

Die Expression des Interleukin-1-Rezeptors  
Typ 1 im Verlauf einer Antigen-induzierten  
Monoarthritis im Kniegelenk der adulten Ratte  
und Einflüsse von Interleukin-1-beta auf  
Neurone der Hinterwurzelganglien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Benjamin Uhlig

geboren am 04.12.1982 in Gera

## Gutachter

1. Priv.-Doz. Dr. Gisela Segond von Banchet (Jena)
2. Prof. Dr. Rolf Bräuer (Jena)
3. Prof. Dr. Rainer H. Straub (Regensburg)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2012

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AMH	A-Faser-Mechano-Hitze-Nozizeptoren
BSA	Rinderserum-Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	freie intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFA	komplettes Freund`sches Adjuvant
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CMH	C-Faser-Mechano-Hitze-Nozizeptoren
COX-2	Cyclooxygenase 2
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMARD	disease-modifying anti-rheumatic drug
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DRG	Dorsal root ganglion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fura-2/AM	Fura-2 Acetoxymethyl-Ester
GDNF	Glia cell line-derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICE	IL-1 $\beta$ converting enzyme
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1RAcP	Interleukin-1-Rezeptor-akzessorisches Protein
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor 1
IL-1RII	Interleukin-1-Rezeptor 2

IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickoxid-(NO)-Synthase
IR	Immunreaktivität
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
kDa	Kilo-Dalton
mBSA	methyliertes Rinderserum-Albumin
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NGF	Nerve growth factor
NO	Stickoxid
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC-PLA-2	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RA	rheumatoide Arthritis
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
SP	Substanz P
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
TX-100	Triton-X100
VCAM-1	vascular-cell adhesion molecule-1
ZNS	Zentralnervensystem

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	S. 7
1.1	Schmerz	S. 7
1.2	Nozizeptoren	S. 8
1.3	Sensibilisierung der Nozizeptoren	S. 10
1.4	Hinterwurzelganglienzellen	S. 11
1.5	DRG-Neurone adulter Ratten als Modell für Nozizeptoren	S. 14
1.6	Der TRPV1-Rezeptor	S. 14
1.7	Die intrazelluläre Kalziumkonzentration	S. 16
1.8	IL-1 $\beta$ , seine Rezeptoren und der IL-1RA	S. 17
1.9	Die Antigen-induzierte Arthritis als Modell für eine periphere Entzündung	S. 20
1.10	Zielstellung	S. 21
2	Material und Methoden	S. 23
2.1	Versuchstiere	S. 23
2.2	Präparation der Hinterwurzelganglien (DRGs)	S. 23
2.2.1	Vorbereitung der Deckgläschen für die Kultivierung	S. 23
2.2.2	Entnahme der Wirbelsäule	S. 24
2.2.3	Herstellung der Nervenzellkultur	S. 24
2.2.4	Herstellung der DRG-Schnitte	S. 25
2.3	Induktion einer Antigen-induzierten Monoarthritis	S. 25
2.4	Darstellung des TRPV1-Rezeptors an kultivierten DRG-Neuronen	S. 26
2.5	Immunzytochemische Experimente zur Regulation des TRPV1-Rezeptors	S. 28
2.6	Vitalitätstest	S. 28
2.7	Darstellung des IL-1RI-Rezeptors an DRG-Schnitten aus Ratten mit einer AIA	S. 28
2.8	Datenanalyse der Rezeptorendarstellung an kultivierten DRG-Neuronen und an DRG-Schnitten	S. 29
2.9	Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationsänderungen (Ca <sup>2+</sup> -Imaging)	S. 30
2.10	Materialien	S. 32
2.10.1	für Präparation, Kultur der DRG-Neuronen und Herstellung der DRG-Schnitte	S. 32
2.10.2	für Induktion der AIA	S. 32
2.10.3	für Zugabeexperimente und Rezeptormarkierungen an Kultur	S. 32
2.10.4	für Rezeptormarkierungen an DRG-Schnitten	S. 32

2.10.5	für Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Messungen	S. 33
2.10.6	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	S. 33
3	Ergebnisse	S. 35
3.1	Expression des Interleukin-1-Rezeptors 1 (IL-1RI)	S. 35
3.1.1	Nachweis von IL-1RI an DRG-Schnitten der Ratte	S. 35
3.1.2	Expression des IL-1RI an histologischen Schnitten von DRGs aus LEWIS-Ratten mit einer AIA	S. 36
3.2	Beschreibung der Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien der Ratte	S. 40
3.3	Exemplarische Beschreibung der Datenanalyse der Markierungen an kultivierten DRG-Neuronen	S. 42
3.4	Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in kultivierten DRG-Neuronen	S. 44
3.5	Vitalitätstest	S. 45
3.6	Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression von TRPV1-Rezeptoren an kultivierten DRG-Neuronen	S. 45
4	Diskussion	S. 49
5	Schlussfolgerungen	S. 60
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	S. 61
7	Anhang	

## Zusammenfassung

Während einer Entzündung werden im betroffenen Gewebe u.a. proinflammatorische Zytokine freigesetzt, die auf nozizeptive Nervenfasern wirken oder Zellen des Immunsystems stimulieren, welche ihrerseits Mediatoren freisetzen, die nozizeptive Fasern erregen und auf das Entzündungsgeschehen stimulierend einwirken können. Ein zentrales proinflammatorisches Zytokin ist Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). In den letzten Jahren sind verschiedene kurz- und langfristige Wirkungen von IL-1 $\beta$  im Zusammenhang mit Schmerz untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  über eine gesteigerte Produktion und Freisetzung verschiedener proalgetischer Mediatoren, wie z.B. Calcitonin gene-related peptide, Substanz P, Nerve growth factor und Stickoxid, Hyperalgesie und mechanische Allodynie bis hin zu Knochen- und Knorpelschäden verursachen kann und ihm damit eine zentrale Rolle in der Genese und Chronifizierung von Schmerzen während chronisch-inflammatorischer Krankheiten wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (RA) zukommt. Es gibt Hinweise, dass IL-1 $\beta$  neben langfristigen Effekten, wie z.B. der Stimulation der Cyclooxygenase 2-Expression, außerdem auch kurzfristig, das heißt nicht über Veränderungen der Expression, Nozizeptoren sensibilisieren kann.

In der Arbeit soll Folgendes untersucht werden:

1. In welchem Umfang wird der Rezeptor von IL-1 $\beta$ , Interleukin-1-Rezeptor 1 (IL-1RI), an den primär afferenten Neuronen exprimiert? Als Modell dienen histologische Schnitte von lumbalen DRG-Neuronen der adulten Ratte, an denen mit immunhistochemischen Markierungen nach der ABC-Methode der IL-1RI nachgewiesen wird. DRG-Neurone sind als Modell für Nozizeptoren seit vielen Jahren anerkannt, um neben elektrophysiologischen auch zellbiologische Fragen an Nozizeptoren zu beantworten.
2. Zeigt der IL-1RI im zeitlichen Verlauf einer Entzündung Veränderungen in seiner Expression? Dazu wird die Expression des IL-1RI an den lumbalen DRG-Neuronen jeweils ipsi- und kontralateral nach Induktion einer Monoarthritis im Kniegelenk der adulten Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten immunhistochemisch an Schnitten untersucht. Als Entzündungsmodell dient eine unilaterale Antigen-induzierte Arthritis (AIA) des Kniegelenks der Ratte. Dieses Modell ist bereits ausführlich histologisch und immunologisch charakterisiert worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IL-1RI in DRG-Neuronen der Ratte zu ca. 25 bis 30 % exprimiert wird und diese Expression in einem Modell einer peripheren Entzündung in der chronischen Phase signifikant auf ca. 50 bis 60 % ansteigt. Die vermehrte IL-1RI-Expression in DRG-Neuronen im verwendeten AIA-Modell trat

sowohl ipsilateral (entzündete Seite) als auch kontralateral (nicht entzündete Seite) auf. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass IL-1 $\beta$  sowohl in der Chronifizierung der RA als auch in der Entwicklung der kontralateralen Hyperalgesie eine Rolle spielen könnte. Sowohl die Grundexpression des IL-1RI als auch die Erhöhung der Expression im verwendeten Entzündungsmodell betrifft vor allem kleine und mittelgroße DRG-Neurone, die die Somata von nozizeptiven Afferenzen beinhalten.

3. Hat IL-1 $\beta$  an peripheren Neuronen einen Einfluss auf die Expression nozizeptionsrelevanter Rezeptoren? Bisher gibt es einige Hinweise darauf, dass proinflammatorische Zytokine wie z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  den TRPV1-Rezeptor (transient receptor potential vanilloid 1) hochregulieren können. Dieser oft als Markerrezeptor für die TRP-Familie gebrauchte Ionenkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Hitzenozizeption. Es wurde dessen Expression an kultivierten DRG-Neuronen nach 2 tägiger Zugabe von IL-1 $\beta$  untersucht. Dabei konnte ein Anstieg der TRPV1-Rezeptorexpression von ca. 21 auf 32 % gezeigt werden. Antagonisiert man diesen Effekt durch die zusätzliche Gabe von IL-1RA, fällt die TRPV1-Rezeptorexpression wieder auf das Ausgangsniveau. Neben dieser langfristigen Wirkung von IL-1 $\beta$  ist auch ein kurzfristiger Signalweg untersucht worden: Obwohl einige Zytokine über intrazelluläre Kalziumkonzentrationsveränderungen in DRG-Neuronen signalisieren, scheint IL-1 $\beta$  nicht in diese Signalwege eingebunden zu sein.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit gibt es einen ersten Hinweis dafür, dass auch IL-1 $\beta$  nicht nur über die bekannte Sensibilisierung, sondern auch über eine mögliche Steigerung der Expression des TRPV1-Rezeptors in DRG-Neuronen Einfluss auf die Entstehung entzündungsassoziierter thermischer Hyperalgesie nehmen könnte.

Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Chronifizierung der RA einzunehmen scheint und dass die Expressionssteigerung des TRPV1-Rezeptors ein Wirkmechanismus von IL-1 $\beta$  sein kann.



# 1 Einleitung

## 1.1 Schmerz

Der Schmerz ist eine eigenständige Sinnesempfindung mit einem spezialisierten System aus Sensoren, Leitungsbahnen und Zentren (Meßlinger 1997). Schmerz wird wahrgenommen, wenn Körpergewebe eine Schädigung durch starke Reize droht oder wenn bereits eine Schädigung vorliegt. Deshalb liegt in seiner Signal- und Warnfunktion eine große Bedeutung (Schaible und Schmidt 2005).

Gewebebedrohende oder gewebeschädigende Reize werden als Noxen (lat. noxa = Schaden) bezeichnet. Sie können mechanischer, thermischer und chemischer Art sein (Handwerker 1999). Noxen aktivieren spezielle Sinnesrezeptoren, sogenannte Nozizeptoren (lat. nocere = schaden), die die Information zum Zentralnervensystem (ZNS) weiterleiten. Die Prozesse der Transformation, Transduktion (Umwandlung von noxischen Reizen in elektrische Potentiale), Weiterleitung und zentralnervösen Verarbeitung noxischer Reize bezeichnet man als Nozizeption, während die neuronalen Strukturen als nozizeptives System bezeichnet werden (Schaible und Schmidt 2005). Diesen objektiv messbaren neuronalen Prozessen der Nozizeption steht die subjektive Schmerzempfindung gegenüber. Begleitsymptome von Schmerz können daher motorischer, vegetativer, affektiver und kognitiver Art sein. Normalerweise wird Schmerz empfunden, wenn das nozizeptive System aktiviert wird. Es gibt aber auch Situationen, in denen Schmerz auftritt, obwohl weder noxische Reize noch eine Aktivierung des nozizeptiven Systems vorhanden sind (Schaible und Vanegas 2000, Schaible und Schmidt 2005).

Schmerz kann nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Ätiopathogenetisch unterscheidet man physiologischen und pathophysiologischen nozizeptiven Schmerz: Ein Schmerz nach Einwirken eines noxischen Reizes auf gesundes Gewebe hat eine Warnfunktion. Man bezeichnet ihn als physiologischen Nozizeptorschmerz. Entsteht der Schmerz aber auf dem Boden einer Entzündung oder nach Gewebeläsion, so ist er als pathophysiologischer Nozizeptorschmerz charakterisiert, der in Form von Dauerschmerzen auftritt, und oft mit einer Hyperalgesie und Allodynie verbunden ist. Die Hyperalgesie ist eine verstärkte Schmerzempfindung bei Applikation noxischer Reize. Als Allodynie dagegen bezeichnet man das Auftreten von Schmerzen bei der Einwirkung nicht-noxischer, normalerweise unter der Schmerzschwelle liegender Reize (z.B. Berührung) (Handwerker 1999, Schaible 2007). Dem nozizeptiven wird der neuropathische Schmerz gegenübergestellt. Er entsteht nach Schädigung oder Erkrankung von Neuronen des peripheren oder zentralen Nervensystems

## 1 Einleitung

und kann ebenfalls mit Hyperalgesie und Allodynie verbunden sein (z.B. Neuralgie nach Herpes zoster) (Schaible und Schmidt 2005, Schaible 2007). Anhand der Dauer des Schmerzes kann man folgende Einteilung vornehmen: Der akute Schmerz hat eine begrenzte Dauer, ist oft die unmittelbare Folge der Einwirkung eines noxischen Reizes und klingt nach Beseitigung der auslösenden Schädigung schnell ab. Früher wurde ein Schmerz chronisch genannt, wenn er mehr als sechs Monate anhielt (Russo und Brose 1998). Manche Autoren akzeptieren jedoch eine solche Definition nicht mehr, sondern definieren den chronischen Schmerz häufig nach seinem Charakter. Häufig besteht bei chronischen Schmerzen eine Diskrepanz zwischen Nozizeption und Schmerz, das heißt, dass oft keine kausale Beziehung (mehr) zwischen der Gewebeschädigung und dem Auftreten von Schmerzen besteht (z.B. Rückenschmerzen). Oft spielen dabei psychologische und soziale Faktoren eine wesentliche Rolle (Schaible und Schmidt 2005). In anderen Fällen können Schmerzen über Jahrzehnte wesentliches Symptom eines Krankheitsprozesses sein (z.B. rheumatoide Arthritis, Arthrose), der das nozizeptive System immer wieder aktiviert. Man spricht auch von chronischem Schmerz, wenn er über eine lange Zeit, immer wiederkehrend auftritt (z.B. Migräne).

Diese Arbeit widmet sich einigen schmerzrelevanten Einflüssen eines Mediators auf Neurone des peripheren nozizeptiven Systems und dem Verhalten des dazugehörigen Rezeptors unter pathophysiologischen Bedingungen. Deshalb sollen im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst grundlegende periphere Mechanismen im nozizeptiven System näher beschrieben werden.

### 1.2 Nozizeptoren

Nozizeptoren kommen in der Haut, in tieferen Geweben (Bindegewebe, Muskeln und Gelenke), sowie in viszerale Strukturen vor. Im Gehirn gibt es keine Nozizeptoren (Meßlinger 1997, Handwerker 1999). Sie gehören zu den langsam leitenden primären Afferenzen mit einer hohen Erregungsschwelle (Meßlinger 1997). Histologisch gehören sie entweder zu den unmyelinisierten C-Fasern (oder Gruppe IV) mit einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  und einer Leitungsgeschwindigkeit von  $< 2$  m/s oder zu den schwach myelinisierten A $\delta$ -Fasern (oder Gruppe III) mit einem Durchmesser von 2-5  $\mu\text{m}$  und 2,5-30 m/s Leitungsgeschwindigkeit. Sie enden im peripheren Gewebe als freie unmyelinisierte Nervenendigungen (Meßlinger 1997), wo sie mit Rezeptoren ausgestattet sind, die potentiell schädigende physikalische und chemische Stimuli detektieren und zur Erregung der Nozizeptoren führen (Vyklícký und Knotková-Urbancová 1996). In diesen Nervenendigungen findet also die Transduktion (s.o.) statt. Nozizeptoren haben kleine umschriebene rezeptive Felder, die die Areale bezeichnen, von denen aus die Fasern erregbar sind, weil dort die

## 1 Einleitung

sensorische Endigung liegt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die unmyelinisierten Fasern in der Regel in Remak-Bündeln zusammengebunden sind, das heißt mehrere Gruppe-IV-Axonon sind von derselben Schwann'schen Zelle umschlossen (Meßlinger 1997). Im Gegensatz dazu werden die Gruppe-III-Fasern innerhalb des peripheren Nerven einzeln von Schwann'schen Zellen versorgt und so mit einer Myelinscheide umgeben (Abbildung 1). In den Endverzweigungen der Gruppe-III-Fasern im Innervationsgebiet ist diese Myelin- oder Markscheide nicht mehr vorhanden (Heppelmann 1997, Meßlinger 1997, Handwerker 1999).

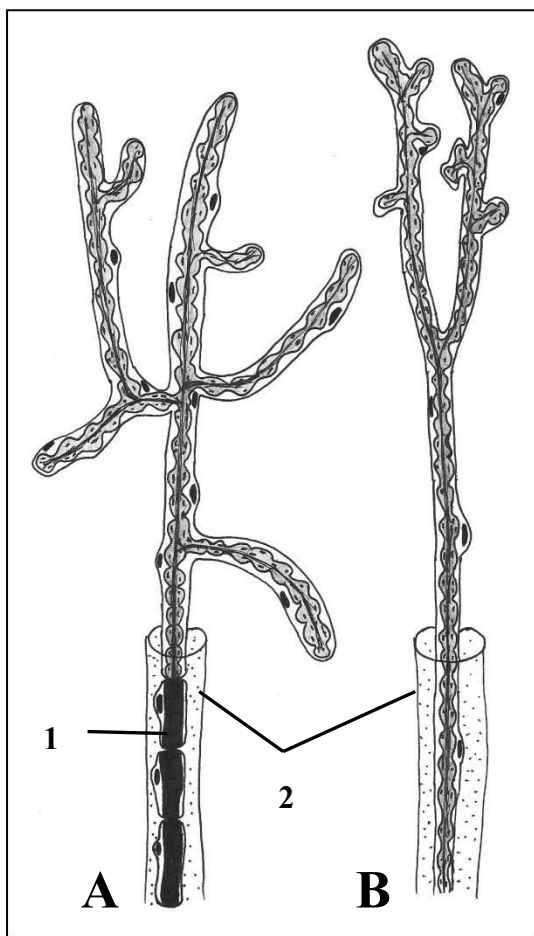


Abb. 1: Schematische Darstellung der freien Nervenendigungen nozizeptiver Fasern am Beispiel des Kniegelenkes der Katze. (A) Nozizeptive Endigung der Gruppe-III-Fasern mit langen (80-200  $\mu\text{m}$ ) und kurzen Ästen (10-20  $\mu\text{m}$ ) unterschiedlicher Ausrichtung und Schwann'schen Zellen (1), die die A-Fasern einzeln umhüllen. (B) Nozizeptive Endigung der Gruppe-IV-Fasern mit einem langen Hauptast (< 300  $\mu\text{m}$ ) und verschiedenen kleinen Seitenästen (< 10  $\mu\text{m}$ ). (2) Perineurium (nach Heppelmann 1997).

Nozizeptoren werden außerdem nach Modalitäten, das heißt nach ihren Antworteigenschaften auf mechanische (spitzer und stumpfer Druck), thermische (Hitze und Kälte) und chemische (z.B. Bradykinin, Prostaglandin, Histamin) Stimulation klassifiziert. Reagieren sie auf alle drei Reizmodalitäten, bezeichnet man sie als polymodal (v.a. in Haut, Sehnen, Skelettmuskulatur, Gelenken) (Meßlinger 1997). In der Haut sind die Nozizeptoren besonders gut untersucht: Die am häufigsten vorkommenden C-Faser-Nozizeptoren (CMHs = C-Faser-Mechano-Hitze-Nozizeptoren) sind polymodal und haben ähnliche mäßig hohe

## 1 Einleitung

Erregungsschwellen wie die A $\delta$ -Faser-Nozizeptoren (AMHs = A-Faser-Mechano-Hitze-Nozizeptoren) des Typ II. Daneben gibt es noch andere A $\delta$ -Faser-Nozizeptoren, die sehr hohe Erregungsschwellen für mechanische Reize besitzen und durch Hitze erst nach längerem Einwirken aktiviert werden (AMH Typ I). Außerdem kommen in der Haut auch noch sog. stumme Nozizeptoren vor, die weder durch nicht-noxische noch durch noxische mechanische Reize im gesunden Gewebe erregt werden können. Ihre extrem hohe Erregungsschwelle wird aber unter sensibilisierenden Bedingungen wie beispielsweise einer Entzündung auf ein den CMH-Fasern ähnliches Niveau herabgesetzt (Campbell und Meyer 1996, Meßlinger 1997).

Nervenfasern oder Afferenzen aus den Gelenken bestehen hauptsächlich aus A $\delta$ - und C-Fasern mit einer hohen Erregungsschwelle für Bewegung. Diese mechanosensitiven Nozizeptoren sollen das Gelenk schützen und werden bei normalen Gelenkbewegungen im Arbeitsbereich nicht aktiviert. Die Muskel-, Sehnen- und Gelenknozizeptoren antworten nur bei Zerrung am Bewegungsapparat und bei Einwirkung starken Drucks, Überdehnung oder Torsion der Gelenkstrukturen (Handwerker 1999). Circa die Hälfte aller C-Fasern sind stumme Nozizeptoren, die vor allem an großen Gelenken (z.B. Knie- oder Sprunggelenk) nachgewiesen wurden (Schaible und Grubb 1993, Schaible und Schmidt 1996, Handwerker 1999). Daneben gibt es eine Gruppe von Afferenzen, die bei nicht-noxischer Bewegung wenig, bei noxischer Bewegung kräftig aktiviert werden (Meßlinger 1997, Handwerker 1999). Sensorische nozizeptive Fasern haben eine afferente Funktion. Sie leiten Informationen aus der Körperperipherie über den Zellkörper des sensorischen Neurons, der innerhalb der Hinterwurzelganglien liegt, ins ZNS.

### **1.3 Sensibilisierung der Nozizeptoren**

Nozizeptoren können durch noxische Reize erregt, aber auch sensibilisiert werden (Kumazawa 1996, Meßlinger 1997, Schaible 2007). Diese sogenannte periphere Sensibilisierung findet an den peripheren sensorischen Endigungen der Nozizeptoren statt. Sie beinhaltet die Abnahme der Erregungsschwelle für mechanische, thermische oder chemische Reize, die Zunahme der Antworten auf noxische Reize, die Rekrutierung von stummen Nozizeptoren, sowie häufig eine Vergrößerung des rezeptiven Feldes (Kumazawa 1996, Schaible und Schmidt 2005). Zusätzlich entwickeln viele Nozizeptoren Spontanaktivität und können damit die Basis für die Entstehung von Ruheschmerzen bilden.

Die Nozizeptorsensibilisierung resultiert aus der Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Bradykinin, Histamin, Serotonin, Prostaglandine) und deren Bindung an Rezeptoren in der Membran der peripheren sensorischen Endigungen. Diese Bindung aktiviert Second-

## 1 Einleitung

messenger-Systeme, die über Enzyme andere Rezeptoren oder Ionenkanäle beeinflussen, so dass diese für mechanische und thermische Reize empfindlicher werden. Prostaglandin E<sub>2</sub> aktiviert z.B. die Adenylatzyklase mit Bildung des Second-messengers cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), der u.a. die Proteinkinase A aktiviert. Letztere bewirkt eine Phosphorylierung von Ionenkanälen und damit eine Sensibilisierung der Nozizeptormembran (Schaible und Schmidt 2005). Durch die Aktivierung des Immunsystems entstehen daneben auch andere chemische Mediatoren wie NO, Leukotriene, Interleukine (z.B. IL-1, IL-6, IL-8) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), die zusammen mit einer gesteigerten Produktion von Neuropeptiden wie z.B. Substanz P und CGRP (Calcitonin gene-related peptide) sowie NGF (Nerve growth factor) und anderen Nervenwachstumsfaktoren in den nozizeptiven Neuronen ebenfalls eine Sensibilisierung von Nozizeptoren bedingen und so zur Entwicklung des Entzündungsschmerzes beitragen (Meßlinger 1997).

Die genannten chemischen Substanzen können außerdem indirekt die Freisetzung anderer Mediatoren oder noxischer Substanzen fördern (Bevan 1996). Sie steuern Ionenkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und beeinflussen somit die Konzentrationen von Second-messengern oder modifizieren die Gentranskription anderer Rezeptoren und Mediatoren (Bevan 1996, Meßlinger 1997, Schaible 2007).

### 1.4 Hinterwurzelganglienzellen

In den paarigen Hinterwurzelganglien sind u.a. die Zellkörper der Nozizeptoren des Körpers zusammengefasst. Sie liegen entlang der Wirbelsäule bei den Hinterwurzeln der aus dem Rückenmark segmental austretenden Spinalnerven, weshalb man sie auch als DRG-Neurone (dorsal root ganglion) oder Spinalganglienzellen bezeichnet. In den Zellkörpern werden Proteine und Neuropeptide gebildet, die mit Hilfe des axoplasmatischen Transports in die peripheren sensorischen Endigungen im Gewebe und in die Nervenfasereindigungen des Rückenmarks gelangen (Handwerker 1999). Im Rückenmark haben sie bei der synaptischen Übertragung eine modulierende Wirkung, im Gewebe wirken sie z.B. auf Rezeptoren der Gefäße. Bei schädigenden Prozessen kommt es zur vermehrten Synthese solcher Neuropeptide, wie z.B. Substanz P und CGRP in den DRG-Neuronen (Donnerer et al. 1992, Hanesch et al. 1993). Ihre periphere Wirkung ist vor allem die Förderung entzündlicher Gewebereaktionen, wie z.B. der Plasmaextravasation aus den Venolen über die Entspeicherung von Mastzellen durch Substanz P (Handwerker 1999) oder der Dilatation der terminalen Arteriolen (Vasodilatation) und Durchblutungssteigerung im entzündeten Gewebe durch CGRP (Escott et al. 1995). Durch die Plasmaextravasation werden T-Lymphozyten,

## 1 Einleitung

Fibroblasten und Synoviozyten stimuliert und z.B. arthritische Symptome verstärkt (Levine et al. 1984). Da die beschriebenen Effekte von neuronalen Strukturen ausgelöst werden, spricht man von der neurogenen Entzündung (Mutschler et al. 2007), die auch zur Sensibilisierung von Nozizeptoren und damit zur Schmerzentstehung beiträgt (Schaible und Grubb 1993).

In der Membran der peripheren sensorischen Endigungen werden eine Vielzahl von molekularen Rezeptoren für Mediatoren sowie Ionenkanäle exprimiert. Die Oberseite in Abbildung 2 zeigt einige Beispiele von Entzündungsmediatoren und andere Stoffe in Beziehung zu ihren Rezeptoren. Viele dieser Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die über Second-messenger-Systeme zur Öffnung von Ionenkanälen beitragen. Außerdem sind verschiedene Zellen dargestellt, aus denen Entzündungsmediatoren freigesetzt werden können. Die Unterseite der Abbildung zeigt Ionenkanäle, die für die Transduktion von chemischen, thermischen und wahrscheinlich auch mechanischen noxischen Reizen in Nozizeptoren von Bedeutung sind. Durch einige davon fließen mehrere Ionentypen, andere dagegen sind selektiv für ein bestimmtes Ion. Zu beachten ist, dass nicht alle dargestellten Rezeptoren oder Ionenkanäle auf ein und derselben peripheren sensorischen Endigung vorkommen (nach Mutschler et al. 2007).

# 1 Einleitung

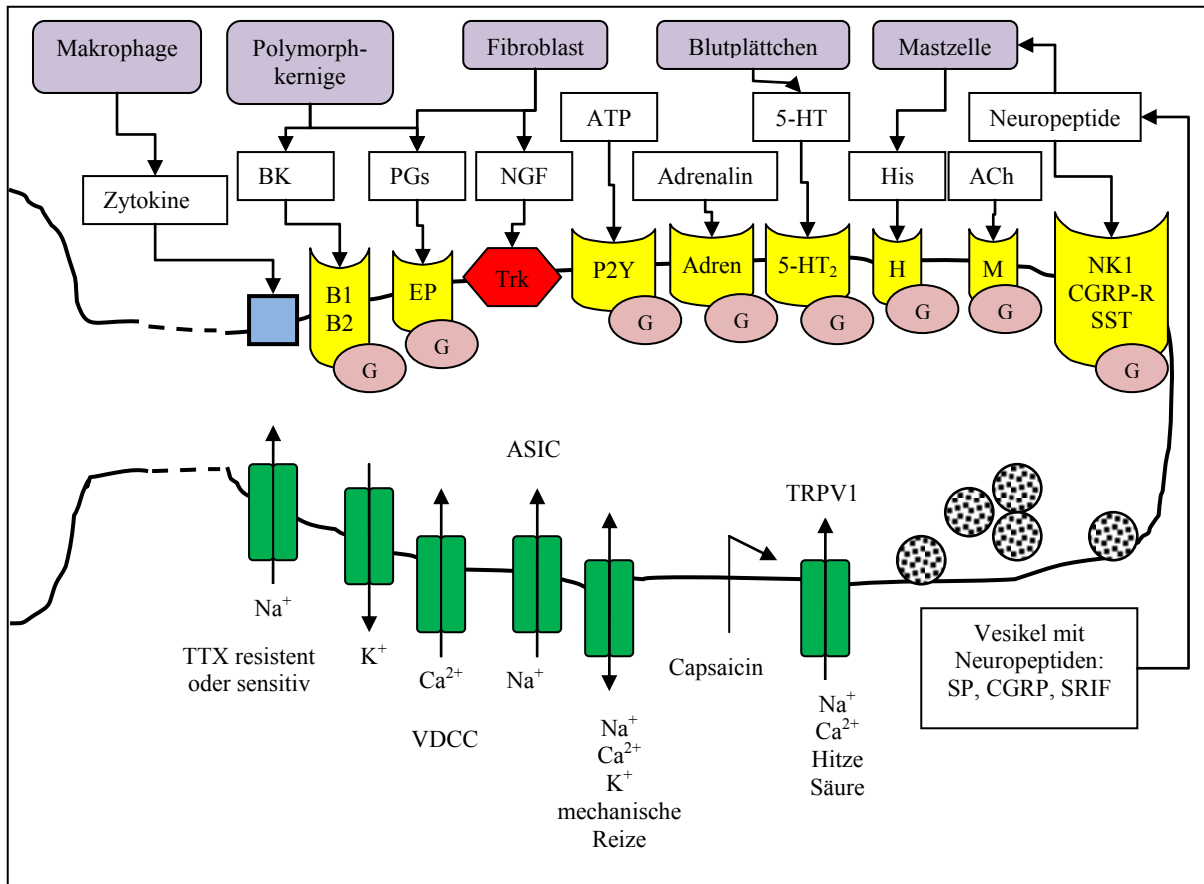


Abb. 2: Modell einer nozizeptiven Primärafferenz mit ihrem Zellkörper und einer sensorischen Endigung. Die Oberseite zeigt Rezeptoren für Mediatoren und Neuropeptide, die Unterseite Ionenkanäle. Die aus verschiedenen Zellen während einer Entzündung freigesetzten Substanzen wirken auf die Rezeptoren in der sensorischen Endigung. Zu berücksichtigen ist, dass nicht alle Rezeptoren oder Ionenkanäle auf einer sensorischen Endigung zu finden sind. Die Endigung selbst setzt ebenfalls Neuropeptide frei, die exzitatorische oder inhibitorische Wirkungen innerhalb des Entzündungsgeschehens haben. Oberseite: BK Bradykinin, PGs Prostaglandine, NGF Nerve growth factor, ATP Adenosintriphosphat, 5-HT 5-Hydroxytryptamin, His Histamin, ACh Acetylcholin, B1 Bradykinin-1-Rezeptor, B2 Bradykinin-2-Rezeptor, EP Prostaglandin-E-Rezeptor, Trk Tyrosinkinase-Rezeptor, P2Y purinergischer Rezeptor für ATP, Adren Adrenozeptor, 5-HT<sub>2</sub> Serotonin-2-Rezeptor, H Histaminrezeptor, M Muscarinrezeptor, NK1 Neurokinin-1-Rezeptor für Substanz P, CGRP-R Rezeptor für CGRP, SST Somatostatinrezeptor, G G-Protein. Unterseite: VDCC Voltage-dependent calcium channel (spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal), ASIC Acid sensitive ion channel (säureempfindlicher Ionenkanal), TRPV1 Transient receptor potential vanilloid 1-Rezeptor, TTX Tetrodotoxin, SP Substanz P, CGRP Calcitonin gene-related peptide, SRIF Somatostatin (nach Mutschler et al. 2007).

### 1.5 DRG-Neurone adulter Ratten als Modell für Nozizeptoren

Da Nozizeptoren sehr feine Endbäumchen (Durchmesser 1  $\mu\text{m}$ ) besitzen, ist das Studium molekularer Prozesse direkt an den peripheren Endigungen erschwert. Für Untersuchungen nozizeptiver Prozesse an der Haut steht zwar ein Haut-Nerven-Präparat zur Verfügung (Handwerker 1999, Oprée und Kress 2000), allerdings erlaubt dies auch keine Ableitung von peripheren Endigungen. Als Modell für Untersuchungen an Haut und tieferen Geweben wie z.B. den Gelenkafferenzen wurden in der vorliegenden Arbeit isolierte Zellkörper von DRG-Neuronen verwendet, um molekulare Veränderungen auf Rezeptor- oder Proteinebene im nozizeptiven System zu untersuchen. Dieses System ist seit vielen Jahren als Modell anerkannt, um neben elektrophysiologischen auch zellbiologische Fragen an Nozizeptoren zu klären (Vyklícký und Knotková-Urbancová 1996). Zahlreiche Studien belegen Gemeinsamkeiten zwischen den Eigenschaften peripherer nozizeptiver Nervendigungen *in vivo* und denen isolierter DRG-Neurone:

Die Zellkörper der DRG-Neurone exprimieren Ionenkanäle, die auch in den sensorischen Endigungen präsent sind. Beispielsweise wurden nichtselektive Kationenkanäle beschrieben, die durch noxische Hitze aktiviert werden (Cesare und McNaughton 1997, Cesare et al. 1999, Waxman et al. 1999).

Die Zellkörper der DRG-Neurone exprimieren zudem Rezeptoren für Liganden, welche auch die sensorischen Endigungen in Präparationen *in vivo* und *in vitro* aktivieren. Das sind z.B. der TRPV1-Rezeptor für Capsaicin und der B2-Rezeptor für Bradykinin (Gold et al. 1996, Kress und Reeh 1996, Kress et al. 1997, Vyklícký et al. 1998).

Nicht zuletzt bewirken Entzündungsmediatoren neben der Aktivierung bzw. Sensibilisierung von nozizeptiven Fasern auch die Freisetzung von Neuropeptiden (z.B. CGRP und Substanz P) aus den Zellkörpern der DRG-Neurone wie aus primär afferenten Fasern und aus peripheren sensorischen Endigungen (Hingtgen und Vasko 1994, Vasko et al. 1994, Hingtgen et al. 1995). Es kann also angenommen werden, dass die Rezeptor- bzw. Proteinexpression der DRG-Neurone derjenigen der sensorischen Endigungen der DRG-Neurone ähnlich ist (Segond von Banchet et al. 2000). Zu berücksichtigen ist dabei, dass Zellkulturen ein *in vitro*-Modell darstellen und deshalb gefundene Ergebnisse in *in vivo*-Ansätzen am Tier und letztlich am Menschen in ihrer Bedeutung überprüft werden müssen.

### 1.6 Der TRPV1-Rezeptor

Der TRPV1-Rezeptor (Transient receptor potential vanilloid 1-Rezeptor), früher auch Vanilloid-1-Rezeptor genannt, gehört zur TRP-Subfamilie der nicht-selektiven



## 1 Einleitung

Kationenkanäle. Er wird durch Capsaicin (dem Hauptbestandteil des roten Chili-Pfeffers), noxische Hitze (ab ca. 42 °C), Protonen (z.B. saures extrazelluläres Milieu bei Entzündungen) und dem Cannabinoid Anandamid aktiviert (Szallasi 2002, Nagy et al. 2004). TRPV1-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung thermischer Hyperalgesie während einer Entzündung. So zeigten Verhaltensstudien mit TRPV1-„Knock out“-Mäusen eine Unfähigkeit der Tiere thermische Hyperalgesie als Antwort auf eine Entzündung zu entwickeln (Davis et al. 2000). Aktivierung des TRPV1-Rezeptors führt zum Kationeneinstrom (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) in nozizeptive sensorische Neurone, was in Membrandepolarisation und Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide von primär afferenten Nervenendigungen resultiert (Szallasi und Blumberg 1999). Anhaltende oder wiederholte Aktivierung des Rezeptors desensibilisiert ihn gegen nachfolgende Stimuli durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Prozess (Mohapatra und Nau 2003, Mohapatra und Nau 2005). Wie in Abbildung 3 schematisch ersichtlich, wird der TRPV1 auch von intrazellulären Proteinkinasen wie Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) beeinflusst.

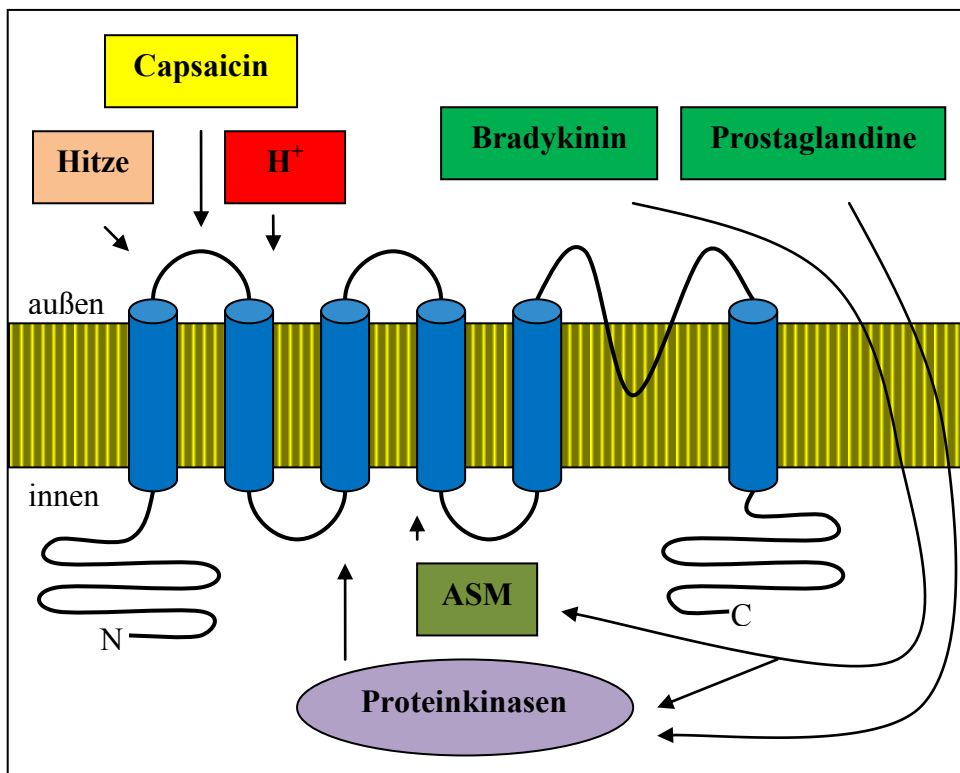


Abb. 3: Schematische Darstellung des TRPV1-Rezeptors und seiner Aktivatoren. Capsaicin, Hitze, niedriger pH ( $\text{H}^+$ ) und Arachidonsäuremetaboliten (ASM) wie z.B. Anandamid können den Rezeptor direkt aktivieren, Prostaglandine und Bradykinin können ihn indirekt via ihrer Rezeptoren (nicht dargestellt) und Aktivierung von Proteinkinasen sensibilisieren (nach Cortright und Szallasi 2004).

## 1 Einleitung

Phosphorylierung durch diese Proteinkinasen führt zur Sensibilisierung des Kanals gegenüber Hitze, Protonen und Capsaicin (Lopshire und Nicol 1998, Premkumar und Ahern 2000, Vellani et al. 2001, Numazaki et al. 2002, Rathee et al. 2002). Entzündungsmediatoren wie Bradykinin und Prostaglandine aktivieren solche Proteinkinasen und sensibilisieren damit den TRPV1-Rezeptor (Cesare und McNaughton 1996, Cortright und Szallasi 2004, Moriyama et al. 2005).

Der TRPV1-Rezeptor wird in der Zytoplasmamembran und auch in intrazellulären zytoplasmatischen Vesikeln exprimiert, die vermutlich als Reservedepot dienen und innerhalb kurzer Zeit, z.B. durch PKC-Aktivierung, zur Zytoplasmamembran transloziert werden können (Morenilla-Palao et al. 2004, Nagy et al. 2004). Die Rolle der TRPV1-Rezeptorexpression im endoplasmatischen Retikulum ist ungeklärt. Möglicherweise ist der Rezeptor dort in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase involviert, da Aktivierung des Rezeptors durch Capsaicin intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mobilisiert (Kárai et al. 2004). Es scheint so, dass nicht das Protein, sondern die mRNA des TRPV1-Rezeptors zur Nervenendigung transportiert wird und erst vor Ort die Translation stattfindet (Tohda et al. 2001). DRG-Neurone, die den TRPV1-Rezeptor zu ca. 30 % exprimieren, haben kleine und mittlere Durchmesser (Ahluwalia et al. 2000, Fukuoka et al. 2002, Amaya et al. 2003, Bär et al. 2004).

Es ist bekannt, dass die TRPV1-Rezeptorexpression durch nozizeptive Moleküle wie NGF (nerve growth factor), GDNF (glia cell line-derived neurotrophic factor) und der Aktivierung Ras-abhängiger Signalwege hochreguliert werden kann (Bron et al. 2003).

In Entzündungsmodellen verhält sich die TRPV1-Rezeptorexpression in DRG-Neuronen unterschiedlich. Es gibt Modelle, in denen die Rezeptoren hochreguliert werden, andere dagegen zeigen keine Änderung der Expression (Carlton und Coggeshall 2001, Ji et al. 2002, Amaya et al. 2003, Zhou et al. 2003, Bär et al. 2004). Hensellek et al. (2007) zeigten einen Einfluss proinflammatorischer Zytokine am Beispiel des  $\text{TNF}\alpha$  auf die Expression des TRPV1-Rezeptors.

### 1.7 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Die zytosolische (intrazelluläre) freie Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in DRG-Neuronen kann durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum gesteigert werden (Miller 1991). Neuronaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Membran ist intensiv erforscht worden (Kostyuk 1989, Llinás et al. 1992).  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären

## 1 Einleitung

Speichern kann durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder durch Inositol-1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) aktiviert werden (Kostyuk und Verkhratsky 1994).

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen agieren als Haupttrigger für die Freisetzung von Neurotransmittern und ihre Involvierung in diesem Prozess wird seit Jahrzehnten untersucht (Katz 1969, Smith und Augustine 1988). Außerdem sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für viele andere neuronale Prozesse wie z.B. der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit (Marty 1989), der Integration elektrischer Signale (Llinás 1988, Marty 1989) und der Genexpression (Szekely et al. 1990) unentbehrlich. Diese Prozesse laufen in einem weiten Zeitspektrum von Millisekunden bis Tagen ab.

Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration sensibilisiert DRG-Neurone für Hitze über einen von Proteinkinasen abhängigen Weg (Guenther et al. 1999, Kress und Guenther 1999, Rathee et al. 2002). Inflammatorische Mediatoren wie Bradykinin, Serotonin und Prostaglandin  $\text{E}_2$ , die ihre Wirkungen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermitteln, können die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigern (Linhart et al. 2003).

### 1.8 IL-1 $\beta$ , seine Rezeptoren und der IL-1RA

Zum Interleukin-1 (IL-1) gehören zwei verschiedene Polypeptide, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die vielfältige proinflammatorische, metabolische, physiologische, hämatopoetische und immunologische Fähigkeiten besitzen. Obwohl beide Formen von IL-1 distinkte Genprodukte sind, nutzen sie dieselben Oberflächenrezeptoren und haben eine ähnliche biologische Funktion (Dinarello 1991). IL-1 $\alpha$ -Messungen sind schwieriger, weil es ein primär zytosolisches Zytokin ist und nur unter außergewöhnlichen Bedingungen *in vitro* und *in vivo* freigesetzt wird (Wakabayashi et al. 1991, Watanabe und Kobayashi 1994). Während IL-1 $\beta$  ein systemischer, hormonähnlicher Mediator ist, regelt IL-1 $\alpha$  primär intrazelluläre Ereignisse und vermittelt lokale Entzündung (Übersicht Dinarello 1996). IL-1 $\beta$  wird aus verschiedenen immunmodulatorischen Zellen wie beispielsweise Makrophagen, peripheren neutrophilen Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und außerdem aus Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, langsamen Muskelzellen und Zellen des ZNS (z.B. Astrozyten, Gliazellen) freigesetzt (Watkins und Maier 1999, Sommer 2001). Die Fülle der IL-1 $\beta$  freisetzenden Zellen spiegelt auch die Wirkungen des Zytokins wieder. So kommt es unter IL-1 $\beta$ -Einfluss beispielsweise zu einer vermehrten Prostaglandinsynthese (v.a. Prostaglandin  $\text{E}_2$ ) durch Stimulierung der Cyclooxygenase-2-Synthese (COX-2) und damit u.a. zur Fiebertriggerung im Hypothalamus (Dinarello 2004). Allerdings wirkt es dort auch durch die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysenachse und der damit verbundenen ACTH- und Cortisolfreisetzung entzündungshemmend. IL-1 $\beta$  steigert die Expression von

## 1 Einleitung

Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) auf mesenchymalen Zellen und VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule-1) auf endothelialen Zellen. Durch letzteres kommt es am Endothel zur Leukozytenadhäsion und Infiltration von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen in den Extrazellularraum (Übersicht Dinarello 2002). Arend (2001) fasst die Rolle von IL-1 $\beta$  in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zusammen. Er stellt IL-1 $\beta$  wie auch TNF $\alpha$  als wichtige Stimulatoren der Produktion proteolytischer Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) innerhalb der Entzündungskaskade heraus. Auch Dinarello (1996) beschreibt einen Zusammenhang zwischen einer Überproduktion von IL-1 $\beta$  und der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Außerdem wirkt IL-1 $\beta$  indirekt über Zunahme der Interleukin-6-Produktion auf die Leber, die daraufhin vermehrt Akutphase-Proteine synthetisiert (Dinarello 2005). Des Weiteren hat IL-1 $\beta$  einen Effekt auf das Knochenmark: Es steigert die Mobilisierung von Granulozytenvorläufern und reifen neutrophilen Granulozyten und bewirkt somit eine periphere Neutrophilie und durch Interleukin-6-Induktion eine Thrombozytose (Dinarello 2005). Dass IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt, zeigen auch die Arbeiten von Dantzer et al. 1991, Rothwell 1991 und Rothwell und Hopkins 1995, die einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg von intrazerebralem IL-1 $\beta$  und der Induktion von Fieber, Krankheitsverhalten, und vermehrter neuroendokriner Aktivität während peripherer Entzündungszustände untersuchten. Außerdem ist die IL-1 $\beta$ -Expression im ZNS während verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder dem Morbus Alzheimer erhöht (Griffin et al. 1989, Patterson 1995).

IL-1 $\beta$  scheint auch eine wichtige Rolle in der Entstehung thermischer Hyperalgesie zu spielen, denn Obreja et al. (2002) beschreiben eine IL-1 $\beta$ -induzierte Potenzierung hitzeaktivierter Ströme über einen PKC-abhängigen Signalweg in peripheren Neuronen. PKC wiederum phosphoryliert hitzetransduzierende Kanäle wie z.B. den TRPV1-Rezeptor (siehe 1.6).

Die Produktion von IL-1 $\beta$  erfolgt nicht über klassische Wege der Proteinsekretion, sondern über die Synthese eines inaktiven Vorläufers: den „IL-1 $\beta$  precursor“ (31 kDa). Durch Caspase-1, auch „IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) genannt, wird dieser IL-1 $\beta$  precursor in die reife Form von IL-1 $\beta$  (17 kDa) gespalten. Durch aktivierte Phospholipasen, vor allem die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLA-2) erfolgt dann die lysosomale Exozytose und Sekretion von IL-1 $\beta$  (Übersicht Dinarello 2005). Der IL-1 $\beta$  precursor kann außerdem von anderen Proteasen, die bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen vermehrt auftreten (Hazuda et al. 1990), wie z.B. Elastase (Dinarello et al. 1986), Cathepsin G (Baggiolini et al. 1978), Collagenase (Hazuda et al. 1990), Chymotrypsin (Mizutani et al.

## 1 Einleitung

1991a), Mastzell-Chymase (Mizutani et al. 1991b), Proteinase-3 (Coeshott et al. 1999) und von einigen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gespalten werden, die man in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis vermehrt nachweisen konnte (Schönbeck et al. 1998).

IL-1 $\beta$  interagiert mit zwei Rezeptoren: dem IL-1-Rezeptor-I (IL-1RI, 80 kDa), der das Signal transduziert, und dem IL-1-Rezeptor-II (IL-1RII, 68 kDa), der zwar IL-1 $\beta$  bindet aber kein Signal weitergibt (Sims et al. 1993). Er wird deshalb auch als „Lockvogelrezeptor“ (decoy receptor) bezeichnet und ist im Zytokinnetzwerk einzigartig (Colotta et al. 1994). Beide IL-1-Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine mit drei Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen (Colotta et al. 1994). Der IL-1RII unterscheidet sich aber vom IL-1RI durch eine kürzere zytoplasmatische Domäne. Extrazelluläre oder lösliche Teile des IL-1RI oder IL-1RII, die sowohl im kranken als auch im gesunden Menschen zirkulieren, dienen als natürliche Puffer, um überschüssiges IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder den Antagonisten von IL-1 $\beta$ , Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA, s.u.) zu binden. Die Affinität dieser Bindungen ist unterschiedlich. Am stärksten bindet IL-1RA an den oberflächengebundenen IL-1RI (50-100 pmol/l), danach IL-1 $\alpha$  (200-300 pmol/l) und IL-1 $\beta$  (0,5-1 nmol/l). Der lösliche IL-1RI bindet hauptsächlich IL-1RA, während sowohl der lösliche als auch der oberflächengebundene IL-1RII hauptsächlich IL-1 $\beta$  nahezu irreversibel binden (Arend et al. 1994, Sims et al. 1994).

Wenn IL-1 $\beta$  an den IL-1RI bindet, wird ein Komplex geformt, der das Interleukin-1-Rezeptor-akzessorische Protein (IL-1RAcP) bindet, was in einer hochaffinen Bindung von IL-1 $\beta$  resultiert (Greenfeder et al. 1995, Übersicht Dinarello 1996). Der IL-1RI wird danach internalisiert und dann zum Zellkern transloziert (Curtis et al. 1990), was die Beeinflussung von Transkriptionsvorgängen wahrscheinlich macht. Die Bindung von IL-1 $\beta$  an den IL-1RI initiiert intrazelluläre Kaskaden [z.B. Aktivierung von MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) und Tyrosinkinase], die in der Aktivierung und Translokation von Transkriptionsfaktoren und z.B. der Transkription des COX-2-Gens und der PGE<sub>2</sub>-Synthese gipfeln (Kuno und Matsushima 1994, Wesche et al. 1997, Dinarello 2004). IL-1 $\beta$  aktiviert auf diese Weise eine Vielzahl von Genen, die für Zytokine, Zytokinrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle oder Entzündungsmediatoren (z.B. Kollagenase und Akutphase-Proteine) kodieren (Kuno und Matsushima 1994).

Zur Interleukin-1-Familie gehört neben IL-18, auf das hier nicht näher eingegangen werden soll, außerdem noch ein IL-1-Inhibitor, der bereits erwähnte IL-1RA. IL-1RA wird lokal von verschiedenen Geweben als Antwort auf eine Entzündung oder Infektion produziert. Von IL-

1RA sind multiple Isoformen bekannt. Eine rekombinante (nicht glykosylierte) Form (17 kDa) hat aber ihre Fähigkeit, die IL-1 $\beta$ -Bindung an den Rezeptor (in vitro) zu inhibieren, nicht verloren (Carter et al. 1990, Eisenberg et al. 1990). IL-1RA bindet kompetitiv an den IL-1RI ohne ein Signal zu transduzieren und blockiert damit den Rezeptor für IL-1 $\beta$  (Übersicht Dinarello 1996). Bindet IL-1RA an den IL-1RI, kommt es nicht zu einer Rekrutierung des IL-1RAcP oder Formung des Heterokomplexes um ein Signal zu triggern (Arend 2001). IL-1RA antagonisiert die Wirkungen von IL-1 $\beta$  und führt damit zur deutlichen Schmerzreduktion. Beispielsweise verringern sich histopathologische Parameter der Gelenkentzündung und Gelenkzerstörung in Ratten mit einer adjuvanten Arthritis, die mit rekombinatem IL-1RA behandelt wurden (Feige et al. 2000). Cunha et al (2000) zeigten, dass es zu einer signifikanten Reduktion der mechanischen Allodynie kommt, die u.a. durch IL-1 $\beta$  vor dem Hintergrund einer peripheren Entzündung verursacht wird.

### **1.9 Die Antigen-induzierte Arthritis als Modell für eine periphere Entzündung**

Für die Untersuchungen zur Expression des IL-1RI in DRG-Neuronen (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bräuer vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena) diente als Entzündungsmodell eine unilaterale Antigen-induzierte Arthritis (AIA) des Kniegelenks der Ratte. Dieses Modell ist ausführlich histologisch und immunologisch charakterisiert worden (Bräuer et al. 1990).

Die rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritis genannt, gehört zu den häufigsten entzündlichen Erkrankungen der peripheren Gelenke des Menschen (Prävalenz: 1 % bei Erwachsenen, ab Alter > 55 Jahren ca. 2 %). Durch unbekannte Faktoren, vermutlich virale oder bakterielle Fremdantigene (Hyrich und Inman 2001, Münz et al. 2009), wird bei genetisch disponierten Personen eine Autoimmunerkrankung induziert mit entzündlicher Infiltration der Gelenkschleimhaut (Synovialis) mit autoreaktiven T-Helferlymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und sog. „dendritic cells“ (abgeleitet von Monozyten/Makrophagen). Im Zentrum der immunologischen Reaktion steht die Interaktion von Lymphozyten (v.a. T-Lymphozyten) und Monozyten mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), Immunglobulinen und Autoantikörpern gegen das Fc-Fragment des IgG (Rheumafaktoren). Es kommt zur Komplementaktivierung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren und knorpelaggressiven Enzymen (z.B. Kollagenase und Elastase). Die Folge ist eine Verdickung der Synovialis (Pannus), die durch Invasion von makrophagenähnlichen Zellen (Typ A-Synoviozyten) und durch Proliferation von fibroblastenähnlichen Zellen (Typ B-Synoviozyten) verursacht wird. Der Pannus überwuchert

## 1 Einleitung

den Knorpel und zerstört ihn ähnlich wie das Wachstum eines Tumors oft unaufhaltsam (tumor like proliferation). Der fortschreitende, selten durch Remission unterbrochene, destruierende Prozess manifestiert sich an zahlreichen Gelenken. Neben Schwellung, Schmerz und Funktionseinbuße der betroffenen Gelenke führt der Entzündungsprozess zur völligen Zerstörung der Gelenkstrukturen. Daneben können extraartikuläre Manifestationen wie z.B. subkutane Rheumknötchen, Nagelveränderungen, Atrophie der Muskulatur und Vaskulitis auftreten (Übersicht Lee und Weinblatt 2001, Übersicht Brennan und McInnes 2008).

Das verwendete Modell der AIA zeigt viele Übereinstimmungen mit der menschlichen RA im histologischen Bild der Entzündung, in der Knorpel- und Knochenschädigung, in bestimmten Immunreaktionen und in der therapeutischen Beeinflussbarkeit (Bräuer et al. 1994, Henzgen et al. 1996, Thoss et al. 1996, Oelzner et al. 2000). Die Arthritis wird in der Ratte durch ein Fremdantigen, methyliertes Rinderserum-Albumin (mBSA), in komplettem Freund'schen Adjuvans ausgelöst. Das Fremdantigen wird in ein Kniegelenk der Ratte gespritzt, nachdem vorher die Tiere spezifisch sensibilisiert worden sind. Damit wird eine monoartikuläre akute Entzündung (Monoarthritis) mit einer Inzidenz von 100 % in den ersten paar Stunden induziert. Dieses Modell ist das einzige etablierte Tiermodell, das von einer akuten Gelenkentzündung spontan in eine chronische Phase übergeht. Die akute Phase der Entzündung ist durch Fibrinexsudation und Invasion von Granulozyten in das Gelenk charakterisiert, während die chronische durch Infiltration von mononukleären Zellen, Hyperplasie der Synovialis, Fibrose der periartikulären Strukturen und Knorpel- und Knochendestruktion charakterisiert werden kann (Segond von Banchet et al. 2000, Schaible et al. 2009). Mechanische Hyperalgesie des entzündeten wie auch des kontralateralen Knies und Senkung der Latenz, die Pfoten auf noxische Hitze hin zurückzuziehen, als Ausdruck schmerzassozierten Verhaltens der Tiere kann beobachtet werden (Segond von Banchet et al. 2009). Boettger et al. (2008) wiesen auch auf die Entwicklung thermischer Hyperalgesie als sekundäre Hyperalgesie fernab vom entzündeten Knie der Ratte hin.

### **1.10 Zielstellung**

Im Rahmen einer Entzündung werden im betroffenen Gewebe u.a. proinflammatorische Zytokine freigesetzt, die auf nozizeptive Nervenfasern wirken oder Zellen des Immunsystems stimulieren, welche ihrerseits Mediatoren freisetzen, die nozizeptive Fasern erregen und auf das Entzündungsgeschehen stimulierend einwirken können. Ein zentrales proinflammatorisches Zytokin neben  $\text{TNF}\alpha$  ist  $\text{IL-1}\beta$ . In den letzten Jahren sind verschiedene kurz- und langfristige Wirkungen von  $\text{IL-1}\beta$  im Zusammenhang mit Schmerz untersucht worden. Dabei

## 1 Einleitung

konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  über eine gesteigerte Produktion und Freisetzung verschiedener proalgetischer Mediatoren, wie z.B. CGRP, Substanz P, NGF und NO, Hyperalgesie und mechanische Allodynie bis hin zu Knochen- und Knorpelschäden verursachen kann und ihm damit eine zentrale Rolle in der Genese und Chronifizierung von Schmerzen während chronisch inflammatorischer Krankheiten wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis zukommt. Es gibt Hinweise, dass IL-1 $\beta$  neben langfristigen Effekten, wie z.B. der Stimulation der COX-2-Expression, außerdem auch kurzfristig, das heißt nicht über Veränderungen der Expression, Nozizeptoren sensibilisieren kann.

In der Arbeit soll Folgendes untersucht werden:

1. In welchem Umfang wird der Rezeptor von IL-1 $\beta$ , IL-1RI, an den primär afferenten Neuronen exprimiert? Als Modell dienen histologische Schnitte von lumbalen DRG-Neuronen der adulten Ratte, an denen mit immunhistochemischen Markierungen der IL-1RI nachgewiesen werden soll.
2. Zeigt der IL-1RI im zeitlichen Verlauf einer Entzündung Veränderungen in seiner Expression? Dazu wird die Expression des IL-1RI an den lumbalen DRG-Neuronen nach Induktion einer Monoarthritis im Kniegelenk der adulten Ratte immunhistochemisch untersucht.
3. Hat IL-1 $\beta$  an peripheren Neuronen einen Einfluss auf die Expression nozizeptionsrelevanter Rezeptoren? Bisher gibt es einige Hinweise darauf, dass proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF $\alpha$  den TRPV1 hochregulieren können. Dieser oft als Markerrezeptor für die TRP-Familie gebrauchter Ionenkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Hitze-nozizeption. Als Ausgangspunkt dient der Befund, dass IL-1 $\beta$  auf hitzeaktivierte Ströme in peripheren Neuronen Einfluss nimmt. Es wird an kultivierten DRG-Neuronen immunzytochemisch untersucht, inwieweit das Zytokin IL-1 $\beta$  die Expression des TRPV1 beeinflusst. Außerdem soll neben dieser möglichen langfristigen Wirkung auch ein möglicher kurzfristiger Einfluss von IL-1 $\beta$  auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationsveränderungen in DRG-Neuronen untersucht werden.

Ziel der Untersuchungen über die Wirkung von IL-1 $\beta$  sollte weiterhin sein, die nur teilweise verstandene Interaktion zwischen Immunsystem und Schmerzsystem besser darstellen zu können. Diese in der Grundlagenforschung erhaltenen Ergebnisse könnten in der Therapie chronischer Schmerzzustände, wie sie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis auftreten, klinisch angewendet werden.



### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

Für die Studien in Kultur wurden erwachsene, ca. 60 Tage alte, männliche Ratten vom Stamm WISTAR, die im Tierlabor Jena gezüchtet wurden, verwendet. Der WISTAR-Stamm ist ein genotypisch dem Ursprungstyp der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ähnlicher Auszuchtstamm, der genetisch gesunde Tiere gewährleistet.

Für die Arthritisstudien wurden erwachsene, ca. 70 Tage alte, weibliche Ratten vom Stamm LEWIS verwendet. Diese Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Es handelt sich beim LEWIS-Stamm um einen Inzuchtstamm, der besonders empfänglich für Autoimmunerkrankungen ist. Allen Tieren standen unter einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus nach Belieben Wasser und Standardfutter zur Verfügung.

Dem Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Fachgebiet Tierschutz sind die Organentnahmen angezeigt worden. Die Genehmigung für die Durchführung der *in vivo*-Versuche lag im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena vor.

#### 2.2 Präparation der Hinterwurzelganglien (DRGs)

##### 2.2.1 Vorbereitung der Deckgläschen für die Kultivierung

Isolierte periphere Neurone der Hinterwurzelganglien (DRGs, dorsal root ganglion) können nicht auf Glas anwachsen. Deshalb wurden verwendete Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm mit Poly-L-Lysin beschichtet. Poly-L-Lysin polymerisiert an der Luft zu einer Matrix aus, an der die Neurone schließlich anwachsen können. Die Deckgläschen wurden durch Salzsäure (1 N) und Ethanol (100 %) gereinigt und fettfrei gemacht, getrocknet und anschließend in Reinstwasser autoklaviert. Die für den jeweiligen Versuch benötigten Deckgläschen wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet und mit je 35-50 µl Poly-L-Lysin beschichtet. Das überflüssige Poly-L-Lysin wurde mit PBS (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) nach frühestens 5 Stunden, spätestens am nächsten Tag abgewaschen. Im Anschluss wurden die Deckgläschen 45 min auf Filterpapier getrocknet und bis zur Nutzung steril in Mikrotiterplatten (12 Gefäße mit je 22 mm Durchmesser) oder kleinen Petrischalen mit je 35 mm Durchmesser in der sterilen Werkbank gelagert.

### 2.2.2 Entnahme der Wirbelsäule

In einem geschlossenen Gefäß wurde das Versuchstier mit CO<sub>2</sub> getötet. Nachdem der Tod durch Atem- und Kreislaufstillstand eingetreten war, wurde der Rücken des Tieres rasiert und mit Ethanol (70 %) gereinigt. Mit einer Pinzette, Schere und einem Skalpell wurde die Haut über der Wirbelsäule von kaudal nach kranial über der Rückenmuskulatur abpräpariert. Danach erfolgten die Abtrennung der Muskeln und Rippen entlang der gesamten Wirbelsäule zu beiden Seiten und die Entnahme der Wirbelsäule durch einen Schnitt kaudal und kranial. Danach wurde die Wirbelsäule in steriler PBS gewaschen und in zwei bis drei Teile geteilt. Diese wurden von dorsal nach ventral entlang des Wirbelkanals mit einer scharfen Schere aufgeschnitten und die halbierten Wirbelsäulenteile in sterilem Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM mit 0,25 % Gentamycin) gelagert.

### 2.2.3 Herstellung der Nervenzellkultur

Mit einer Augenschere und einer spitzen Pinzette wurden die Ganglien aus den in DMEM liegenden Wirbelsäulenstücken unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena, Deutschland) herauspräpariert und wiederum in DMEM gelagert. Weil die Neurone sehr empfindlich auf mechanische Reize reagieren, wurde auf eine vorsichtige Behandlung der Hinterwurzelganglien geachtet. Nun erfolgte eine Reinigung der Ganglien von restlichen Nervenfortsätzen, anhängenden Bindegewebe und Blutgefäßresten, um eine möglichst reine Kultur aus Nervenzellen zu erhalten. Zunächst wurden die Ganglien enzymatisch mit Collagenase (250 U/ml, gelöst in Ham's F-12) für 100 min im Klimaschrank bei 37 °C und 3,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um ein unspezifisches Andauen der Bindegewebshüllen, die die Ganglien umgeben, zu bewirken. Alle nun folgenden Schritte fanden in der sterilen Werkbank statt. Danach wurden die Ganglien mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig aus der Collagenase-Lösung aufgesaugt, in kalzium- und magnesiumfreie PBS überführt und dreimal darin gewaschen. Dann erfolgte für 11 min eine weitere enzymatische Behandlung mit Trypsin (10000 U/ml, gelöst in DMEM) im Klimaschrank, die durch zweimaliges Waschen mit DMEM beendet wurde. Da Trypsin ein spezifisches Andauen der Bindegewebshüllen zwischen den Nervenzellen innerhalb der Ganglien bewirkt, können die Zellen durch Schütteln und mehrmaliges Aufziehen durch eine Pasteurpipette mechanisch vereinzelt werden. Danach wurde durch wiederholtes Absinken der Ganglienreste und Abziehen der Überstände, in welchen sich die aus ihrem Zellverband gelösten Neuronen befanden, eine Suspension in einem sterilen Gefäß gewonnen. Die Suspension von Neuronen wurde 8 min bei 1600 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland), ein Teil des Überstands verworfen,

## 2 Material und Methoden

das Sediment durch leichtes Schwenken des Gefäßes resuspendiert, neues DMEM aufgefüllt und anschließend noch einmal zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte in Ham's F-12 plus Nährmedium eine dritte Zentrifugation, nach der erneut der Überstand abgezogen wurde, bis ein Restvolumen übrig blieb, das ungefähr dem benötigten Volumen für die zu bestückenden Deckgläschen entspricht. Der Niederschlag vom Boden wurde mit einer Pasteurpipette nochmals gelöst. Je 50 µl Neuronensuspension wurden auf die beschichteten Deckgläschen (siehe 2.2.1) pipettiert und die Zellen im Klimaschrank bei 37 °C und 3,5 % CO<sub>2</sub> bis zu 3 Tagen gelagert. Täglich wurden die Zellen mit frischem Ham's F-12 plus Nährmedium gefüttert. Die erste Zugabe erfolgte zwischen 5 und 15 Stunden nach dem Auftragen der Zellen auf die Deckgläschen.

Damit möglichst keine Zellen durch scharfe Kanten verletzt werden oder an der Pipettenwand anhaften, wurden alle verwendeten Pasteurpipetten vorher mit Sigmacote<sup>®</sup> beschichtet und ihre Spitzen anschließend mit einem Bunsenbrenner rund geschmolzen und abgeflammt.

### 2.2.4 Herstellung der DRG-Schnitte

Nachdem die Ganglien aus den Wirbelsäulenstücken herauspräpariert wurden (siehe oben), wurden sie sofort in 2 % Paraformaldehydlösung für mindestens 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Dann wurden die Ganglien über Nacht gewässert und am nächsten Morgen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden sie für je 30 min in 50 %, 70 %, 96 %, 100 % Ethanol und 100 % Xylol inkubiert und anschließend in Methylbenzoat (100 %) überführt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden sie in Paraffin (Histosec<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Die so erhaltenen Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom (Jung, Heidelberg, Deutschland) in 7 µm dünne Scheiben geschnitten und je sechs Schnitte auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost<sup>®</sup>Plus, Braunschweig, Deutschland) verteilt und bis zur weiteren Verwendung trocken bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.3 Induktion einer Antigen-induzierten Monoarthritis

Als Modell für eine Arthritis diente eine unilaterale Antigen-induzierte Arthritis (AIA) des Kniegelenks, die im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bräuer etabliert worden ist.

Zunächst wurden die Ratten mit einer subkutanen Injektion von 500 µg methyliertem Rinderserum-Albumin (mBSA), dem Antigen, in 500 µl Salzlösung, emulgiert in 500 µl komplettem Freund'schen Adjuvant (CFA), das mit 2mg/ml Mycobacterium tuberculosis Stamm H37RA ergänzt wurde, vorimmunisiert. Zur Vorimmunisierung gehörte auch eine

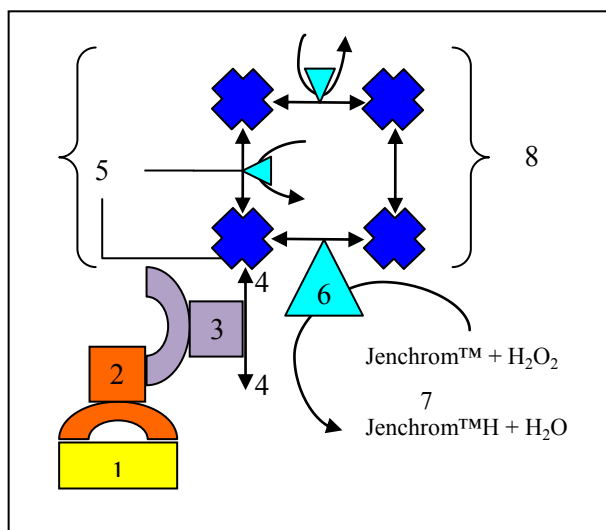
## 2 Material und Methoden

intraperitoneale Injektion von  $2 \times 10^9$  hitzeabgetöteten *Bordetella pertussis*-Keimen. Beide Injektionen sind nach 7 Tagen wiederholt worden. Die unilaterale AIA wurde dann nach weiteren 14 Tagen durch Injektion desselben Antigens (500  $\mu\text{g}$  mBSA in 50  $\mu\text{l}$  Salzlösung) in den Gelenkspalt des rechten Knies ausgelöst. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 1, 3, 7 und 21 Tagen) nach Induktion der AIA (Tag 0), durch  $\text{CO}_2$ -Begasung getötet und die DRGs der lumbalen Segmente L1-L5 der ipsi- und kontralateralen Seite für die immunhistochemische Analyse des Interleukin-1-Rezeptors wie oben beschrieben entnommen. In diesen Segmenten befinden sich die Zellkörper der sensorischen Nerven, die die Kniegelenke innervieren. Anschließend wurden von den DRG-Neuronen Schnitte angefertigt (siehe 2.2.4). Folgende Kontrollen wurden mitgeführt: Zum einen erfolgte die Tötung von einigen vorimmunisierten Ratten, bevor die AIA ausgelöst wurde (= Tag 0), zum anderen wurden Ratten getötet, die weder vorimmunisiert, noch durch Injektion des Antigens in den Gelenkspalt des rechten Knies behandelt worden waren (normale Kontrolle). Insgesamt wurden 30 Ratten verwendet: 5 normale Ratten, 5 vorimmunisierte Ratten (Tag 0) und jeweils 5 Ratten, die am 1., 3., 7. und 21. Tag nach AIA-Induktion getötet wurden.

### 2.4 Darstellung des TRPV1-Rezeptors an kultivierten DRG-Neuronen

Diese Versuche dienten dem Nachweis des TRPV1-Rezeptors (transient receptor potential vanilloid subtype 1) an kultivierten Hinterwurzelganglienzellen. Das Prinzip der Markierung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abb. 4: Immunhistochemischer Nachweis nach der ABC-Methode: An den Rezeptor (1) bindet ein spezifischer, unkonjugierter Primärantikörper (2). Im nächsten Schritt gibt man einen Sekundärantikörper (3) zu dem bereits gebundenen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist



spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und mit Biotin-Gruppen (4) konjugiert. Ein vorgeformter (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-komplex (ABC-Komplex) (5) bindet an die Biotin-Gruppe des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase (6) setzt den Farbstoff zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen Niederschlag (7) um (gebogene Pfeile). Der ABC-Komplex wird durch die multivalente Bindungskapazität des (Strept)Avidins so produziert, dass an drei von vier möglichen

## 2 Material und Methoden

Bindungsstellen des (Strept)Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird und so viele ABC-Komplexe in die einzelnen Nachweiskomplexe integriert werden (8) (nach Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Die kultivierten Zellen wurden nach kurzem Spülen mit PBS (20 mmol/l, pH 7,4) in 2 % Paraformaldehyd plus 0,3 % Triton X-100 (TX-100) für 30 min fixiert, mit PBS plus TX-100 und mit PBS ohne TX-100 jeweils dreimal gewaschen, um das Fixans zu entfernen. Kurz vor dem Beginn der Antikörpermarkierung wurden die Zellen nochmals mit destilliertem Wasser gespült und im Autoklaven (Sanoclav, Wolf, Bad Überkingen-Hausen, Deutschland) mit 0,1 mol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 15 min bei 120 °C behandelt. Dadurch wurden einerseits die endogene Peroxidase gehemmt und andererseits das Antigen demaskiert. Nach dem langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur und dem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit 2 % Ziegen Serum in PBS, versetzt mit 0,3 % TX-100 für 30 min. Der Zusatz von TX-100 war notwendig, da der verwendete primäre Antikörper gegen das C-terminale (intrazelluläre) Ende des TRPV1-Rezeptors gerichtet war. Die Zellen wurden dann mit dem Primärantikörper, anti-TRPV1, in einer Verdünnung von 1:75 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der polyklonale Antikörper wurde in Kaninchen hergestellt und richtet sich gegen ein C-terminales, 15 Aminosäuren langes Peptid des TRPV1-Rezeptors der Ratte. Am nächsten Tag, nach dem Waschen mit PBS plus 0,3 % TX-100, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper [biotinyliertes anti-Kaninchen (1:200)] für 40 min. Nach dem Waschen mit PBS plus TX-100, wurden die Zellen mit einem (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC-Kit) für 40 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS plus TX-100 gewaschen und die Bindung von Biotinyl-Anti-Kaninchen-Antikörper mit Jenchrom™ sichtbar gemacht (siehe Abb. 4). Die Reaktion wurde nach 40 min durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliertes Wasser) beendet und anschließend die markierten Neuronenkulturen eingebettet. Dazu wurden die Präparate zunächst entwässert, indem sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 2 x 100 %) geführt wurden. Dann erfolgte eine Verdrängung des Alkohols durch Terpeneol, welches dann durch Xylol ersetzt wurde. Schließlich wurden die Präparate auf Objektträgern in DePeX eingebettet. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur für zwei bis drei Tage erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung der Präparate. Eine Kontrollgruppe von Zellen, die nicht dem ersten Antikörper aber allen nachfolgenden Substanzen ausgesetzt wurde, ist parallel markiert worden, um die Spezifität des Detektionssystems (Sekundärantikörper, ABC-Kit, Jenchrom™) zu überprüfen. Diese Kontrolle zeigte keine Färbung der Zellen.

### **2.5 Immunzytochemische Experimente zur Regulation des TRPV1-Rezeptors**

Diese Versuche sollten die Frage klären, ob das Zytokin IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ) die Expression des TRPV1-Rezeptors beeinflussen kann.

Die DRG-Neurone wurden, wie unter 2.2.3 beschrieben, präpariert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag der Kultivierung erfolgte neben der Gabe des Nährmediums die erste Zugabe von IL-1 $\beta$  in den Konzentrationen 1  $\mu$ mol/l und 1 nmol/l, die dann über zwei Tage alle zwei Stunden fortgesetzt wurde. Um die Konzentrationen trotz Fütterung mit Ham's F-12 plus Nährmedium zu gewährleisten, wurde am zweiten Tag vor Beginn der Zugabe von IL-1 $\beta$  jeweils die Hälfte des Nährmediums durch neues ersetzt. Dann erfolgten die Fixierung der DRG-Neurone und die Untersuchung der Expression des TRPV1-Rezeptors mit einem spezifischen Antikörper (siehe 2.4). Als Kontrollen für diese Experimente dienten kultivierte DRG-Neurone, denen kein IL-1 $\beta$  zugesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Auswertung wie unter 2.8 beschrieben. In einer anderen Versuchsreihe wurden IL-1 $\beta$  (1  $\mu$ mol/l) und dessen Wirkung inhibierender Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA, rekombinant aus humanen *Escherichia coli*) kombiniert zu kultivierten Neuronen für zwei Tage zugegeben und die TRPV1-Rezeptorexpression mit derjenigen nach alleiniger Zugabe von IL-1 $\beta$  (1  $\mu$ mol/l) verglichen. Die Fixierung der DRG-Neurone erfolgte wie oben beschrieben. Zur Kontrolle der Spezifität des Detektionssystems wurden auch hier Kontrollen ohne Zusatz des 1. Antikörpers mitgeführt.

### **2.6 Vitalitätstest**

Um auszuschließen, dass eine mehrtägige Inkubation mit IL1- $\beta$  zu einem Absterben der Neurone führt, wurde ein Vitalitätstest mit Trypan blau durchgeführt. Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, während er in tote Zellen gelangen kann. Abgestorbene Zellen erscheinen deshalb unter dem Mikroskop blau. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden für 10 Minuten mit einer 0,4 % Trypan blau-Lösung inkubiert. Danach wurde der restliche Farbstoff durch intensives Waschen mit PBS vollständig entfernt und der Anteil der gefärbten Zellen sofort unter dem Mikroskop ausgezählt. Insgesamt wurden Neurone aus drei unabhängigen Kulturansätzen ausgewertet.

### **2.7 Darstellung des IL-1RI-Rezeptors an DRG-Schnitten aus Ratten mit einer AIA**

Der Nachweis des IL-1RI-Rezeptors (Interleukin-1-Rezeptor Typ 1) an Hinterwurzelganglienzellen bei einer AIA sollte klären, ob und in welchem Ausmaß die Expression des IL-1RI-Rezeptors in einem Modell der Arthritis beeinflusst wird. Dazu wurden DRG-Neurone wie

## 2 Material und Methoden

unter 2.3 beschrieben, von normalen Ratten, vorimmunisierten Ratten (Tag 0) sowie Ratten, die am 1., 3., 7. und 21. Tag nach Induktion der AIA getötet wurden, verwendet. Die ipsi- und kontralateral zur AIA gelegenen Ganglien wurden getrennt präpariert. Zunächst wurden einige Vorversuche an erwachsenen, ca. 60 Tage alten, männlichen Ratten vom Stamm WISTAR durchgeführt, um die optimale Konzentration der spezifischen Antikörper auszutesten und die Antikörper in ihren Färbereigenschaften kennen zu lernen. Der anti-IL-1RI-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 und biotinylierter anti-Kaninchen (1:100) eingesetzt. Anti-IL-1RI wurde polyklonal in Kaninchen hergestellt und richtet sich gegen die Aminosäuren 121-270 des Interleukin-1-Rezeptors 1. Die Methode für die Darstellung des IL-1RI-Rezeptors ist die unter 2.4 beschriebene. Die DRG-Schnitte wurden durch Xylol, absteigende Ethanolkonzentrationen (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) und destilliertem Wasser entparaffiniert und analog den kultivierten DRG-Neuronen markiert. Die Einbettung der DRG-Schnitte erfolgte nach Entwässerung in Entellan. Kontrollen ohne Zusatz des primären Antikörpers waren negativ.

### **2.8 Datenanalyse der Rezeptorendarstellung an kultivierten DRG-Neuronen und an DRG-Schnitten**

Die Auswertung der oben beschriebenen Markierungen und Kontrollen erfolgte unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland), das mit einem Bildanalysesystem (KS 300, Zeiss, Echingen, Deutschland) verbunden war. Dabei kamen nur solche Zellen für die Auswertung in Betracht, die nicht von anderen Zellen oder Geweben überdeckt waren und ein strukturell intaktes Aussehen aufwiesen. Bei 400-facher Vergrößerung für die kultivierten DRG-Neurone bzw. 200-facher Vergrößerung für die DRG-Schnitte wurden zufällige Stichproben von 100 bis 200 Zellen von jedem Deckgläschen ausgewählt. Von den kultivierten Neuronen wurden der mittlere Grauwert, die Querschnittsfläche und der mittlere Durchmesser der Neuronen mittels des Bildanalysesystems erfasst. Damit die Stichproben untereinander vergleichbar waren, wurden die Grauwerte des Hintergrundes der Deckgläschen aufgenommen, um Unterschiede der Färbeintensität zu berücksichtigen. Dann wurde der gemessene Grauwert für jedes Neuron durch den Mittelwert des Grauwertes des Hintergrundes dividiert und dieser relative Grauwert auf einer Skala von 0 (=weiß) bis 1 (=schwarz) aufgetragen (siehe Beispiel in 3.3, Abb. 11). Es war nun durch den dazugehörigen relativen Grauwert der Negativkontrolle (Mittelwert aus allen Kontrollen) möglich, den Grauwertbereich der Zellen festzulegen, die keine zusätzliche Färbung aufgrund der Bindung eines Antikörpers aufwiesen (negative Zellen), sondern ihren Eigengrauwert zeigten. Als positiv bewertet wurden Zellen, die einen relativen Grauwert über dem der Neuronen der dazugehörigen

## 2 Material und Methoden

Kontrollinkubation aufwiesen. Durch diese Vorgehensweise wurde eine objektive Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen möglich. So konnte die Menge der Neuronen, die den gesuchten Rezeptor exprimieren, ermittelt werden. Außerdem war es durch die gleichzeitige Vermessung der mittleren Querschnittsfläche und des mittleren Durchmessers der Neurone möglich, Korrelationen zwischen Zellgröße und Rezeptorexpression festzustellen. Insgesamt wurden 28 unabhängige Kulturen analysiert und 2800 Neurone ausgewertet.

Die Neurone der DRG-Schnitte wurden wie die kultivierten Neurone ausgewertet, mit dem Unterschied, dass die Bewertung der als positiv oder negativ anzusehenden Zellen nicht über eine Grauwertmessung erfolgte. Da die Färbung des IL-1RI-Rezeptors der DRG-Schnitte nicht linear verlief, konnte keine objektive Methode zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen angewandt werden, sondern musste mit dem Augenmaß vorgenommen werden. Dabei wurden Zellen, bei denen die Färbung nicht als eindeutig positiv erkennbar war, als negativ bewertet. Das Messen der mittleren Querschnittsfläche und des mittleren Durchmessers geschah dann wie oben beschrieben. Insgesamt wurden 60 Schnitte und 12000 Neurone ausgewertet.

Die Anzahl der positiven und negativen Zellen wurde in Prozent angegeben und die Daten der verschiedenen experimentellen Gruppen zusammengefasst und als Mittelwert und S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) ausgedrückt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem U-Test von Mann & Whitney geprüft. Unterschiede wurden mit  $p \leq 0,05$  als signifikant akzeptiert. Bei dem Test der DRG-Schnitte wurden Unterschiede unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur mit  $p \leq 0,016$  als signifikant akzeptiert.

### **2.9 Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationsänderungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging)**

Der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) diente dem Nachweis möglicher Wirkungen des Zytokins auf intrazelluläre Kaskaden, die über Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reguliert werden.

Die DRG-Neurone wurden präpariert und für zwei Tage in Ham's F-12 plus Nährmedium kultiviert (siehe 2.2). Danach wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 5  $\mu\text{mol/l}$  Fura-2 Acetoxymethyl-Ester (Fura-2/AM), gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) und 0,02 % Pluronic<sup>®</sup> F-127 30 min bei 20 °C inkubiert. Pluronic<sup>®</sup> F-127 unterstützt die Membrangängigkeit und die Verteilung von Fura-2/AM in der Zelle, das in Wasser eine geringe Löslichkeit hat. In der Zelle wird der Ester Fura-2/AM von intrazellulären Esterasen zu freiem Fura-2 gespalten, welches die Zellmembran nicht mehr passieren und freies Kalzium in der Zelle binden kann. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit HEPES-Puffer (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethan-



## 2 Material und Methoden

sulfonsäure) mehrmals gewaschen und für 20 min in der Pufferlösung belassen, um die Spaltung von Fura-2/AM zu komplettieren. In der Messkammer (aufrechtes Mikroskop Nikon Eclipse E600FN, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurden die Zellen kontinuierlich mit HEPES-Puffer perfundiert. Die Durchflussrate betrug ungefähr 2 ml/min. Alle Messungen wurden bei 20-24 °C durchgeführt und erfolgten nach Beladung der Neurone mit Fura-2/AM nach maximal einer Stunde.

Der Fluoreszenzfarbstoff wurde abwechselnd mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt (Monochromator Polychrome IV, T.I.L.L. Photonics, Gräfeling, Deutschland). Das emittierte Licht bei 510 nm wurde mittels einer CCD-Kamera (T.I.L.L. Photonics) gesammelt. Die CCD-Kamera war an einen PC zur Datenauswertung gekoppelt. Alle 260 ms wurde eine Messung durchgeführt und in sequentiellen Dateien gespeichert. Die erhaltenen Bildsequenzen wurden mittels einer Software von T.I.L.L. Photonics analysiert. Für jedes Bildpaar wurde das Verhältnis der Emission nach Anregung mit Licht von 340 nm und Licht von 380 nm berechnet, gleichzeitig wurde der Hintergrund subtrahiert. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte wurden aus den Fluoreszenzverhältnissen (R) nach der Gleichung (Grynkiewicz et al. 1985):  $[Ca^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  berechnet.  $K_d$  ist die Dissoziationskonstante von Fura-2 für  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$  ist das Fluoreszenzverhältnis aus dem Signal bei 380 nm in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  zu dem in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  ( $\beta = 3,33 \pm 0,18$ ; 6 Neurone) und  $R_{min}$  und  $R_{max}$  sind die minimalen bzw. maximalen Fluoreszenzverhältnisse.  $R_{min}$  ( $= 0,41 \pm 0,05$ ; 6 Neurone) wurde bei Inkubation der Neurone mit normalem  $Ca^{2+}$ -freien HEPES-Puffer plus 10 mmol/l EDTA (Ethylendiamintetraacetat) und 10  $\mu$ M Ionomycin gemessen, während  $R_{max}$  ( $= 4,34 \pm 0,3$ ; 6 Neurone) bei Inkubation mit HEPES-Puffer plus 8 mmol/l  $CaCl_2$  und 10  $\mu$ mol/l Ionomycin ermittelt wurde.

Um die lokale Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  von den erhaltenen Verhältnisbildern zu bestimmen, wurde der Umfang der Zellen im Sichtbereich markiert und damit die Messfläche (ROI – region of interest) ausgewählt. Der danach erhaltene Verhältniswert entsprach dem Mittelwert der Fluoreszenzen jeder einzeln ausgewählten Zelle und wurde als Funktion der Zeit dargestellt.

Vor jedem Experiment wurde die Perfusion angehalten. Nach 20 s wurde HEPES-Puffer als Testvolumen (100  $\mu$ l) zum Erkennen von mechanisch aktivierbaren Zellen zum Bad gegeben. Nach weiteren 20 s wurde IL-1 $\beta$  in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l (gelöst in HEPES-Puffer) appliziert. Um die Vitalität der kultivierten DRG-Neurone zu überprüfen, wurde am Ende jeder Messung 50 mmol/l KCl (gelöst in HEPES-Puffer) zugegeben. Insgesamt wurden für die  $Ca^{2+}$ -Imaging-Experimente 10 unabhängige Kulturen von DRG-Neuronen gebraucht und 100 Neuronen analysiert.

## 2 Material und Methoden

Folgende Kriterien wurden zur Identifizierung einer Antwort auf die IL-1 $\beta$ -Applikation genutzt: Eine Änderung um 5 % der  $[Ca^{2+}]_i$  als Grenze für einen positiven Effekt, Latenz zwischen Zugabe der Substanz und Beginn der Antwort  $\leq 10$  s, keine Antwort auf HEPES-Puffer-Applikation und Reaktion auf die Gabe von 50 mmol/l KCl am Ende jedes Experiments.

### 2.10 Materialien

#### 2.10.1 für Präparation, Kultur der DRG-Neuronen und Herstellung der DRG-Schnitte

Sterile PBS, kalzium- und magnesiumfreie PBS, DMEM, Gentamycin, Penicillin und Streptomycin wurden von Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Salzsäure von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Ham's F-12-Kulturmedium, L-Glutamin, Poly-L-Lysin, Sigmacote<sup>®</sup> und Trypsin wurden bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) gekauft. NGF wurde von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) geliefert. Die Collagenase wurde von Paesel & Lorei (Hanau, Deutschland) gekauft. Die Petrischalen, Mikrotiterplatten und Deckgläschen wurden von Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Nunc (Roskilde, Dänemark) bzw. Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

#### 2.10.2 für Induktion der AIA

Komplettes Freund'sches Adjuvant (CFA, ergänzt mit 2 mg/ml Mycobacterium tuberculosis Stamm H37RA) wurde von Difco (Detroit, Michigan, USA), mBSA von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) geliefert. Die hitzeabgetöteten Bordetella pertussis-Keime wurden vom Pertussis-Referenzlabor des Krankenhauses Berlin-Friedrichshain (Berlin, Deutschland) bezogen.

#### 2.10.3 für Zugabeexperimente und Rezeptormarkierungen an Kultur

Der Anti-TRPV1-Antikörper, IL-1RA und Ziegenserum wurden von Biotrend (Köln, Deutschland), der biotinylierte Anti-Kaninchen-Antikörper von Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark) bezogen. Triton X-100, IL-1 $\beta$  und Trypan blau Lösung wurden bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) gekauft. Der ABC-Kit wurde von Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien, USA) bezogen. Jenchrom<sup>™</sup> wurde von JenLab GmbH (Jena, Deutschland) geliefert. Zitrat, Terpeneol, Xylol und DePeX wurden bei Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Ethanol bei Roth (Karlsruhe, Deutschland) gekauft.

#### 2.10.4 für Rezeptormarkierungen an DRG-Schnitten

Bei Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) wurde der Anti-IL-1RI-Antikörper und das Paraffin-Einbettmedium Entelan bei Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft.

### 2.10.5 für $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen

Fura-2/AM und Pluronic<sup>®</sup>F-127 wurde von Molecular Probes Europe (Leiden, Niederlande), Ionomycin von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) geliefert.

### 2.10.6 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien für die unten aufgeführten Lösungen wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) und Gibco (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

#### 1. Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS, phosphat-buffered saline):

140 mmol/l	Natriumchlorid (NaCl)
2,7 mmol/l	Kaliumchlorid (KCl)
1,5 mmol/l	Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
8,1 mmol/l	Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
pH	7,4

#### 2. Ham`s F-12 plus Nährmedium (Neuronen-Nährmedium)

10 %	Pferdeserum (hitzeinaktiviert)
10 ng/ml	NGF (7S recombinant aus Maus)
1 mmol/l	L-Glutamin
100 U/ml	Penicillin
100 U/ml	Streptomycin

in Ham`s F-12-Medium gelöst.

#### 3. Fixans (Paraformaldehydlösung)

0,02 mol/l	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
0,08 mol/l	Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
2 %	Paraformaldehyd
0,05 %	Glutaraldehyd
pH	7,4

#### 4. HEPES-Puffer

150 mmol/l	NaCl
5 mmol/l	KCl

## 2 Material und Methoden

10 mmol/l	Glucose
10 mmol/l	HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure)
2 mmol/l	CaCl <sub>2</sub>
2 mmol/l	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
pH	7,4

Alle anderen Chemikalien, die nicht näher aufgeführt sind, wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Gibco (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression des Interleukin-1-Rezeptors 1 (IL-1RI)

#### 3.1.1 Nachweis von IL-1RI an DRG-Schnitten der Ratte

Um die Expression des IL-1RI *in vivo* nachzuweisen, wurden DRGs der WISTAR-Ratte mit anti-IL-1RI-Antikörper markiert. Die Abbildung 5 A zeigt beispielhaft DRGs eines Schnittes nach Inkubation mit anti-IL-1RI-Antikörper. Positive Zellen erscheinen dunkel. Abbildung 5 B zeigt ein Beispiel eines DRG-Schnitts, der nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurde. Es wurden keine Zellen markiert.

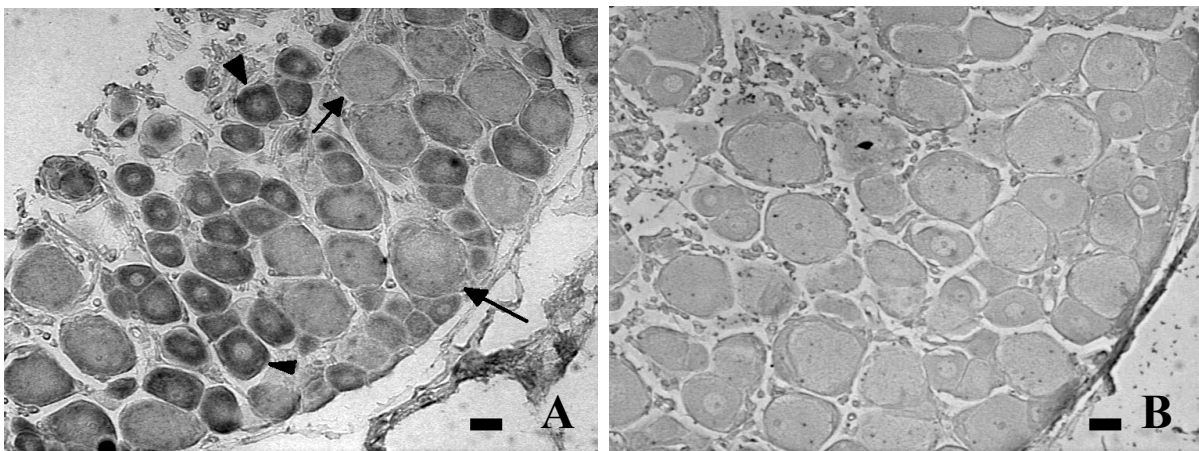


Abb. 5: Lumbale DRG-Schnitte der adulten WISTAR-Ratte. (A) DRG-Neurone nach Markierung mit einem anti-IL-1RI-Antikörper. (B) DRG-Neurone, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden (→ Beispiel für IL-1RI-negative Zellen, ► Beispiel für IL-1RI-positive Zellen). Balken ca. 20 µm.

Da für die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) Ratten vom Stamm LEWIS verwendet wurden, für die Zellkultur-Experimente aber Ratten vom Stamm WISTAR, wurde zunächst überprüft, ob die Grundexpression des IL-1RI-Rezeptors in beiden Tierstämmen vergleichbar ist. Abbildung 6 zeigt eine Gegenüberstellung des mittleren Anteils positiver DRG-Neurone nach Markierung mit dem anti-IL-1RI-Antikörper beider Stämme. Sowohl für WISTAR, als auch für normale LEWIS wurden die positiven DRG-Neurone nach Auszählung von 200 Zellen pro Ratte ( $n = 5$ ) bestimmt und prozentual zusammengefasst. Der mittlere Anteil von DRG-Neuronen aus WISTAR-Ratten, die den gesuchten Rezeptor exprimieren (positive Zellen), beträgt  $33,0 \pm 3,9 \%$  (siehe Abb. 6 schwarzer Balken). Der graue und weiße Balken der Abbildung 6 stellen die mittleren Anteile positiver DRG-Neurone der rechten und linken Körperseite der normalen LEWIS-Ratte dar. Die Körperseite wäre bei Auslösung einer AIA

### 3 Ergebnisse

entsprechend die ipsi- bzw. kontralateral zur AIA gelegene Seite. Die mittleren Anteile positiver DRG-Neurone betragen  $26,4 \pm 2,9$  % für die ipsilaterale und  $25,3 \pm 5,3$  % für die kontralaterale Seite. Die Expression des IL-1RI in normalen Ratten der Stämme WISTAR und LEWIS bewegt sich also im gleichen Größenbereich.

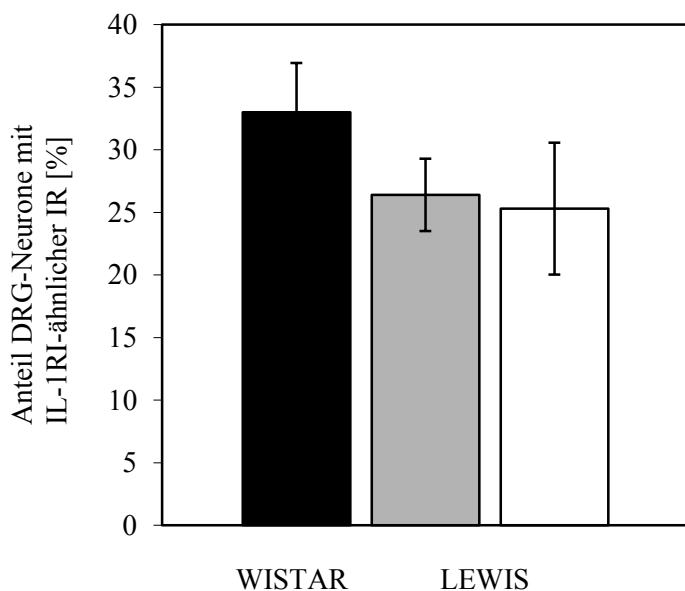


Abb. 6: Mittlerer Anteil für IL-1RI positiver Zellen in lumbalen DRG-Schnitten der normalen Ratte. Schwarzer Balken: DRG-Neurone von Ratten des Stammes WISTAR. Grauer und weißer Balken: DRG-Neurone von normalen LEWIS-Ratten der rechten (grauer Balken) und linken Seite (weißer Balken). Dies wäre nach Auslösung einer AIA entsprechend die ipsi- bzw. kontralateral zur AIA gelegene Seite. IR = Immunreaktivität.

Zusätzlich wurden auch die Querschnittsfläche und der Durchmesser jedes Neurons bestimmt und deren Verteilung berechnet (siehe 2.8). In 3.1.2 sind die Ergebnisse der Querschnittsflächenbestimmung der DRG-Neurone der LEWIS-Ratten aufgeführt. Auf eine Darstellung der Durchmesserverteilung der DRG-Neurone ist im weiteren Verlauf generell verzichtet worden, da sie dem Muster der Querschnittsverteilung folgt. Ihre Bestimmung diente zum einen als Kontrolle, strukturell intakte (nicht gequetschte oder anderweitig beschädigte) Zellen ausgewertet zu haben, zum anderen der Bestätigung der Größenverteilung positiver und negativer DRG-Neurone.

#### 3.1.2 Expression des IL-1RI an histologischen Schnitten von DRGs aus LEWIS-Ratten mit einer AIA

Um die mögliche Beeinflussung der Expression des Interleukin-1-Rezeptors 1 *in vivo* durch eine Arthritis zu untersuchen, wurde der IL-1RI im Verlauf einer AIA immunhistochemisch nachgewiesen (siehe 2.7). Dazu wurden DRGs von normalen Ratten, vorimmunisierten Ratten (Tag 0), sowie Ratten, die am 1., 3., 7. und 21. Tag nach Induktion der AIA getötet wurden, verwendet (siehe 2.3). Außerdem wurden die ipsi- und kontralateral zur AIA gelegenen Ganglienzellen getrennt markiert und wie unter 2.8 beschrieben ausgewertet. Die Abbildung 7 zeigt einen Vergleich zweier DRG-Schnitte. (A) stellt dabei ein Beispiel der Grundexpression

### 3 Ergebnisse

des IL-1RI in einer normalen Ratte dar, während (B) ein DRG-Schnitt der AIA am 21. Tag zeigt (► positive, → negative Zellen).

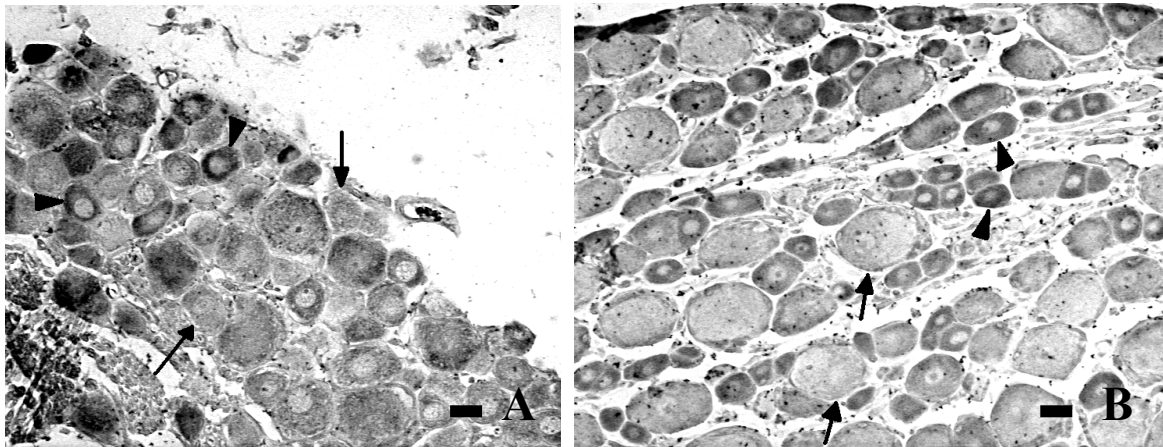


Abb. 7: Lumbale DRG-Schnitte der adulten LEWIS-Ratte nach Markierung mit einem anti-IL1RI-Antikörper. (A) DRG-Neurone einer normalen Ratte. (B) DRG-Neurone einer Ratte nach Auslösung einer AIA nach 21 Tagen (→ für IL-1RI negative Zellen, ► für IL-1RI positive Zellen). Balken ca. 20  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 8 sind die Anteile der für IL-1RI positiven Zellen von DRG-Schnitten im Verlauf einer AIA zu unterschiedlichen Zeitpunkten zusammengefasst. Jedem Balken entspricht der aus je 5 Ratten ( $n = 5$ ) gemittelte Anteil positiver DRG-Neurone aus je 200 in die Auswertung einbezogenen Zellen. Der mit K (Kontrolle) beschriftete Balken (Abb. 8 jeweils erster Balken) entspricht der Grundexpression des IL-1RI in DRG-Neuronen von normalen LEWIS-Ratten der ipsilateralen (A,  $26,4 \pm 2,9$  %) und kontralateralen Seite (B,  $25,3 \pm 5,3$  %). Um den möglichen Effekt der AIA auf die Expression des IL-1RI zu untersuchen, diente der Anteil positiver DRG-Neurone der vorimmunisierten Ratten (Tag 0) als Vergleichsgruppe (Abb. 8 jeweils zweiter Balken). Ihre Werte betragen für die ipsilaterale Seite  $42,1 \pm 5,7$  % und für die kontralaterale Seite  $38,4 \pm 4,4$  %. Bereits nach der Vorimmunisierung (Tag 0) fällt ein signifikanter Anstieg der Anteile positiver DRG-Neurone beider Seiten im Vergleich zur Kontrolle auf ( $p \leq 0,004$ ; U-Test von Mann & Whitney). Im weiteren Verlauf der AIA kommt es zu einer signifikanten Zunahme der für IL-1RI positiven Zellen beider Seiten ab Tag 7 beziehungsweise 21 im Vergleich mit denen des Tages 0 ( $p \leq 0,004$ ; U-Test von Mann & Whitney). Am Tag 7 (Abb. 8 jeweils fünfter Balken) beläuft sich der Anteil positiver DRG-Neurone ipsilateral auf  $58,6 \pm 5,0$  % und kontralateral auf  $56,9 \pm 4,9$  % und erreicht mit  $58,8 \pm 6,0$  % für die ipsilaterale und  $60,6 \pm 4,8$  % für die kontralaterale

### 3 Ergebnisse

Seite am Tag 21 (Abb. 8 jeweils sechster Balken) das gemessene Maximum. Der Anteil positiver DRG-Neurone vom Tag 0 der AIA nimmt somit ipsilateral um  $16,7 \pm 6,0$  % am Tag 21, kontralateral um  $22,2 \pm 4,8$  % zu.

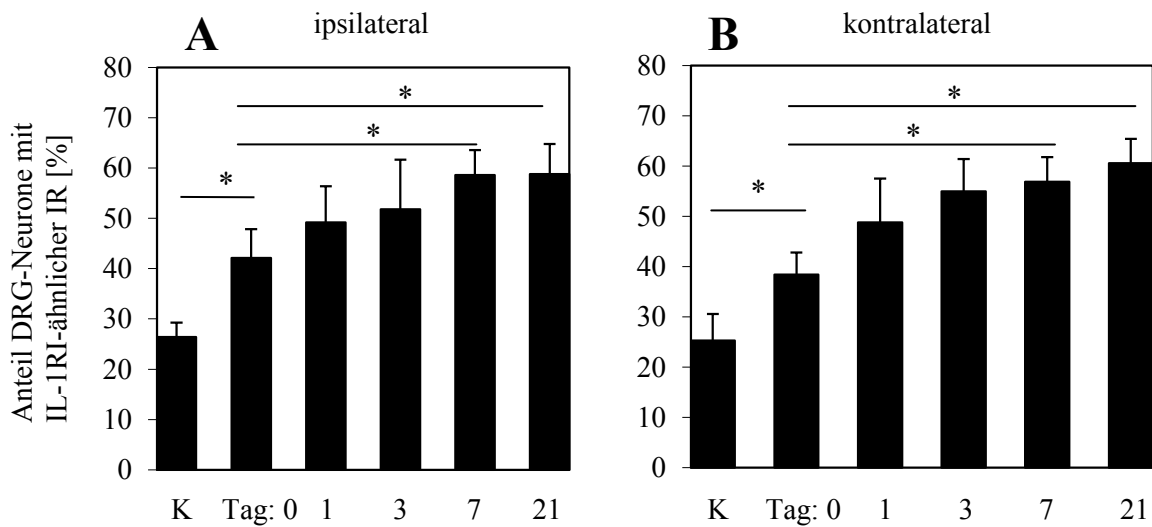


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der IL-1RI-Expression von DRG-Neuronen der Ratte in einer AIA. K (Kontrolle) bezeichnet DRG-Neurone von normalen Ratten, Tag 0 die von vorimmunisierten Ratten und Tag 1 bis 21 die von Ratten, die am 1., 3., 7. und 21. Tag nach AIA-Induktion getötet wurden. (A) Ipsilateral zur AIA gelegene DRG-Neurone. (B) DRG-Neurone, die zur AIA kontralateral präpariert und markiert wurden. IR = Immunreaktivität. \* = Signifikanz ( $p \leq 0,004$ ; U-Test von Mann & Whitney).

Zusätzlich zur IL-1RI-Expression im Verlauf der AIA wurde auch untersucht, welche Größe die IL-1RI-positiven Neurone hatten. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Querschnittsfläche von DRG-Neuronen aus LEWIS-Ratten nach Induktion einer AIA. Die Histogramme der linken Seite (Abb. 9 A, C, E) stellen die Querschnittsflächen der DRG-Neurone dar, die aus der ipsilateralen Seite der Ratten entnommen wurden, während die der rechten Seite diejenigen der kontralateralen Seite repräsentieren. In der Abbildung 9 sind exemplarisch die Verteilungen am Tag 0 (A-B), Tag 7 (C-D) und Tag 21 (E-F) dargestellt. Die weißen Balken zeigen den Anteil aller analysierten DRG-Neurone mit verschiedenen Querschnittsflächen. Die Gruppe der für IL-1RI positiven DRG-Neurone (schwarze Balken) ist als Teilgruppe der untersuchten Gesamtpopulation dargestellt. Alle Werte der Einzelanalysen ( $n = 5$ ) mit je 200 Zellen wurden zusammengefasst und der mittlere Anteil auf der Ordinate aufgetragen. Es ist eine Konsistenz der Größenverteilung der Gesamtpopulation über alle Tage der AIA zu bemerken (weiße Balken). Es gibt keine Verschiebung der Größenverteilung der Gesamtpopulation von DRG-Neuronen zu größeren oder kleineren Somagrößen hin.



### 3 Ergebnisse

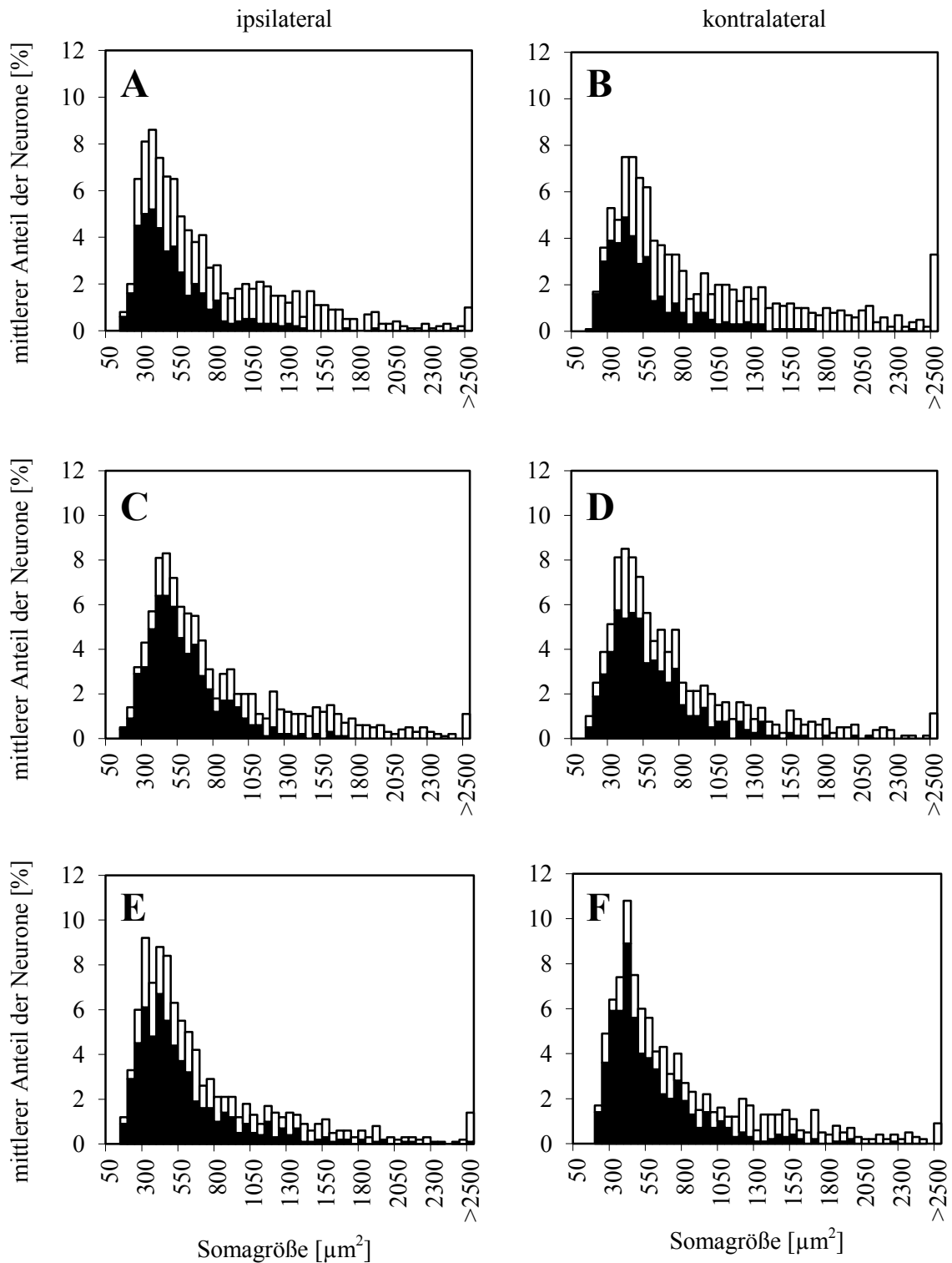


Abb. 9: Verteilung der Querschnittsfläche von DRG-Neuronen der LEWIS-Ratte im Verlauf einer AIA nach Markierung mit einem anti-IL-1RI-Antikörper. (A-B) DRG-Neurone vorimmunisierter Ratten (Tag 0 der AIA). (C-D) DRG-Neurone von Ratten, die am 7. Tag nach Auslösung der AIA getötet wurden. (E-F) DRG-Neurone von Ratten, die nach Ablauf von 21 Tagen getötet wurden. (A, C, E) bezieht sich auf DRG-Neurone, die ipsilateral, (B, D, F) auf solche, die kontralateral zur AIA gelegen aus den Ratten entnommen wurden. Weiße Balken: Querschnittsfläche aller analysierten DRG-Neurone, schwarze Balken: Querschnittsfläche der für IL-1RI positiven DRG-Neurone.

Die meisten DRG-Neurone sind klein oder mittelgroß. Die Größenverteilung der für IL-1RI positiven Zellen ist zu allen Zeitpunkten (vorimmunisierte Ratten (Tag 0), Tag 7 und Tag 21 der AIA) ähnlich derjenigen der Gesamtpopulation. Lediglich der Anteil der IL-1RI-positiven DRG-Neurone nimmt zu, was die schon oben beschriebene signifikante Steigerung der Anteile ab Tag 7 repräsentiert. Die Zunahme des Anteils positiver DRG-Neurone ist in fast allen Somagrößen, vor allem aber der kleinen und mittelgroßen DRG-Neurone, die die Gruppe der Nozizeptoren beinhalten, zu erkennen (Abb. 9 schwarze Balken).

#### **3.2 Beschreibung der Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien der Ratte**

Die Messung intrazellulärer Kalziumänderungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging), sowie die immunzytochemischen Experimente zur Regulation des TRPV1-Rezeptors wurden an Primärkulturen von isolierten DRG-Neuronen der erwachsenen Ratte (WISTAR) durchgeführt. In Abbildung 10 sind DRG-Neurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung zu sehen. Frisch isolierte DRG-Neurone (Abb. 10 A) haben meistens eine kugelförmige bis ellipsoid erscheinende Form. Es sind zu diesem Zeitpunkt nur die Zellkörper der aus dem Zellverband der Ganglien herausgelösten Nervenzellen zu sehen, weil bei der Präparation die Ausläufer abgeschnitten wurden. Da sich die DRG-Neurone in der Primärkultur im Gegensatz zu den DRG-Schnitten (siehe Abb. 5) durch ihre Vereinzelung kugelförmig zusammenziehen, sind auch ihre in der Aufsicht gemessenen Flächen von  $50 \mu\text{m}^2$  bis ungefähr  $1000 \mu\text{m}^2$  kleiner als diejenigen der DRG-Schnitte ( $150 \mu\text{m}^2$  bis mehr als  $2500 \mu\text{m}^2$ ).

Nach etwa einem Tag in Kultur verändern die Zellen ihren Phänotyp: Viele Somata bilden Ausläufer und nehmen eine abgeflachte Form an (Abb. 10 D-E). Nach ungefähr zwei bis drei Tagen in Kultur haben die DRG-Neurone eine Vielzahl von neuen Ausläufern gebildet (Abb. 10 D-E  $\rightarrow$ ) und scheinen vereinzelt auch Kontakte untereinander zu entwickeln. Der verhältnismäßig große Zellkern der Neurone mit dem Nukleolus ist in allen Stadien der Kultur auffällig (Abb. 10 A, D  $\rightarrow$ ). Man erhält mit der verwendeten Präparationstechnik keine reine Neuronenkultur, sondern es werden auch andere Zelltypen mit in die Kultur genommen. Dies sind vor allem Satellitenzellen (Abb. 10 B-C  $\blacktriangleright$ ), ein Gliazellen-Typ, der nur im peripheren Nervensystem vorkommt. Die Satellitenzellen umhüllen normalerweise die Neurone vollständig, dienen dem mechanischen Schutz und haben für die Neuronensomata vielfältige trophische Funktion (Dublin und Hanani 2007). Die Satellitenzellen sind gut von den DRG-Neuronen in der Kultur zu unterscheiden, da sie wesentlich kleiner sind als die kleinsten Neurone und eine bohnenähnliche bis kugelige Form haben. Des Weiteren finden sich in der

### 3 Ergebnisse

Neuronenkultur einige Epithelzellen und Bindegewebszellen, die sich mit der Kulturdauer vermehren, da sie teilungsfähig sind (Abb. 10 E ➡). Sie sind von den DRG-Neuronen durch ihre Größe und flache, quadratische Form gut abzugrenzen.

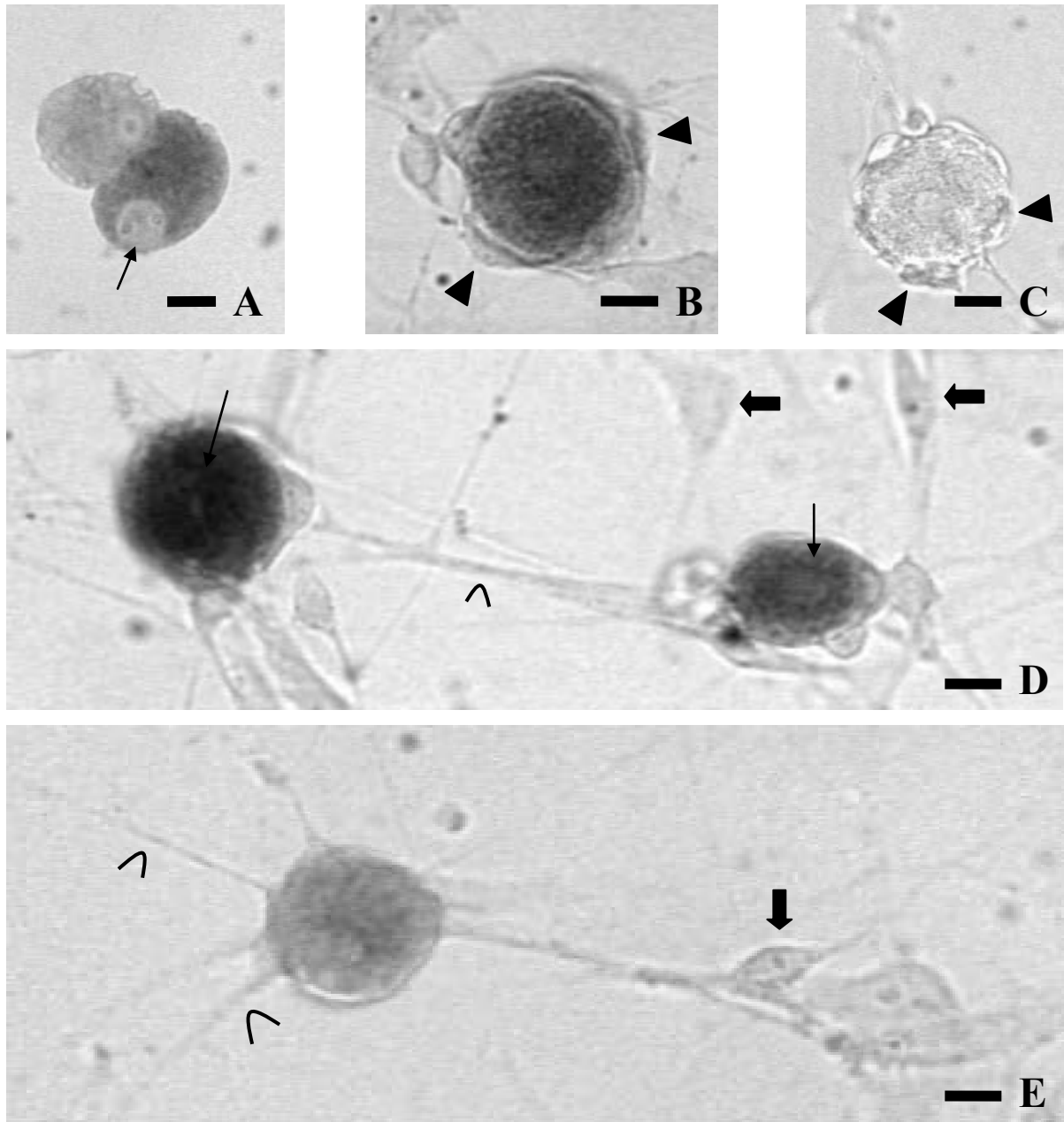


Abb. 10: Kultur isolierter DRG-Neurone der adulten Ratte. (A) DRG-Neurone, kultiviert für einen Tag (→ Zellkern eines Neurons). (B-E) Zwei bis drei Tage alte Kulturen (> Ausläufer, → Zellkerne der Neurone, ► Satellitenzellen, ➡ Epithelzelle). Balken ca. 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 Exemplarische Beschreibung der Datenanalyse der Markierungen an kultivierten DRG-Neuronen**

Aufgrund der Veränderung der relativen Grauwerte der DRG-Neurone können semi-qualitative Aussagen über die Bindung eines Antikörpers getroffen werden. Außerdem kann die Anzahl der Neuronen mit der gesuchten Markierung bestimmt werden. Mittels der Zellgröße wird geprüft, ob eine vollständige DRG-Neuronenpopulation isoliert wurde.

In Abbildung 11 ist die Verteilung der relativen Grauwerte von Neuronen dargestellt. Abbildung 11 A zeigt die Grauwertverteilung der Kontrollen, in denen kein primärer Antikörper eingesetzt wurde, während Abbildung 11 B die Verteilung der Grauwerte nach Zusatz eines spezifischen Antikörpers (im Beispiel anti-TRPV1-Antikörper) demonstriert. Für beide Bedingungen wurden jeweils die relativen Grauwerte aus mehreren Kulturen zusammengefasst ( $n = 5$ ) und der Mittelwert dargestellt. Die relativen Grauwerte der Neurone der Kontrollen bewegen sich zwischen 0,0 und 0,3. Dies bezeichnet den Grauwertbereich, in dem die Neurone keine spezifische Bindung mit dem Primärantikörper eingegangen sind (negative Zellen). Da ein Grauwert  $\leq 0,3$  nicht auf eine Immunreaktion zurückzuführen ist, wird damit der Bereich der Grauwerte für die unmarkierten Neurone nach Zusatz eines spezifischen Antikörpers festgelegt (Abb. 11 B, weiße Balken). Außerdem sind alle Neurone mit einem Grauwert  $> 0,3$  als positiv für die Existenz des TRPV1-Rezeptors bewertet worden (Abb. 11 B, schwarze Balken). Anhand dieser Grauwertgrenze (Abb. 11 A-B, schwarze Ecken) aus den gemittelten Kontrollen wurde die Anzahl der positiven Neurone, die TRPV1 exprimieren, in jedem Einzelexperiment bestimmt. Alle Einzelexperimente wurden zusammengefasst und die Anzahl der positiven Neurone in Prozent angegeben.

Die Abbildung 11 C-D zeigt beispielhaft die Verteilung der Querschnittsfläche einer Kontrolle (C) und nach Zusatz eines spezifischen Antikörpers (D, hier anti-TRPV1-Antikörper). Die weißen Balken zeigen den mittleren Anteil aller analysierten DRG-Neurone mit verschiedenen Größen. Der mittlere Anteil der positiven DRG-Neurone (Abb. 11 D, schwarze Balken) ist als Teilgruppe der Gesamtpopulation dargestellt. Auch hier wurden die Werte aus allen Einzelexperimenten zusammengefasst (siehe auch 2.8).

### 3 Ergebnisse

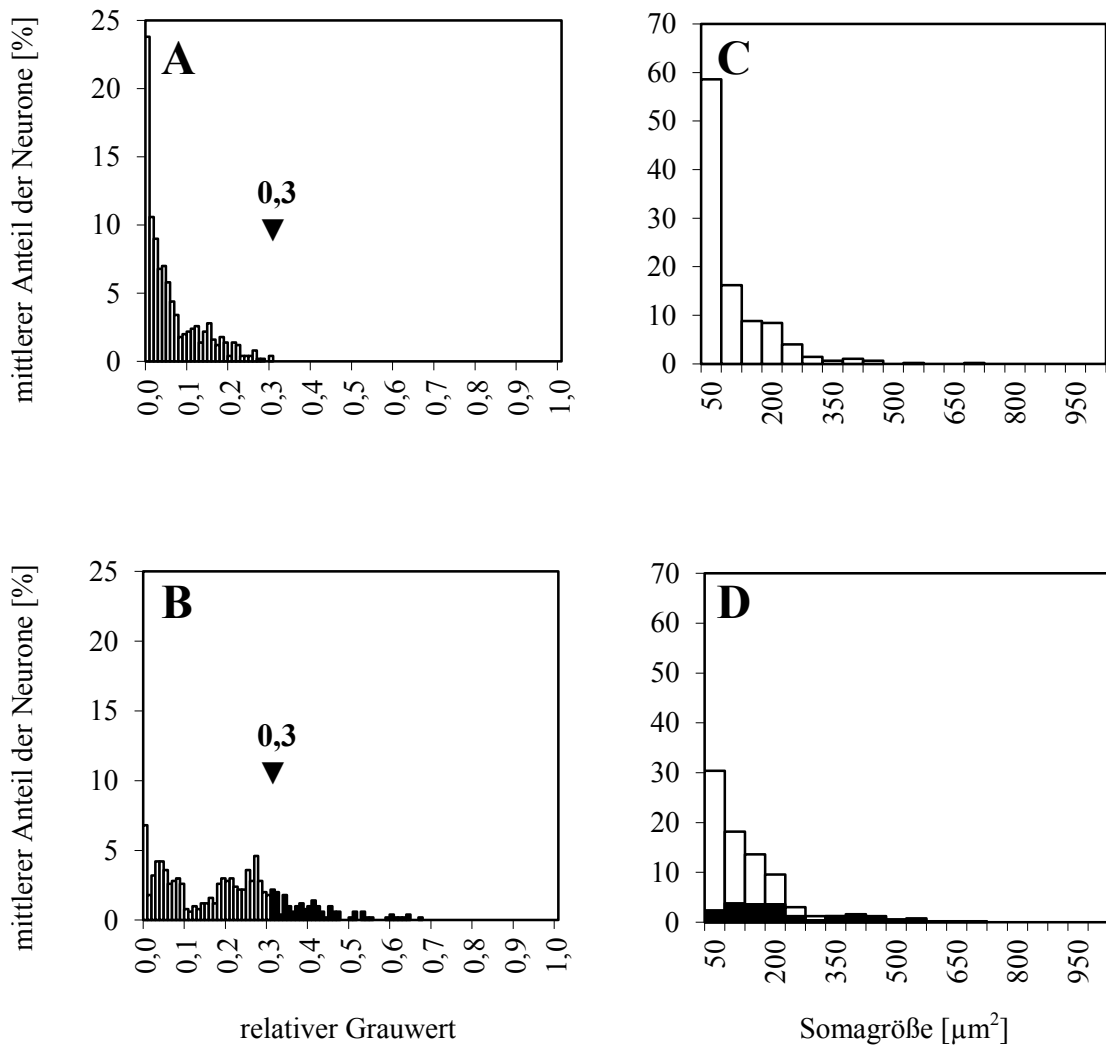


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Datenanalyse am Beispiel der Markierung mit einem anti-TRPV1-Antikörper. (A-B) Densitometrische Darstellung der Verteilung der relativen Grauwerte (mittlerer Grauwert der DRG-Neurone/mittlerer Grauwert des Hintergrundes). (A) mittlere Grauwertverteilung der Kontrolle. (B) mittlere Grauwertverteilung der DRG-Neurone bei Zusatz eines primären Antikörpers. Weiße Balken: DRG-Neurone mit Grauwerten, die im Bereich der Grauwerte der Kontrolle (0,0-0,3) liegen. Schwarze Balken: DRG-Neurone mit größeren Grauwerten (0,3) als die Grauwerte der DRG-Neuronen der Kontrolle. (C-D) Histogramme der mittleren Verteilung der Somagrößen der DRG-Neurone der Kontrolle (C) und der DRG-Neurone, die mit primärem Antikörper inkubiert wurden (D). Weiße Balken: Querschnittsfläche aller in die Analyse einbezogenen DRG-Neuronen (jeweils 100 Zellen aus je fünf Kulturen). Schwarze Balken: Querschnittsfläche der für Antikörperbindung positiven DRG-Neuronen (Grauwerte > 0,3).

### 3.4 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in kultivierten DRG-Neuronen

Nachdem die Existenz des IL-1RI an DRG-Neuronen *in vivo* nachgewiesen und die Änderung seiner Expression in einer Entzündung gezeigt wurde (siehe oben), sollten nun mögliche Effekte von IL-1 $\beta$  an DRG-Neuronen untersucht werden.

Die Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) sollte dabei einen möglichen Kurzzeiteffekt von IL-1 $\beta$  an kultivierten DRG-Neuronen nachweisen. Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch das Verhalten von vier kultivierten DRG-Neuronen nach IL-1 $\beta$ -Applikation. Dabei ist die  $[Ca^{2+}]_i$  als Funktion der Zeit auf der Ordinate aufgetragen. Unter Verwendung der in 2.9 genannten Kriterien für eine Antwort auf die IL-1 $\beta$ -Applikation wurde bei keiner von insgesamt 100 untersuchten Zellen eine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach vorheriger Gabe von IL-1 $\beta$  gefunden. Daraus folgern wir, dass IL-1 $\beta$  die intrazelluläre Kalziumkonzentration in DRG-Neuronen im von uns gewählten Zeitbereich und Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l nicht beeinflusst.

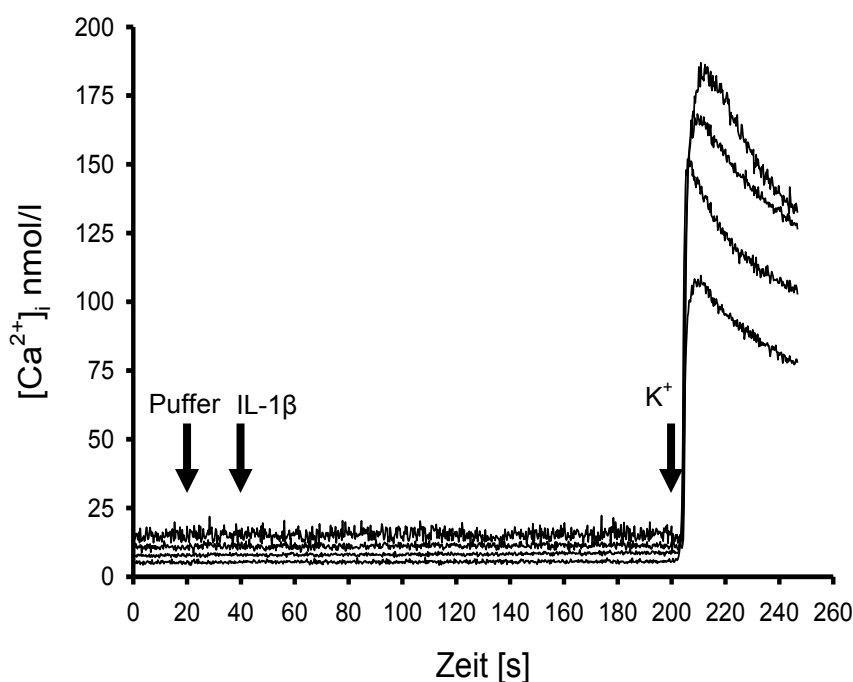


Abb. 12: Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in DRG-Neuronen. Dargestellt ist die typische Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in nmol/l in Abhängigkeit von der Zeit in vier unterschiedlichen DRG-Neuronen. IL-1 $\beta$  wurde in diesem Beispiel in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l eingesetzt. Puffer = HEPES-Puffer;  $K^+$  = 50 mmol/l KCl in HEPES-Puffer.

### 3.5 Vitalitätstest

Die Versuche mit Trypan blau zur Überprüfung der Vitalität der DRG-Neurone nach einer mehrtägigen Inkubation mit IL1- $\beta$  (siehe auch 2.6) ergaben, dass IL-1 $\beta$  nicht zu einem Absterben der Neurone führt. Es wurden jeweils drei unabhängige Kulturen mit jeweils 100 Zellen untersucht. Nach 5 Tagen Inkubation mit IL1- $\beta$  in einer Konzentration von 1 oder 10 nmol/l waren  $6,9 \pm 2,1$  % bzw.  $5,7 \pm 3,1$  % mit dem Farbstoff gefärbt. In parallel untersuchten Zellen, die genau so lange kultiviert wurden, aber keinen IL1- $\beta$  Zusatz bekamen, waren  $5,8 \pm 2,6$  % der DRG-Neurone abgestorben. Somit konnten wir davon ausgehen, dass eine mehrtägige Inkubation der Zellkultur mit IL-1 $\beta$  die Zellen nicht abtötet.

### 3.6 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression von TRPV1-Rezeptoren an kultivierten DRG-Neuronen

Um mögliche Langzeiteffekte von IL-1 $\beta$  an kultivierten DRG-Neuronen darzustellen, wurde die Expression des TRPV1-Rezeptors nach Inkubation der Neurone mit IL-1 $\beta$  untersucht (siehe 2.5). Die Abbildung 13 zeigt kultivierte DRG-Neurone nach Markierung mit anti-TRPV1-Antikörper (A), bei zusätzlicher Gabe von IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l (B) sowie DRG-Neurone, die ohne Primärantikörper markiert wurden (C).

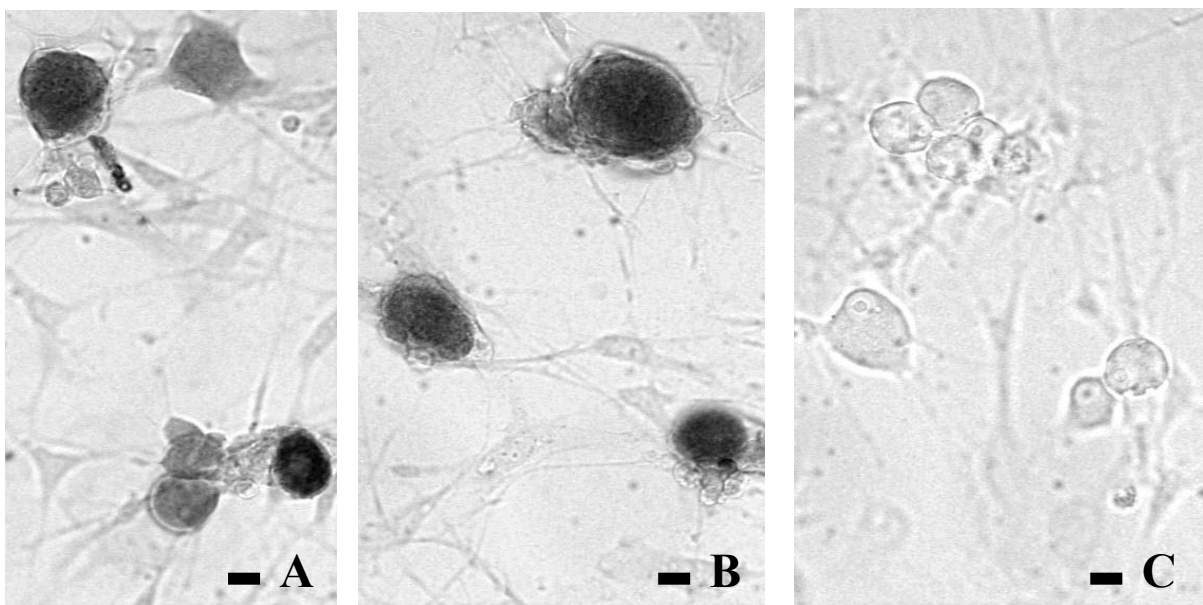


Abb. 13: Drei Tage alte Primärkultur von DRG-Neuronen der WISTAR-Ratte. (A) DRG-Neurone nach Markierung mit einem anti-TRPV1-Antikörper. (B) DRG-Neurone nach Zugabe von IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l. (C) DRG-Neurone ohne Primärantikörper. Balken = ca. 10  $\mu$ m.

### 3 Ergebnisse

In Abbildung 14 ist die mittlere Anzahl der DRG-Neurone, die den TRPV1-Rezeptor exprimieren, in Abhängigkeit von vorheriger IL-1 $\beta$ -Zugabe dargestellt. Es wurden jeweils fünf Kulturen mit je 100 Zellen untersucht. Der schwarze Balken repräsentiert den Mittelwert der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden DRG-Neuronen, denen kein IL-1 $\beta$  zugesetzt wurde (Kontrolle). Er beträgt  $21,0 \pm 7,5$  %. Nach Zusatz von IL-1 $\beta$  in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  für zwei Tage zeigten  $32,2 \pm 8,5$  % aller Neurone eine positive Markierung für den TRPV1-Rezeptor (Abb. 14 grauer Balken). Nach Zusatz von IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 1  $\text{nmol/l}$  waren  $24,4 \pm 5,6$  % positiv (Abb. 14 weißer Balken). Somit bewirkt IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Zunahme der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden DRG-Neuronen ( $p \leq 0,02$ ; U-Test von Mann & Whitney).

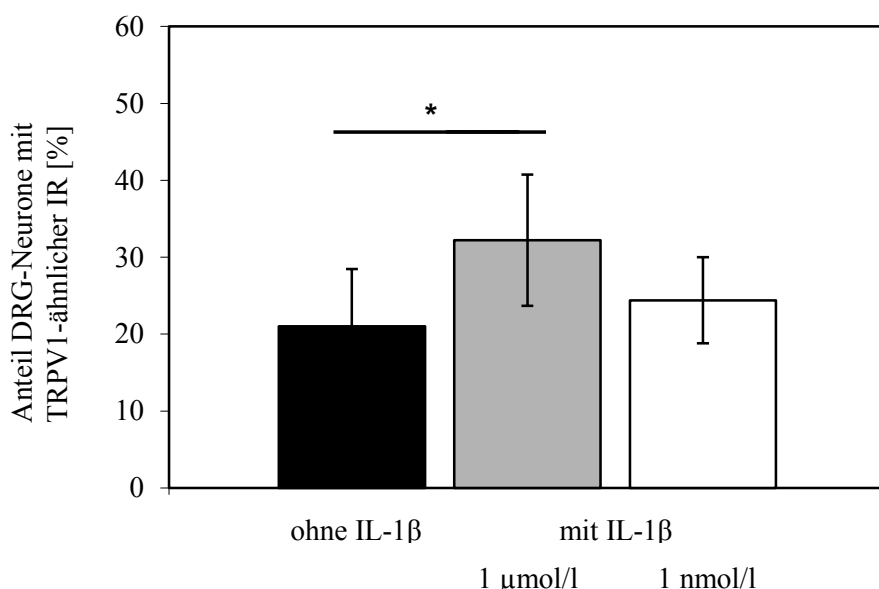


Abb. 14: Mittlere Anzahl der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden kultivierten DRG-Neuronen. Der schwarze Balken stellt die Kontrollinkubation der TRPV1-Expression in kultivierten DRG-Neuronen dar. Der graue und der weiße Balken stellen die mittlere Anzahl der TRPV1-Rezeptor-positiven DRG-Neuronen nach Gabe von IL-1 $\beta$  in den Konzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$  und 1  $\text{nmol/l}$  dar. \* = Signifikanz ( $p \leq 0,02$ ; U-Test von Mann & Whitney); IR = Immunreaktivität.

Auch in diesem Experiment wurden zu jedem Neuron jeweils Querschnittsfläche und Durchmesser errechnet. Die Verteilung der Querschnittsfläche für die Grundexpression des TRPV1-Rezeptors in kultivierten DRG-Neuronen ist in Abb. 11 dargestellt (siehe 3.3). Die Abbildung 15 zeigt die Verteilung der Querschnittsfläche, die auf der Abszisse aufgetragen ist, bei vorheriger Applikation von 1  $\mu\text{mol/l}$  (A) und 1  $\text{nmol/l}$  IL-1 $\beta$  (B) zu den Neuronenkulturen.



### 3 Ergebnisse

Die weißen Balken entsprechen jeweils der Gesamtpopulation von DRG-Neuronen, deren Querschnittsflächen aus dem arithmetischen Mittel von jeweils fünf Neuronenkulturen errechnet wurden, während die schwarzen Balken jeweils die mittleren Anteile TRPV1-Rezeptor-positiver DRG-Neurone an den Querschnittsflächen visualisieren. Letztgenannte nehmen im Vergleich zu den mittleren Anteilen der TRPV1-Rezeptor-positiven DRG-Neurone ohne vorherige IL-1 $\beta$ -Applikation (siehe Abb. 11 in 3.3) besonders in den kleinen und mittelgroßen DRG-Neuronengrößen zu (siehe Abb. 15). Die mittlere Verteilung der Querschnittsflächen der untersuchten Neurone verändert sich durch IL-1 $\beta$ -Applikation nicht.

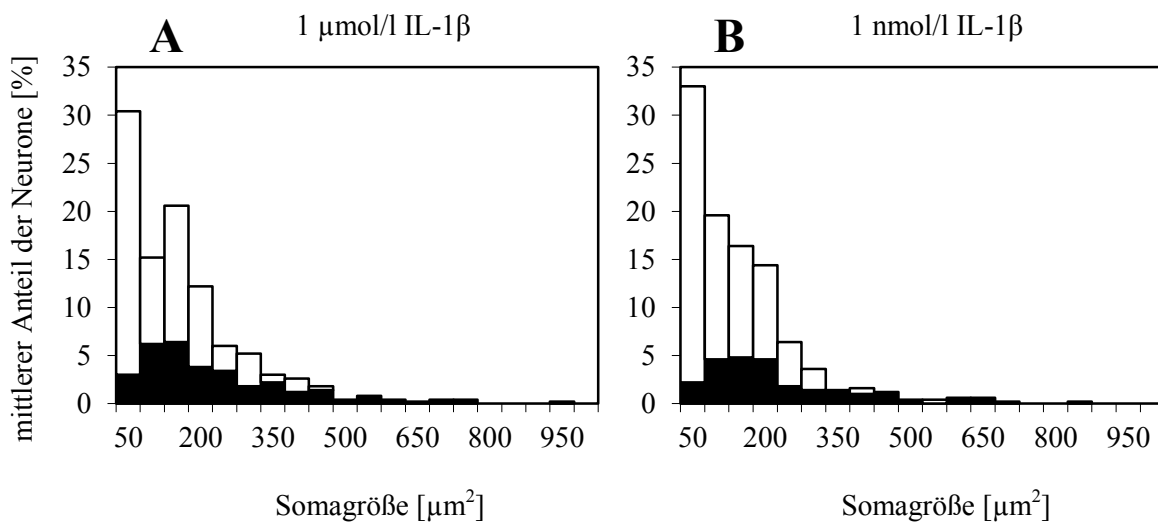


Abb. 15: Mittlere Verteilung der Querschnittsfläche von kultivierten DRG-Neuronen. IL-1 $\beta$  wurde in den Konzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$  (A) und 1  $\text{nmol/l}$  (B) zugegeben. Weiße Balken: Querschnittsfläche aller in die Analyse einbezogenen DRG-Neurone. Schwarze Balken: Querschnittsfläche der für den TRPV1-Rezeptor positiven DRG-Neuronen.

Zusätzlich wurde IL-1 $\beta$  in einer anderen Versuchsreihe mit dessen Antagonisten, IL-1RA, kombiniert zu kultivierten DRG-Neuronen zugegeben. Abbildung 16 zeigt die mittlere Anzahl der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden DRG-Neuronen nach IL-1 $\beta$ -Zugabe (1  $\mu\text{mol/l}$ ) im Vergleich mit derjenigen nach kombinierter Zugabe von IL-1 $\beta$  (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und IL-1RA (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Es wurden je vier unterschiedliche Kulturen mit je 100 Zellen untersucht.  $32,8 \pm 1,5$  % aller Neurone zeigten nach Zusatz von IL-1 $\beta$  in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  für zwei Tage eine positive Markierung für den TRPV1-Rezeptor (Abb. 16 grauer Balken). Demgegenüber bewirkt die gemischte Zugabe von IL-1 $\beta$  (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und IL-1RA (10  $\mu\text{mol/l}$ ) eine signifikante Abnahme der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden DRG-Neuronen auf  $20,5 \pm 2,7$  % (Abb. 16 weißer Balken,  $p \leq 0,014$ ; U-Test von Mann & Whitney).

### 3 Ergebnisse

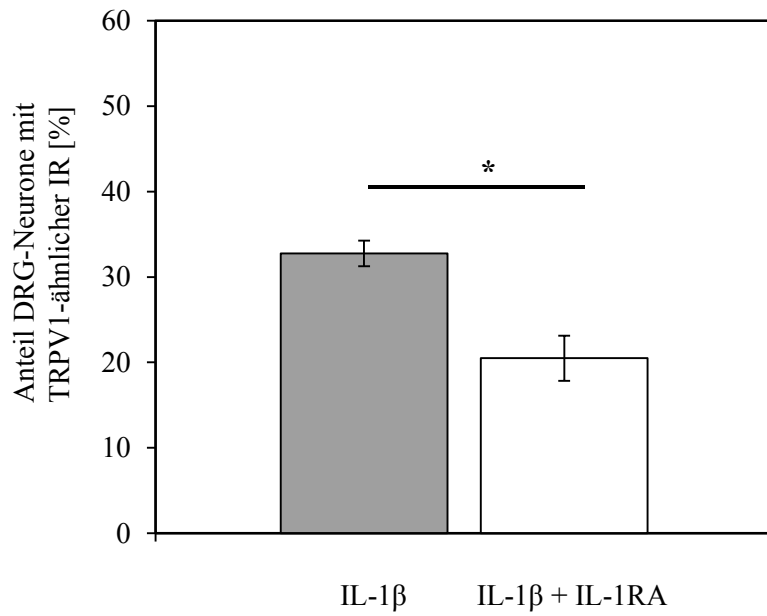


Abb. 16: Mittlere Anzahl der den TRPV1-Rezeptor exprimierenden kultivierten DRG-Neuronen. Der graue und weiße Balken stellen die mittlere Anzahl der TRPV1-Rezeptor-positiven DRG-Neurone nach Gabe von IL-1 $\beta$  (1  $\mu$ mol/l) und IL-1 $\beta$  (1  $\mu$ mol/l) plus IL-1RA (10  $\mu$ mol/l) dar. \* = Signifikanz ( $p \leq 0,014$ ; U-Test von Mann & Whitney); IR = Immunreaktivität.

### 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IL-1RI in DRG-Neuronen der Ratte zu ca. 25 bis 30 % exprimiert wird. Diese Expression steigt signifikant in einem Modell einer peripheren Entzündung zum einen in der Vorimmunisierungsphase auf ca. 40 %, zum anderen in der chronischen Phase auf ca. 50 bis 60 % ipsi- und kontralateral an. Sowohl die Grundexpression des IL-1RI als auch die Erhöhung der Expression im verwendeten Entzündungsmodell betrifft vor allem kleine und mittelgroße DRG-Neurone, die die Somata von nozizeptiven Afferenzen beinhalten. Außerdem untersuchten wir Kurz- und Langzeiteffekte von IL-1 $\beta$ , dem Substrat des IL-1RI, auf kultivierte DRG-Neurone. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration, als Beispiel eines Kurzeffekts, veränderte sich nach Applikation von IL-1 $\beta$  nicht. In den untersuchten Langzeiteffekten von IL-1 $\beta$  konnten wir demonstrieren, dass die TRPV1-Rezeptorexpression nach Gabe von IL-1 $\beta$  anstieg. Antagonisiert man den Effekt von IL-1 $\beta$  mit IL-1RA, fällt die TRPV1-Rezeptorexpression wieder auf das Ausgangsniveau. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-1 $\beta$  einen Teil seiner pronozizeptiven Effekte durch die Regulierung der TRPV1-Rezeptorexpression ausüben kann.

Bereits seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, dass sensorische Neurone sowohl eine Quelle für IL-1 $\beta$  als auch Wirkort für IL-1 $\beta$  darstellen (Schultzberg et al. 1987). Copray et al. (2001) untersuchten die Expression von IL-1 $\beta$  und dem IL-1RI in DRG-Neuronen der Ratte durch In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie. Sie beschrieben, dass ca. 70 % der DRG-Neurone IL-1 $\beta$  und nahezu alle DRG-Neurone den IL-1RI exprimieren. Dieser Nachweis geschah aber bezüglich des IL-1RI auf m-RNA-Ebene und nicht auf Protein-Ebene. Zwar waren in jener Studie ca. 65 % der DRG-Neurone auch für das Protein IL-1 $\beta$  immunreaktiv positiv (Coprav et al. 2001), aber ein quantitativer Nachweis des IL-1RI-Proteins in DRG-Neuronen wurde nicht vorgenommen. Möglicherweise gibt es einen Regulationsmechanismus zwischen Translation und Expression oder es zeigt sich, dass eine aktuelle Translation nicht in allen DRG-Neuronen stattfindet, was den relativ großen Unterschied der Expression des IL-1RI auf m-RNA-Ebene in dieser Studie versus auf Protein-Ebene in der vorliegenden Arbeit erklären kann.

Takeda et al. (2007) wiesen einen ähnlichen Anteil der IL-1RI-Expression (38,7 %) in Neuronen des Ganglion trigeminale, einem den Hinterwurzelganglien ähnlichen Ganglion, in WISTAR-Ratten nach. Außerdem war diese Grundexpression des IL-1RI wie in der

## 4 Diskussion

vorliegenden Arbeit vor allem in kleinen und mittelgroßen Neuronen vorhanden. Die Autoren konnten zudem einen ähnlichen, sogar höher liegenden Anstieg der IL-1RI-Expression (70,9 %) auch vor allem in kleinen Neuronen nach Auslösung einer peripheren Entzündung durch subkutane Injektion von komplettem Freund'schen Adjuvant (CFA) nachweisen.

Bereits in den vorimmunisierten Ratten wiesen wir gegenüber gesunden Tieren erstmalig einen signifikanten Anstieg der IL-1RI-Expression in kleinen und mittelgroßen DRG-Neuronen nach. Dies ist wahrscheinlich auf eine leichte allgemeine Krankheitsreaktion zurückzuführen. Zeichen einer Arthritis wie beispielsweise Gelenkschwellung, Gewichtsverlust, Hyperalgesie oder Schmerz-assoziiertes Verhalten, existiert in diesen Ratten nicht (Boettger et al. 2008, Boettger et al. 2009), jedoch bleibt es Gegenstand weiterer Forschungsarbeit, diese Erhöhung der IL-1RI-Expression in DRG-Neuronen trotz fehlendem Verhaltenskorrelat zu erklären. Eine Erhöhung der Rezeptorexpression für andere proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TNF $\alpha$ , in DRG-Neuronen während der Vorimmunisierung bei AIA-Tests ist bisher nicht beschrieben worden (Boettger et al. 2008).

Andere Untersuchungen von IL-1 $\beta$  im entzündeten Gelenk, nicht in DRG-Neuronen, unterstützen die Hypothese, dass das System um IL-1 $\beta$  und dessen Rezeptor während chronisch inflammatorischer Krankheiten, besonders aber während der rheumatoiden Arthritis (RA) hochreguliert ist. So beschrieben Pohlers et al. (2005) eine vermehrte IL-1 $\beta$ -Expression auf m-RNA- und Protein-Ebene in der Synovialis der Ratten am Beginn der AIA. IL-1 $\beta$ -m-RNA und IL-1 $\beta$ -Protein werden bereits sechs Stunden nach Induktion der AIA signifikant vermehrt exprimiert. Zwar gehen diese gesteigerten Expressionen nach ein bis drei Tagen wieder zurück, IL-1 $\beta$ -Protein sogar unter „präarthritische“ Spiegel, doch muss sich dies nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widersprechen, da erstens keine DRG-Neurone, sondern die Synovialis der Ratten untersucht wurde und zweitens keine Aussagen zur Expression des IL-1RI gemacht wurden. Es ist auffällig, dass IL-1 $\beta$ -mRNA- und IL-1 $\beta$ -Protein-Expressionen positiv mit der Krankheitsschwere, gemessen an der Kniegelenkschwellung, korrelieren (Pohlers et al. 2005). Dies mag die zentrale Rolle von IL-1 $\beta$  im Verlauf der RA widerspiegeln. IL-1 $\beta$  wird in der chronischen Phase der Entzündung in der Synovialis herunterreguliert. Es ist hochpotent, bereits 2 – 3 % des durch IL-1 $\beta$  besetzten IL-1RI reichen aus, um einen biologischen Effekt auszulösen (Ye et al. 1992, van den Berg und Bresnihan 1999). Eine Herunterregulierung der IL-1 $\beta$ -Expression wäre also bei gleichzeitiger Hochregulierung der IL-1RI-Expression denkbar, wenn der IL-1 $\beta$ -Effekt in der chronischen Phase der Entzündung aufrechterhalten bleibt. Verschiedene Studien wiesen nach, dass zehnbis 100-fach überschießende Mengen des IL-1RA nötig sind, um nur 50 % der IL-1-Antwort

## 4 Diskussion

in den Zellen zu inhibieren, die den IL-1RI exprimieren (Arend et al. 1990, Arend 1993). Trotzdem ist das Verhältnis IL-1RA/IL-1 mit 1,2 bis 3,6 in der Genexpression während der RA deutlich unter der genannten nötigen Menge, die für eine Inhibierung der IL-1-Bioaktivität nötig wäre (Firestein et al. 1994, Übersicht van den Berg und Bresnihan 1999). Es könnte also auch eine Imbalance zwischen IL-1 $\beta$  und IL-1RA zur Entwicklung einer RA beitragen, auf die auch andere Arbeiten hinweisen (Chomarat et al. 1995, Arend und Gabay 2000).

In einer anderen AIA-Studie, in der Zellen aus dem Kniegelenk von Mäusen untersucht wurden, war IL-1 $\beta$ -mRNA nicht signifikant aber dennoch tendenziell vermehrt exprimiert, während IL-1 $\beta$ -Expression auf Proteinebene signifikant vom ersten bis zum Beginn der chronischen Phase der Entzündung (Tag sieben) erhöht war (Schurigt et al. 2005). Einen zeitlich ähnlichen Anstieg zeigte die gemessene Gelenkschwellung in dieser Studie.

Bis jetzt gibt es nur eine andere Studie, die die Expression des IL-1RI-Proteins in DRG-Neuronen von Ratten untersuchte: Li et al. (2005) konnten eine Grundexpression des IL-1RI im Größenbereich derjenigen der vorliegenden Arbeit vor allem in kleinen DRG-Neuronen nachweisen. Auch wiesen die Autoren in dieser Studie einen signifikanten Anstieg des IL-1RI nach intraartikulärer Injektion von CFA in DRG-Neuronen nach drei Tagen nach. Ebenso stieg in diesem Entzündungsmodell auch IL-1 $\beta$  auf Proteinebene nach Auslösung der Arthritis vor allem in kleinen DRG-Neuronen signifikant an. Jedoch wurde in dieser Studie weder ein zeitlicher Verlauf der IL-1RI-Expression noch diese in Bezug auf kontralaterale DRG-Neuronen untersucht. In der vorliegenden Arbeit fanden wir einen Anstieg der IL-1RI-Expression in der chronischen Phase (Tag 7 und 21 nach Auslösung der Entzündung). Li et al. (2005) beschrieben diesen Anstieg der IL-1RI-Expression am dritten Tag nach Auslösung der Entzündung, also bereits in der akuten Phase, was möglicherweise auf das verwendete andere Entzündungsmodell zurückzuführen ist. Die Autoren wiesen wegen der kombinierten Expression von IL-1 $\beta$  und IL-1RI in DRG-Neuronen auf einen eventuell vorhandenen autokrinen oder parakrinen IL-1 $\beta$ -Signalweg hin, der auch bei dem im Vergleich zu IL-1 $\beta$  verzögerten Anstieg der IL-1RI-Expression eine Rolle spielen könnte, obwohl bis jetzt keine AIA-Studie zur IL-1 $\beta$ -Proteinexpression in DRG-Neuronen existiert.

In einem neuropathischen Schmerzmodell, bei dem Spinalnerven von Ratten ligiert wurden, konnte ein schnellerer und stärkerer Anstieg der Expression für IL-1RI in DRG-Neuronen nachgewiesen werden als in der vorliegenden Arbeit (Lee et al. 2004). Auch war dieser Anstieg von kürzerer Dauer, denn bereits am 14. Tag nach Verletzung der Nerven war die Expression des IL-1RI wieder auf dem Niveau der Kontrollen. Zu beachten ist aber, dass es

## 4 Diskussion

sich bei dem untersuchten Target um m-RNA vor dem Hintergrund eines neuropathischen Schmerzmodells handelt. Die Autoren suggerierten, dass IL-1 $\beta$  neben TNF $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Initiierung von anhaltenden neuropathischen Schmerzen habe und die nur relativ kurze erhöhte Expression von Zytokinen und deren Rezeptoren stark vom verwendeten Gewebetyp, dessen Lokalisierung und dem verwendeten neuropathischen Schmerzmodell abhängt, denn die untersuchte erhöhte IL-1RI-Expression im Rückenmark begann später und fiel erst wieder am 28. Tag auf Kontrollniveau.

Die vermehrte IL-1RI-Expression in DRG-Neuronen im verwendeten AIA-Modell trat sowohl ipsilateral als auch kontralateral auf. Dies könnte eine Rolle von IL-1 $\beta$  in der Entwicklung von symmetrischer Hyperalgesie nahelegen, da in der AIA auch schmerzassoziiertes Verhalten des entzündeten und des kontralateralen Knies bezüglich mechanischer und thermischer Hyperalgesie beobachtet werden kann (Segond von Banchet et al. 2009, siehe 1.9). Interessanterweise ist eine Hyperalgesie auch in Patienten mit RA und in einigen anderen Tiermodellen symmetrisch nachweisbar (Kidd et al. 1995, Zangger et al. 2005, Russel et al. 2009). Kidd et al. (1995) konnten vermehrte Substanz P (SP)-Expression in DRG-Neuronen nach Induktion einer Monoarthritis in Ratten ipsi- und kontralateral zeigen. Da IL-1 $\beta$  Einfluss auf SP-Spiegel in DRG-Neuronen besitzt (siehe unten), könnte dieser symmetrische Effekt auch durch IL-1 $\beta$  verursacht sein. Auch wird diese Hypothese durch die Tatsache gestützt, dass IL-1 $\beta$  als einziges detektierbares Zytokin in der kontralateralen Pfote von Ratten in einem TNF $\alpha$ -induzierten Entzündungsmodell, in dem thermische Hyperalgesie symmetrisch auftritt, vermehrt nachweisbar ist (Russell et al. 2009). Diese Nachweise legen erstens eine neurogene Ursache nahe und weisen zweitens auf eine besondere Rolle von IL-1 $\beta$  in der Genese bilateraler thermischer Hyperalgesie hin. Einen weiteren Hinweis zeigt die verhinderte bilaterale Hyperalgesie durch vorherige IL-1RA-Gabe in diesem Modell auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen somit die vor kurzem neu entwickelte Hypothese, dass IL-1 $\beta$  eine besondere Rolle vor allem in der Genese der kontralateralen Hyperalgesie im Rahmen peripherer Entzündungszustände spielt (Russell et al. 2009).

Auch die Ergebnisse in einem neuropathischen Schmerzmodell stützen diese Hypothese. Nach peripherer Nervenläsion ist die Transkription für IL-1 $\beta$ , nicht aber für TNF $\alpha$  kontralateral erhöht (Kleinschnitz et al. 2005). Dieser mögliche Zusammenhang ist auch im ZNS nachgewiesen worden: Intrathekale Gabe von IL-1RA kann einmal etablierte bilaterale mechanische Allodynie und thermische Hyperalgesie blockieren oder aufheben (Milligan et al.

2005). Auch Kleibeuker et al. (2007) wiesen auf bilaterale IL-1 $\beta$ -abhängige Mechanismen im ZNS für mechanische Allodynie in einem neuropathischen Schmerzmodell hin.

Erhöhte IL-1 $\beta$ -Spiegel werden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Serum, in der Gelenkflüssigkeit sowie im entzündeten Gewebe des Gelenkes gefunden und korrelieren positiv mit Messungen der Aktivität der Erkrankung (Eastgate et al. 1988, Hopkins et al. 1988, van den Berg und Bresnihan 1999, Lubberts und van den Berg 2003). IL-1 $\beta$  ist neben TNF $\alpha$  das wichtigste Zytokin in der Pathogenese der Gelenkdestruktion, genauer gesagt beim Zusammenbruch des Knorpelkollagens und der Proteoglykane sowie bei der Knochenerosion (Pettipher et al. 1986, Arend und Dayer 1995, van den Berg und Bresnihan 1999, van den Berg 2000). IL-1 $\beta$ -Spiegel in der Gelenkflüssigkeit sind bei Patienten mit Gelenkerosionen größer als bei solchen ohne Gelenkerosionen (Fong et al. 1994). IL-1 kann die Expression einer Protease, Cathepsin B, in synovialen Fibroblasten steigern (Huet et al. 1993). Diese zerstört Kollagen und Proteoglykane und besitzt vermutlich eine führende Rolle während der RA (Trabandt et al. 1991). Cathepsine und auch Matrixmetalloproteinasen (MMP), Enzyme, die in der Knochen- und Knorpelschädigung involviert sind, werden auch im Verlauf der AIA vom dritten Tag an exprimiert (Mentzel und Bräuer 1998, Schurigt et al. 2005). IL-1 $\beta$  kann auch MMP-Expression und -Freisetzung induzieren (Mentzel und Bräuer 1998, van den Berg 2000) und MMP-Aktivität korreliert mit der IL-1 $\beta$ -Proteinkonzentration im Kniegelenk von Mäusen, die einer AIA ausgesetzt wurden (Schurigt et al. 2005).

Antagonisiert man IL-1 $\beta$  mit rekombinantem IL-1RA in Ratten mit einer adjuvanten Arthritis, verringern sich histopathologische Parameter der Gelenkentzündung und Gelenkzerstörung, Knochenmineraldichteverlust, Pfotenschwellung und Körpergewichtsverlust als Ausdruck der Kachexie (Feige et al. 2000). In der genannten Studie konnte außerdem eine synergistische Inhibition der adjuvanten Arthritis durch TNF $\alpha$ -Blockade nachgewiesen werden, was einen TNF $\alpha$ -unabhängigen Signalweg von IL-1 $\beta$  suggeriert, auf den auch die Arbeiten von Kuiper et al. (1998) und van den Berg et al. (1999) hindeuten.

IL-1 und TNF $\alpha$  sind schon lange als zwei dominante vorantreibende Faktoren in arthritischen Krankheiten bekannt (Pettipher et al. 1986, Brennan et al. 1989a, Brennan et al. 1989b, Arend und Dayer 1990, Arend und Dayer 1995). Beide Zytokine besitzen überlappende aber doch unterschiedliche biologische Aktivitätsspektren (Übersichten Brennan et al. 1989a, Dinarello 1998, Bresnihan und Cunnane 1998, Beutler 1999). TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind beide für die inflammatorische Komponente der Arthritis verantwortlich, während IL-1 $\beta$  wahrscheinlich in der Knochen- und Knorpelschädigung sowie der Angiogenese, die eher in der chronischen

## 4 Diskussion

Phase vorherrschen, über TNF $\alpha$  dominiert (van Lent et al. 1995, Kuiper et al. 1998, Joosten et al. 1999, van den Berg et al. 1999, Feige et al. 2000, van den Berg 2000, Coxon et al. 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen diese Hypothese, da eine verstärkte Expression des IL-1RI in der chronischen Phase der AIA als Modell für die RA beschrieben wurde, während die Rezeptoren für TNF $\alpha$  im gleichen Modell weder in der akuten noch in der chronischen Phase hochreguliert sind (Boettger et al. 2008). IL-1 $\beta$  käme demnach eine besondere Rolle in der chronischen Phase der RA zu.

In der klinischen Anwendung stehen zur Therapie der RA neben Glukokortikoiden, nicht-steroidalen Antirheumatika, Analgetika, u.a. ergänzende Therapiemöglichkeiten auch DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs = langwirksame Antirheumatika, „Basistherapeutika“) zur Verfügung. Eines davon ist ein rekombinanter humaner IL-1RA (Anakinra, Kineret®), der mit dem physiologisch vorkommenden IL-1RA fast identisch ist und kompetitiv zu IL-1 an den IL-1RI bindet (Rubbert-Roth und Perniok 2003, Cohen et al. 2004, Übersicht Geyer und Müller-Ladner 2010). Anakinra, das aufgrund der kurzen Halbwertszeit täglich subcutan verabreicht werden muss, dient dabei als gut tolerierter Teil einer Kombinationstherapie für RA-Patienten, die auf nichtbiologische DMARDs nicht mehr reagieren und hemmt das im Röntgenbild sichtbare Fortschreiten der Erkrankung, die sogenannte Röntgenprogression (Furst 2004, Mertens und Singh 2009), führt zu einem Rückgang der Gelenkschwellung als Ausdruck der Krankheitsaktivität und zu einer Verbesserung des CRP-Spiegels sowie Abnahme der Schmerzen auf einer gemessenen Schmerzskala (Bresnihan et al. 1998). Allerdings stehen Langzeitergebnisse zur Therapie mit Anakinra noch aus. In Deutschland ist es in Kombination mit Methotrexat zugelassen und sollte gemäß den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie für den Einsatz biologischer Therapeutika eingesetzt werden (Rubbert-Roth und Perniok 2003).

Nicht zur Therapie der RA aber zur Behandlung anderer rheumatischer Erkrankungen existieren in der Anti-IL-1-Therapie außerdem Canakinumab, ein humaner monoklonaler Anti-IL-1 $\beta$ -Antikörper, der u.a. in der Therapie der seltenen systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis eingesetzt wird (Übersicht Geyer und Müller-Ladner 2010) und Rilonacept, ein dimeres Fusionsprotein, bestehend aus der Liganden-bindenden Domäne des IL-1RI und des Interleukin-1-Rezeptor-akzessorischen Proteins (IL-1RAcP), die an humanes IgG1 gebunden sind. Rilonacept neutralisiert zirkulierendes IL-1 bevor es an den oberflächengebundenen IL-1RI binden kann und wird u.a. in der Therapie der Gicht-Arthritis



## 4 Diskussion

eingesetzt (Übersicht Geyer und Müller-Ladner 2010). In diesen Studien wird aber fast nie der empfundene Schmerz quantifiziert.

Neben den vorher genannten Studien zur Bedeutung von AIA und IL-1 $\beta$ , existieren zahlreiche Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die die Bedeutung von Nozizeption und IL-1 $\beta$  näher charakterisieren: So wird berichtet, dass IL-1 $\beta$  mechanische oder thermische Hyperalgesie durch vermehrte Expression von Neuropeptiden in DRG-Neuronen (Lindsay und Harmar 1989, Lindsay et al. 1989, Woolf et al. 1994, Safieh-Garabedian et al. 1995, Morioka et al. 2002a, Morioka et al. 2002b, Hou et al. 2003), durch Freisetzung von Stickoxid (NO) (Sung et al. 2004, Sung und Wong 2007) oder durch Injektion in den Fuß von Ratten verursacht (Ferreira et al. 1988, Fukuoka et al. 1994, Safieh-Garabedian et al. 1995, Sachs et al. 2002).

Auch ist eine IL-1 $\beta$ -induzierte Sensibilisierung von Nozizeptoren durch die kontrovers diskutierte Prostaglandinproduktion (Ferreira et al. 1988, Follenfant et al. 1989, Crestani et al. 1991, Crofford et al. 1994, Watkins et al. 1994, Übersicht Verri et al. 2006), durch Induktion von Bradykinin-Rezeptoren (Perkins und Kelly 1994) oder als Resultat direkter Aktivierung von Nozizeptoren (Fukuoka et al. 1994, Obreja et al. 2002) möglich.

Umgekehrt reduzieren Antikörper gegen IL-1 $\beta$ , die Gabe von IL-1RA oder Antikörper gegen den IL-1RI mechanische Allodynie oder thermische Hyperalgesie in neuropathischen und nicht-neuropathischen Schmerzmodellen (Cunha et al. 1992, Safieh-Garabedian et al. 1995, Sommer et al. 1999, Cunha et al. 2000).

Eine Verhaltensstudie mit IL-1-„Knock out“-Mäusen zeigt reduzierte thermische und mechanische Hyperalgesie in Entzündungs- und neuropathischen Modellen (Honore et al. 2006). In IL-1RI-„Knock out“-Mäusen und Mäusen, die den IL-1RA überexprimieren, ist eine mechanische Allodynie, hervorgerufen durch neuropathische Einflüsse, sogar aufgehoben (Wolf et al. 2006). IL-1 $\beta$  scheint somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung der thermischen Hyperalgesie und der mechanischen Allodynie zu spielen. Trotzdem bleibt es Gegenstand weiterer Forschungsarbeit, wie genau eine Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und deren Rezeptoren zur gesteigerten Schmerzwahrnehmung führt. Prinzipiell kann IL-1 $\beta$  als Mediator in der Genese und Aufrechterhaltung der Entzündung oder / und durch direkte Wirkung auf neuronale Strukturen Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung nehmen. Unsere Arbeitsgruppe wies vor kurzem einen langfristigen Einfluss von IL-1 $\beta$  auf eine G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (GRK-2) in DRG-Neuronen nach (Segond von Banchet et al. 2011). Diese Rezeptorkinase internalisiert G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) u.a. durch Phosphorylierung, wodurch es zu einem schnellen

und deutlichen Funktionsverlust der Rezeptoren kommt, da diese weniger für die Aktivierung durch endogene Liganden zur Verfügung stehen (Pitcher et al. 1998, Ferguson 2001, Luttrell und Lefkowitz 2002). Die nachgewiesene Senkung der GRK-2-Expression durch IL-1 $\beta$  kann also zu einer Zunahme der Hyperalgesie führen, da es zu einer verminderten Internalisierung nozizeptionsrelevanter und in Allodynie und Hyperalgesie involvierter GPCR kommt, welche damit vermehrt für die Aktivierung durch endogene Liganden zur Verfügung stehen. Beispiele für GPCR sind Chemokinrezeptoren oder der Neurokinin-1-Rezeptor (Aragay et al. 1998, Lombardi et al. 2002, Vroon et al. 2004, Jiménez-Sainz et al. 2006). Die GRK-2 stellt also einen möglichen neuronalen Angriffspunkt für proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  (Lombardi et al. 1999) in der Auslösung und Aufrechterhaltung von Allodynie und Hyperalgesie dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer langfristiger Einfluss von IL-1 $\beta$  auf DRG-Neurone *in vitro* und damit eine mögliche Beteiligung von IL-1 $\beta$  in der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen untersucht. IL-1 $\beta$  führt zu einer signifikanten Steigerung der TRPV1-Rezeptorexpression in DRG-Neuronen. Bisher gibt es einige Hinweise auf eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors durch IL-1 $\beta$ . Obreja et al. (2002) fanden eine IL-1 $\beta$ -induzierte Potenzierung hitzeaktivierter Ströme in DRG-Neuronen via Proteinkinase C (PKC), die eine wichtige Komponente zur Entstehung entzündungsassoziierter Hyperalgesie darstellen, da hitzetransduzierende Kanäle wie der TRPV1-Rezeptor u.a. von der PKC phosphoryliert und damit sensibilisiert werden (siehe 1.6). Die Autoren wiesen auch darauf hin, dass ein mögliches Ziel dieser PKC vermittelten Phosphorylierung im IL-1 $\beta$ -Signalweg der TRPV1-Rezeptor sein könnte. Wie in 1.6 bereits dargestellt, tragen auch Prostaglandine zur Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors bei. Die Arbeiten von Dayer et al. (1986), Schweizer et al. (1988) und Fehrenbacher et al. (2005) wiesen eine Stimulierung der Prostaglandin E<sub>2</sub>- (PGE<sub>2</sub>)-Synthese durch IL-1 $\beta$  *in vitro* nach. PGE<sub>2</sub> wiederum verstärkt Capsaicin-Ströme über die Phosphorylierung des TRPV1-Rezeptors durch PKA (Lopshire und Nicol 1998, Übersicht Holzer 2004).

Die Expression des TRPV1-Rezeptors verändert sich im Verlauf einer AIA in DRG-Neuronen nicht (Bär et al. 2004). Auch in anderen akuten und chronischen Entzündungsmodellen konnte keine Veränderung der TRPV1-Rezeptorexpression in DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Zhou et al. 2003). Andere Entzündungsmodelle, die mit thermischer Hyperalgesie einhergehen, zeigen dagegen eine Hochregulation dieses Rezeptors (Carlton und Coggeshall 2001, Ji et al. 2002, Amaya et al. 2003, Bron et al. 2003). Auch in einem neuropathischen

Modell kann eine Erhöhung der TRPV1-Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene in DRG-Neuronen gefunden werden (Fukuoka et al. 2002). Zhou et al. (2003) erklärten, dass das wichtigste Element in der Entstehung entzündungsassoziierter thermischer Hyperalgesie möglicherweise nicht die Hochregulierung der TRPV1-Rezeptorexpression sei, sondern eventuell die Sensibilisierung des hitzetransduzierenden TRPV1-Rezeptors durch proinflammatorische Mediatoren (Burgess et al. 1989, Chuang et al. 2001). Die Rolle des TRPV1-Rezeptors in der Entstehung von Gelenkschmerzen, wie sie bei rheumatoider Arthritis auftreten, ist unklar. Schaible et al. (2009) wiesen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass mechanische, nicht thermische Hyperalgesie das Hauptproblem in Gelenkkrankheiten darstellt und dass es nicht bekannt ist, ob thermische Hyperalgesie im Menschen überhaupt eine Rolle spielt. Trotzdem ist der TRPV1-Rezeptor in Patienten mit RA in synovialen Fibroblasten hochreguliert (Engler et al. 2007). Auch kann im Verlauf einer AIA sekundär thermische Hyperalgesie beobachtet werden (Boettger et al. 2008, Boettger et al. 2009).

Die gemessene Grundexpression des TRPV1-Rezeptors in DRG-Neuronen beträgt ca. 21 % und betrifft vor allem kleine und mittelgroße Zellen. Auch andere Arbeiten wiesen den TRPV1-Rezeptor in kleinen und mittelgroßen DRG-Neuronen nach, lagen aber mit ca. 27 - 45 % für die Grundexpression zum Teil höher (Amaya et al. 2003, Zhou et al. 2003, Bär et al. 2004, Hensellek et al. 2007, Zachařová und Paleček 2009). Es gibt also wahrscheinlich starke Schwankungen in der TRPV1-Rezeptorexpression in DRG-Neuronen unter Normalbedingungen. Zudem haben unterschiedliche Nachweismethoden verschiedene Sensitivitäten. Es gibt Hinweise dafür, dass proinflammatorische Mediatoren und Zytokine Einfluss auf die TRPV1-Rezeptorexpression in DRG-Neuronen nehmen können: So erhöht z.B. TNF $\alpha$  die Expression des TRPV1-Rezeptors auf Proteinebene *in vitro* (Hensellek et al. 2007). Auch Nerve growth factor (NGF) kann den TRPV1-Rezeptor sowohl sensibilisieren (Übersicht Holzer 2004), als auch dessen Expression in DRG-Neuronen steigern (Bron et al. 2003). Ji et al. (2002) fanden allerdings eine Erhöhung des TRPV1-Rezeptors auf Proteinebene in DRG-Neuronen durch NGF ohne Änderung der Transkription des Rezeptors, was die Ergebnisse der Studie von Tohda et al. (2001) erklären könnte, in der ein axonaler Transport der mRNA des TRPV1-Rezeptors in primären Afferenzen nachgewiesen wurde (siehe 1.6). Bisher gibt es keine Studie über den Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die TRPV1-Expression, weder in DRG-Neuronen noch in anderen Zellen.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gibt es also einen ersten Hinweis dafür, dass auch IL-1 $\beta$  nicht nur über die bekannte Sensibilisierung, sondern auch über eine mögliche

## 4 Diskussion

Steigerung der Expression des TRPV1-Rezeptors in DRG-Neuronen Einfluss auf die Entstehung entzündungsassoziierter thermischer Hyperalgesie nehmen könnte. Dies wird durch die nachgewiesene Senkung der TRPV1-Rezeptorexpression durch den spezifischen Antagonisten IL-1RA auf das Ausgangsniveau unterstützt. Allerdings sind für die Hochregulierung des TRPV1-Rezeptors im Vergleich zu TNF $\alpha$ , das bereits in einer Konzentration von 0,6 nmol/l ausreicht, um diesen Effekt hervorzurufen (Hensellek et al. 2007), relativ hohe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (1  $\mu$ mol/l) nötig. Eine mögliche Erklärung dafür bietet der TNF $\alpha$ -induzierte IL-1 $\beta$ -Anstieg (Woolf et al. 1997, Russell et al. 2009), bei dem TNF $\alpha$  als vorantreibendes proinflammatorisches Zytokin agiert und nachfolgend andere Zytokine den weiteren Entzündungsprozess beherrschen. Es wäre also möglich, dass TNF $\alpha$  den TRPV1-Rezeptor initial hochreguliert und diese Aufgabe durch IL-1 $\beta$  erst nach Erreichen hoher lokaler Konzentrationen fortgesetzt wird. Da diese Expression nur zu einem Zeitpunkt (nach zweitägiger Zugabe von IL-1 $\beta$ ) untersucht wurde, können damit nur Aussagen zu einem langfristigen Einfluss von IL-1 $\beta$  gemacht werden. Es könnte z.B. auch sein, dass die TRPV1-Expression durch IL-1 $\beta$  schon früher ansteigt als gemessen. Der langfristige Einfluss schließt mögliche Änderungen der Expression von anderen Mediatoren auch als Mittlersubstanzen durch IL-1 $\beta$  mit ein: IL-1 $\beta$  könnte über die gesteigerte NGF-Synthese oder aber auch direkt durch eine posttranskriptionale Erhöhung des Rezeptors in der Membran der DRG-Neuronen beispielsweise via PKC agieren. In der immunzytochemischen Darstellung des TRPV1-Rezeptors konnte eine intrazelluläre oder membrangebundene Form nicht unterschieden werden. Ob die gefundene gesteigerte TRPV1-Expression in DRG-Neuronen Ergebnis direkter IL-1 $\beta$ -Aktivität, bzw. bekannter intrazellulärer IL-1 $\beta$ -Signalwege ist oder ob IL-1 $\beta$  über die bekannte gesteigerte NGF-Synthese agiert, bleibt eine Aufgabe weiterer Forschungsarbeit. Möglicherweise hängen auch beide oder noch andere Mechanismen damit zusammen.

Es ist bereits bekannt, dass TNF $\alpha$  als Beispiel für ein proinflammatorisches Zytokin die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) erhöhen kann (Pollock et al. 2002). Auch GPCR-aktivierende, inflammatorische Mediatoren wie Bradykinin, Serotonin und PGE $_2$  signalisieren wahrscheinlich auch über eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (Linhart et al. 2003, Segond von Banchet et al. 2011, siehe 1.7). Die  $[Ca^{2+}]_i$  spielt also eine wichtige Rolle in der Sensibilisierung von Nozizeptoren und damit in der Entstehung von Hyperalgesie.

In der Vergangenheit sind im Zusammenhang mit der Sensibilisierung von Nozizeptoren zahlreiche Kurzeiteffekte von IL-1 $\beta$  beschrieben worden. So führt IL-1 $\beta$  zu einer Hydrolyse

## 4 Diskussion

von GTP (O'Neill et al. 1990), Phosphotidylcholin, Phosphotidylserin oder Phosphotidylethanolamin (Rosoff et al. 1988, Rosoff 1989) und Freisetzung von Ceramid durch neutrale Sphingomyelinase (Schütze et al. 1994). Auf einem zellulären Niveau moduliert IL-1 $\beta$  die Erregbarkeit von Neuronen des circumventrikulären Gewebes, was in einer Membranpotentialänderung durch Bindung an den IL-1RI resultiert (Desson und Ferguson 2003, Ferri und Ferguson 2003). Auch Takeda et al. (2007) wiesen einen Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die neuronale Erregbarkeit des Ganglion trigeminale nach. Fukuoka et al. (1994) fanden einen Einwärtsstrom in DRG-Neuronen nach Applikation von IL-1 $\beta$  bereits nach einer Minute. Özaktay et al. (2006) konnten *in vivo* eine gesteigerte Mechanosensitivität von Afferenzen der Ratte durch Gabe von IL-1 $\beta$  auf exponierte DRGs nach 30 min nachweisen. Auch neuere, bisher nicht publizierte Arbeiten weisen daraufhin, dass IL-1 $\beta$  eine Steigerung der Mechanosensitivität innerhalb von ein bis drei Stunden an peripheren Nerven verursacht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer möglicher Kurzeiteffekt von IL-1 $\beta$ , nämlich dessen möglicher Einfluss auf die  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht. Da IL-1 $\beta$  nicht den klassischen Kalzium-Inositol-1,4,5-triphosphat-(IP<sub>3</sub>)-Signalweg triggert (Übersicht Kuno und Matsushima 1994), wäre eine Beeinflussung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen möglich. Unsere Arbeiten zeigen, dass IL-1 $\beta$  in dem gewählten Konzentrationsbereich die  $[Ca^{2+}]_i$  in DRG-Neuronen nicht verändert. Mit einer Ausnahme (Kawatani und Birder 1992) gibt es bereits einige Hinweise dafür, dass IL-1 $\beta$  keine kurzfristige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  stimuliert (Abraham et al. 1987, Georgilis et al. 1987, Übersicht O'Neill et al. 1990, Übersicht O'Neill 1995, Übersicht Dinarello 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies zum ersten Mal auch in DRG-Neuronen. Eine langfristige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  schließt sich damit aber generell nicht aus. Wie in 1.6 bereits beschrieben, kommt es nach TRPV1-Rezeptoraktivierung u.a. zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. Regelt IL-1 $\beta$  die TRPV1-Rezeptorexpression hinauf, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, würde eine längerfristige IL-1 $\beta$ -Einwirkung auf DRG-Neurone wahrscheinlich auch die  $[Ca^{2+}]_i$  erhöhen.

### 5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Interleukin-1 $\beta$  die Expression des TRPV1-Rezeptors hochreguliert. So könnte IL-1 $\beta$  eine Bedeutung in der Entwicklung und Aufrechterhaltung thermischer Hyperalgesie über die verstärkte Expression des TRPV1-Rezeptors in DRG-Neuronen haben und damit einen Einfluss auf den Phänotyp von Neuronen.

In Zusammenhang mit der Sensibilisierung von Nozizeptoren gibt es einige Hinweise auf kurzfristige Effekte durch IL-1 $\beta$ . Neuere, bisher nicht publizierte Arbeiten scheinen darauf hinzuweisen, dass IL-1 $\beta$  eine Steigerung der Mechanosensitivität an peripheren Neuronen innerhalb von ein bis drei Stunden verursacht. IL-1 $\beta$  signalisiert in DRG-Neuronen kurzfristig aber wahrscheinlich nicht über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, auch wenn dieser Mechanismus im Signalweg anderer proinflammatorischen Mediatoren involviert ist. Längerfristige Einflüsse von IL-1 $\beta$  auf die  $[Ca^{2+}]_i$  sind damit aber nicht ausgeschlossen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle in der Genese chronischer Schmerzen während der rheumatoiden Arthritis (RA) zukommt, da der Rezeptor von IL-1 $\beta$ , IL-1RI, in DRG-Neuronen im Verlauf einer AIA in der chronischen Phase ipsi- aber auch kontralateral vermehrt exprimiert wird. Die bilaterale Expression dieses Rezeptors weist auch auf eine besondere Rolle von IL-1 $\beta$  in der Entstehung der kontralateralen Hyperalgesie im Rahmen peripherer Entzündungszustände hin.

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit handelt es sich zum Teil um *in vitro*-Versuche, die *in vivo* verifiziert werden müssen. Weiterhin bleibt es Gegenstand weiterer Forschungsarbeit wie und warum eine Schmerzreduktion durch einen neuronalen Angriffspunkt oder / und durch Hemmung der Entzündung während chronisch-inflammatorischer Krankheiten erreicht werden kann. Die Kenntnis der Pathogenese auf molekularer Ebene ist wie bei allen Krankheiten, so auch bei Autoimmunkrankheiten, von größter Bedeutung. Dadurch ist die Entwicklung effektiver Therapiestrategien besonders bei chronischen Schmerzzuständen wie beispielsweise der RA erst möglich. Therapeutische Versuchsansätze sind zum Beispiel die Neutralisierung der Zytokine, die während der AIA dominant sind, durch monoklonale Antikörper oder lösliche Zytokinrezeptoren (Drevlow et al. 1996, Choy und Panayi 2001). Weiterhin sind Rezeptorblockade durch Rezeptorantagonisten oder monoklonale Antikörper gegen Zytokinrezeptoren oder die Aktivierung antiinflammatorischer Signalwege denkbar (Choy und Panayi 2001). Insgesamt ist das therapeutische Potential der Zytokinblockade zur Schmerzlinderung noch nicht ausreichend ausgeschöpft worden.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Abraham RT, Ho SN, Barna TJ, McKean DJ. 1987. Transmembrane signalling during interleukin 1-dependent T cell activation. Interactions of signal 1- and signal 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism. *J Biol Chem*, 262(6):2719-2728.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. 2000. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, 100(4):685-688.

Amaya F, Oh-Hashi K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. 2003. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*, 963(1-2):190-196.

Aragay AM, Mellado M, Frade JMR, Martin AM, Jiménez-Sainz MC, Martínez-AC, Mayor F Jr 1998. Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(6):2985-2990.

Arend WP. 2001. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum*, 30(2):1-6.

Arend WP. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol*, 54:167-227.

Arend WP, Dayer J-M. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38(2):151-160.

Arend WP, Dayer J-M. 1990. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 33(3):305-315.

Arend WP, Gabay C. 2000. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res*, 2(4):245-248.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Arend WP, Malyak M, Smith MFJ, Whisenand TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG, Dower SK. 1994. Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol*, 153(10):4766-4774.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest*, 85(5):1694-1697.

Bär K-J, Schaible H-G, Bräuer R, Halbhuber K-J, Segond von Banchet G. 2004. The proportion of TRPV1 protein-positive lumbar DRG neurones does not increase in the course of acute and chronic antigen-induced arthritis in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett*, 361(1-3):172-175.

Baggiolini M, Bretz U, Dewald B, Feigenson ME. 1978. The polymorphonuclear leukocyte. *Agents Actions*, 8(1-2):3-10.

Beutler BA. 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl*, 57:16-21.

Bevan S. 1996. Signal transduction in nociceptive afferent neurons in inflammatory conditions. In: Kumazawa T, Kruger L, Mizumura K, Hrsg. *The polymodal nociceptor – a gateway to pathological pain*. *Prog Brain Res*, 113:201-213.

Boettger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stoeckigt R, Segond von Banchet G, Bräuer R, Schaible H-G. 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum*, 58(8):2368-2378.

Boettger MK, Weber K, Schmidt M, Gajda M, Bräuer R, Schaible H-G. 2009. Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis. *Pain*, 145(1-2):142-150.



## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Bräuer R, Henzgen S, Thoss K, Waldmann G. 1990. Changes of immunoregulatory properties and induction of autoimmune reactivity to cartilage in rabbits with antigen-induced arthritis. *Exp Pathol*, 40(1):35-44.

Bräuer R, Kette H, Henzgen S, Thoss K. 1994. Influence of cyclosporin A on cytokine levels in synovial fluid and serum of rats with antigen-induced arthritis. *Agents Actions*, 41(1-2):96-98.

Brennan FM, Chantry D, Jackson AM, Maini RN, Feldmann M. 1989a. Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun*, 2:177-186.

Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. 1989b. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8657):244-247.

Brennan FM, McInnes IB. 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 118(11):3537-3545.

Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41(12):2196-2204.

Bresnihan B, Cunnane G. 1998. Interleukin-1 receptor antagonist. *Rheum Dis Clin North Am*, 24(3):615-628.

Bron R, Klesse LJ, Shah K, Parada LF, Winter J. 2003. Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci*, 22(1):118-132.

Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP. 1989. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci*, 9(9):3314-3325.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Campbell JN, Meyer RA. 1996. Cutaneous nociceptors. In: Belmonte C, Cervero F, Hrsg. Neurobiology of nociceptors. Erste Aufl. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 117-145.

Carlton SM, Coggeshall RE. 2001. Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett*, 310(1):53-56.

Carter DB, Deibel MRJ, Dunn CJ, Tomich C-SC, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, Harris PKW, Yem AW, Waszak GA, Chosay JG, Sieu LC, Hardee MM, Zurcher-Neely HA, Reardon IM, Heinrikson RL, Truesdell SE, Shelly JA, Eessalu TE, Taylor BM, Tracey DE. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature*, 344(6267):633-638.

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA. 1999. Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7658-7663.

Cesare P, McNaughton P. 1997. Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, 7(4):493-499.

Cesare P, McNaughton P. 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(26):15435-15439.

Chomarath P, Vannier E, Dechanet J, Rissoan MC, Banchereau J, Dinarello CA, Miossec P. 1995. Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 $\beta$  in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol*, 154(3):1432-1439.

Choy EHS, Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 334(12):907-916.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature*, 411(6840):957-962.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J. 1999. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(11):6261-6266.

Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ, Greenwald MW, Block S, Shergy WJ, Hanrahan PS, Kraishi MM, Patel A, Sun G, Bear MB. 2004. A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Ann Rheum Dis*, 63(9):1062-1068.

Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. 1994. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today*, 15(12):562-566.

Copray JCVM, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Küst BM, Liem RSB, Huitinga I, Tilders FJH, Van Dam A-M, Boddeke HWGM. 2001. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol*, 118(2):203-211.

Cortright DN, Szallasi A. 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1: An update. *Eur J Biochem*, 271(10):1814-1819.

Coxon A, Bolon B, Estrada J, Kaufman S, Scully S, Rattan A, Duryea D, Hu YL, Rex K, Pacheco E, Van G, Zack D, Feige U. 2002. Inhibition of interleukin-1 but not tumor necrosis factor suppresses neovascularization in rat models of corneal angiogenesis and adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, 46(10):2604-2612.

Crestani F, Seguy F, Dantzer R. 1991. Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. *Brain Res*, 542(2):330-335.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T. 1994. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester and corticosteroids. *J Clin Invest*, 93(3):1095-1101.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1992. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107(3):660-664.

Cunha JM, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. 2000. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 130(6):1418-1424.

Curtis BM, Widmer MB, deRoos P, Qwarnstrom EE. 1990. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J Immunol*, 144(4):1295-1303.

Dantzer R, Bluthé RM, Kelley KW. 1991. Androgen-dependent vasopressinergic neurotransmission attenuates interleukin-1-induced sickness behavior. *Brain Res*, 557(1-2):115-120.

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(6783):183-187.

Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest*, 77(2):645-648.

Desson SE, Ferguson AV. 2003. Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol*, 550(1):113-122.

Dinarello CA. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *JEM*, 201(9):1355-1359.

Dinarello CA. 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*, 10(4):201-222.

Dinarello CA. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 20(27):1-13.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Dinarello CA. 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*, 16(5-6):457-499.

Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6):2095-2147.

Dinarello CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77(8):1627-1652.

Dinarello CA, Cannon JG, Mier JW, Bernheim HA, LoPreste G, Lynn DL, Love RN, Webb AC, Auron PE, Reuben RC, Rich A, Wolff SM, Putney SD. 1986. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J Clin Invest*, 77(6):1734-1739.

Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. 1992. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neurosci*, 49(3):693-698.

Drevlow BE, Lovis R, Haag MA, Sinacore JM, Jacobs C, Blosche C, Landay A, Moreland LW, Pope RM. 1996. Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(2):257-265.

Dublin P, Hanani M. 2007. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain Behav Immun*, 21(5):592-598.

Eastgate JA, Wood NC, Di Giovine FS, Symons JA, Grinlinton FM, Duff GW. 1988. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8613):706-709.

Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 343(6256):341-346.

Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H. 2007. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(4):884-888.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Escott KJ, Beattie DT, Connor HE, Brain SD. 1995. Trigeminal ganglion stimulation increases facial skin blood flow in the rat: a major role for calcitonin gene-related peptide. *Brain Res*, 669(1):93-99.

Fehrenbacher JC, Burkey TH, Nicol GD, Vasko MR. 2005. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E2 receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells. *Pain*, 113(1-2):113-122.

Feige U, Hu YL, Gasser J, Campagnuolo G, Munyakazi L, Bolon B. 2000. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. *Cell Mol Life Sci*, 57(10):1457-1470.

Ferguson SS. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1):1-24.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. 1988. Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334(6184):698-700.

Ferri CC, Ferguson AV. 2003. Interleukin-1 beta depolarises paraventricular nucleus parvocellular neurones. *J Neuroendocrinol*, 15(2):126-133.

Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ, Arend WP. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37(5):644-652.

Follenfant RL, Nakamura-Craig M, Henderson B, Higgs GA. 1989. Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 beta-induced, prostaglandin-independent hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 98(1):41-43.

Fong KY, Boey ML, Koh WH, Feng PH. 1994. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. *Clin Exp Rheumatol*, 12(1):55-58.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Fukuoka H, Kawatani M, Hisamitsu T, Takeshige C. 1994. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. *Brain Res*, 657(1-2):133-140.

Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. 2002. VR1, but not P2X3, increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain*, 99(1-2):111-120.

Furst DE. 2004. Anakinra: review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther*, 26(12):1960-1975.

Georgilis K, Schaefer C, Dinarello CA, Klempner MS. 1987. Human recombinant interleukin 1 beta has no effect on intracellular calcium or on functional responses of human neutrophils. *J Immunol*, 138(10):3403-3407.

Geyer M, Müller-Ladner U. 2010. Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 22(3):246-251.

Gold MS, Dastmalchi S, Levine JD. 1996. Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat in vitro. *Neurosci*, 71(1):265-275.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. 1995. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*, 270(23):13757-13765.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(19):7611-7615.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440-3450.

Guenther S, Reeh PW, Kress M. 1999. Rises in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitisation of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci*, 11(9):3143-3150.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Handwerker HO. 1999. Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, Schaible H-G. 1993. Acute and chronic phases of unilateral inflammation in rat's ankle are associated with an increase in the proportion of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive dorsal root ganglion cells. *Eur J Neurosci*, 5(2):154-161.

Hazuda DJ, Strickler J, Kueppers F, Simon PL, Young PR. 1990. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem*, 265(11):6318-6322.

Hensellek S, Brell P, Schaible H-G, Bräuer R, Segond von Banchet G. 2007. The cytokine TNF $\alpha$  increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Moll Cell Neurosci*, 36(3):381-391.

Henzgen S, Petrow PK, Thoss K, Bräuer R. 1996. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp Toxicol Pathol*, 48(4):255-263.

Heppelmann B. 1997. Anatomy and histology of joint innervation. *J Peripher Nerv Syst*, 2(1):5-16.

Hingtgen CM, Vasko MR. 1994. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res*, 655(1-2):51-60.

Hingtgen CM, Waite MR, Vasko MR. 1995. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci*, 15(7):5411-5419.

Holzer P. 2004. TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3):231-241.



## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, Iwakura Y, Decker MW, Faltynek C, Sullivan J, Jarvis MF. 2006. Interleukin-1 $\alpha\beta$  gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res*, 167(2):355-364.
- Hopkins SJ, Humphreys M, Jayson MI. 1988. Cytokines in synovial fluid. I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1. *Clin Exp Immunol*, 72(3):422-427.
- Hou L, Li W, Wang X. 2003. Mechanism of interleukin-1 $\beta$ -induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. *J Neurosci Res*, 73(2):188-197.
- Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, Lafyatis R, Duquesnoy B, Degand P. 1993. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Arthritis Rheum*, 36(6):772-80.
- Hyrich KL, Inman RD. 2001. Infectious agents in chronic rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 13(4):300-304.
- Ji R-R, Samad TA, Jin S-X, Schmoll R, Woolf CJ. 2002. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1):57-68.
- Jiménez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, Mayor F Jr, Aragay AM. 2006. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell*, 17(1):25-31.
- Joosten LA, Helsen MMA, Saxne T, van de Loo FAJ, Heinegård D, van den Berg WB. 1999. IL-1 $\alpha\beta$  blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF- $\alpha$  blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol*, 163(9):5049-5055.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Kárai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Oláh Z. 2004. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sensory neurons. *J Biol Chem*, 279(16):16377-16387.

Katz B, Hrsg. 1969. The release of neural transmitter substances. Liverpool: Liverpool University Press.

Kawatani M, Birder L. 1992. Interleukin-1 facilitates Ca<sup>2+</sup> release in acute dissociated dorsal root ganglion (DRG) cells of rat [Abstract]. *Neuroscience*, 18:691.

Kidd BL, Cruwys SC, Garrett NE, Mapp PI, Jolliffe VA, Blake DR. 1995. Neurogenic influences on contralateral responses during experimental rat monoarthritis. *Brain Res*, 688(1-2):72-76.

Kleibeuker W, Ledebuer A, Eijkelkamp N, Watkins LR, Maier SF, Zijlstra J, Heijnen CJ, Kavelaars A. 2007. A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia. *Eur J Neurosci*, 25(6):1696-1704.

Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Sommer C, Stoll G. 2005. Contralateral cytokine gene induction after peripheral nerve lesions: dependence on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *Brain Res Mol Brain Res*, 136(1-2):23-28.

Kostyuk PG. 1989. Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience*, 28(2):253-261.

Kostyuk P, Verkhratsky A. 1994. Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*, 63(2):381-404.

Kress M, Guenther S. 1999. The role of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in the ATP-induced heat sensitisation process of rat nociceptive neurons. *J Neurophysiol*, 81(6):2612-2619.

Kress M, Reeh PW. 1996. More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(26):14995-14997.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Kress M, Reeh PW, Vyklicky L. 1997. An interaction of inflammatory mediators and protons in small diameter dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett*, 224(1):37-40.

Kuiper S, Joosten LA, Bendele AM, Edwards CK 3rd, Arntz OJ, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. 1998. Different roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis. *Cytokine*, 10(9):690-702.

Kumazawa T. 1996. Sensitization of polymodal receptors. In: Belmonte C, Cervero F, Hrsg. *Neurobiology of nociceptors*. Erste Aufl. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 325-345.

Kuno K, Matsushima K. 1994. The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol*, 56(5):542-547.

Lee DM, Weinblatt ME. 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 358(9285):903-911.

Lee H-L, Lee K-M, Son S-J, Hwang S-H, Cho H-J. 2004. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport*, 15(18):2807-2811.

Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. 1984. Intra-neuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science*, 226(4674):547-549.

Li M, Shi J, Tang J, Chen D, Ai B, Chen J, Wang L, Cao F, Li L, Lin C, Guan X. 2005. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1 $\beta$  and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. *Acta Pharm Sinica*, 26(2):192-198.

Lindsay RM, Harmar AJ. 1989. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*, 337(6205):362-364.

Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J. 1989. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience*, 33(1):53-65.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Linhart O, Obreja O, Kress M. 2003. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neurosci*, 118(1):69-74.

Llinás RR. 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242(4886):1654-1664.

Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. 1992. Distribution and functional significance of the P-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci*, 15(9):351-355.

Lombardi MS, Kavelaars A, Heijnen CJ. 2002. Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. *Crit Rev Immunol*, 22(2):141-163.

Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JWJ, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ. 1999. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*, 13(6):715-725.

Lopshire JC, Nicol GD. 1998. The camp transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci*, 18(16):6081-6092.

Lubberts E, van den Berg WB. 2003. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Adv Exp Med Biol*, 520:194-202.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 2002. The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115(3):455-465.

Marty A. 1989. The physiological role of calcium dependent channels. *Trends Neurosci*, 12(11):420-424.

Mentzel K, Bräuer R. 1998. Matrix metalloproteinases, IL-6, and nitric oxide in rat antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 16(3):269-276.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Mertens M, Singh JA. 2009. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*, 36(6):1118-1125.

Meßlinger K. 1997. Was ist ein Nozizeptor? *Schmerz*, 11(5):353-366.

Miller RJ. 1991. The control of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Prog Neurobiol*, 37(3):255-285.

Milligan E, Zapata V, Schoeniger D, Chacur M, Green P, Poole S, Martin D, Maier SF, Watkins LR. 2005. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci*, 22(11):2775-2782.

Mizutani H, Black R, Kupper TS. 1991a. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest*, 87(3):1066-1071.

Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. 1991b. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med*, 174(4):821-825.

Mohapatra DP, Nau C. 2005. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by Calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 280(14):13424-13432.

Mohapatra DP, Nau C. 2003. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 278(50):50080-50090.

Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Carcía-Sanz N, Ferrer-Montiel A. 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*, 279(24):25665-25672.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Morioka N, Inoue A, Hanada T, Kumagai K, Takeda K, Ikoma K, Hide I, Tamura Y, Shiomi H, Dohi T, Nakata Y. 2002a. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology*, 43(5):868-876.
- Morioka N, Takeda K, Kumagai K, Hanada T, Ikoma K, Hide I, Inoue A, Nakata Y. 2002b. Interleukin-1 $\beta$ -induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzymes: secretory type IIA and cytosolic type IV. *J Neurochem*, 80(6):989-997.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain*, 1:3.
- Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 9(4):246-258.
- Mutschler E, Schaible H-G, Vaupel MA. 2007. *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Sechste Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 706-720.
- Nagy I, Sántha P, Jancsó G, Urbán L. 2004. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3):351-369.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. Erste Aufl. München, Jena: Urban & Fischer-Verlag.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C $\epsilon$  and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*, 277(16):13375-13378.
- 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 J*, 16(12):1497-1503.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Oelzner P, Kunze A, Henzgen S, Thoss K, Hein G, Stein G, Bräuer R. 2000. High-dose clodronate therapy prevents joint destruction in chronic antigen-induced arthritis of the rat but inhibits bone formation at the axial skeleton. *Inflamm Res*, 49(8):424-433.

O'Neill LAJ. 1995. Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1. *Biochim Biophys Acta*, 1266(1):31-44.

O'Neill LAJ, Bird TA, Saklatvala J. 1990. Interleukin-1 signal transduction. *Immunol Today*, 11:392-394.

Oprée A, Kress M. 2000. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci*, 20(16):6289-6293.

Özaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, Cavanaugh JM, Asik I, DeLeo JA, Weinstein, JN. 2006. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J*, 15(10):1529-1537.

Patterson PH. 1995. Cytokines in Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurobiol*, 5(5):642-646.

Perkins MN, Kelly D. 1994. Interleukin-1 $\beta$  induced-desArg<sup>9</sup>bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology*, 33(5):657-660.

Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. 1986. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(22):8749-8753.

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, 67:653-692.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Pohlers D, Siegling A, Buchner E, Schmidt-Weber CB, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Bräuer R, Kinne RW. 2005. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Therapy*, 7(3):445-457.

Pollock J, McFarlane SM, Connell MC, Zehavi U, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Scott RH. 2002. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* 42(1):93-106.

Premkumar LS, Ahern GP. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408(6815):985-990.

Rathee PK, Distler C, Neuhuber W, Wang GK, Wang S-Y, Nau C, Kress M. 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signalling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*, 22(11):4740-4745.

Rosoff PM. 1989. Characterization of the interleukin-1 stimulated phospholipase C activity in human T lymphocytes. *Lymphokine Res*, 8(4):407-413.

Rosoff PM, Savage N, Dinarello CA. 1988. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell*, 54(1):73-81.

Rothwell NJ. 1991. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci*, 12(11):430-436.

Rothwell NJ, Hopkins SJ. 1995. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci*, 18(3):130-136.

Rubbert-Roth A, Perniok A. 2003. Der Interleukin-1-Rezeptorantagonist Anakinra (Kineret®) in der Behandlung mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol*, 62(4):367-377.



## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Russell FA, Fernandes ES, Keeble JE, Brain SD. 2009. Tumor necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. *Pain*, 142(3):264-274.

Russo CM, Brose WG. 1998. Chronic pain. *Annu Rev Med*, 49:123-133.

Sachs D, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. 2002. Tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*, 96(1-2):89-97.

Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. 1995. Contribution of interleukin-1 $\beta$  to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 115(7):1265-1275.

Schaible H-G. 2007. Pathophysiologie des Schmerzes. *Orthopäde*, 36(1):8-16.

Schaible H-G, Grubb BD. 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55(1):5-54.

Schaible H-G, Richter F, Ebersberger A, Boettger MK, Vanegas H, Natura G, Vazquez E, Segond von Banchet G. 2009. Joint pain. *Exp Brain Res*, 196(1):153-162.

Schaible H-G, Schmidt RF. 2005. Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. 29. Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 317-333.

Schaible H-G, Schmidt RF. 1996. Neurobiology of articular nociceptors. In: Belmonte C, Cervero F, Hrsg. *Neurobiology of nociceptors*. Erste Aufl. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 202-219.

Schaible H-G, Vanegas H. 2000. How do we manage chronic pain? *Baillière's Clin Rheumatol*, 14(4):797-811.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Schönbeck U, Mach F, Libby P. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 161(7):3340-3346.

Schütze S, Machleidt T, Krönke M. 1994. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol*, 56(5):533-541.

Schultzberg M, Svenson SB, Uden A, Bartfai T. 1987. Interleukin-1-like immunoreactivity in peripheral tissues. *J Neurosci Res*, 18(1):184-189.

Schurigt U, Stopfel N, Hüchel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Bräuer R. 2005. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(1):174-188.

Schweizer A, Feige U, Fontana A, Müller K, Dinarello CA. 1988. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions*, 25(3-4):246-251.

Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Bräuer R, Schaible H-G. 2009. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain*, 145(1-2):151-159.

Segond von Banchet G, Fischer N, Uhlig B, Hensellek S, Eitner A, Schaible H-G. 2011. Molecular effects of interleukin-1 $\beta$  on dorsal root ganglion neurons: Prevention of ligand-induced internalization of the bradykinin 2 receptor and downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Neurosci*, 46(1):262-271.

Segond von Banchet G, Petrow PK, Bräuer R, Schaible H-G. 2000. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res*, 2(5):424-427.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK. 1993. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(13):6155-6159.

Sims JE, Giri JG, Dower SK. 1994. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol*, 72(1):9-14.

Smith SJ, Augustine GJ. 1988. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci*, 11(10):458-464.

Sommer C. 2001. Zytokine bei neuropathischen Schmerzen. *Anästhesist*, 50(6):416-426.

Sommer C, Petrausch S, Lindenlaub T, Toyka KV. 1999. Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett*, 270(1):25-28.

Sung C-S, Wen Z-H, Chang W-K, Ho S-T, Tsai S-K, Chang Y-C, Wong C-S. 2004. Intrathecal interleukin-1 $\beta$  administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res*, 1015(1-2):145-153.

Sung C-S, Wong C-S. 2007. Cellular mechanisms of neuroinflammatory pain: the role of interleukin-1beta. *Acta Anaesthesiol Taiwan*, 45(2):103-109.

Szallasi A. 2002. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am J Clin Pathol*, 118(1):110-121.

Szallasi A, Blumberg PM. 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51(2):159-211.

Szekely AM, Costa E, Gayson DR. 1990. Transcriptional program coordination by N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptor stimulation in primary cultures of cerebellar neurons. *Mol Pharmacol*, 38(5):624-633.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, Nasu M, Takahashi M, Kitagawa J, Matsumoto S. 2007. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*, 129(1-2):155-166.

Thoss K, Henzgen S, Petrow PK, Katenkamp D, Bräuer R. 1996. Immunomodulation of rat antigen-induced arthritis by leflunomide alone and in combination with cyclosporin A. *Inflamm Res*, 45(2):103-107.

Tohda C, Sasaki M, Konemura T, Sasamura T, Itoh M, Kuraishi Y. 2001. Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. *J Neurochem*, 76(6):1628-1635.

Trabandt A, Gay RE, Fassbender HG, Gay S. 1991. Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34(11):1444-1451.

van den Berg WB. 2000. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 59:81-84.

van den Berg WB, Bresnihan B. 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillières Best Pract Res Clin Rheumatol*, 13(4):577-597.

van den Berg WB, Joosten LAB, Kollias G, van de Loo FAJ. 1999. Role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1 $\beta$  in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis*, 58:40-48.

van Lent PLEM, van de Loo FAJ, Holthuysen AEM, van den Bersselaar LAM, Vermeer H, van den Berg WB. 1995. Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J Rheumatol*, 22(12):2250-2258.

Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ. 1994. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci*, 14(8):4987-4997.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*, 534(3):813-825.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther*, 112(1):116-138.

Vroon A, Heijnen CJ, Lombardi MS, Cobelens PM, Mayor F Jr, Caron MG, Kavelaars A. 2004. Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J Leukoc Biol*, 75(5):901-909.

Vyklický L, Knotková-Urbancová H. 1996. Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res*, 45(1):1-9.

Vyklický L, Knotková-Urbancová H, Vitásková Z, Vlachová V, Kress M, Reeh PW. 1998. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol*, 79(2):670-676.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. 1991. *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, 87(6):1925-1935.

Watanabe N, Kobayashi Y. 1994. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. *Cytokine*, 6(6):597-601.

Watkins LR, Maier SF. 1999. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7710-7713.

Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF. 1994. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654(1):15-26.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. 1999. Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7635-7639.

Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU. 1997. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1 induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem*, 272(12):7727-7731.

Wolf G, Gabay E, Tal M, Yirmiya R, Shavit Y. 2006. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain*, 120(3):315-324.

Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. 1997. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Br J Pharmacol*, 121(3):417-424.

Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. 1994. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*, 62(2):327-331.

Ye K, Koch KC, Clark BD, Dinarello CA. 1992. Interleukin-1 down-regulates gene and surface expression of interleukin-1 receptor type I by destabilizing its mRNA whereas interleukin-2 increases its expression. *Immunology*, 75(3):427-434.

Zacharová G, Paleček J. 2009. Parvalbumin and TRPV1 receptor expression in dorsal root ganglion neurons after acute peripheral inflammation. *Physiol Res*, 58(2):305-309.

Zangger P, Keystone EC, Bogoch ER. 2005. Asymmetry of small joint involvement in rheumatoid arthritis: prevalence and tendency towards symmetry over time. *Joint Bone Spine*, 72(3):241-247.

Zhou Y, Li G-D, Zhao Z-Q. 2003. State-dependent phosphorylation of  $\epsilon$ -isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. *J Neurochem*, 85(3):571-580.

## 7 Anhang

### Lebenslauf

<b>Name:</b>	Benjamin Uhlig
<b>Geburtsdatum:</b>	04.12.1982 Gera, Deutschland
1989 - 1991	3. POS Gera (Friedrich-Schiller-Oberschule)
1991 - 1993	10. Grundschule Gera (Bergschule)
1993 - 2001	Goethe-Gymnasium/Rutheneum seit 1608 Gera
Juni 2001	Abitur
2001 - 2002	Zivildienst
2002 - 2009	Studium der Humanmedizin (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2004	Ärztliche Vorprüfung
2009	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
18.05.2009	Approbation
seit 01.10.2009	Assistenzarzt, Klinik für Augenheilkunde Städtisches Klinikum Dessau
Dessau, 03.07.2012	Benjamin Uhlig

## Publikationen

Segond von Banchet G, Fischer N, Uhlig B, Hensellek S, Eitner A, Schaible H-G. 2011. Molecular effects of interleukin-1 $\beta$  on dorsal root ganglion neurons: Prevention of ligand-induced internalization of the bradykinin 2 receptor and downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Neurosci*, 46(1):262-271.

Segond von Banchet G, Uhlig B, Schaible H-G. 2008. The cytokine IL-1 $\beta$  and its receptor IL-1R1 in dorsal root ganglia (DRG) of the rat. *Acta Physiol*, 191(663):OM1-2-5.

Segond von Banchet G, Brell P, Uhlig B, Brauer R, Schaible H-G. 2006. The cytokine TNF $\alpha$  can increase the expression of the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor. *Acta Physiol*, 186(650):PM02P-2.



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologie 1 der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-G. Schaible angefertigt. Ihm danke ich, dass ich dieses interessante und für die Grundlagenforschung wichtige Thema bearbeiten durfte und mir alle Arbeitsmittel zur Verfügung gestellt wurden. Weiterhin möchte ich ihm meinen Dank für sein persönliches Engagement und seine konstruktive Kritik an meiner Arbeit aussprechen.

Dem Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V., dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) und der Ernst-Abbe-Stiftung möchte ich für die erhebliche finanzielle Unterstützung meiner Promotion durch die Vergabe des Ernst-Abbe-Stipendiums danken.

Von ganzem Herzen möchte ich Frau PD Dr. G. Segond von Banchet danken. Sie hat wesentlichen Anteil am Entstehen dieser Arbeit gehabt, indem sie mich bei den experimentellen Arbeiten hervorragend betreute. Auch unterstützte sie mich bei der Lösung von Problemen durch ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ihr kontinuierliches Interesse am Fortgang meiner Arbeit hat mich ermuntert.

Für die gewissenhafte und zuverlässige Assistenz bei den experimentellen Arbeiten danke ich besonders Frau Antje Wallner. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physiologie 1 möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Bräuer vom Institut für Pathologie des Klinikums der FSU Jena danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern besonderen Dank aussprechen, die den Fortgang meiner Arbeit stets mit Interesse verfolgt und mich geduldig und großzügig unterstützt haben.

Abschließend möchte ich meiner Ehefrau Christiane danken, die mich stets hilfreich beraten hat und mir mit Rat und Tat geduldig zur Seite stand.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigene Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. H.-G. Schaible, Frau PD Dr. G. Segond von Banchet,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Benjamin Uhlig, Verfasser