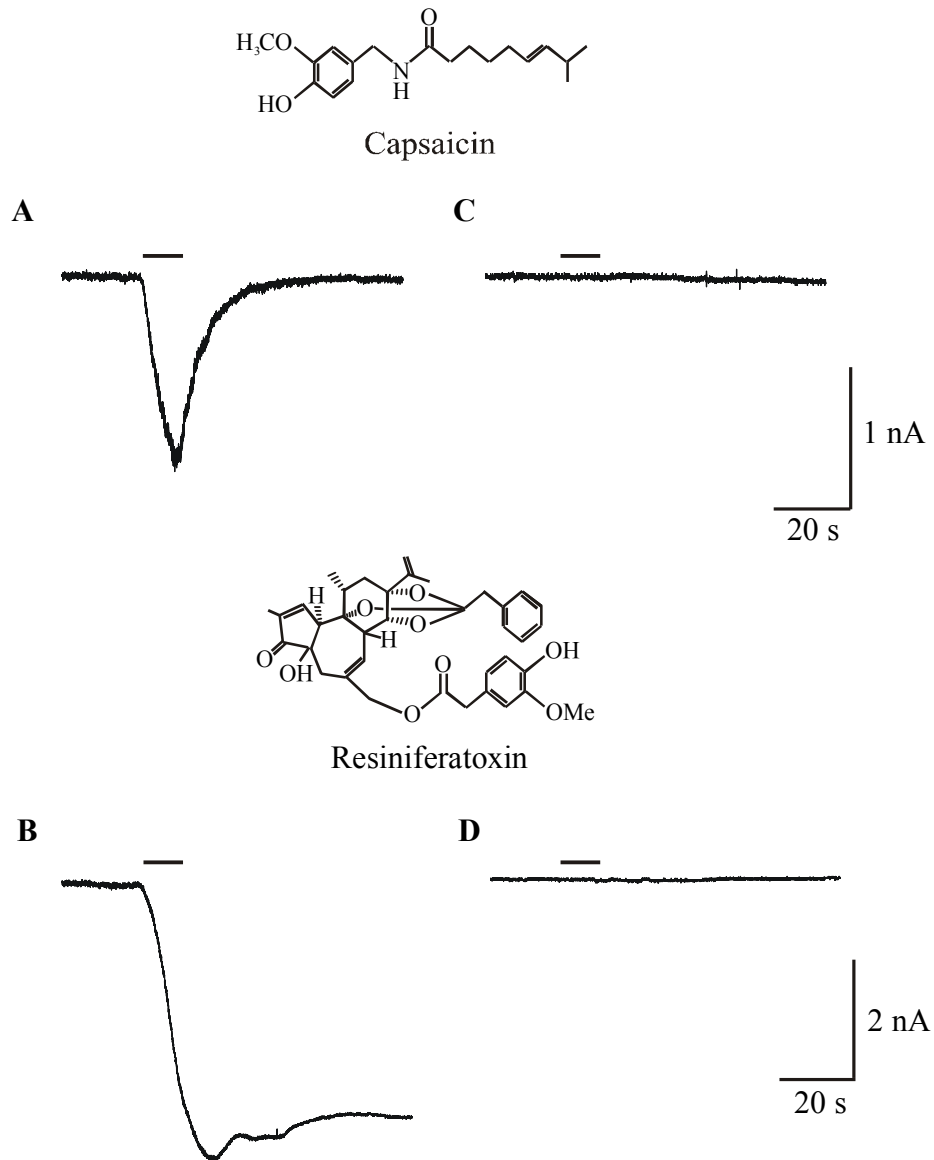


Abb. 8 Repräsentative Ableitungen von Vanilloid-sensiblen (A, B), und Vanilloid-unempfindlich Neuronen (C, D) der Wildtyp Maus.



Abb. 9 Repräsentative Capsaicin-induzierte Einwärtsströme in drei Zellen mit einer ähnlichen Kinetik der Aktivierung aber mit deutlichen Unterschieden hinsichtlich der Kinetik der Inaktivierung.

3.1.2 Verlust der Sensibilität für Vanilloide in der TRPV1-defizienten Maus

Spinalganglienzellen von TRPV1-defizienten Tieren wurden ebenso mit Capsaicin (1,0 μM) und Resiniferatoxin (300 nM) untersucht. Von 79 untersuchten Neuronen der TRPV1^{-/-} Maus wurden weder Capsaicin- noch Resiniferatoxin-induzierte Einwärtsströme beobachtet. Somit verursachte die Abwesenheit von TRPV1 in Spinalganglienzellen einen kompletten Verlust der Sensibilität für beide Vanilloide. Weitere Resiniferatoxin-sensible TRP-Kanäle wurden demnach in Spinalganglienzellen nicht vorgefunden. Der Unterschied zwischen TRPV1^{+/+} und TRPV1^{-/-} Tieren hinsichtlich der Vanilloid-Sensibilität ist hoch signifikant ($p \ll 0.001$, Chi-quadrat Test) (Abb. 10).

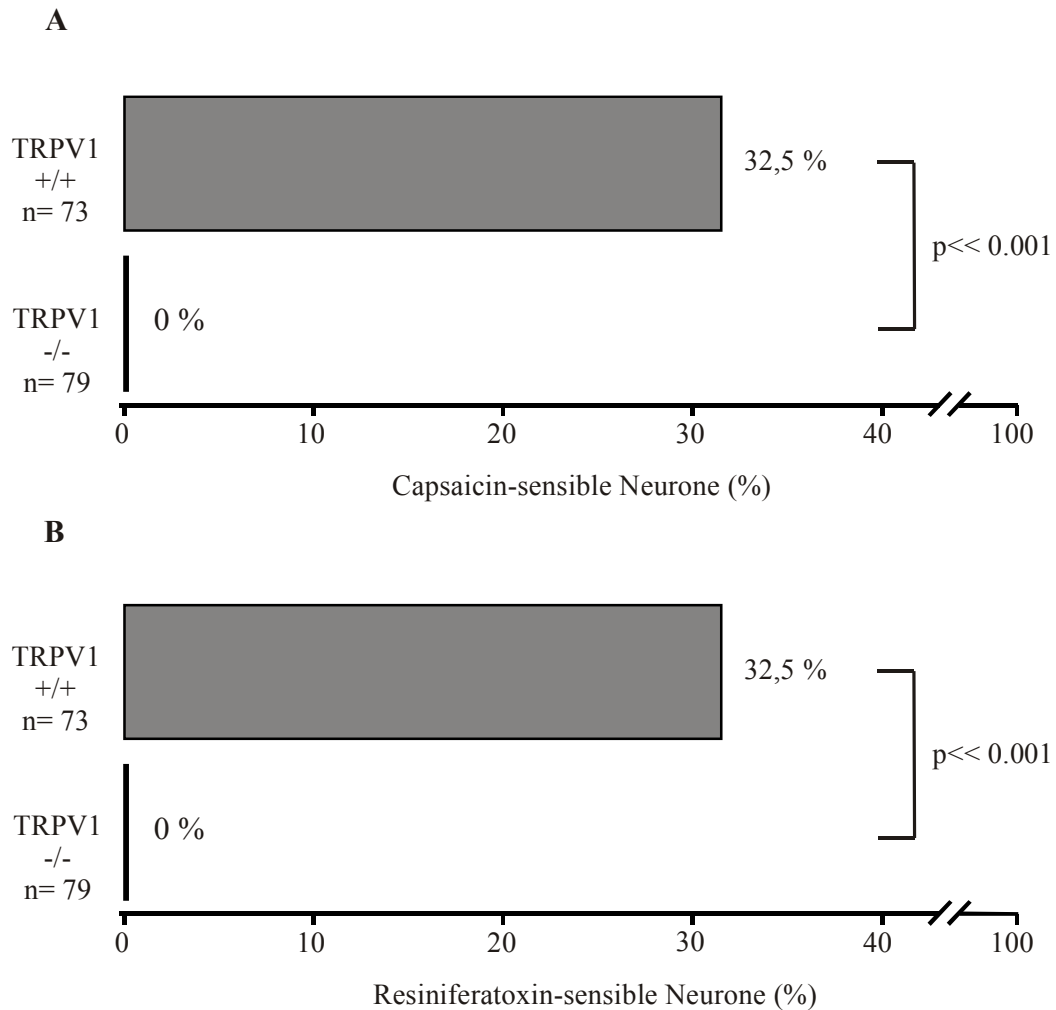


Abb. 10 Capsaicin- (A) und Resiniferatoxin- (B) induzierte Einwärtsströme wurden in 32,5% der Neurone von der Wildtyp (TRPV1+/+) Maus (n= 73) gefunden, hingegen wurde keine Vanilloid-sensiblen Zellen in der TRPV1-/- Maus (n= 79) beobachtet ($p \ll 0,001$, Chi-Quadrat Test).

3.1.3 Capsaicin-induzierte Einwärtsströme in Spinalganglienzellen von Wildtyp-Mäusen der Inzuchtstämme Balb/C und C57/Bl6

Insgesamt wurden 133 Neurone von adulten Balb/C Mäusen hinsichtlich ihrer Capsaicin-Sensibilität untersucht. In 27,1% (36/133) der untersuchten Zellen wurden Capsaicin-induzierte Einwärtsströme beobachtet, 72,9% (97/133) der Zellen waren Capsaicin-unempfindlich. Der Anteil Capsaicin-sensiblen Zellen unterscheidet sich

somit nicht signifikant zwischen C57/Bl6- (31,5%) und Balb/C Mäusen ($p > 0,4$, Chi-Quadrat Test). Die mittlere Amplitude der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme betrug in Balb/C $2058,5 \pm 285,6$ pA, die mittlere Stromdichte $97,6 \pm 14,0$ pA/pF. Wie in Abbildung 11 dargestellt, fanden sich damit auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Amplitude Capsaicin-induzierter Einwärtsströme zwischen C57/Bl6- ($1975,9 \pm 305,9$ pA bzw. $72,9 \pm 10,6$ pA/pF) und Balb/C Tieren ($p > 0,8$ bzw. $> 0,2$, ungepaarte t-Tests).

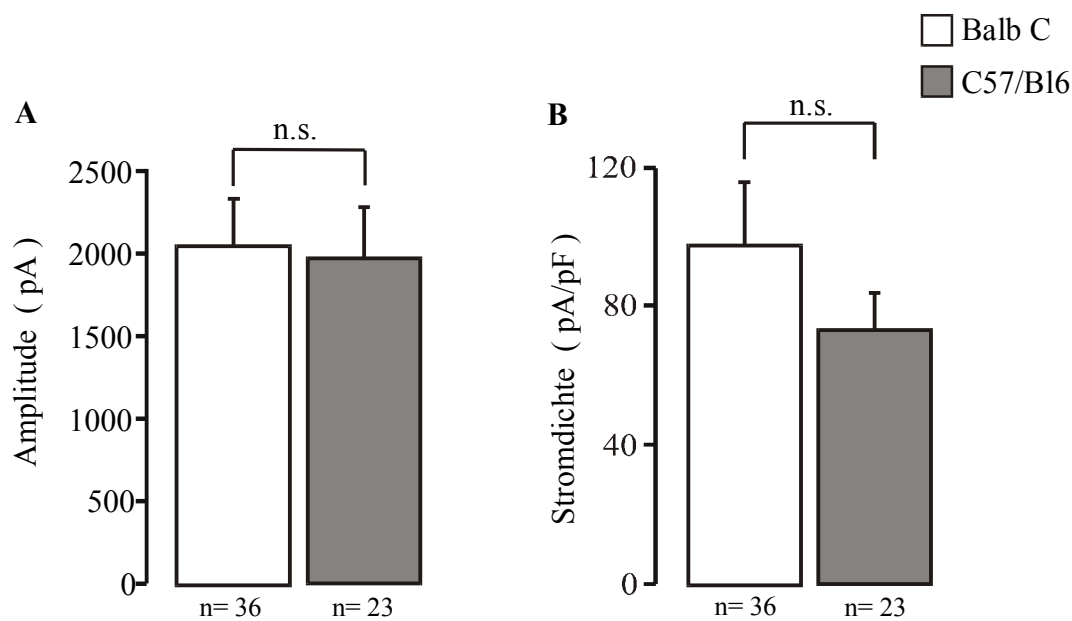


Abb. 11 Die mittlere Amplitude (A) bzw. Stromdichte (B) der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme in Zellen von Balb/C- und C56/Bl6-Mäusen (ungepaarte t-Tests; n.s. nicht signifikant).

3.1.4 Capsaicin-Sensibilität IB4-positiver und IB4-negativer Spinalganglienzellen

Durch die Vitalfärbung mit IB4 konnten die Neurone vor den Ableitungen als IB4-positiv bzw. IB4-negativ klassifiziert werden (Abb. 12). Nur Zellen mit einem eindeutigen Ergebnis der IB4-Färbung wurden für die Ableitungen benutzt. Eventuelle Einflüsse der elektrischen Eigenschaften der Neurone durch die IB4-Färbung konnten in

einem früheren Bericht ausgeschlossen werden (Stucky et al. 1998). Die Größe der untersuchten IB4-negativen Neurone unterschied sich nicht von der Größe der untersuchten IB4-positiven Neurone. In der Balb/C Maus betrug der mittlere Durchmesser und die mittlere Kapazität der IB4-positiven Zellen $23,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$ bzw. $20,4 \pm 0,4 \text{ pF}$ ($n= 74$), der IB4-negativen Zellen $24,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ bzw. $24,6 \pm 2,7 \text{ pF}$ ($n= 59$) ($p > 0,1$ respektive, $> 0,1$, ungepaarte t-Tests). Die entsprechenden Werte für die Wildtyp C57/Bl6 Maus war für die IB4-positive Zellen $22,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ bzw. $25,0 \pm 1,1 \text{ pF}$ ($n= 37$), für die IB4-negativen Zellen $22,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$ bzw. $25,1 \pm 2,0 \text{ pF}$ ($n= 36$) ($p > 0,4$ resp. $> 0,8$, ungepaarte t-Tests). In der C57/Bl6 (TRPV1+/+) Maus waren 32% der kultivierten Spinalganglienzellen IB4-positiv, in der TRPV1-/- Maus 34% (Caterina et al. 2000). In der Balb/C Maus konnte 33% der Zellen als IB4-positiv klassifiziert werden, somit war die Anzahl IB4-positiver Neurone in den drei untersuchten Genotypen nicht verschieden.

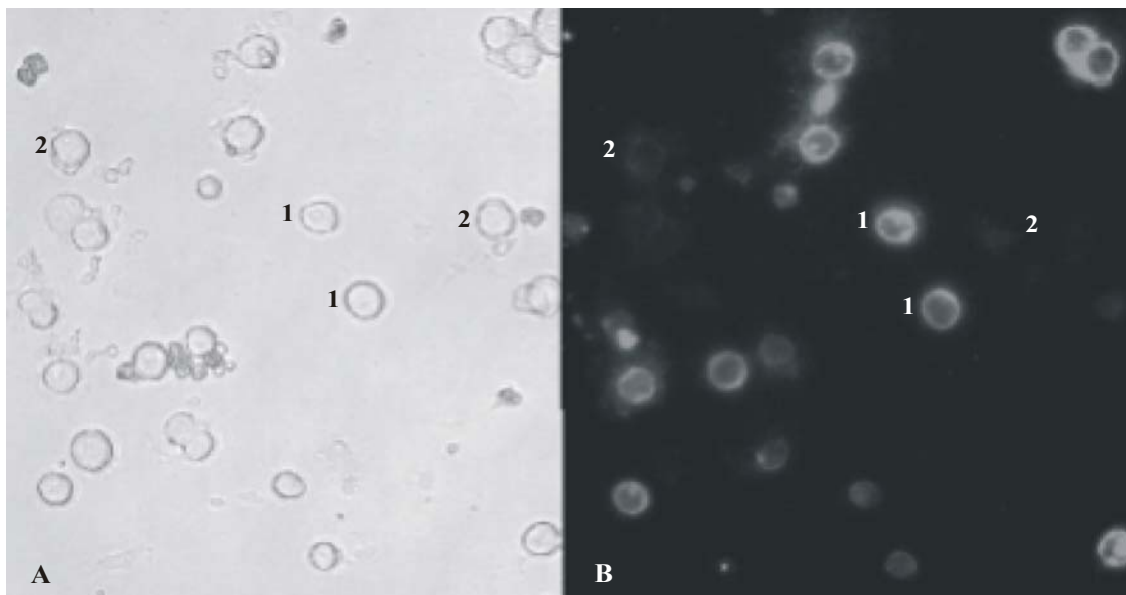


Abb. 12 Kultivierte Spinalganglienzellen einer adulten Maus (40x Vergrößerung). Durchlichtmikroskopie (A) und Fluoreszenzlichtmikroskopie (B) nach Vitalfärbung mit IB4-FITC. Nur Zellen mit einem eindeutigen Ergebnis der IB4-Färbung wurden untersucht; IB4-positiv (1) und IB4-negativ (2).

Von den untersuchten Zellen der Balb/C Maus waren 25,7% (19/74) der IB4-positiven und 28,2% (17/59) der IB4-negativen Zellen Capsaicin-sensibel. Die entsprechenden Daten von Untersuchungen der C57/Bl6 Maus waren ähnlich, 27,0% (10/37) der IB4-positiven Zellen und 36,1% (13/36) der IB4-negativen Zellen waren Capsaicin-sensibel. Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnten somit in keinem der beiden Mäusestämme signifikante Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz Capsaicin-sensibler Neurone zwischen IB4-positiven und -negativen Neuronen festgestellt werden ($p > 0,2$, Chi-Quadrat-Test). Die Größe der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme in IB4-positiven und IB4-negativen Zellen ist in Abbildung 14 dargestellt. In Ableitungen von Zellen der Balb/C Maus war die mittlere Amplitude der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme IB4-negativer Zellen signifikant größer als die mittlere Amplitude IB4-positiver Zellen (IB4-negativ: $2650,0 \pm 442,2$ pA ($n=17$), IB4-positiv: $1529,2 \pm 344,9$ pA ($n=19$)) ($p < 0,05$, ungepaarter t-Test). Ein entsprechender Unterschied ließ sich aber nicht in den Zellen der C57/Bl6 Maus feststellen (IB4-negativ: $1870,9 \pm 347,2$ pA ($n=13$), IB4-positiv: $2112,5 \pm 583,9$ pA ($n=10$)) ($p > 0,6$, ungepaarter t-Test). Hinsichtlich der Stromdichte der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme wurden in keinem der beiden Mäusestämme signifikante Unterschiede zwischen IB4-positiven und -negativen Neurone vorgefunden (Abb. 14). In der Balb/C Maus war die mittlere Stromdichte in der IB4-negativen Zellen tendenziell größer als in IB4-positiven Zellen, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (IB4-negativ: $118,5 \pm 15,9$ pA/pF, IB4-positiv: $76,8 \pm 22,9$ pA/pF) ($p > 0,1$, ungepaarter t-Test). In Zellen der C57/Bl6 Maus fand sich hinsichtlich der mittleren Stromdichte der Capsaicin-induzierten Einwärtsströme ebenso kein Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen (IB4-positiv: $69,8 \pm 18,1$ pA/pF; IB4-negativ: $75,1 \pm 13,9$ pA/pF) ($p > 0,7$, ungepaarter t-Test).

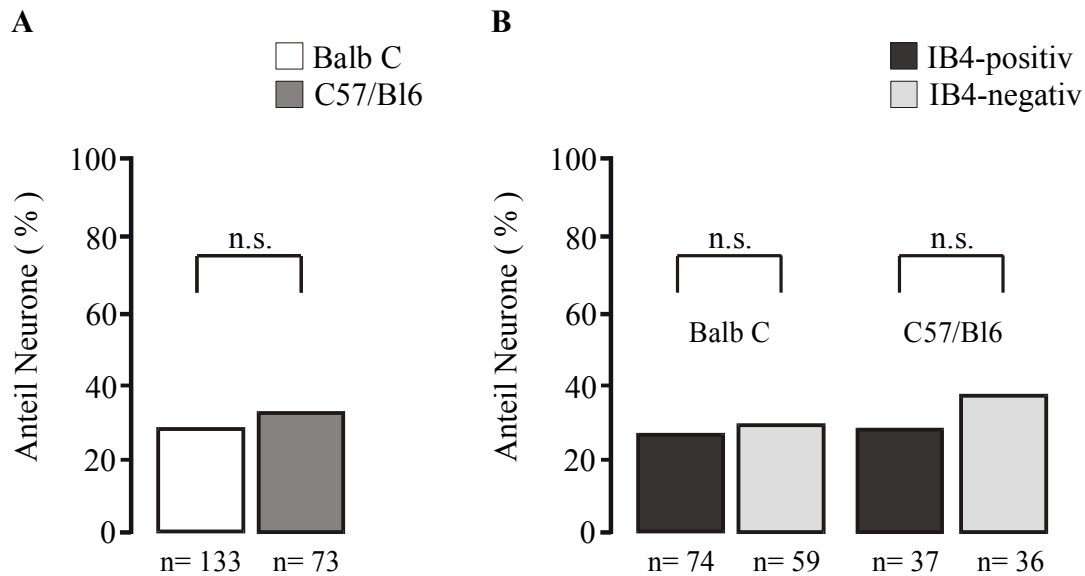


Abb. 13 A. Anteil Capsaicin-sensibler Neurone in Balb/C bzw. C57/B16 Tieren. B. Anteil Capsaicin-sensibler Neurone der IB4-positiven bzw. IB4-negativen Neuronen von Wildtyp Balb/C- und C57/B16- Tieren (Chi-Quadrat Test; n.s. nicht signifikant).

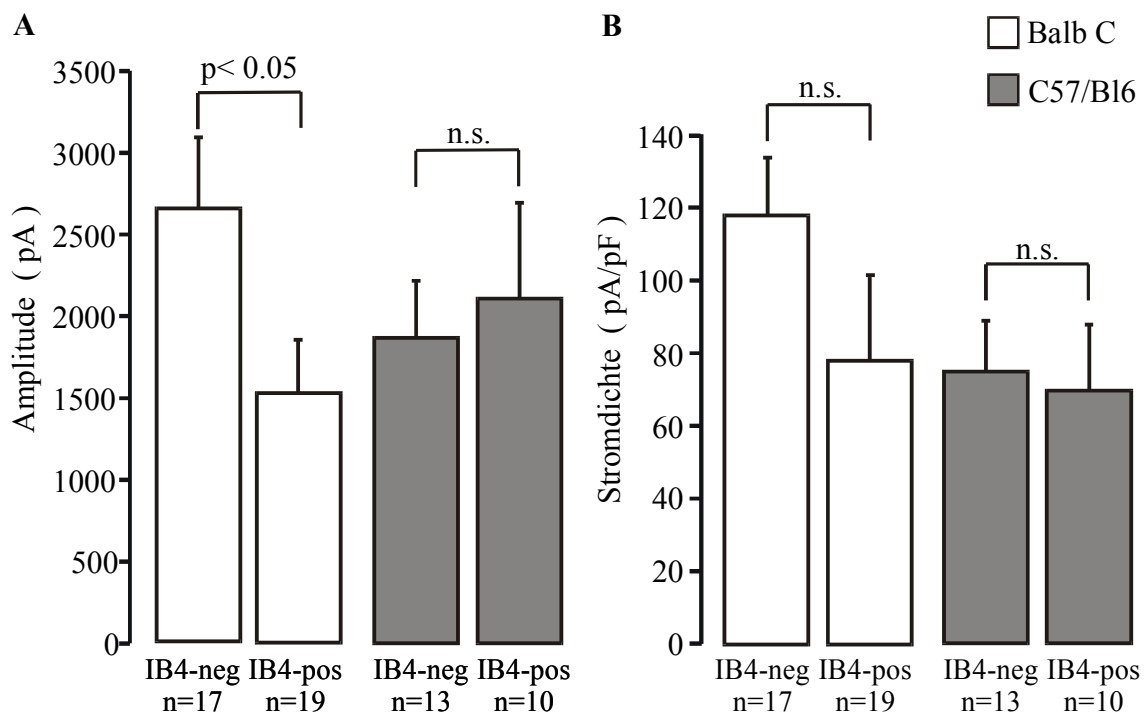


Abb. 14 Mittlere Amplitude (A), bzw. mittlere Stromdichte (B), Capsaicin-induzierter Einwärtsströme in IB4-positiven und IB4-negativen Neurone von Balb/C- oder C57/B16-Tieren (ungepaarter t-Test; n.s. nicht signifikant).

3.1 Protonen-Sensibilität in Nozizeptoren wird hauptsächlich von TRPV1 vermittelt

Die Vielzahl von Protonen-sensiblen Rezeptoren, die in Spinalganglienzellen exprimiert werden, ruft eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich Kinetik und Sensibilität von Protonen-induzierten Einwärtsströmen in diesen Neuronen hervor (Bevan und Yeats 1991; Benson et al. 2002). In dieser Studie wurde daher der Frage nachgegangen, welche Bedeutung TRPV1 in dieser Protonen-induzierten Aktivierung sensibler Neurone hat. Mittels Untersuchungen von Spinalganglienzellen von TRPV1^{+/+} und TRPV1^{-/-} Mäusen wurde diese Fragestellung mit der Patch-Clamp Technik bearbeitet. Eine extrazelluläre Lösung mit einem pH-Wert von 5,0 wurde als Stimulus verwendet. Eine Korrelation zwischen Protonen-Sensibilität und der Expression von TRPV1 wurde dargestellt, indem bei jeder Zelle auch die Capsaicin-Sensibilität geprüft wurde. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob sich IB4-positive und IB4-negative Neurone hinsichtlich ihrer Protonen-Sensibilität unterscheiden.

3.2.1 Die Expression von TRPV1 vermittelt Spinalganglienzellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Protonen

Zunächst wurden Zellen der Wildtyp (C57/B16) Maus untersucht. Insgesamt 50 Neurone zeigten bei Exposition von pH 5,0 Einwärtsströme mit unterschiedlichen kinetischen Merkmalen. Repräsentative Ableitungen Protonen-induzierter Einwärtsströme in Vanilloid-sensitiven (A) sowie Vanilloid-unempfindlichen Neuronen (B) werden in Abbildung 15 dargestellt. Die mittlere maximale Amplitude aller untersuchten Zellen betrug $731,2 \pm 121,1$ pA, entsprechend einer Stromdichte von $31,1 \pm 5,5$ pA/pF (n= 50). Protonen-induzierte Einwärtsströme der Vanilloid-sensiblen Zellen zeigten eine mittlere Amplitude von $1347,1 \pm 224,6$ pA, die mittlere Stromdichte betrug $53,5 \pm 10,8$ pA/pF (n= 21). Diese Einwärtsströme zeigten typischerweise eine langsame Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung, ähnlich der Kinetik Capsaicin-induzierter Einwärtsströme (Abb. 15A). Signifikant kleiner waren die Protonen-induzierten Einwärtsströme der Vanilloid-unempfindlichen Zellen der

TRPV1^{+/+} Maus ($285,2 \pm 40,9$ pA bzw. $14,9 \pm 3,0$ pA/pF; n= 31) (Abb. 17; $p < 0.001$, ungepaarter t-Test). Die Einwärtsströme der Vanilloid-unempfindlichen Zellen aktivierten typischerweise schnell und persistieren bis zum Ende der Applikation von Protonen (Abb. 15B).

Die Sensibilität für Protonen wurde dann in den Neuronen der TRPV1^{-/-} Maus untersucht, dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den Neuronen von TRPV1^{-/-} und TRPV1^{+/+} Tieren festgestellt. In den untersuchten Zellen der TRPV1^{-/-} Maus betrug die mittlere Amplitude der Protonen-induzierten Einwärtsströme $199,6 \pm 27,4$ pA, die mittlere Stromdichte betrug $9,9 \pm 1,6$ pA/pF (n= 44). Wie in Abbildung 16 dargestellt, waren somit die Einwärtsströme aller untersuchten Zellen von der TRPV1^{+/+} Maus signifikant größer als die Einwärtsströme aller untersuchten Zellen von der TRPV1^{-/-} Maus ($p < 0.01$, ungepaarter t-Test). Die Untersuchung der Protonen-Sensibilität der Vanilloid-unempfindlichen Zellen hingegen zeigte in beiden Genotypen ähnliche Ergebnisse. Die mittlere Amplitude und die mittlere Stromdichte Protonen-induzierter Einwärtsströme der TRPV^{-/-} Neurone unterschieden sich nicht von der mittleren Amplitude bzw. der mittleren Stromdichte der Vanilloid-unempfindlichen Zellen der TRPV1^{+/+} Maus (Abb. 17; $p > 0,1$ resp. $> 0,1$, ungepaarte t-Tests). Diese Daten zeigen die Bedeutung von TRPV1 als ein wichtiger Protonen-sensibler Rezeptor, aber auch, dass die Protonen-Sensibilität sensibler Neurone offensichtlich von weiteren Rezeptoren vermittelt wird. Abbildung 18A zeigt eine Reiz-Antwort-Funktion von Protonen-induzierten Einwärtsströmen in Spinalganglienzellen der Wildtyp Maus (C57/Bl6), induziert durch pH 6,0, 5,0 und 4,0. Die mittleren Amplituden der Einwärtsströme induziert durch pH 6,0 unterschieden sich nicht zwischen Capsaicin-sensiblen und Capsaicin-unempfindlichen Zellen nicht. Bei pH 5,0 hingegen zeigt sich hinsichtlich der mittleren Amplitude ein deutlicher Unterschied zwischen Capsaicin-sensiblen und Capsaicin-unempfindlichen Zellen. Die Ursache dafür könnte eine von TRPV1 in Vanilloid-sensiblen Zellen sein. Einwärtsströme induziert durch pH 4,0 zeigen weiterhin deutliche Unterschiede zwischen Vanilloid-sensiblen und – unempfindlichen Zellen; dieser Unterschied ist aber weniger deutlich als bei pH 5,0. Die Ursache ist wahrscheinlich eine Aktivierung weiterer Protonen-sensiblen Ionenkanäle. Hinweise dafür sind Protonen-induzierte Einwärtsströme mit kinetischen Merkmalen,

die typisch für die Gruppe der sogenannten „acid sensitive ion channels“ (ASIC) sind (Abb. 18B, siehe auch Diskussion).

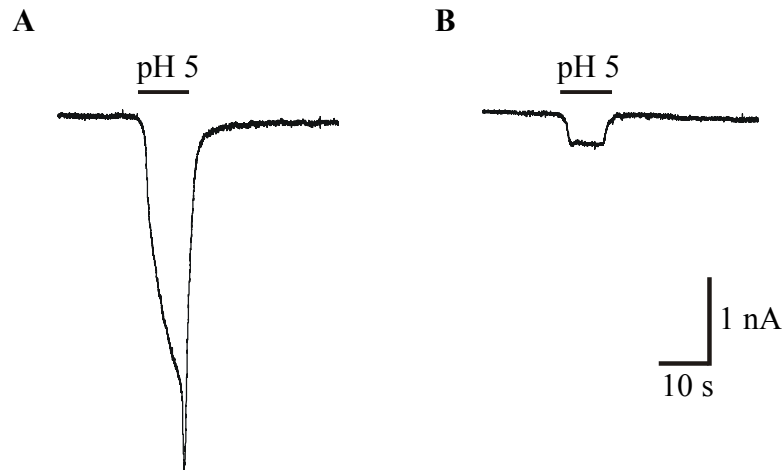


Abb. 15 Repräsentative Protonen-induzierte Einwärtsströme der Wildtyp Maus. A. Großer Einwärtsstrom mit kinetischen Merkmalen, die charakteristisch für Vanilloid-sensible Neurone sind. B. Kleiner Einwärtsstrom mit kinetischen Merkmalen, charakteristisch für Vanilloid-unempfindliche Neurone.

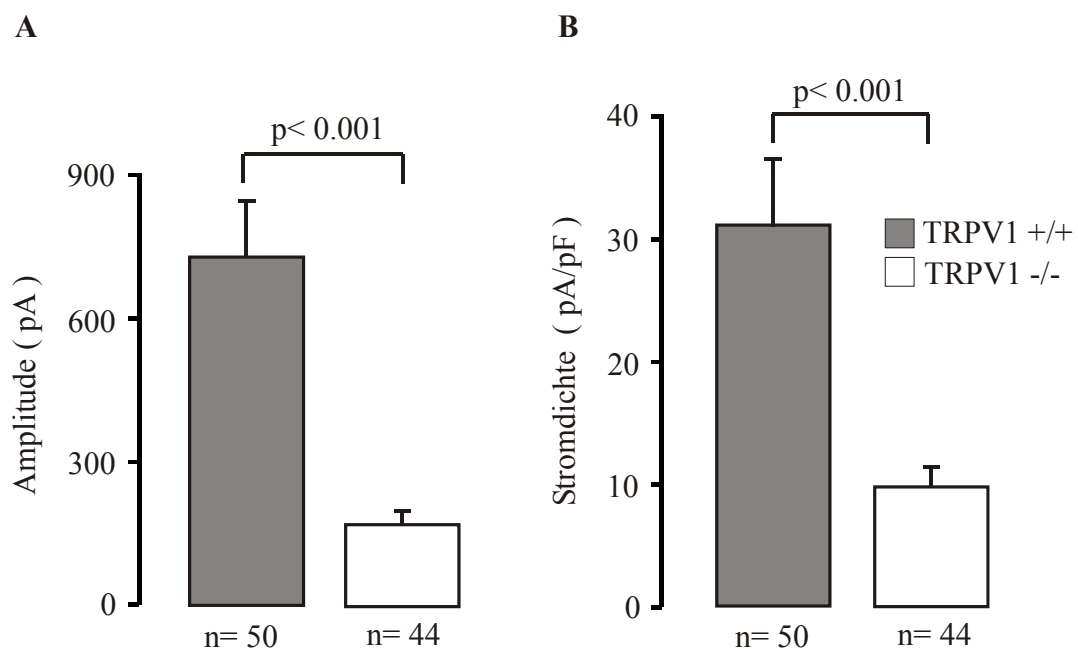


Abb. 16 Mittlere Amplitude (A) und mittlere Stromdichte (B) Protonen-induzierter Einwärtsströme der untersuchten Zellen von TRPV1+/+ und TRPV1-/- Tieren.

■ TRPV1^{+/+} Capsaicin-sensibel ■ TRPV1^{+/+} Capsaicin-insensibel □ TRPV1^{-/-} Alle Neurone

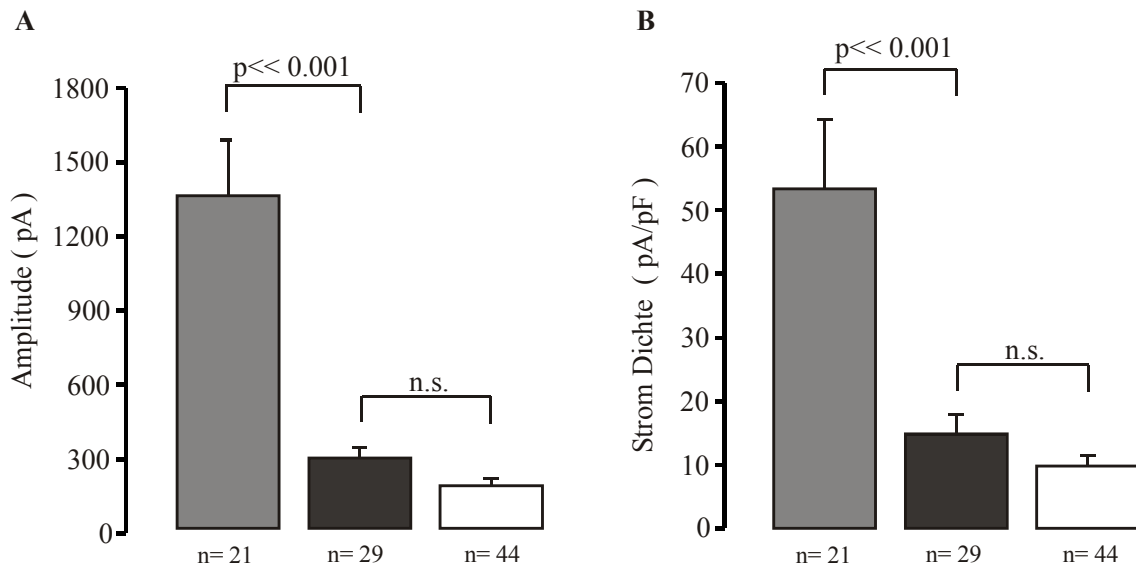


Abb. 17 Die mittlere Amplitude (A) und mittlere Stromdichte (B) der Protonen-induzierten (pH 5,0) Einwärtsströme in Capsaicin-sensiblen Zellen bzw. Capsaicin-unempfindlichen Zellen der TRPV1^{+/+} Maus, sowie allen untersuchten Zellen der TRPV1^{-/-} Maus.

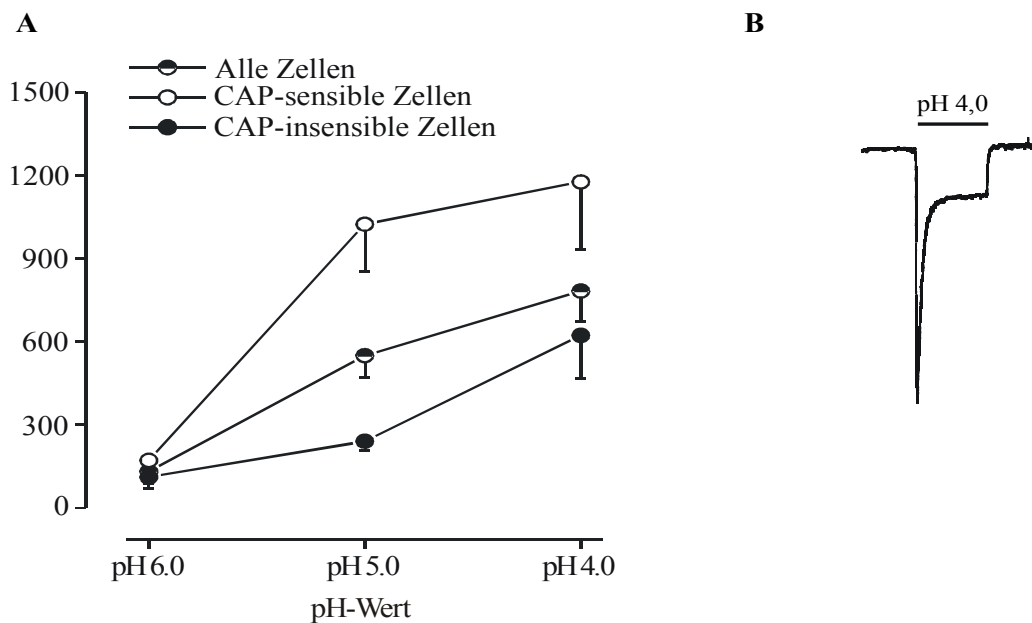


Abb. 18 A. Reiz-Antwort-Funktion von Protonen-induzierten Einwärtsströmen aktiviert durch pH 6,0, 5,0 und 4,0 in Spinalganglienzellen der Wildtyp Maus. B. Einwärtsstrom mit einem schnellen transienten Strom, gefolgt von einem langsamen persistierenden Strom, kinetische Merkmale typisch für ASICs (acid sensitive ion channels).

3.2.2 Protonen-induzierte Einwärtsströme in IB4-positiven und IB4-negativen Spinalganglienzellen

Hinsichtlich der Capsaicin-Sensibilität zeigten sich keine Unterschiede zwischen IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen in der Wildtyp (C57/B16) Maus. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnten auch keine Unterschiede hinsichtlich der Protonen-Sensibilität (pH 5,0) zwischen IB4-positiven und -negativen Zellen nachgewiesen werden. In Neuronen der TRPV1^{+/+} Maus betrug die mittlere Amplitude der IB4-negativen Zellen $728,1 \pm 133,1$ pA und die mittlere Stromdichte $32,3 \pm 4,8$ pA/pF (n= 26). Die entsprechenden Werte der IB4-positiven Zellen betragen $734,6 \pm 213,7$ pA bzw. $29,8 \pm 10,5$ pA/pF (n= 24) ($p > 0,9$ resp. $> 0,8$, ungepaarter t-Test). Für Zellen der TRPV1^{-/-} Maus, die alle Capsaicin-unempfindlich waren, wurden die IB4-positiven und IB4-negativen Zellen hinsichtlich ihrer Sensibilität für Protonen in gleicher Weise untersucht. Die mittlere Amplitude der IB4-negativen Zellen betrug $224,3 \pm 40,6$ pA und die mittlere Stromdichte $11,1 \pm 2,3$ pA/pF (n= 15). Ähnliche Werte wurden für die IB4-positiven Zellen erhoben, $186,8 \pm 36,6$ pA bzw. $9,3 \pm 2,1$ pA/pF (n= 29) ($p > 0,5$ resp. $0,5$, ungepaarte t-Tests). Die Abwesenheit von TRPV1 resultierte somit in einer Reduktion der Protonen-Sensibilität in IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen.

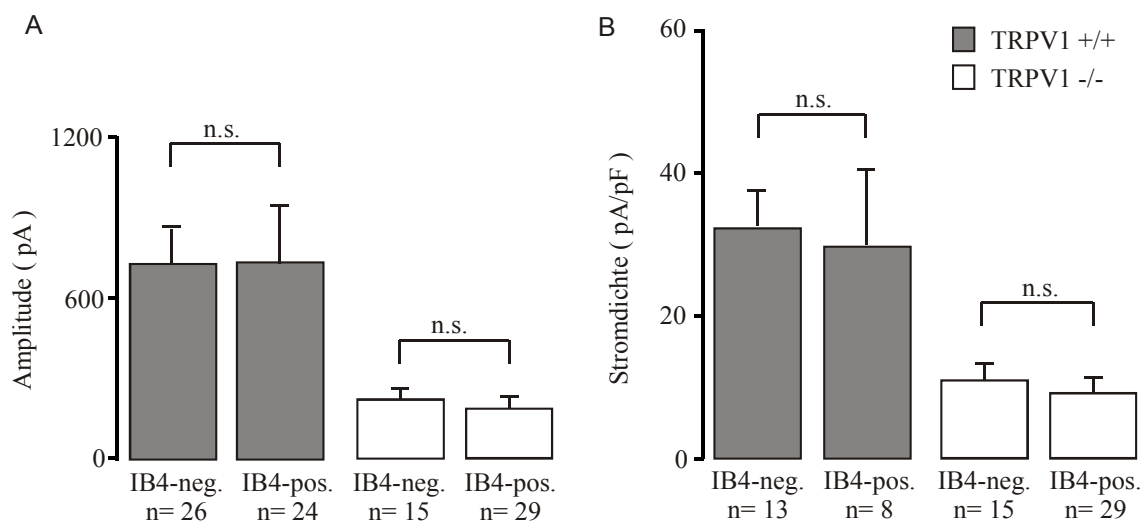


Abb. 19 Mittlere Amplitude (A) bzw. mittlere Stromdichte Protonen-induzierten Einwärtsströmen von IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen in TRPV1^{+/+} und TRPV1^{-/-} Mäusen.

3.2 Hitze-Sensibilität in Nozizeptoren wird hauptsächlich von TRPV1 vermittelt

Die Rolle von TRPV1 bei der Hitze-Sensibilität sensorischer Neurone sollte mit Hilfe der TRPV1^{-/-} Maus untersucht werden. Einzelne Neurone wurden in der Whole-Cell Konfiguration mit einem standardisierten Hitzereiz untersucht (siehe Methodik). Um Hitze-Rezeptoren mit unterschiedlichen Temperatur-Schwellen erfassen zu können, wurde der Hitzereiz in Form einer Rampe appliziert. Innerhalb von 11s wurde die extrazelluläre Lösung von einer Ausgangstemperatur von ca. 30°C auf ca. 60°C erwärmt. Um eine Korrelation zwischen Hitze-Sensibilität und Expression von TRPV1 zu ermöglichen, wurde für jede untersuchte Zelle auch die Capsaicin-Sensibilität geprüft.

3.3.1 Reduzierte Hitze-induzierte Einwärtsströme in sensorischen Neuronen der TRPV1^{-/-} Maus

Zunächst wurden 47 Spinalganglienzellen von TRPV1^{+/+} Tieren auf deren Hitze-Sensibilität geprüft. Wie in Abbildung 20 dargestellt, wurden drei Zellpopulationen mit unterschiedlichen Sensibilitäten für Hitze beobachtet. Die größte Population zeigte keine Hitze-induzierten Einwärtsströme bei Temperaturen bis 60°C und kann daher als Hitze-unempfindlich bezeichnet werden (Abb. 20A). Der Anteil dieser Hitze-unempfindlichen Zellen in der TRPV1^{+/+} Maus ist 48,9% (23/47). In keiner dieser Zellen wurden Vanilloid-induzierte Einwärtsströme beobachtet, d.h. keine dieser Hitze-unempfindlichen Zellen exprimiert TRPV1. In der zweiten Zellpopulation wurden Hitze-induzierten Einwärtsströme beobachtet, die bei Temperaturen über 43°C aktiviert wurden (Abb. 20C). Der Anteil dieser Neuronenpopulation in der TRPV1^{+/+} Maus betrug 44,7% (21/47). Diese Zellen zeigten Capsaicin-induzierte Einwärtsströme. Die dritte und kleinste Neuronenpopulation wurde durch Hitze-induzierte Einwärtsströme charakterisiert, die erst über 50°C aktiviert wurden (Abb. 20E). In 6,4% (3/47) der Zellen der TRPV1^{+/+} Maus wurden diese Hitze-induzierten Einwärtsströme beobachtet. In keiner dieser Zellen wurden Capsaicin-induzierte Einwärtsströme beobachtet. Hitze-induzierte Einwärtsströme mit einer Aktivierung bei Temperaturen von über 50°C

wurden bereits in sensorischen Neuronen beschrieben, aber vorwiegend in größeren Zellen ($> 30\mu\text{m}$) (Nagy und Rang 1999a). Die mittlere Größe der Zellen, die in dieser Arbeit „hochschwellige“ Hitze-Sensibilität aufwiesen, betrug in der TRPV1+/+ Maus $25,8 \pm 2,7 \mu\text{m}$ bzw. $26,2 \pm 4,1 \text{ pF}$ und ist damit tendenziell größer als die der Hitze-unempfindlichen Zellen ($23,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ bzw. $22,8 \pm 1,3 \text{ pF}$) und die der Hitze- und Vanilloid-sensiblen Zellen ($21,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ bzw. $27,9 \pm 2,6 \text{ pF}$). Weiterhin waren alle Zellen mit dieser Hitze-Sensibilität IB4-negativ.

Bei der Analyse von Spinalganglienzellen der TRPV1-/- Maus wurden bemerkenswerte Defizite hinsichtlich der Hitze-Sensibilität festgestellt. Insgesamt 72 Zellen der TRPV1-/- Maus wurden mit dem Hitze-Stimulus untersucht. 91,7% (66/72) der untersuchten Zellen waren Hitze-unempfindlich, d.h. diese Zellen zeigten keine Einwärtsströme bei Temperaturen bis 60°C . Somit war der Anteil der Hitze-unempfindlichen Zellen in der TRPV1-/- Maus hoch signifikant größer als in der TRPV1+/+ Maus (Abb. 20B) ($p < 0.001$, Chi-Quadrat Test). Hitze-induzierte Einwärtsströme mit einer Aktivierung bei Temperaturen von mehr als 43°C , die typischerweise in Capsaicin-sensiblen Zellen der TRPV1+/+ Maus vorgefunden wurden, wurden in keiner (0/72) der untersuchten Zellen der TRPV1-/- Maus beobachtet. Einwärtsströme mit diesem Profil wurden somit nur in Vanilloid-sensiblen Zellen der TRPV1+/+ Maus beobachtet und scheinen aus dem Grund durch die Aktivierung von TRPV1 zu entstehen. Die Prävalenz von Neuronen mit diesen Hitze-induzierten Einwärtsströmen und mit einer Aktivierung bei Temperaturen über 43°C war somit auch hoch signifikant größer in TRPV1+/+ - als in TRPV1-/- Tieren (Abb. 20D) ($p < 0.001$, Chi-Quadrat Test). Die dritte Population mit Hitze-induzierten Einwärtsströmen mit Temperaturschwellen über 50°C wurde hingegen in 8,3% (6/72) der untersuchten Zellen der TRPV1-/- Maus beobachtet. Die Prävalenz dieser Zellpopulation ist somit nicht signifikant unterschiedlich zwischen TRPV1+/+ und TRPV1-/- Mäusen (Abb. 20F) ($p > 0,1$, Chi-Quadrat Test). Die mittlere Größe der Zellen mit hochschwelligen Hitze-induzierten Einwärtsströmen betrug in der TRPV1-/- Maus $21,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ bzw. $23,1 \pm 3,2 \text{ pF}$ und ist somit nicht größer als die der Hitze-unempfindlichen Neurone des TRPV1-/- Genotyps ($23,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$ bzw. $22,8 \pm 1,1 \text{ pF}$). Im Gegensatz zu der Wildtyp Maus, wo die hochschwellige Hitze-Sensibilität nur in IB4-negativen beobachtet wurde, waren in der TRPV1-/- Maus alle Zellen dieser Kategorie IB4-positiv.

In Abbildung 21 wird die Temperaturabhängigkeit der Hitze-induzierten Einwärtsströmen der jeweiligen Zellpopulationen dargestellt. Die Temperatur-Schwelle der Hitze-induzierten Einwärtsströme der Vanilloid-sensiblen Zellen der TRPV1+/+ Maus liegt bei 43- 45°C, während die Einwärtsströme der Vanilloid-unempfindlichen- und Hitze-sensiblen Zellen der TRPV1+/+ und TRPV1-/- Tieren erst bei Temperaturen über 50°C aktiviert wurden. Die mittlere Hitze-Antwort der Zellen ohne deutliche Hitze-induzierte Einwärtsströme zeigt einen passiven Einwärtsstrom ohne eine spezifische Temperatur-Schwelle. Wie die Capsaicin-induzierten Einwärtsströme waren auch die einzelnen Spitzenamplituden der Hitze-induzierten Einwärtsströme sehr variabel. Um eine eventuelle Korrelation zwischen der Sensibilität auf Capsaicin und Hitze nachweisen zu können, wurden die jeweiligen Amplituden gegeneinander aufgetragen (Abb. 22). Der lineare Korrelationskoeffizient für die Sensibilität auf Capsaicin und Hitze betrug 0,70 (n= 49; p < 0,001) über alle Zellen. Die Abbildung zeigt deutlich, dass Zellen mit einer kleinen Amplitude des Capsaicin-Stromes sehr große Hitze-Ströme aufweisen konnten. Im Gegensatz dazu zeigten einige Zellen mit einer großen Amplitude des Capsaicin-Stromes sehr kleine Hitze-Ströme.

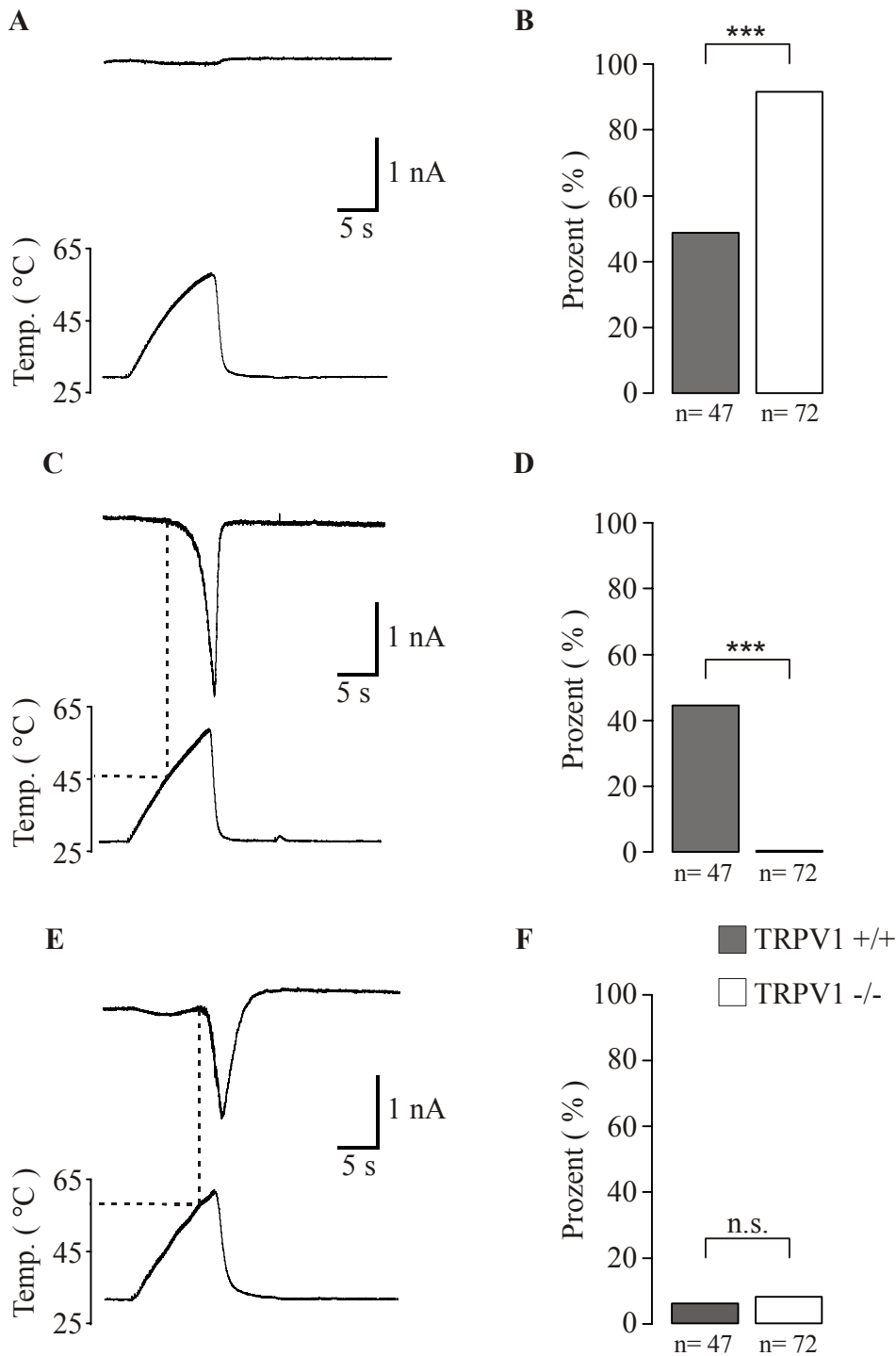


Abb. 20 Repräsentative Beispiele für Hitze-induzierte Einwärtsströme sowie deren Prävalenz in Spinalganglienzellen von TRPV1^{-/-} und TRPV1^{+/+} Tieren. A, B. Hitze-unempfindliche Zellen ohne Einwärtsstrom bei Temperaturen bis 60°C. C, D. Hitze- und Vanilloid-sensible Zellen mit Hitze-induzierten Einwärtsströmen ab 43°C (nur in TRPV1^{+/+}). E, F. Hitze-sensible Zellen mit Hitze-induzierten Einwärtsströmen über 50°C. (Chi-Quadrat Test, *** hoch signifikant; n.s. nicht signifikant).

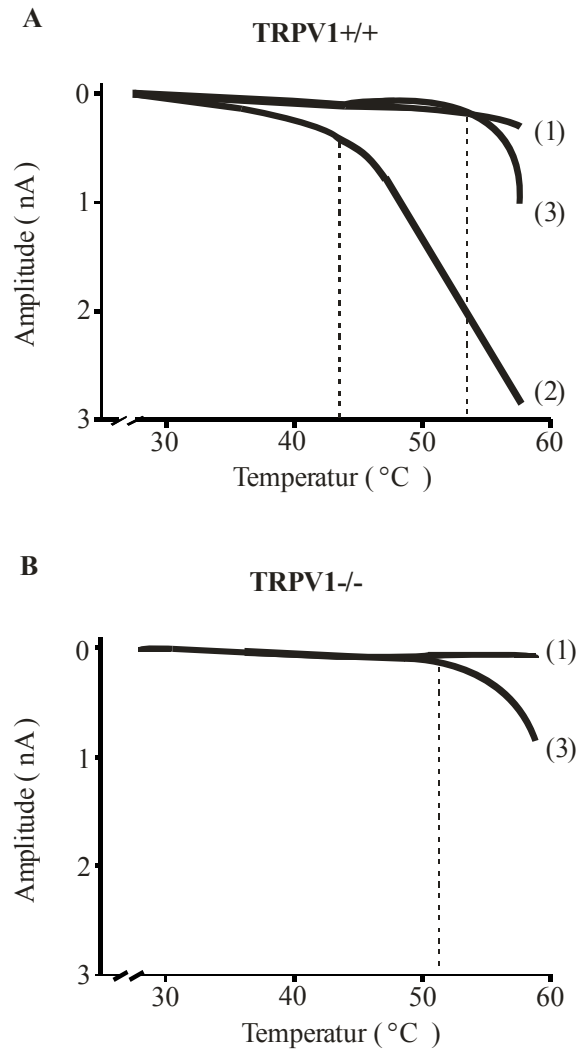


Abb. 21 Mittlere-Hitze Antwort der untersuchten Zellen von TRPV1+/+ (A) und TRPV1-/- (B) Tieren. Die Mehrzahl der Vanilloid-unempfindlichen Zellen wiesen keine Hitze-induzierten Einwärtsströme auf (1). Vanilloid-sensible Zellen wiesen Hitze-induzierten Einwärtsströme auf, die ab ca. 43°C aktiviert wurden (2). Einige Vanilloid-unempfindliche Zellen wiesen Hitze-induzierten Einwärtsströme auf, die über 50°C aktiviert wurden (3).

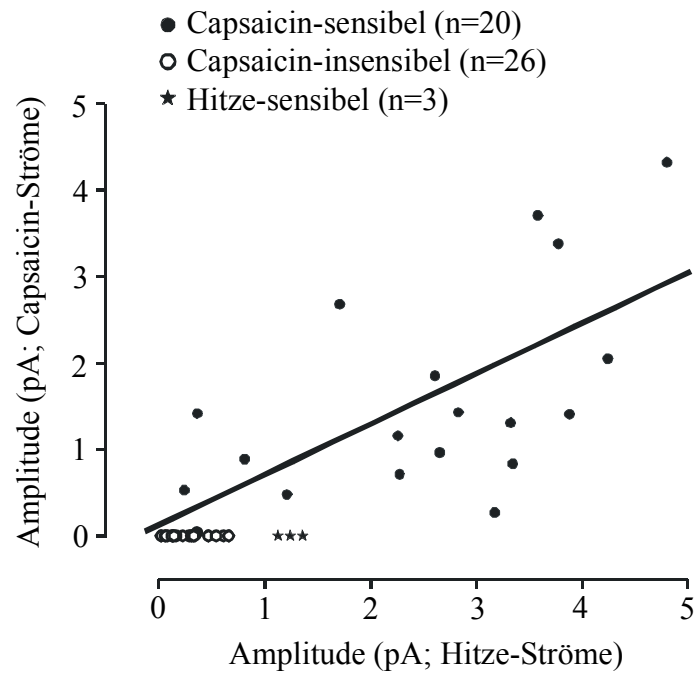


Abb. 22 Korrelation der Spitzenamplituden der Capsaicin- (Ordinate) und Hitze-induzierten (Serzisse) Einwärtsströmen in der Wildtyp Maus. Korrelationskoeffizient für alle Messwerte, $r = 0.70$ ($p < 0.001$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der Patch-Clamp Technik Untersuchungen an definierten Populationen von Spinalganglienzellen von TRPV1-defizienten Mäusen und an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Spinalganglienzellen durch Vanilloide, Protonen und Hitze, maßgeblich von TRPV1 vermittelt wird. Die Patch-Clamp Untersuchungen können mit weiteren umfassenden Studien der TRPV1-defizienten Maus verglichen werden (Tabelle 2; Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000).

Unser Verständnis über die Mechanismen der Aktivierung von Nozizeptoren durch verschiedene Stimuli konnte in den letzten Jahren stark erweitert werden. Vor allem durch die Fortschritte im molekularbiologischen Bereich liegen gegenwärtig vielversprechende Genprodukte vor, die bei der Erforschung der molekularen Transduktionsmechanismen in sensorischen Neuronen von größtem Interesse sind (Snider und McMahon 1998; Eglén et al. 1999; Wood 2000; Julius und Basbaum 2001). Der unlängst klonierte Vanilloid Rezeptor, TRPV1, zeigt vielversprechende Eigenschaften für solch ein Transduktionsmechanismus auf. TRPV1 kann als ein polymodaler Rezeptor betrachtet werden. Die ersten beschriebenen Agonisten von TRPV1 in heterologen Expressionssystemen waren Vanilloide, Protonen ($\text{pH} < 6.0$) und Hitze ($< 43^\circ\text{C}$) (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). Inzwischen ist die Liste der TRPV1-Agonisten um ein Vielfaches erweitert worden, unter anderem konnten endogene Substanzen wie Endocannabinoide (Anandamid) und Eicosanoide (Leukotrien B₄) als TRPV1-Agonisten identifiziert werden (Zygmunt et al. 1999; Hwang et al. 2000). Die Expression von TRPV1 ist nahezu ausschließlich auf die umschriebene Population von Neuronen begrenzt, die als Nozizeptoren klassifiziert werden (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Julius und Basbaum 2001). Berichte über eine Expression von TRPV1 in verschiedenen neuronalen Geweben im ZNS liegen zwar vor, bisher fehlen aber eindeutige Studien für das Vorliegen dieser Rezeptoren ausserhalb des Hypothalamus (Mezey et al. 2000). Eine Gruppe der Nozizeptoren ist polymodal und kann definitionsgemäß mechanisch und thermisch ($< 43^\circ\text{C}$) aktiviert werden, aber auch chemisch z.B. durch Capsaicin oder Protonen (Raja et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Die funktionelle Parallele zwischen polymodalen

Nozizeptoren und TRPV1, zusammen mit der spezifischen Expression von TRPV1 in diesen Neuronen, lassen vermuten, dass TRPV1 eine bedeutende Funktion in Nozizeptoren ausübt (Caterina und Julius 2001b).

4.1 TRPV1 und Vanilloid-Sensibilität

Die Vanilloid-Sensibilität von Nozizeptoren wird seit mehr als 30 Jahren intensiv erforscht (Jancso et al. 1967, Szolcsanyi und Jancso-Gabor 1975; Heyman und Rang 1985; Wood et al 1988; Holzer 1991; Szallasi und Blumberg 1999). Aufgrund pharmakologischer Experimente wurde schon früh vermutet, dass ein oder mehrere „Capsaicin-Rezeptoren“ in sensorischen Neuronen existieren (Szallasi und Blumberg 1990; Holzer 1991). Jedoch dauerte es bis 1997, bevor TRPV1 als der erste Capsaicin- bzw. Vanilloid-Rezeptor kloniert werden konnte (Caterina et al. 1997). Das Fehlen jeglicher Vanilloid-Sensibilität in kultivierten Spinalganglienzellen der TRPV1-defizienten Maus zeigt, dass TRPV1 die Vanilloid-Sensibilität dieser Neurone generiert. In weiteren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass die Vanilloid-Sensitivität in den transgenen Tieren ohne TRPV1 entweder stark reduziert war, oder in den meisten Fällen völlig fehlte (Tabelle 2, Caterina et al. 2000). Die fehlende Vanilloid-Sensibilität *in vivo* konnte sehr elegant durch einen nicht invasiven aversiven Verhaltenstest demonstriert werden. Bei diesem Test wurde TRPV1-defizienten und Wildtyp-Mäusen Trinkwasser angeboten, das mit Capsaicin gesättigt wurde. Während Wildtyp-Mäuse nach einem ersten Versuch die Aufnahme dieser wässrigen Capsaicinlösung abrupt einstellten, wurde bei der TRPV1-defizienten Mäusen kein verändertes Trinkverhalten beobachtet (Caterina et al. 2000).

In der Literatur herrschte Uneinigkeit darüber, ob TRPV1, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, der einzige Rezeptor für sowohl Capsaicin als für RTX darstellt. Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, sind Capsaicin-induzierte Einwärtsströme hinsichtlich deren kinetischer Merkmale uneinheitlich. Aus diesem Grund wurde wiederholt die Existenz von mehreren Capsaicin-Rezeptoren vorgeschlagen (Liu und Simon 1994; Petersen et al. 1996). Eine mögliche Erklärung für diese Heterogenität der TRPV1-vermittelten Einwärtsströme, ist die Formation von Heteromultimären aus

TRPV1 (TRPV1) mit anderen TRP-Untereinheiten bzw. TRPV1-Splice Varianten. Die Vanilloid-unempfindliche TRP-Untereinheiten TRPV2 (VRL-1), TRPV3, TRPM8 und die TRPV1-Splicevariante VR5'SV werden alle in sensorischen Neuronen exprimiert. (Caterina et al. 1999; Schumacher et al. 2000; Peier et al., 2002a, b; McKemy et al. 2002; Smith et al. 2002; Xu et al. 2002). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass funktionelle Eigenschaften von TRPV1 durch die Co-Expression mit TRPV3 verändert werden (Smith et al. 2002).

Weiterhin ist anhand von Studien mit Resiniferatoxin die Existenz von mehreren Vanilloid-Rezeptoren vorgeschlagen worden (Ács et al. 1996; Szallasi und Blumberg 1996; Biró et al., 1997). Unter anderem zeigten sich in Arbeiten über Rezeptor-Bindungsaffinität und ⁴⁵Calcium-Aufnahme deutliche Unterschiede zwischen Resiniferatoxin und Capsaicin. Dabei zeigte Resiniferatoxin eine 25fach höhere Bindungsaffinität in Relation zur RTX-induzierten ⁴⁵Ca-Aufnahme, während die Affinität für die Capsaicin-induzierte ⁴⁵Ca-Aufnahme in Relation zur Bindungsaffinität größer war (Ács et al. 1996). Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass die Expression von TRPV1 auch für die RTX-Sensibilität von Spinalganglienzellen notwendig ist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist eine Interaktion von RTX mit weiteren TRP-Untereinheiten, Heteromultimären aus TRP-Untereinheiten oder anderen noch unbekanntem Membranproteinen, die aber nicht durch Vanilloide aktiviert werden bzw. keine Calcium-Aufnahme verursachen (Szallasi und Blumberg 1999). Weitere Bindungsstudien an Neuronen der TRPV1-defizienten Maus mit RTX und anderen Vanilloiden könnten diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern.

Bei der Expression von mehreren TRP-Untereinheiten in Spinalganglienzellen mag es überraschend sein, dass TRPV1 der einzige Vanilloid-sensible Rezeptor ist. Trotz der Sequenz-Ähnlichkeit der TRP-Rezeptoren scheint die Vanilloid-Sensibilität nur von wenigen Aminosäuren im TRPV1 kodiert zu werden. Die Sensibilität des TRPV1-Rezeptors für Vanilloide, Protonen und Hitze werden durch Mutationen der intrazellulär lokalisierten C- und N-Termini verändert (Schumacher et al. 2000; Vlachova et al. 2003). Für die Vanilloid-Sensibilität alleine hingegen scheint die Sequenz von etwa 8 intrazellulär lokalisierten Aminosäureresten im dritten transmembranen Segment verantwortlich zu sein (Jordt und Julius 2001). Interessanterweise ist diese Sequenz im TRPV1 vom Mensch, Ratte und Maus konserviert, nicht aber im Vanilloid-

unempfindlichen TRPV1 des Hünchens oder im TRPV2 von Säugetieren. Der Einbau dieser spezifischen Aminosäuresequenz im TRPV1 des Hünchens bzw. im TRPV2 der Ratte, resultiert in Vanilloid-sensiblen Rezeptoren (Jordt und Julius 2001).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass sowohl IB4-positive als auch IB4-negative Spinalganglienzellen der Ratte TRPV1 exprimieren (Tominaga et al. 1998; Michael und Priestley 1999; Guo et al. 1999). Weiterhin ist bekannt, dass NGF und GDNF regulierende Effekte sowohl auf die TRPV1-Expression als auch auf die Vanilloid-Sensibilität an kultivierten Spinalganglienzellen haben (Winter et al. 1988; Ogun-Muyiwa et al. 1999; Schmidt und Koltzenburg 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Vanilloid-Sensibilität zwischen IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen einer neuen Arbeit, in der von einer größeren Vanilloid- und Protonen-Sensibilität in IB4-negativen Neuronen berichtet wird (Dirajlal et al. 2003). Diese Diskrepanz ist unter Umständen durch technische Parameter zu erklären. Beispielsweise lässt die IB4-FITC Färbung an vitalen Neuronen nicht immer eine zuverlässige Beurteilung zwischen IB4-positiven und IB4-negativen Neuronen zu. Weiterhin ist die Auswahl der zu untersuchenden Spinalganglienzellen von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen streng auf klein- bis mittelgroße Neurone begrenzt, die aus zervikalen, thorakalen oder lumbalen Spinalganglien stammten. In anderen Arbeitsgruppen wurden z.B. nur die Ganglien L4 – L6 entnommen oder Experimente werden sowohl an kleinen wie auch an großen Spinalganglienzellen durchgeführt. Diese unterschiedlichen Versuchsbedingungen könnten zu den verschiedenen Befunden beitragen.

In der vorliegenden Studie wurden Neurone von zwei Wildtyp-Stämmen untersucht: C57/Bl6 und Balb/C. In Arbeiten, in denen das nozizeptive Verhalten verschiedener Mäuse-Stämme untersucht wurde, wurden deutliche Unterschiede zwischen C57/Bl6 und Balb/C Mäusen vorgefunden (Mogil et al. 1999; Lariviere et al. 2001). Dabei zeigten C57/Bl6 eine stärkere thermische Sensibilität im Vergleich zu Balb/C Mäusen. Ebenso war die Ausprägung der Capsaicin-Sensibilität und der Capsaicin-induzierten thermischen Hyperalgesie geringfügig stärker in den C57/Bl6 Mäusen als in den Balb/C Mäusen. In der vorliegenden Arbeit konnten aber keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Vanilloid-Sensibilität von Spinalganglienzellen zwischen C57/Bl6 und

Balb/C Mäuse festgestellt werden. Es ist möglich, dass die Anzahl der untersuchten Neurone nicht ausreichend war, um diese Unterschiede auf einer zellulären Ebene aufzuzeigen. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit sämtliche Spinalganglien für die DRG Kulturen verwendet, daher wurden neben kutanen Afferenzen auch wahrscheinlich Afferenzen der Viszera und tiefer somatischen Gewebe untersucht. In Verhaltens-Experimenten hingegen werden fast ausschließlich kutane Nozizeptoren der Hinterpfote stimuliert (Ganglion L4 – L6). Es ist möglich, dass das Expressionsmuster von TRPV1 in tiefen somatischen, viszeralen und kutanen Nozizeptoren unterschiedlich ist. Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz zwischen der vorliegenden *in vitro* Untersuchung und den Verhaltensuntersuchungen in Mogils Arbeit ist eine unterschiedliche Expression von Proteinen, die mit der Aktivierung von TRPV1 assoziiert sind. So wurde in einer Studie an C57/Bl6- und AKR-Mäusen (thermische Sensibilität C57/Bl6 > AKR), eine höhere Expression von TRPV1 und dem dem Neuropeptid CGRP in Neuronen der C57/Bl6 Mäuse gefunden (Miermeister et al. 2002). Die Folge dieser Konstellation wäre eine erhöhte Freisetzung von CGRP in Folge einer TRPV1-Aktivierung peptidhaltiger Neurone (IB4-negativ) und möglicherweise eine gesteigerte synaptische Übertragung auf sekundäre Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks.

4.2 TRPV1 und Protonen-Sensibilität

Entzündung oder Nekrose nach einer Gewebsschädigung, kann zu einer signifikanten Ansäuerung des Gewebes führen (Reeh und Steen 1996). Eine Folge davon ist die Aktivierung von Nozizeptoren und demzufolge die Entstehung von Schmerzen (Steen und Reeh 1993; Steen et al. 1995). Die durch Protonen vermittelte Aktivierung von Nozizeptoren scheint durch eine Vielzahl von Protonen-sensiblen Rezeptoren vermittelt zu werden. Dies korreliert mit der ausgeprägten Heterogenität der Protonen-induzierten Einwärtsströme in Spinalganglienzellen (Bevan und Yeats 1991; Kress und Zeilhofer 1999; Julius und Basbaum 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protonen-Sensibilität sensorischer Neurone der Maus von der TRPV1-Expression abhängt. Dabei zeigten Neurone der TRPV1-defizienten Maus und

Vanilloid-unempfindlichen Neuronen der Wildtyp-Maus ähnlich geringe Protonen-Sensibilitäten, die signifikant kleiner waren als die Protonen-Sensibilität der Vanilloid-sensiblen Neurone. Im Gegensatz zu der fehlenden Vanilloid-Sensibilität in der TRPV1-defizienten Maus zeigte sich für die Protonen-Sensibilität nur eine deutliche Reduktion. Es ist wahrscheinlich, dass die verbleibende Protonen-Sensibilität zum Teil durch Untereinheiten der ASICs generiert wird. Bisher wurden sechs ASIC-Untereinheiten in Spinalganglienzellen identifiziert: ASIC1a und b, ASIC2a und b, ASIC3 und ASIC4. Diese können funktionelle Homomere oder Heteromultimere bilden (Waldmann et al. 1997a, b; Chen et al. 1998; Bassilana et al. 1997; Lingueglia et al. 1997; Babinski et al. 2000; Akopian et al. 2000; Benson et al. 2002). Einwärtsströme vermittelt durch ASICs zeigen charakteristische kinetische Merkmale mit einem schnellen, transienten Einwärtsstrom, gefolgt von einem langsamen, persistierenden Einwärtsstrom (Abb. 18 B; Waldmann und Lazdunski 1998; Sutherland et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden in kleinen und mittelgroßen Spinalganglienzellen der Maus (TRPV1-defizient und Wildtyp) nur geringe Einwärtsströme mit dieser Charakteristik vorgefunden (Leffler et al. 2000). Das Expressionsmuster der einzelnen ASIC-Untereinheiten in Spinalganglienzellen der Maus wurde bisher nicht ausführlich beschrieben. Patch-Clamp Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass ASIC-ähnliche Einwärtsströme hauptsächlich in den großen Spinalganglienzellen der Maus vorkommen (Benson et al. 2002; Xie et al. 2002). Die Expression der meisten ASIC-Untereinheiten scheint in der Ratte hauptsächlich auf die IB4-negative Neuronenpopulation beschränkt zu sein (Olsson et al. 1998; Chen et al. 1998; Akopian et al. 2000; Immke et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnten wie schon für die Vanilloid-Sensibilität keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Protonen-Sensibilität zwischen IB4-negativen und IB4-positiven Neuronen nachgewiesen werden. ASIC-ähnliche Einwärtsströme werden aber hauptsächlich in IB4-negativen Neuronen der Maus gefunden, sowohl in der TRPV1-defizienten- als auch in der Wildtyp-Maus (Leffler et al. 2000; Dirajlal et al. 2003). Die vorliegende Arbeit steht im Gegensatz zu der Arbeit von Dirajlal et al. (2003), in der größere Protonen-induzierte Einwärtsströme in den IB4-negativen Zellen gefunden wurden. Wie oben diskutiert, könnte diese Diskrepanz zwischen den beiden Studien auf unterschiedlichen experimentellen Bedingungen beruhen. Die Tatsache, dass ASIC-ähnliche Einwärtsströme vor allem in den großen IB4-negativen Spinalganglienzellen

auftreten, macht im Besonderen die Auswahl der zu untersuchenden Zellen bei diesen Experimenten bedeutsam. Die Funktion der ASICs für die Nozizeption ist noch unklar. Untersuchungen an transgenen Mäusen (ASIC2a- und ASIC3-defiziente) schlagen eine Bedeutung sowohl für die Protonen-Sensibilität als auch für die Mechano-Sensibilität sensorischer Neurone vor (Price et al. 2000, 2001). Weiterhin scheint ASIC3 eine besondere Funktion bei Muskelschmerzen oder Angina Pectoris zu spielen. Neurone, die das Myokard innervieren, zeigen eine sehr hohe Expression von ASIC3 (Benson et al. 1999; Sutherland et al. 2001; Immke et al. 2002). Sowohl TRPV1 wie auch die ASICs scheinen somit wichtige nozizeptive Aufgaben auszuüben, unter anderem als Protonen-Rezeptoren. Bei der vorliegenden Arbeit, scheint aber TRPV1 eine größere Bedeutung für die Protonen-Sensibilität nozizeptiver Neurone der Maus zu haben. Protonen aktivieren ASIC-Kanäle durch eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, die bei neutralen pH-Werten an der Pore des Kanals gebunden sind und somit einen Einwärtsstrom blockiert (Immke und McCleskey 2003). Bei TRPV1 hingegen scheint die Interaktion zwischen Protonen und spezifischen Aminosäureresten in der Pore-bildenden Region des fünften transmembranen Segmentes die Protonen-induzierte Aktivierung des Rezeptors zu bewirken (Jordt und Julius 2000). Dabei ist die Identität des Aminosäurerestes an Position 648 essentiell für die Protonen-Sensibilität von TRPV1. Eine Mutation an dieser Stelle bewirkt eine selektive Abnahme der Aktivierbarkeit durch Protonen, nicht aber der Aktivierbarkeit durch Vanilloide oder Hitze. Neben der Fähigkeit TRPV1 direkt zu aktivieren, bewirken Protonen auch eine Sensibilisierung von TRPV1 gegenüber anderen Agonisten wie Capsaicin oder Hitze (Tominaga et al. 1998; McLatchie und Bevan 2001). Für diese Sensibilisierung scheint die Identität des Aminosäurerestes an Position 600 von Bedeutung zu sein (Jordt und Julius 2000). In Anbetracht der Aktivierbarkeit von TRPV1 durch endogene Substanzen wie Anandamid, Leukotrien B4 oder Hitze, scheint diese Sensibilisierung von TRPV1 durch Protonen bei Zuständen wie Entzündung und Fieber von großer Bedeutung zu sein.

4.3 TRPV1 und Hitze-Sensibilität

Viele der polymodalen Nozizeptoren sind Hitze-sensibel und besitzen eine Schwelle zwischen 43- 45°C (Treede et al. 1992; Julius und Basbaum 2001). In diesem Temperaturbereich liegt in psychophysischen Experimenten auch die Schmerzschwelle (Treede et al. 1992; Raja et al. 1999). Die Hitze-Sensibilität der polymodalen Nozizeptoren ähnelt in vielen Hinsichten der Hitze-Sensibilität von TRPV1. Dabei liegt die Schwelle für die Hitze-induzierte Aktivierung von TRPV1 ebenfalls bei 43- 45°C (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). Weiterhin wurden in elektrophysiologischen Studien beschrieben, dass Hitze-sensible Neurone zum größten Teil auch Vanilloid-sensibel sind (Szolcsanyi et al. 1988; Cesare und McNaughton 1996; Kirschstein et al. 1997; Nagy und Rang 1999a, b). In der vorliegenden Arbeit wurden Einwärtsströme, die ab 45°C aktiviert werden, nur in Vanilloid-sensiblen Neuronen der Wildtyp-Maus beobachtet. Vor diesem Hintergrund war es nicht überraschend, dass Hitze-induzierte Einwärtsströme in Spinalganglienzellen der TRPV1-defizienten Maus stark reduziert waren. Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren *in vitro* Experimente gefunden. (Tabelle 1; Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Reduzierte Hitze-Empfindlichkeit TRPV1-defizienter Mäuse *in vivo* wurde jedoch nur bei Temperaturen > 50°C beobachtet, nicht aber wie erwartet bei 45°C (Caterina et al. 2000). Obgleich sich TRPV1 als ein wichtiger Hitze-Rezeptor sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Experimenten darstellte, ist durch diese Ergebnisse die Existenz von mehreren Hitze-sensiblen Rezeptoren anzunehmen. Tatsächlich wurden in der vorliegenden Arbeit Hitze-induzierte Einwärtsströme in Vanilloid-unempfindlichen Neuronen TRPV1-defizienten Mäusen und von Wildtyp-Mäusen beobachtet. Im Vergleich zu dem TRPV1-vermittelten Einwärtsstrom zeigten diese Einwärtsströme eine hohe Schwelle (> 50°C). Es ist möglich, dass TRPV2 (VRL-1) diese Art von Hitze-induzierten Einwärtsströmen generiert (Caterina et al. 1999; Nagy et al. 1999a; Ahluwalia et al. 2002). Die Expression von TRPV2 ist hauptsächlich auf große Spinalganglienzellen begrenzt, daher könnte die TRPV2-exprimierende Zellpopulation dem Typ I AMH-Fasern entsprechen (Caterina et al. 1999; Julius und Basbaum 2001). Die Frage, ob die fast normale Hitze-Empfindlichkeit der TRPV1-defizienten Tieren durch TRPV2 vermittelt wird, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig

beantworten. Aufgrund der hohen Temperaturschwelle und des Expressionsmusters scheint dies jedoch unwahrscheinlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Expression von TRPV2 in TRPV1-defizienten Tieren kompensatorisch hochreguliert wird. Außerdem verringert sich die Schwelle für die Aktivierung von TRPV2, wenn der Rezeptor wiederholt durch einen Hitze-Stimulus aktiviert wird (Caterina et al. 1999). Dagegen spricht eine neuere Arbeit an TRPV1-defizienten Mäusen, in der für Hitze-sensible Neurone keine TRPV2-Expression nachgewiesen werden konnte (Koerber et al. 2001). Die konservierte Hitze-Sensibilität der TRPV1-defizienten Maus bei niedrigeren Temperaturen, liesse sich auch durch andere Mechanismen erklären. Ein viel versprechender Kandidat ist dabei TRPV3 (Peier et al. 2002; Smith et al. 2002; Xu et al. 2002). TRPV3, eine Vanilloid-unempfindliche aber Hitze-sensible TRP-Untereinheit, wird in sensorischen Neuronen und in nichtneuronalen Geweben exprimiert. Im Vergleich zu TRPV1 und TRPV2, zeigt TRPV3 eine deutlich niedrigere Schwelle für die Hitze-induzierte Aktivierung die bei den verschiedenen Studien zwischen 22 und 39°C liegt. Es ist unklar, warum diese Art von Hitze-induzierten Einwärtsströmen nicht in Spinalganglienzellen von TRPV1-defizienten Mäusen beobachtet wurde (vorliegende Arbeit; Davis et al. 2000). Eine mögliche Ursache wäre eine schwache Expression des Proteins in kultivierten Neuronen, so dass bei Anfang der Experimente nach 12h in Kultur nur noch wenige TRPV3-Kanäle in der Zellmembran vorhanden sind. Diese Möglichkeit wird unterstützt von der Arbeit von Peier et al., in der nur eine sehr schwache Expression von TRPV3 in Spinalganglien, aber eine starke Expression in Keratinozyten gefunden wurde. Weiterhin ist es möglich, dass kleinste Einwärtsströme, die schon ab Zimmertemperatur aktiviert waren, nicht als solche erkannt worden sind.

Während die molekularen Substrate für die Vanilloid- und Protonen-Sensibilität der TRP-Untereinheiten aufgeklärt zu sein scheinen, sind die Mechanismen der Hitze-induzierten Aktivierung noch unbekannt. Der Stellenwert von TRPV1, TRPV2 und TRPV3 bei der Hitze-Sensibilität sensorischer Neurone könnten durch die Charakterisierung von entsprechenden Knockout-Mäusen aufgeklärt werden.

4.4 TRPV1 und Pathophysiologie

Die vorliegenden Untersuchungen widmeten sich der Funktion von TRPV1 in einem physiologischen Zustand. Dabei wurde gezeigt, dass TRPV1 ein essentielles Transduktionselement für Vanilloid-, Protonen- und Hitze-Sensibilität von Nozizeptoren darstellt. Die Bedeutung von TRPV1 in Bezug auf pathophysiologische Zustände wie bei Entzündung oder Nervenverletzung wurde bisher nicht mittels der Patch-Clamp Methode untersucht. Es soll jedoch erwähnt werden, dass die entzündungsinduzierte thermische Hyperalgesie in TRPV1-defizienten Tieren herabgesetzt ist (Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Im Gegensatz dazu ist die thermische Hyperalgesie, die nach einer Nervenläsion beobachtet wird, in TRPV1-defizienten Tieren unverändert nachweisbar (Caterina et al. 2000). Weiterhin zeigten TRPV1-defiziente Mäuse eine unveränderte Sensibilität für mechanische Stimuli. Ebenso war die mechanische Hyperalgesie sowohl nach Entzündung als auch nach Nervenschädigung in TRPV1-defizienten Mäusen unverändert (Tabelle 2; Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Die Expression von TRPV1 wird bei einer Entzündung hochreguliert, bei Läsion des Neurons aber herunterreguliert (Michael und Priestley 1999; Itoh et al. 2001). Weiterhin wurde wiederholt beschrieben, dass TRPV1 durch Entzündungsmediatoren und Zytokine wie Bradykinin, NGF, PGE₂, IL-1 β und ATP, stark sensibilisiert werden kann (Chuang et al. 2001; Julius und Basbaum 2001; Obreja et al. 2002). Somit ist eine Beteiligung von TRPV1 speziell bei der entzündungsinduzierten thermischen Hyperalgesie wahrscheinlich, nicht aber bei neuropathischen Schmerzzuständen.

<i>in vitro</i>	Stimulus/Marker	TRPV1-/- Phänotyp
Immunhistochemie von Spinalganglion Neuronen	TRPV1	Fehlt
	TRPV2	±
	IB4	±
	SP	±
Immunhistochemie von Rückenmarksneurone nach 50°C	Fos-Expression Laminae I-II	↓↓
	Laminae V-VI	↓
Calcium-Imaging von Spinalganglion Neuronen	Capsaicin	Fehlt
	Resiniferatoxin	Fehlt
	Protonen (pH 5,0)	↓↓↓
	ATP	±
Haut-Nerv-Präparat	Capsaicin C-Fasern	Fehlt
	Aδ-Fasern	Fehlt
	Protonen (pH 5,0) C-Fasern	↓↓↓
	Aδ-Fasern	±
	Hitze C-Fasern	↓↓↓
	Aδ-Fasern	±
Mechanische Reizung C-, Aδ-	±	
Extrazelluläre Ableitungen WDR-Neurone Lamina V	Mechanische Kodierung	±
	Thermische Kodierung	↓↓↓
<i>in vivo</i>		
"paw licking"	Vanilloide (Injektion Pfote)	↓↓↓
erhöhte Körpertemperatur (Δ °C)	Capsaicin (Injektion subkutan)	Fehlt
"aversive drinking" Test	Capsaicin (im Trinkwasser)	Fehlt
"tail immersion" Test	Hitze (>48°C)	↓↓
	(<48°C)	±
"hot plate" Test	Hitze (>50°C)	↓↓
	(<50°C)	±
Gewebsentzündung nach Senföl od. CFA (Pfote)	Hitze (Hargreaves Test)	↓↓↓
	Mechanische Reizung	±
Nervenläsion (Ligation)	Hitze (Hargreaves Test)	±
	Mechanische Reizung	±

Tabelle 2. Tabellarische Darstellung des Phänotyps von TRPV1-knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen (Fehlt: völliges Fehlen einer Reaktion; ↓↓↓: sehr starke Reduktion; ↓↓: starke Reduktion; ↓: mässige Reduktion; ±: kein Unterschied) (für Details: Caterina et al. 2000).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Erforschung des Schmerzes sind die molekularen Transduktionsmechanismen in afferenten sensorischen Neuronen von großem Interesse. Funktionelle Eigenschaften und eine nahezu selektive Expression von TRPV1 in sensorischen Neuronen, haben zu einer intensiven Erforschung dieses Proteins geführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stellenwert von TRPV1 in sensorischen Neuronen untersucht, indem Neurone transgener TRPV1-knockout Mäusen elektrophysiologisch charakterisiert wurden. Der Phänotyp der TRPV1-defizienten Tieren zeigte dabei deutlich, dass TRPV1 bei verschiedener nozizeptiven Prozessen ein bedeutendes Transduktionselement darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPV1 für die Vanilloid-Sensibilität sensorischer Neurone essentiell ist. Weiterhin zeigte sich eine stark reduzierte Protonen-Sensibilität und Hitze-Sensibilität in Neuronen der TRPV1-defizienten Maus; für diese beiden Stimulus-Modalitäten existieren aber neben TRPV1 weitere Rezeptoren. Für die Protonen-Sensibilität scheinen dabei ASIC-Untereinheiten beteiligt zu sein. Für die thermische Sensibilität sensorischer Neurone hingegen, ist die Beteiligung weiterer TRP-Untereinheiten wie TRPV2 und TRPV3 wahrscheinlich. Laut der vorliegenden Arbeit spielt TRPV1 somit bei der Aktivierung polymodaler Nozizeptoren eine zentrale Rolle, und somit auch für die Entstehung von Schmerz. Durch die Charakterisierung der TRPV1-defizienten Maus konnte die Bedeutung von TRPV1 bei der Entstehung nozizeptiven Verhaltens *in vivo* sowohl im physiologischen wie auch im pathophysiologischen Kontext dargestellt werden. Aus diesen Befunden wurde gefolgert, dass TRPV1 speziell bei entzündungsinduzierten Schmerzen, nicht aber bei neuropathischen Schmerzen, eine Rolle spielt. Eine analgetische Wirkung von Antagonisten oder Modulatoren von TRPV1 wäre nur bei Schmerzzuständen zu erwarten, bei denen TRPV1 beteiligt ist. Die Frage, ob TRPV1 ein günstiger Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Analgetika darstellt, lässt sich daher trotz den hier erarbeiteten Ergebnissen nicht eindeutig beantworten. Die weitere Erforschung von TRPV1, aber auch von weiteren vielversprechenden Genprodukten wie TRP- und ASIC-Untereinheiten, ist nach wie vor die Voraussetzung für eine erfolgreiche Lösung dieser Frage.

Literaturverzeichnis

Acs G, Lee J, Marquez VE, Blumberg PM (1996) Distinct structure-activity relations for stimulation of ^{45}Ca uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. *Brain Res Mol Brain Res* 35:173-82.

Ahluwalia J, Rang H, Nagy I (2002) The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 16:1483-1489.

Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN (2000) A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 11:2217-2222.

Amaya F, Decosterd I, Samad TA, Plumpton C, Tate S, Mannion RJ, Costigan M, Woolf CJ (2000) Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol Cell Neurosci* 15:331-342.

Baron R (2000) Capsaicin and nociception: from basic mechanisms to novel drugs. *The Lancet* 356:785-787.

Basilana F, Champigny G, Waldmann R, de Weille J, Heurteaux C, Lazdunski M (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* 272:28819-28822.

Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Séguéla P (2000) Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd^{3+} . *J Biol Chem* 275:28519-28525.

Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV (1998) A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 18:3059-3072.

Benson CJ, Xie J, Wemmie J, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM (2001) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:2388-2343.

Bergmann I, Priestley JV, McMahon SB, Brocker EB, Toyka KV, Koltzenburg M (1997) Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 9:18-28.

Bevan S, Yeats J (1991) Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol (Lond)* 433:145-161.

Biro T, Acs G, Acs P, Modarres S, Blumberg PM (1997) Recent advances in understanding of vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2:56-60.

Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998). The Expression of P2X3 Purinoreceptors in Sensory Neurons: Effects of Axotomy and Glial-Derived Neurotrophic Factor. *Mol Cell Neurosci* 12:256-268.

Bruster S, Jarman B, Bosanquet N, Weston D, Erens R, Delbanco TL (1994) National survey of hospital patients. *BMJ* 309:1542-1546.

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response Properties of Mechanoreceptors and Nociceptors in Mouse Glabrous Skin: An In Vivo Study. *J Neurophysiol* 85:1561-1574.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.
- Caterina MJ, Julius D (2001a) Sense and specificity: a molecular identity of nociceptors. *Curr Opin in Neurol* 9:525-530.
- Caterina MJ, Julius D (2001b) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487-517.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- Cesare P, McNaughton P (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:15435-15439.
- Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA (1999) Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:7658-7663.
- Chen CC, England s, Akopian AN, Wood JN (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10240-10245.
- Chuang H, Prescott ED, Haeyoung K, Shannon S, Jordt S-E, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411:957-962.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.

Department of Health, UK (2000) Services for patients with pain. Report of Clinical Standards Advisory Group.

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

Dirajlal S, Pauers LE, Stucky CL (2003) Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* 89:513-524.

Djoughri L, Bleazard L, Lawson SL (1998) Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 513:857-872.

Eglen RM, Hunter JC, Dray A (1999) Ions in the fire: recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *TIPS* 20:337-342.

Fjell J, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Fried K, Black JA, Waxman SG (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* 67:267-82.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *TIPS* 23:183-191.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (TRPV1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11:946-958.

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

Harper AA, Lawson SN (1985) Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol (Lond)* 359:31-46.

Heyman I, Rang HP (1985) Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett.* 56:69-75.

Hille B. (2001) *Ionic Channels in Excitable Membranes*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 607 pp.

Holzer P (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43:143-201.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6155-6160.

Immke DC, Molliver DC, Fierro L, McCleskey EW (2002). Distribution of ASIC3 in sensory neurons indicates a functional role in both nociceptive and mechanosensory signaling. Program No. 51.9. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, Online.

Immke DC, McCleskey EW (2003) Protons open Acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca(2+) blockade. *Neuron* 37:75-84.

Itoh M, Takasaki I, Andoh T, Nojima H, Tominaga M, Kuraishi Y (2001) Induction by carrageenan inflammation of prepronociceptin mRNA in TRPV1-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia. *Neurosci Res* 40:227-233.

Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J (1967) Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 31:138-151.

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

Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108:421-430.

Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-10.

Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee S-Y, Kang C-J, Kim WB, Kim D, Oh U (1999) Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 19:529-538.

Kirschstein T, Busselberg D, Treede RD (1997). Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 231:33-36.

Koerber HR, Woodbury CJ, Caterina MJ, Koltzenburg M (2001) Identity of cutaneous sensory neurons containing VRL-1 in wildtype and VR1-KO mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 27, p. 928.4

Koltzenburg (1995) Stability and plasticity of nociceptor function and their relationship to evoked and ongoing pain. *Seminars in the Neurosciences* 7:199-210

Koltzenburg M, Lewin GR (1997) Der Einfluss von Neurotrophinen auf den Phänotyp sensorischer Neurone. *Neuroforum* 1:27-31.

- Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR (1997) Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78:1841-1850.
- Koltzenburg M (1999) The changing sensitivity in the life of the nociceptor. *Pain Supplement* 6:S93-S102
- Kress M, Fetzer S, Reeh PW, Vyklicky L (1996) Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat. *Neurosci Lett.* 211:5-8.
- Kress M, Reeh PW (1996) More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14995-14997.
- Kress M, Zeilhofer HU (1999) Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:112-118.
- Lariviere WR, Wilson SG, Laughlin TM, Kokayeff A, West EE, Adhikari SM, Wan Y, Mogil JS (2002) Heritability of nociception. III. Genetic relationships among commonly used assays of nociception and hypersensitivity. *Pain* 97:75-86.
- Lawson SN, Waddell PJ (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, Mönter B, Carerina MJ, Julius D, Koltzenburg M (2000) Disruption of the Vanilloid Receptor Gene Impairs the Responses of Sensory Neurons to Protons. *Soc. Neurosci. Abstr.* p. 632.1
- Lewin GR, Mendell LM (1992) Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 16:353-359.
- Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M (1997) A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 272:29778-29783.

Liu L, Simon SA (1994) A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:738-741.

Liu L, Szallasi A, Simon SA (1998) A non-pungent resiniferatoxin analog, phorbol 12-phenylacetate 13 acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 84:569-581.

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.

McLatchie LM, Bevan S (2001) The effects of pH on the interaction between capsaicin and the vanilloid receptor in rat dorsal root ganglia neurons. *Br J Pharmacol* 132:899-908.

Merskey H, Bogduk N (1994) *Classification of Chronic Pain Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms.* 2nd Edition, IASP Press.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype-1 (TRPV1), and TRPV1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3655-3660.

Michel GJ, Priestley JV (1999) Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 19:1844-1854.

Miermeister F, Seifert F, Bernardini N, Petersen M, Hofmann H, Siegling A, Michaelis M, Devor M, Reeh PW (2002) Heritable differences in noxious heat but not mechanical sensitivity are reflected in neurosecretory, transcriptional and sensory capacities of primary afferent neurons in inbred mouse strains. (submitted).

Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M (1999) Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80:67-82.

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19:849-861.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Mol Cell* 9:229-231.

Nagy I, Rang HP (1999a) Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a subpopulation of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 88:995-997.

Nagy I, Rang HP (1999b) Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J Neurosci* 19:10647-10655.

Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M (2002) IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB* 16:1497-1503.

Ochoa J, Torebjörk E (1989) Sensations evoked by intraneural microstimulation of C nociceptor fibers in human skin nerves. *J Physiol* 415:583-599.

Ogun-Muyiwa P, Helliwell R, McIntyre P, Winter J (1999) Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates TRPV1 and substance P in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 10:2107-2111.

Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R (1998) An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *NeuroReport* 9:1109-1113.

Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046-2049.

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

Petersen M, LaMotte RH, Klusch A, Kniffki KD (1996) Multiple capsaicin-evoked currents in isolated rat sensory neurons. *Neuroscience* 75:495-505.

Plenderleith MB, Snow PJ (1993) The plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurones which innervate the skin in the rat. *Neurosci Lett* 159:17-20.

Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, Stucky CL, Mannsfeldt AG, Brennan TJ, Drummond HA, Qiao J, Benson CJ, Tarr DE, Hrstka RF, Yang B, Williamson RA, Welsh MJ (2000) The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 407:1007-1011.

Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32:1071-1083.

Raja SN, Rinkamp M, Meyer RA, Campbell JN, Raja SN (1996) Peripheral neural mechanisms of nociception. In *Textbook of Pain*, 4 Aufl. Edited by Wall PD, Melzack R. Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 11-57.

Reeh PW, Steen KH (1996) Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res* 113:143-151.

Reichling DB, Levine JD (2000) In hot pursuit of the elusive heat transducers. *Neuron* 26:555-558.

Robinson CJ, Torebjork HE, LaMotte RH (1983). Psychophysical detection and pain ratings of incremental thermal stimuli: a comparison with nociceptor responses in humans. *Brain Res* 274:87-106

Sakmann B, Neher E (1995) *Single Channel Recording*. 2nd ed, Kluwer Academic Publishers, 700 pp.

Schaible HG, Schmidt RF (1988). Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. *J Physiol*. 403:91-104.

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15:333-341.

Schmidt KH, Koltzenburg M (1999) Capsaicin sensitivity of peptidergic and non-peptidergic adult sensory neurons. *Peripheral Nerve Society*.

Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD (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* 275:2756-2762.

Sherrington CS (1990) Cutaneous sensations. In: *Textbook of Physiology* (Schäfer EA, ed). London:Pentland 920-1001.

Sherrington CS (1906) *The Integrative Action of the Nervous System* (New York: Scribner)

Silverman JD, Kruger L (1990) Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol* 19:789-801.

Silos-Santiago I, Molliver DC, Ozaki S, Smeyne RJ, Fagan AM, Barbacid M, Snider WD (1995) Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J. Neurosci* 15:5929-5942.

Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186-190.

Snider WD, McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20:629-632.

Steen KH, Reeh PW (1993) Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 154:113-116.

Steen KH, Steen AE, Reeh PW (1995) A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, *in vitro*. *J Neurosci* 15:3982-3989.

Stucky CL, Lewin GR (1998) Isolectin B4-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19:6497-6505.

Stucky CL, Gold MS, Zhang X (2001) Mechanisms of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11845-11846.

Stucky CL, Koltzenburg M (1999) The low affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J. Neurosci* 17:4398-4405.

Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW (2001) Acid sensing ion channels 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:711-716.

Szolcsányi J, Jancso-Gabor A (1975) Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 287:157-169.

Szolcsányi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res* 446:262-268.

Szallasi A and Blumberg PM (1990) Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* 524:106-111.

Szallasi A, Blumberg PM (1989) Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515-250.

Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev* 51:159-212.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Glibert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.

Torebjörk HE, Vallbo AB, Ochoa JL (1987) Intra-neural microstimulation in man. Its relation to specificity of tactile sensations. *Brain* 110:1509-1529.

Torebjörk HE, Ochoa JL (1990) New method to identify nociceptor units innervating glabrous skin of the human hand. *Exp Brain Res* 81:509-514.

Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38:397-421.

Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* 483:747-758.

Viana F, de la Pena E, Belmonte C (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5:254-260.

Vlachova V, Teisinger J, Suankova K, Lyfenko A, Etrich R and Vyklicky L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23:1340-1350.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997a) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386:173-177.

Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M (1997b) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 272:20975-20978.

Waldmann R, Lazdunski M (1998) H(+)-gated channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:418-424.

Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjork HE (1999) Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin *J Neurosci* 19:10184-10190.

Welch JM, Simon SA, Reinhart PH (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 USA* 97:13889-13894.

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

Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S (1988) Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 8:3208-3220.

Wood JN (2000) II. Genetic approaches to pain therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G507-G512.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.

Woolf CJ, Salter MW (2001) Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* 288:1765-1768.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgard M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.

Xie J, Price MP, Berger AL, Welsh MJ (2002) DRASIC contributes to pH-gated currents in large dorsal root ganglion sensory neurons by forming heteromultimeric channels. *J Neurophysiol* 87:2835-2843.

Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181-186.

Danksagung

Bei Professor Martin Koltzenburg, mein Betreuer und ständiger Förderer bei dieser Arbeit, bedanke ich mich ganz herzlich! Für die Betreuung während der Arbeit, für anregende und lehrreiche Diskussionen, für eine außergewöhnliche Großzügigkeit, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und für das freundschaftliche Zusammenarbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Martina Weigand, Herrn Dr. Klaus Schmidt und Herrn Dr. Marc Schneider für die hervorragende technische Unterstützung und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für eine exzellente Hilfestellung zur Etablierung der Patch-Clamp Methode möchte ich mich bei Frau PD. Dr. Michaela Kress, (Institut für Physiologie, Universität Erlangen) bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. A. Karschin (Institut für Physiologie, Universität Würzburg), der sich freundlicherweise als Gutachter für diese Promotionsarbeit zur Verfügung gestellt hat.

Meiner Freundin Mareike danke ich für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit, aber auch für ihre liebevolle Unterstützung für alles was ich unternehme!

Für eine sehr erfolgreiche und auch freundschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich herzlich bei Prof. Michael Caterina (Baltimore) und Prof. David Julius (San Fransisco).

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.V. Toyka, Direktor der Neurologischen Universitätsklinik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, bedanken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Nils Andreas Leffler, geb. Gustavsson
Geburtsdatum	1. Mai 1975
Geburtsort	Lerum, Schweden
Familienstand	ledig, keine Kinder
Nationalität	Schwedisch
Eltern	Margareta Broström, geb. Leffler; Bankkauffrau Nils-Gunnar Gustavsson; Immobilienmakler
Geschwister	Asa Leffler, Grundschullehrerin; Sara Gustavsson, Studentin

Schul Ausbildung

1982 – 1985	Skogslyckeskolan, Uddevalla, Schweden
1985 – 1988	Unnerödsskolan, Uddevalla, Schweden
1988 – 1991	Västerskolan, Uddevalla, Schweden
1991 – 1994	Östrabo Gymnasiet, Uddevalla, Schweden <i>Abitur</i> mit der Durchschnittsnote 1,3

09/1994 – 06/1995 Au-Pair Tätigkeit in Hamburg

Hochschulausbildung

WS 1995/96 – SS 1997	Vorklinisches Studium an der Medizinischen Universität Lübeck
08/1997	<i>Physikum</i> mit der Note - befriedigend (3,0) -
WS 1997/98 – SS 2001	Klinisches Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1999	<i>Erstes Staatsexamen</i> mit der Note - gut (2,0) -
05 – 10/2000	Forschungsaufenthalt an der Yale University, New Haven, USA unter der Leitung von S. G. Waxman, MD, PhD, Leiter des Department of Neurology, Yale University
09/2001	<i>Zweites Staatsexamen</i> mit der Note - gut (1,66) -
WS 2001/02 – SS 2002	Praktisches Jahr (Chirurgie, Humangenetik, Innere Medizin)
10/2002	<i>Drittes Staatsexamen</i> mit der Note - gut (2,0) - Gesamtnote der ärztlichen Prüfung - gut (1,83) -
11/2002 – 06/2003	Arzt im Praktikum, Institut für Klinische Pharmakologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt a.M. unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. G. Geisslinger.
seit 07/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Anästhesiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, unter der Leitung von Prof. Dr. J. Schüttler.

Erlangen, November 2004

Andreas Leffler