

**Ein zelluläres Entzündungsmodell zur Untersuchung  
Chlorid-abhängiger Sensibilisierungsprozesse in  
Schmerzzellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

**vorgelegt von  
Diplom Biologin Katharina Lehmeier-Funk,  
Juli 2009**



**Ein zelluläres Entzündungsmodell zur Untersuchung  
Chlorid-abhängiger Sensibilisierungsprozesse in  
Schmerzzellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom Biologin Katharina Lehmeyer-Funk,  
geb. Funk  
Juli 2009

**Ein zelluläres Entzündungsmodell zur Untersuchung  
Chlorid-abhängiger Sensibilisierungsprozesse in  
Schmerzzellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

**vorgelegt von  
Diplom Biologin Katharina Lehmeier-Funk,  
geb. Funk  
aus Bad Dürkheim**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

Die Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in der Zeit von September 2006 bis Juli 2009 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stephan Frings angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Stephan Frings

Prof. Dr. med. Thomas Kuner

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss der Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg, den

Katharina Lehmeyer-Funk, geb. Funk

Bereits veröffentlichte Publikationen:

Gilbert,D.; Funk,K.; Dekowski,B.; Lechler,R.; Keller,S.; Mohrlen,F.; Frings,S.; Hagen,V. (2007); Caged capsaicins: New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons; Chembiochem.; 8 (1): 89 – 97

Veröffentlichte Teilpublikationen:

Gilbert,D.; Franjic-Wurtz,C.; Funk,K.; Gensch,T.; Frings,S.; Mohrlen,F. (2007); Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system; Int. J. Dev. Neurosci.; 25 (7): 479 – 98

Funk,K.; Woitecki,A.; Franjic-Wurtz,C.; Gensch,T.; Mohrlen,F.; Frings,S. (2008); Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal root ganglion neurons; Mol. Pain; 12 (4): 32

## **Danksagung**

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Physiologie des Instituts für Zoologie, die mir geholfen, mich ermutigt und unterstützt, meine guten und schlechten Launen ertragen haben und mir wie eine zweite Familie waren.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. Stephan Frings für die Überlassung dieses interessanten Themas. Die Freiheit in der Bearbeitung, die Möglichkeit zur Eigeninitiative und die konstruktiven Gespräche zur Überwindung vieler Hürden, haben mir die Ausdauer und den Ehrgeiz gegeben diese Arbeit anzufertigen.

Prof. Dr. med. Thomas Kuner für die Begutachtung und das Interesse an meiner Arbeit. Die angeregten Diskussionen unserer Treffen haben mir die kritische Betrachtung meiner Arbeit aus anderen Blickwinkeln ermöglicht und zu vielen neuen experimentellen Ideen beigetragen.

Dr. Thomas Gensch vom Forschungszentrum Jülich für seine Geduld, Anleitung und Unterstützung bei den Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen, sowie die unterhaltsamen Gespräche zur Bewältigung der langen Messtage.

Diplom Biologe Thomas Hengl für seine außerordentliche Geduld und Mühe in der Korrektur meiner Arbeit.

Meiner Familie für stete Unterstützung und die Ermunterung nicht aufzugeben.

Meinem Mann, Christoph, einfach für alles. Besonders jedoch, dass auch er sich durch meine Arbeit gequält und mir mit den Korrekturen geholfen hat.





## Zusammenfassung

Die Kenntnis über die Mechanismen der Schmerzverarbeitung und ihre Veränderung durch Entzündungen spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer, spezifischer Schmerzmedikamente. Schmerzreize werden von den Fasern spezialisierter Nervenzellen des peripheren Nervensystems, den Nozizeptoren, im Gewebe, den Organen und den Muskeln detektiert. Ihre Zellkörper liegen in den Spinalganglien. Die Nozizeptoren selbst stellen somit die erste Verarbeitungsstelle für Schmerzreize dar. Die Erforschung der Beeinflussung ihrer Signaltransduktion durch Entzündungsmediatoren stand deshalb im Mittelpunkt dieser Arbeit. In *in vivo* Modellen vergehen Tage bis zur Manifestation einer Entzündung. Hier ist es gelungen ein neues Modell auf zellulärer Basis zu entwickeln, das die Induzierung einer Entzündung innerhalb weniger Stunden ermöglicht und sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* angewendet werden kann. Das hier etablierte *ex vivo* Entzündungsmodell verwendet die Entzündungsmediatoren Bradykinin, ATP, NGF und Prostaglandin E<sub>2</sub>. Die Entzündungsmediatoren führen zu einer erhöhten Expression der Entzündungsmarker *Substance P* und CGRP. Diese Expressionssteigerung wird auch in den *in vivo* Modellen beobachtet und dort als Nachweis für die Manifestation der Entzündung eingesetzt. Es ist zudem gelungen, den Einfluss der Entzündungsmediatoren auf verschiedene Transduktionskanäle nachzuweisen. Sie erhöhen *ex vivo* die Expression der Kanäle TRPV1, Gleichzeitig konnte auch eine Reduzierung der Desensitivierung des TRPV1-Kanals.

Ein in Spinalganglien noch weitgehend unerforschter Aspekt der Signaltransduktion ist die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration. Diese wurde in funktionellen Studien und Expressionsanalysen untersucht. Entzündungsmediatoren führen hier über eine gesteigerte Chloridakkumulation zu erhöhten intrazellulären Chloridkonzentrationen in den Spinalganglienzellen. Der Anstieg in der Chloridakkumulation wird dabei über eine verstärkte Aktivität und Expression von NKCC1, dem Chloridimporter und die gleichzeitige Reduzierung der KCC2-Expression (Chloridexporter), vermittelt.

In ersten Versuchen wurden auch Calcium-aktivierte Chloridströme untersucht, die möglicherweise durch den TMEM16A-Kanal vermittelt werden. Die Aktivierung von TRPV1 führt zu Chlorideinströmen und Chloridausströmen in Spinalganglienneuronen. Die Chlorideinströme wurden dabei durch die Behandlung mit den Entzündungsmediatoren verringert. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Bedeutung von Chlorid in den Nozizeptoren zu klären.

## Abstract

The knowledge about the mechanisms behind the transduction of pain signals and their modification by inflammatory processes is important for the development of new specific drugs.

Fibers of specialized neurons of the peripheral nervous system, so called nociceptors, detect painful stimuli in skin, organs and muscles. The signal is transduced to the cell body in the dorsal root ganglion. Hence nociceptors are the first site for signal processing, and the investigation of inflammation induced impact on their signal transduction was the focus of this work.

*In vivo*, it takes days to manifest an inflammation. In this work a new inflammation model on cellular basis was established, which induces an inflammation already after some hours. The model can be used *ex vivo* and *in vitro*. The applied inflammation mediators, ATP, NGF, bradykinin and PGE<sub>2</sub> enhance the expression of substance P and CGRP, which are commonly used as inflammation markers. Enhanced expression of these markers is also *in vivo* taken as evidence for the manifestation of an inflammation. Additionally, the influence on the expression of different transduction channels was investigated. *Ex vivo*, the inflammation mediators amplify the expression of TRPV1, TRPV2 and ASIC3. *In vitro*, a reduction in TRPV1-desensitisation was observed after the incubation with inflammation mediators.

A new and sparsely investigated aspect of signal transduction in nociceptors is the regulation of the intracellular chloride concentration. In this work inflammation mediators induced a rise in the intracellular chloride concentration in DRG-neurons. This rise is mediated by enhanced expression and potentiated activity of NKCC1 (chloride importer) and reduced KCC2 expression (chloride exporter). First investigations show that DRG neurons use chloride in their signal transduction and produce chloride currents after the activation of the transduction channel TRPV1. Inward currents are reduced after the incubation with inflammation mediators, while outward currents stay unaffected. These currents are possibly mediated by TMEM16A, a calcium-activated chloride channel. But these results can only be taken as first indications for the importance of chloride in the signal transduction of pain cells.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Aktivierung von Schmerzzellen .....	2
1.2	Transduktionskanäle – Detektion des Schmerzsignals .....	2
1.2.1	Der TRPV1-Kanal .....	5
1.2.2	Weitere TRPV-Kanäle .....	6
1.2.3	Der ASIC3-Kanal ( <i>Asic sensing ion channel 3</i> ) .....	6
1.2.4	Der P2X <sub>3</sub> -Kanal .....	7
1.3	Chlorid – Erregung oder Inhibition .....	8
1.3.1	GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren und Calcium aktivierte Chloridkanäle in Spinalganglienneuronen .....	9
1.3.2	NKCC1 und KCC2 regulieren die intrazelluläre Chloridkonzentration .....	10
1.4	Das <i>ex vivo</i> Entzündungsmodell .....	13
1.5	Ziel der Arbeit .....	14
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Spinalganglienpräparation .....	16
2.2	Primärkultur .....	17
2.3	Vitalitätstests .....	19
2.3.1	Lebendgewebeschnitte .....	19
2.3.2	Prinzip der Vitalitätstests .....	19
2.3.3	Bilddokumentation .....	20
2.4	Immunhistochemie .....	20
2.4.1	Fixierung und Schneiden von Spinalganglien .....	20
2.4.2	Immunhistochemische Färbung .....	21
2.4.3	Spezifität der Antikörper .....	23
2.4.4	Datenanalyse .....	25
2.4.5	TMEM16A – Färbung .....	26
2.4.6	Bilddokumentation .....	27
2.5	Calcium Imaging Experimente .....	28
2.5.1	Vorbereitung der Zellen .....	28
2.5.2	Direkte Stimulation mit Entzündungsmediatoren .....	29
2.5.3	Aktivierung von Transduktionskanälen vor und nach der Behandlung mit Entzündungsmediatoren .....	29

2.5.4	Auswertung .....	30
2.6	Chloridimaging Experimente .....	31
2.6.1	Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging-Mikroskopie (2P-FLIM) ...	31
2.6.2	Experimente zur Chloridhomöostase in Spinalganglienzellen.....	33
2.6.3	Chloridsignale nach Capsaicinstimulierung.....	35
2.6.4	Datenanalyse .....	36
2.7	Lösungen .....	38
3	Ergebnisse .....	42
3.1	Etablierung des <i>ex vivo</i> Entzündungsmodells .....	42
3.1.1	Spinalganglienzellen exprimieren funktionelle Rezeptoren für Entzündungsmediatoren .....	42
3.1.2	Spinalganglienzellen überleben die Behandlung mit Entzündungsmediatoren	45
3.1.3	Die Reaktion auf die Behandlung mit Entzündungsmediatoren ist vergleichbar mit physiologischen Entzündungsreaktionen.....	46
3.2	Beeinflussung der Expression von Transduktionskanälen durch Entzündungsmediatoren .....	48
3.3	Entzündungsmediatoren reduzieren die Desensitivierung des TRPV1-Kanals in der Primärkultur .....	55
3.4	Die Chloridhomöostase wird durch Entzündungsmediatoren beeinflusst .....	59
3.4.1	Die intrazelluläre Chloridkonzentration wird durch Entzündungsmediatoren erhöht	59
3.4.2	Die Chloridhomöostase wird durch NKCC1 und KCC2 reguliert.....	61
3.5	Phosphorylierung von NKCC1 als schnelle Reaktion auf Entzündungsmediatoren	65
3.6	Spinalganglienzellen exprimieren den Chloridkanal TMEM16A .....	67
3.7	Erste Versuche zu Capsaicin-induzierten Chloridströmen in Spinalganglienzellen	68
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	74
4	Diskussion .....	76
4.1	Ein <i>ex vivo</i> Entzündungsmodell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Spinalganglienzellen und Entzündungsmediatoren .....	76
4.2	Entzündungsmediatoren steigern die Expression von TRPV1, TRPV2 und ASIC3	77
4.3	Entzündungsmediatoren reduzieren die Desensitivierung von TRPV1 .....	78
4.4	Entzündungsmediatoren führen zu einem Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration.....	79
4.5	Mechanismen zur Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration .....	80

4.6	Capsaicin induziert Chloridströme in Zellen intakter Spinalganglien .....	81
4.7	Entzündungsmediatoren beeinflussen Chloridströme in Zellen intakter Spinalganglien.....	83
4.8	Ausblick .....	85
5	Abkürzungsverzeichnis .....	86
6	Referenzen.....	88

# 1 Einleitung

Die Entwicklung neuer, spezifischer Schmerzmedikamente mit möglichst wenigen Nebenwirkungen ist ein Ziel der Schmerzforschung. Hierfür ist es wichtig, die grundlegenden Mechanismen der Schmerztransduktion und ihrer Veränderung durch Entzündungen und Nervenverletzungen zu kennen.

Entzündungen sind Schutzreaktionen des Körpers vor gewebeschädigenden Reizen (Strahlung, Hitze, Toxine, Säure) oder Infektionen durch Viren, Bakterien und Parasiten. Unterstützt wird die Schutzfunktion durch eine verstärkte Schmerzwahrnehmung (Hyperalgesie), die aus der Aktivierung und Sensibilisierung von Schmerzzellen (Nozizeptoren) resultiert (Abb. 1.1). Nozizeptoren sind auf die Wahrnehmung von Schmerzsignalen spezialisiert und werden durch Mediatoren, die in einer Entzündung freigesetzt werden, direkt aktiviert und gegenüber Schmerzreizen sensibilisiert (Almeida et al., 2004; Schaible, 2007). Die Sensibilisierung erfolgt über die Modulation von Transduktionsmechanismen, die für die Weiterleitung eines Signals zum Gehirn verantwortlich sind. Entzündungsmediatoren erhöhen in der Signaltransduktion der Nozizeptoren einerseits die Aktivität von Transduktionskanälen, die die Schmerzreize detektieren (Cadiou et al., 2007; Kress et al., 1997; Ma und Quirion, 2007; Mohapatra und Nau, 2003; Xu und Huang, 2002). Gleichzeitig wird auch der Schwellenwert spannungsgesteuerter Natriumkanäle gesenkt (Binshtok et al., 2008; Ma und Quirion, 2007; Wang et al., 2006; Woolf und Costigan, 1999) und die Chloridkonzentration in der Zelle beeinflusst (Price et al., 2009; Rocha-Gonzalez et al., 2008), so dass die Schwelle zur Übermittlung eines Reizes an das Rückenmark in Form von Aktionspotentialen schneller überschritten wird.

Die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und den Schmerzzellen, die den Zustand des Körpers an das Gehirn weiterleiten, werden streng kontrolliert (Schaible, 2007; Thacker et al., 2007). Sind die Regulationsmechanismen gestört, kann dies zu chronischen Entzündungen führen, die mit Krankheiten wie rheumatoide Arthritis, Autoimmunerkrankungen oder Asthma assoziiert sind (Bulling et al., 2001; Cevikbas et al., 2007; Dray, 1995; Serhan und Savill, 2005). Die direkte Regulation der Nozizeptoraktivität durch Entzündungsmediatoren macht die Untersuchung der Signaltransduktion in Schmerzzellen deshalb zu einem wichtigen Thema der Schmerzforschung auf der Suche nach neuen Zielen für die Entwicklung von Schmerzmedikamenten.

## 1.1 Aktivierung von Schmerzzellen

Schmerzhafte, potenziell gewebeschädigende Reize (Noxen) aus der Haut, den Organen und den Muskeln werden von den freien Nervenendigungen der Schmerzstellen detektiert. Sie leiten das Signal über schnelle A $\delta$ -Fasern und langsame C-Fasern zum Zellkörper des Nozizeptors weiter. Damit wird eine zeitliche Differenzierung in der Schmerzempfindung geschaffen. A $\delta$ -Fasern vermitteln den ersten, akuten Schmerz, während C-Fasern für ein später einsetzendes und langandauerndes Schmerzempfinden verantwortlich sind (Julius und Basbaum, 2001; Scholz und Woolf, 2002).

Die Spinalganglien (DRG = *dorsal root ganglia*) liegen zu beiden Seiten des Rückenmarks und enthalten die Zellkörper der Nozizeptoren, sowie die anderer somatosensorischer Neurone. Die Neurone besitzen unterschiedliche Funktionen und Größen (20-70  $\mu\text{m}$ ). Sie werden von Satellitenzellen umhüllt, deren Aufgaben denen der Gliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) ähneln (Geuna et al., 1998; Tandrup, 2004). Überschreitet das Signal den Schwellenwert zur Generierung von Aktionspotentialen, wird es über das Rückenmark zum Gehirn weitergeleitet, und es kommt zu bewussten Schmerzempfindung (Messlinger, 1997; Schaible, 2007). Die Aktivierung der Nozizeptoren kann jedoch auch zu einer retrograden Signalleitung zurück zum Gewebe führen. Sie wird zur Modulation des Schmerzsignals an den freien Nervenendigungen der Nozizeptoren eingesetzt (Massaad et al., 2004; Schaible, 2007).

## 1.2 Transduktionskanäle – Detektion des Schmerzsignals

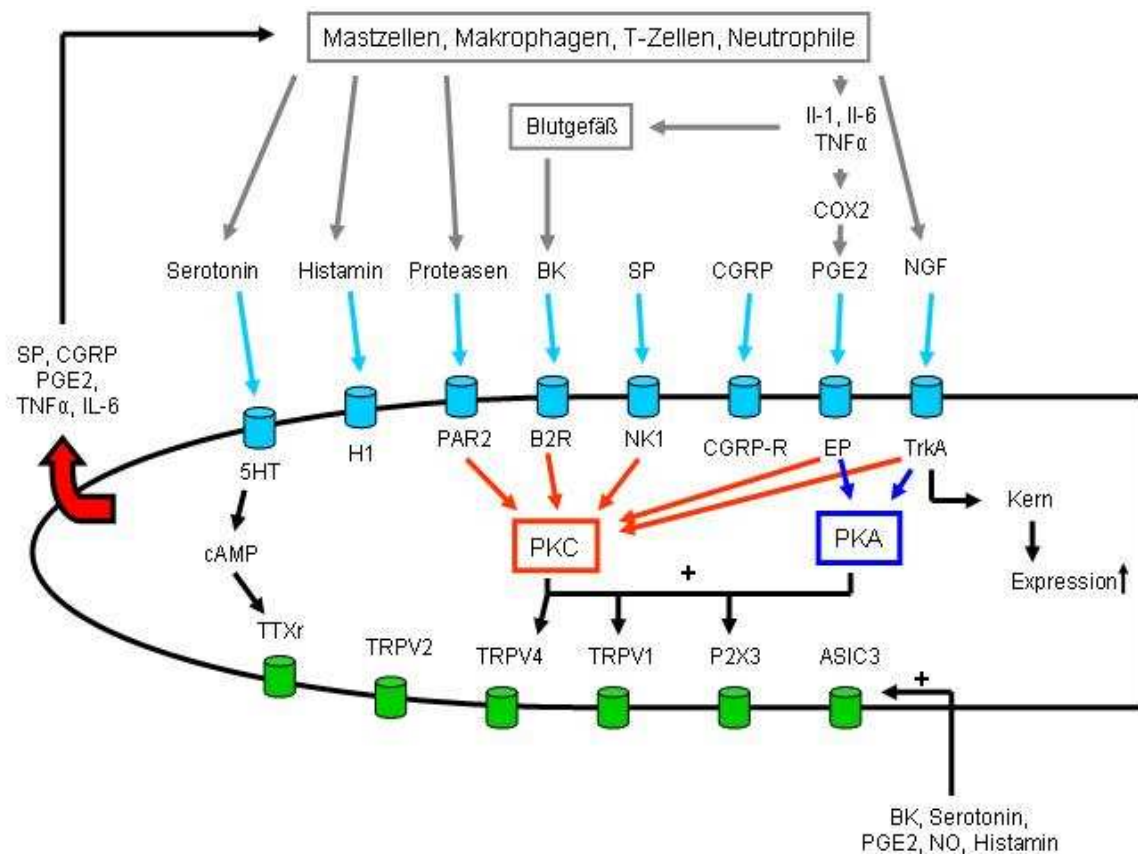
In der Schmerztransduktion beginnt alles mit der Detektion von Schmerzreizen durch die Transduktionskanäle. Diese werden in der Membran der Nozizeptoren exprimiert und durch thermische, chemische oder mechanische Reize aktiviert. Die Expression dieser Kanäle bestimmt so darüber, auf welche Schmerzreize ein Nozizeptor reagiert. Es gibt Transduktionskanäle, welche durch eine bestimmte Reizart aktiviert werden (monomodal), andere dagegen werden sowohl durch thermische als auch durch chemische oder mechanische Reize geöffnet und gelten deshalb als polymodal (Caterina und Julius, 2001; Schaible, 2007; Suzuki et al., 2003).

Die erste Prozessierung des Schmerzreizes findet also durch die Transduktionskanäle in den Nozizeptoren statt. Der Aktivitätszustand dieser Kanäle ist dabei entscheidend, da er über die Detektion eines Signals bestimmt. Entzündungsmediatoren, die in einer Entzündung von Immunzellen, verletzten Zellen und Nozizeptoren selbst freigesetzt werden, senken über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden den Schwellenwert der Transduktionskanäle und erhöhen somit deren Aktivität (Abb. 1.1) (Binshtok et al., 2008; Dray, 1995; Haddad, 2007; Ma et al., 2006; Schaible, 2007; Scholz und Woolf, 2002). Zu den Entzündungsmediatoren zählen Histamin, Serotonin, Cytokine (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), Proteasen, *Nerve Growth Factor* (NGF), Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Adenosin Triphosphat (ATP) und Bradykinin (BK). Sie können Nozizeptoren durch die Bindung an ihre Rezeptoren direkt aktivieren oder sie sensibilisieren. Gleichzeitig werden auch die Immunzellen durch die Mediatoren aktiviert und zur weiteren Ausschüttung dieser Moleküle angeregt (Moalem und Tracey, 2006; Thacker et al., 2007; Zhang und An, 2007).

Die retrograde Signalleitung führt nach Aktivierung der Schmerzzellen zur Freisetzung der Neuropeptide *Substance P* (SP) und *Calcitonin Gene related Peptide* (CGRP) (Massaad et al., 2004; Schaible, 2007) an der Synapse im Hinterhorn und im peripheren Gewebe. Im Gewebe stimulieren die Neuropeptide Immunzellen zur weiteren Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und führen zu einer erleichterten Invasion der Immunzellen ins Gewebe, ausgelöst durch eine Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Abb.1.1). Gleichzeitig aktivieren und sensibilisieren sie über eine positive Rückkopplungsreaktion die freien Nervenendigungen der Nozizeptoren (Harrison und Geppetti, 2001; Li et al., 2008; Lin et al., 2007; Roosterman et al., 2006; Tang et al., 2008). Da SP und CGRP in einer Entzündung verstärkt exprimiert und sekretiert werden, gelten sie als Entzündungsmarker (Bulling et al., 2001; Kuniyoshi et al., 2007; Staton et al., 2007).

Diese Mechanismen führen zu einem dichten Netzwerk gegenseitiger Aktivierung von Immunzellen und Schmerzzellen und enden in einer verstärkten Signalweiterleitung der Schmerzzellen, die ihrerseits auf die Sensibilisierung verschiedener Transduktionskomponenten, wie zum Beispiel den Transduktionskanälen, gegenüber Schmerzreizen, zurückzuführen ist (Abb. 1.1).





**Abbildung 1.1:** Entzündungsreaktion an einer nozizeptiven Afferenz im Gewebe.

Immunzellen und Blutgefäße (grau) setzen Entzündungsmediatoren frei, die an ihre Rezeptoren (blau) in der Membran der Schmerzrezeptoren binden. Daraufhin aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden die Proteinkinase A (dunkelblau) und C (orange). Diese verstärken durch Phosphorylierung die Aktivität der Transduktionskanäle TRPV1, TRPV4 und P2X<sub>3</sub> (grün). Auch die Aktivität des ASIC3-Kanals wird durch Entzündungsmediatoren über bisher noch nicht bekannte intrazelluläre Signalkaskaden erhöht.

NGF bildet bei Bindung zusätzlich einen Komplex mit TrkA, der in den Kern wandert und dort die Expression verschiedener Transduktionskanäle, spannungsgesteuerter Kanäle, Rezeptoren für Entzündungsmediatoren und der Neuropeptide SP und CGRP steigert.

Gleichzeitig führt die Aktivierung der nozizeptiven Afferenz zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , IL-6), SP und CGRP (roter Pfeil). Diese stimulieren wiederum Immunzellen zur Freisetzung von weiteren Entzündungsmediatoren.

Diese gegenseitige Aktivierung von Immunzellen und Nozizeptoren führt zu entzündungsbedingten Schmerzen und Hyperalgesie.

### 1.2.1 Der TRPV1-Kanal

Ein Kanal, der im Zentrum der Schmerzforschung steht, ist der *Transient receptor potential vanilloid receptor 1* (TRPV1-Rezeptor). Dieser Transduktionskanal wird durch Hitze (> 42 °C), Vanilloide und Protonen aktiviert und sowohl von schnell leitenden A $\delta$ -Fasern als auch von den langsameren C-Fasern exprimiert. Verschiedene Studien zeigen, dass der TRPV1-Kanal eine entscheidende Rolle in Entzündungsreaktionen und chronischen Schmerzen durch die Ausbildung von Hyperalgesie spielt (Caterina und Julius, 2001; Cortright et al., 2007; Leffler et al., 2006).

Der Aktivitätszustand des TRPV1-Kanals wird durch die Proteinkinasen A und C reguliert. Diese werden über die Bindung von Entzündungsmediatoren wie ATP, PGE<sub>2</sub>, Bradykinin, NGF und Proteasen an ihre Rezeptoren aktiviert. PGE<sub>2</sub> und NGF aktivieren die Proteinkinase A (PKA) (Mohapatra und Nau, 2003; Wang et al., 2006), während ATP, Proteasen, Bradykinin und NGF zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führen (Dai et al., 2004b; Tominaga et al., 2001; Vellani et al., 2001; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2005). Beide Kinasen phosphorylieren den TRPV1-Rezeptor, senken dadurch seinen Schwellenwert zur Wahrnehmung von Hitzereizen und erhöhen so seine Aktivität. Zusätzlich bildet NGF einen Komplex mit seinem Rezeptor (TrkA), der zum Kern transportiert wird und dort die Transkription verschiedener Transduktionskanäle, darunter auch TRPV1, steigert (Amaya et al., 2004; Ji et al., 2002; Zhang et al., 2005). Gleichzeitig löst die Bindung an TrkA eine Aktivierung der PKC und der PI3-Kinase aus, die dann in Vesikeln gespeicherte TRPV1-Moleküle phosphoryliert. Daraufhin werden die Vesikel zur Membran transportiert und die Kanäle dort eingebaut (Morenilla-Palao et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Werden der TRPV1-Kanal oder seine regulatorischen Kinasen inhibiert, hat dies eine starke Reduzierung der Hyperalgesie zur Folge (Davis et al., 2000; Vellani et al., 2001; Vyklicky et al., 1998; Yu et al., 2008). Diese Beobachtungen machen den TRPV1-Rezeptor zum Ziel vieler pharmakologischer Studien auf der Suche nach neuen Schmerzmedikamenten.

### 1.2.2 Weitere TRPV-Kanäle

Der TRPV2-Kanal gehört ebenfalls zu den Thermosensoren und wird durch Temperaturen über 52 °C aktiviert. Temperaturen dieser Höhe sind extrem gefährlich für den Körper. Daher wird der TRPV2-Rezeptor hauptsächlich in den schnellen A $\delta$ -Fasern exprimiert (Caterina et al., 1999; Tominaga und Caterina, 2004). Die Beteiligung von TRPV2 an entzündungsbedingten Schmerzen ist wenig untersucht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine periphere Entzündung, ausgelöst durch die Injektion des *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), die Expression des Proteins erhöht (Shimosato et al., 2005).

Ein weiterer TRPV-Kanal, der in den Fokus der Schmerzforschung rückt, ist der TRPV4-Rezeptor. Er wird durch physiologische Temperaturen über 27 °C geöffnet und in Zellen verschiedener Größe exprimiert. Auch eine Rolle in der Transduktion osmotisch induzierter und mechanischer Schmerzreize wird ihm zugesprochen (Cortright et al., 2007; O'Neil und Heller, 2005; Suzuki et al., 2003). Zudem verdichten sich die Hinweise auf die Beteiligung des TRPV4-Rezeptors an der Entstehung entzündungsbedingter Hyperalgesie. Der Kanal wird mit den Neuropeptiden SP und CGRP co-exprimiert und seine Aktivierung führt zur Freisetzung dieser Peptide (Cao et al., 2009). Ebenso beeinflussen Entzündungsmediatoren die Aktivität des Kanals. Alessandri-Haber et al. wiesen in verschiedenen Studien (2003; 2005; 2006) eine Potenzierung von TRPV4-Strömen durch PGE<sub>2</sub> nach, die zur Entstehung einer Hyperalgesie führten. Ein Mechanismus zur Verstärkung von Strömen durch den TRPV4-Kanal ist die Sensibilisierung des Rezeptors über PKA und PKC. Proteasen spalten den PAR<sub>2</sub>-Rezeptor und aktivieren damit diese beiden Kinasen (Grant et al., 2007). Die durch Entzündungsmediatoren induzierte Hyperalgesie ist in TRPV4-*Knockout* Mäusen stark reduziert (Alessandri-Haber et al., 2006). Daher gilt auch dieser Transduktionskanal inzwischen als wichtiges Ziel der Schmerzforschung.

### 1.2.3 Der ASIC3-Kanal (*Asic sensing ion channel 3*)

Dieser Transduktionskanal wird durch extrazelluläre Protonen aktiviert und steht mit der Schmerzentstehung bei ischämischen Herzerkrankungen in Verbindung, bei denen der pH-Wert im Gewebe stark abfällt (Ohtori et al., 2006). Auch in peripheren Entzündungsprozessen sinkt der pH-Wert auf unter 6 und induziert Schmerzen. Es ist bekannt, dass die Expression

von ASIC3 in verschiedenen Entzündungsmodellen hochreguliert wird (Ikeuchi et al., 2009; Mamet et al., 2002; Mamet et al., 2003; Ohtori et al., 2006). Die Expression des Kanals wird dabei von NGF kontrolliert (Mamet et al., 2003). Gleichzeitig verstärken Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Serotonin, PGE<sub>2</sub>, Histamin, Arachidonsäure und Stickstoffmonoxid Protonen-induzierte Ströme (Cadiou et al., 2007; Kress et al., 1997; Mamet et al., 2002; Smith et al., 2007). In ASIC3-*Knockout* Mäusen ist die Säure-induzierte Hyperalgesie nur teilweise reduziert, da auch der TRPV1-Kanal durch Protonen aktiviert wird (Chen et al., 2002).

#### **1.2.4 Der P2X<sub>3</sub>-Kanal**

Extrazellulär freigesetztes ATP öffnet den P2X<sub>3</sub>-Kanal, der zur Familie der purinergen Rezeptoren gehört, und führt so zur direkten Aktivierung von Nozizeptoren und damit zur Empfindung von Schmerzen. Wie bei den anderen Kanälen, wird auch die Expression und Aktivität des P2X<sub>3</sub>-Kanals durch Entzündungsmediatoren reguliert. So aktivieren Bradykinin, PGE<sub>2</sub> und SP die Proteinkinasen A und C, welche dann P2X<sub>3</sub> phosphorylieren und so ATP-induzierte Ströme durch den Kanal verstärken (Paukert et al., 2001; Wang et al., 2007). In Entzündungsmodellen für periphere Entzündungen durch die Injektion von CFA werden ATP-induzierte Ströme ebenfalls potenziert (Xu und Huang, 2002). Zusätzlich steigert NGF in mehreren Modellen die Expression des Rezeptors (Hamilton et al., 2001; Wynn et al., 2004; Xiang et al., 2008; Xu und Huang, 2002). Wird der P2X<sub>3</sub>-Kanal inhibiert, ist die Hyperalgesie reduziert und macht damit auch diesen Transduktionskanal zum Kandidaten für die Schmerztherapie (Dai et al., 2004a; Oliveira et al., 2009).

Mehrere Studien zeigen, dass TRPV1 mit TRPV2, ASIC3 und P2X<sub>3</sub> in DRG-Neuronen co-exprimiert werden können (Greffrath et al., 2003; Kobayashi et al., 2005; Molliver et al., 2005; Ugawa et al., 2005). Viele Nozizeptoren sind deshalb polymodal und besitzen damit die Fähigkeit auf unterschiedliche Schmerzreize zu reagieren. Hinsichtlich der Steigerung der Schmerzempfindlichkeit durch Entzündungsmediatoren ist dies besonders interessant, da bei Co-Expression jeder dieser Kanäle am Zustandekommen der Hyperalgesie beteiligt sein kann.

### 1.3 Chlorid – Erregung oder Inhibition

Die neuronale Aktivität wird entscheidend durch die intrazelluläre Chloridkonzentration beeinflusst. In verschiedenen Neuronentypen ist die Chloridkonzentration über die Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 reguliert und wird als Bestandteil der Signaltransduktion eingesetzt. Neurone des zentralen Nervensystems und die olfaktorische Neurone des peripheren Nervensystems verwenden dabei unterschiedliche Konzepte.

Embryonale Neurone des zentralen Nervensystems (ZNS) akkumulieren durch den Chloridimporter NKCC1 (Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1) aktiv Chlorid und setzen Chloridausströme als exzitatorisches Element ein (Ben Ari, 2002). In Ratten und Mäusen findet in den ersten zwei Wochen nach der Geburt der sogenannte „*Chloride Switch*“ statt. Die Expression des Chloridexporters KCC2 (Kalium-Chlorid-Cotransporter 2) wird induziert und die des NKCC1-Transporters herunterreguliert. Dies führt zu einer Senkung der intrazellulären Chloridkonzentration. Die Öffnung von Chloridkanälen resultiert dann in inhibitorischen Chlorideinströmen (Lu et al., 1999; Price et al., 2005; Rivera et al., 1999; Stein et al., 2004). Die Expression von NKCC1 und KCC2 bestimmt somit darüber, ob Chlorid eine erregende oder eine hemmende Rolle in der Signaltransduktion des ZNS spielt.

Ein anderes Konzept wird von den sensorischen Neuronen des olfaktorischen Epithels (Riechzellen) verwendet, die zum peripheren Nervensystem gehören. Sowohl im Embryo als auch im adulten Tier besitzen die Neurone eine hohe intrazelluläre Chloridkonzentration. Diese wird durch ständige, NKCC1-vermittelte Chloridakkumulation aufrechterhalten. Riechzellen nutzen so Chloridausströme durch Calcium-gesteuerte Chloridkanäle als Depolarisationsmechanismus in ihrer Signaltransduktion (Kaneko et al., 2004; Reuter et al., 1998).

Die sensorischen Neurone der Spinalganglien gehören ebenfalls zum peripheren Nervensystem, nehmen hier jedoch eine Sonderstellung ein. Innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt sinkt die intrazelluläre Chloridkonzentration in einigen Zellen ab, wohingegen andere eine hohe Chloridkonzentration behalten (Gilbert et al., 2007; Price et al., 2006). Dies führt zu einer heterogenen Verteilung der intrazellulären Chloridkonzentration in Spinalganglienzellen, die sich danach in drei Gruppen einteilen lassen. Zellen mit niedrigem Chlorid (40mM), Zellen mit mittlerem Chlorid (60mM) und Zellen mit hohem Chlorid (80mM) (Gilbert et al., 2007). Spinalganglienneurone besitzen daher die Möglichkeit, Chlorid unterschiedlich in der Transduktion von Signalen einzusetzen. Einerseits können Zellen mit niedrigem Chlorid durch Chlorideinstrom gehemmt werden, während Zellen mit erhöhtem

Chlorid andererseits Chloridausströme als depolarisierende Komponente verwenden können (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Gallagher et al., 1978; Kanaka et al., 2001; Kaneko et al., 2004; Kenyon, 2000; Rudomin und Schmidt, 1999). Die Chloridströme werden dabei vermutlich über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und Calcium-aktivierte Chloridkanäle (CaCC) vermittelt (Andre et al., 2003; Currie et al., 1995; Price et al., 2009; Sung et al., 2000).

### **1.3.1 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und Calcium-aktivierte Chloridkanäle in Spinalganglienneuronen**

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren spielen vor allem in der synaptischen Übertragung des Schmerzsignals im Hinterhorn des Rückenmarks eine wichtige Rolle. Interneurone des Rückenmarks aktivieren GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in der präsynaptischen Endigung der nozizeptiven Afferenz. Die Folge ist ein Chloridausstrom, welcher die Zelle schwach depolarisiert und zur Inaktivierung präsynaptischer spannungsgesteuerter Natriumkanäle führt. Ankommende Aktionspotentiale werden dadurch abgeschwächt, und es kommt zu einer verminderten Transmitterfreisetzung (Rudomin und Schmidt, 1999; Willis, 2006; Willis, Jr., 1999). Die abgeschwächte synaptische Signalübertragung ist nicht stark genug, um Aktionspotentiale in den Projektionsneuronen des Rückenmarks zu erzeugen. Das Signal wird nicht zum Gehirn weitergeleitet. Dieser Mechanismus wird als PAD (*Primary afferent depolarization*) bezeichnet und verursacht normalerweise präsynaptische Inhibition (Abb. 1.2). Durch verstärkte afferente Stimulation in Entzündungen oder nach Nervenverletzungen kann die PAD jedoch überwunden werden. Es kommt zu einem exzitatorischen Chloridausstrom, das Signal wird über das Rückenmark weitergeleitet und es kommt durch die Aktivierung von Hinterhornreflexen zu neurogenen Entzündungen und Hyperalgesie im Gewebe (de Koninck, 2007; Garcia-Nicas et al., 2001; Lin et al., 1999; Rudomin und Schmidt, 1999; Sluka et al., 1993; Willis, Jr., 1999). GABA<sub>A</sub> vermittelte PAD spielt ebenfalls in der Peripherie eine Rolle in der Signaltransduktion (Carlton et al., 1999).

Neben den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind auch Calcium-aktivierte Chloridkanäle an der Signaltransduktion in Spinalganglienneuronen beteiligt. Sie werden in der Chlorid-basierten Signalverstärkung eingesetzt, wie sie auch in den olfaktorischen sensorischen Neuronen verwendet wird (Kaneko et al., 2004; Reuter et al., 1998). Pathophysiologische Zustände steigern die Chloridakkumulation der Spinalganglienneurone (Funk et al., 2008) und führen zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Zellen durch Chloridausströme (Andre et al., 2003;

Hilaire et al., 2005; Oh und Weinreich, 2004). TMEM16A als Kandidat für den Calcium-aktivierten Chloridkanal in den Schmerzzellen steht seit kurzem im Fokus der Wissenschaft (Caputo et al., 2008; Hartzell, 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008). In den Spinalganglienzellen wird TMEM16A verstärkt in kleinen Neuronen exprimiert, denen nozizeptive Eigenschaften zugesprochen werden (Yang et al., 2008). Daher spielt der TMEM16A-Kanal eventuell eine Rolle in der Schmerztransduktion. Die Expressionsstudien fanden jedoch ausschließlich an den Somata der Spinalganglienzellen statt und es ist bisher noch nicht bekannt, ob der Kanal auch in der Peripherie oder den Synapsen im Hinterhorn exprimiert wird.

### **1.3.2 NKCC1 und KCC2 regulieren die intrazelluläre Chloridkonzentration**

Der elektroneutrale Co-Transporter NKCC1 akkumuliert Chlorid in den Spinalganglienneuronen (Abb. 1.2). NKCC1 wird von den meisten Neuronen exprimiert (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Alvarez-Leefmans et al., 2001; Gilbert et al., 2007; Sung et al., 2000) und über die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen aktiviert (Darman und Forbush, 2002; Flemmer et al., 2002; Rocha-Gonzalez et al., 2008).

Im Rückenmark führen CFA-induzierte Entzündungen oder Verletzungen der Nerven über eine gesteigerten Expression von NKCC1 und dem Transport und Einbau neuer NKCC1-Moleküle in die Membran zu einer verstärkten Schmerzwahrnehmung (Cramer et al., 2008; Galan und Cervero, 2005; Zhang et al., 2008). Die Aktivierung von NKCC1 und die damit verbundene Chloridakkumulation spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Zellen. Im Vergleich zum physiologischen Zustand weist der Transporter in einer Entzündung einen erhöhten Grad der Phosphorylierung auf und akkumuliert verstärkt Chlorid. Dies führt zu depolarisierenden Chloridströmen in pathophysiologischen Zuständen (Galan und Cervero, 2005; Pieraut et al., 2007).

In den Spinalganglien wird der NKCC1-Transporter dabei durch eine negative Rückkopplungshemmung kontrolliert. Über Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird die Aktivität des Kanals so gesteuert, dass die Zellen der Spinalganglien zwar zum Teil eine erhöhte Chloridkonzentration aufweisen, es aber nicht zu exzitatorischen Strömen kommt (Rocha-Gonzalez et al., 2008). In einer Entzündung jedoch kann dieses Gleichgewicht zum phosphorylierten Zustand des Kanals hin verschoben werden und es kommt zur verstärkten Chloridakkumulation und erregenden Chloridströmen (Rocha-Gonzalez et al., 2008).

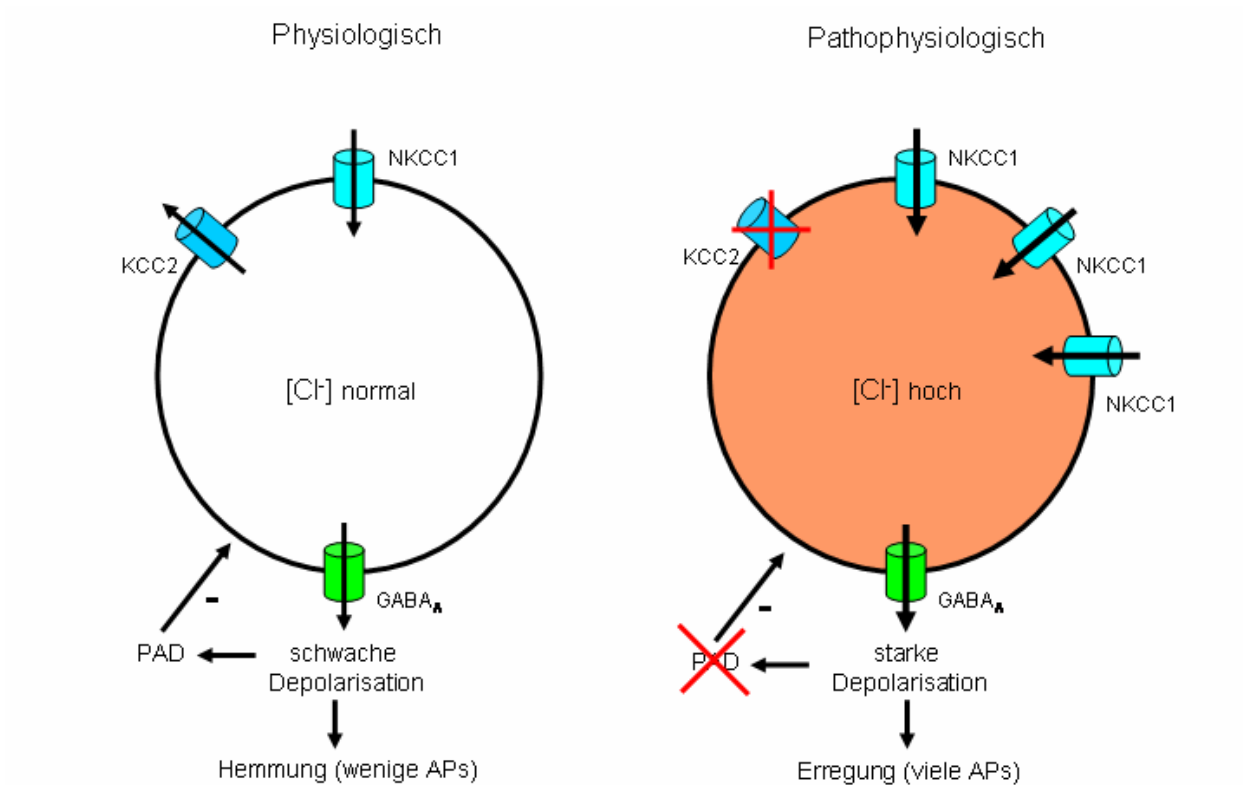
Zusätzlich lindert die periphere und zentrale Applikation des NKCC1-Antagonisten Bumetanid entzündungsbedingten Schmerz, Hyperalgesie und Allodynie (Granados-Soto et al., 2005; Pitcher et al., 2007; Sung et al., 2000; Valencia-de Ita et al., 2006). Der NKCC1-Transporter ist in Spinalganglienneuronen somit nicht nur für die Aufrechterhaltung einer konstanten Chloridkonzentration im physiologischen Zustand verantwortlich, sondern wird durch Entzündungen und Nervenverletzungen beeinflusst und ist direkt an der Ausbildung pathophysiologischer Zustände beteiligt (Abb. 1.2).

Weniger eindeutig ist die Rolle des Chloridexporters KCC2. Im Rückenmark ist seine Expression und Beteiligung an pathophysiologischen Veränderungen gut untersucht. So führen hier periphere Entzündungen oder die Verletzung der Nerven zur Herunterregulierung der Expression von KCC2 (Cramer et al., 2008; Miletic und Miletic, 2008; Nomura et al., 2006; Rivera et al., 2004; Wu et al., 2009; Zhang et al., 2008). Da NKCC1 unverändert oder sogar verstärkt exprimiert wird, resultieren diese Änderungen in der Transporterexpression in einer Disinhibition der Neurone. Aufgrund der fehlenden Inhibition erfolgt dann eine gesteigerte Schmerzwahrnehmung über die verstärkte Weiterleitung von Schmerzsignalen.

Während im Rückenmark die Expression von KCC2 eindeutig nachgewiesen ist, wird sie in den Spinalganglien kontrovers diskutiert (Abb. 1.2). Einerseits konnte in einigen Studien KCC2 nicht detektiert werden (Kanaka et al., 2001; Morales-Aza et al., 2004; Price et al., 2006), während andere Untersuchungen dagegen eindeutig die Expression von KCC2 (mRNA und Protein) zeigen (Funk et al., 2008; Gilbert et al., 2007; Lu et al., 1999). Es ist daher durchaus möglich, dass der KCC2-Transporter auch in den Spinalganglien an der Ausbildung pathophysiologischer Veränderungen beteiligt ist.

Die intrazelluläre Chloridkonzentration spielt also eine entscheidende Rolle in der Erregbarkeit von Neuronen des nozizeptiven Systems. Sie wird durch die Chloridtransporter KCC2 und NKCC1 kontrolliert. Entzündungen und Nervenverletzungen regulieren die Aktivität und Expression der beiden Chloridtransporter und verschieben das Gleichgewicht zur Chloridakkumulation hin. Daraus resultierende erregende Chloridströme führen dann zu einer Sensibilisierung des nozizeptiven Systems und einer verstärkten Schmerzwahrnehmung. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind in den Nozizeptoren der Spinalganglien noch weitgehend unbekannt. Doch gerade die Untersuchung dieser Zellen ist interessant, da sie den Schmerzreiz direkt detektieren und die erste Verarbeitungsstelle für das Signal darstellen.





**Abbildung 1.2:** Beeinflussung der Chloridsignaltransduktion durch pathophysiologische Veränderungen an Spinalganglien-Neuronen.

Im physiologischen Zustand wird die Chloridkonzentration im Spinalganglien-Neuron durch die ausgeglichene Aktivität der Chloridtransporter KCC2 und NKCC1 auf einem konstanten Wert gehalten. Wird die Zelle stimuliert, strömt Chlorid durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in den extrazellulären Raum und die Zelle wird leicht depolarisiert. Dies führt zur PAD, welche die weitere Signalweiterleitung dieser Zelle hemmt.

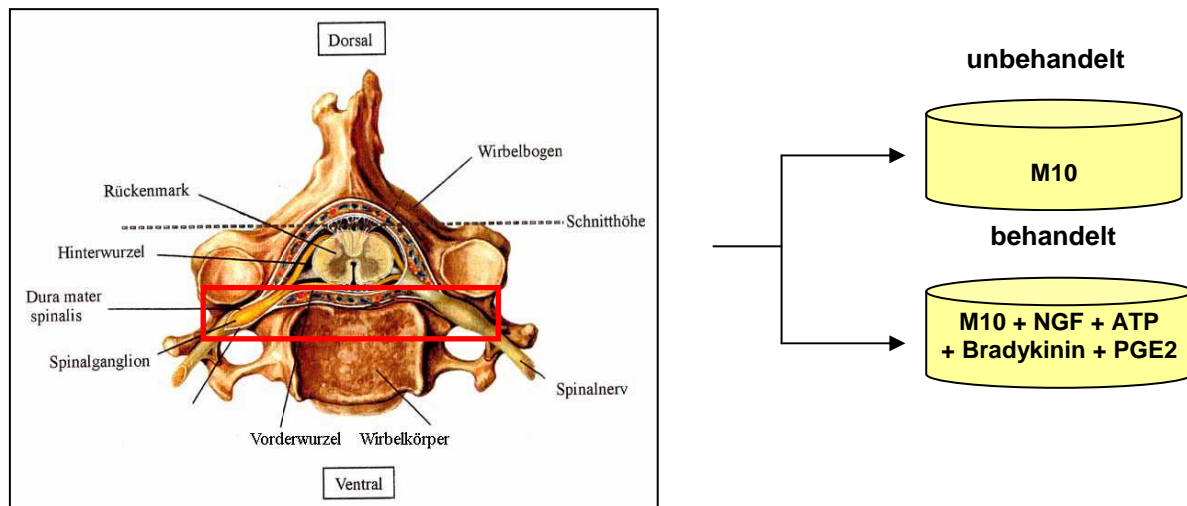
Pathophysiologische Veränderungen der Zelle führen zum Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration durch die verstärkte Expression und Aktivität von NKCC1 und eine Herunterregulierung von KCC2. Das bei Stimulierung ausströmende Chlorid depolarisiert die Zelle so stark, dass die PAD überwunden wird und es zu einer Erregung des Neurons kommt. Die Pfeile markieren die Richtung des Chloridstroms.

## 1.4 Das *ex vivo* Entzündungsmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Entzündungsmediatoren (EM) auf die Reaktion von somatosensorischen Zellen der Spinalganglien untersucht. Die Zellen der Spinalganglien eignen sich für solche Untersuchungen, da sie die erste Prozessierungsstation eines Schmerzreizes repräsentieren und direkt mit Entzündungsprozessen in Kontakt kommen. Sie wurden deshalb in dieser Arbeit als Modell zur Untersuchung des Einflusses einer Entzündung auf die Schmerztransduktion gewählt.

In bisherigen Modellen werden Entzündungen und Hyperalgesie häufig durch die Injektion von Capsaicin oder CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) induziert (Amaya et al., 2003; Bulling et al., 2001; Chen und Sommer, 2007; Laird et al., 2004; Shimosato et al., 2005; Staton et al., 2007). Allerdings dauert die Manifestation der Entzündung bis zu 35 Tagen und die Tiere erleiden Qualen. Es gibt Ansätze, in denen Entzündungsmediatoren auf dissoziierte Spinalganglienzellen oder Nervenpräparationen appliziert werden, um die Interaktionen von Entzündungsmediatoren mit Schmerzzellen zu untersuchen (Kasai und Mizumura, 2001; Kessler et al., 1992; Kress et al., 1997; Ma et al., 2006; Song et al., 2003). Allerdings wurde in diesen Modellen hauptsächlich die direkte Interaktion der Mediatoren mit den Neuronen untersucht oder die Änderung im Feuerverhalten der Zellen analysiert. Deshalb wurde in dieser Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht, eine Entzündung schnell *ex vivo* und *in vitro* zu induzieren und die Wirkung von Entzündungsmediatoren über mehrere Stunden, sowohl auf die Transduktionskanäle als auch auf die intrazelluläre Chloridkonzentration hin zu untersuchen.

In dem hier entwickelten *ex vivo* Entzündungsmodell (Abb. 1.3) wurden intakte Spinalganglien (rechts des Rückenmarks) oder eine Primärkultur aus Spinalganglienzellen mit den Entzündungsmediatoren NGF (100 ng/ml), ATP (1,8  $\mu$ M), Bradykinin (0,9  $\mu$ M) und PGE<sub>2</sub> (1,4  $\mu$ M) für ein bis drei Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 4 Well-Platten inkubiert. Sie werden im weiteren Verlauf der Arbeit als behandelte DRGs bezeichnet. Die verwendeten Mediatoren treten in physiologischen Entzündungsprozessen auf und sorgen dort für die Sensibilisierung und verstärkte Aktivität der Schmerzzellen, was in Hyperalgesie resultiert. Die Spinalganglien links des Rückenmarks wurden nach dem gleichen Protokoll in reinem M10-Medium inkubiert (unbehandelte DRGs). Nach der Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell wurden die DRGs sofort für Experimente verwendet oder eingefroren. Bei der Verwendung von Primärkulturen wurden die Zellen 24-48 h nach der Dissoziation und direkt vor den Experimenten nach dem Protokoll des Entzündungsmodells behandelt.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des *ex vivo* Entzündungsmodells.

Die Spinalganglien (roter Kasten) werden aus dem thorakalen und lumbalen Bereich der Wirbelsäule präpariert. Die Spinalganglien links des Rückenmarks dienen als Kontrollen und werden für ein bis drei Stunden in M10 inkubiert. Die Spinalganglien rechts des Rückenmarks werden in M10 mit den Entzündungsmediatoren NGF, ATP, Bradykinin und PGE<sub>2</sub> für ein bis drei Stunden behandelt (behandelte DRGs).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mit einem neuen Modell entzündungsbedingte Veränderungen der Transduktionskanäle und der intrazellulären Chloridkonzentration in Spinalganglienzellen zu untersuchen. Experimente an intakten Spinalganglien sollten einen möglichst physiologischen Zustand der Schmerzzellen garantieren. Nach Etablierung des *ex vivo* Entzündungsmodells sollte zunächst der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression verschiedener Transduktionskanäle untersucht werden. Der TRPV1-Kanal spielte eine besondere Rolle, da seine Beteiligung in entzündungsbedingten Schmerzen hinreichend nachgewiesen wurde. Experimente an dissoziierten Zellen hatten das Ziel den Einfluss der Entzündungsmediatoren auf die TRPV1-Aktivität nachzuweisen.

Gleichzeitig sollte die Rolle der intrazellulären Chloridkonzentration in einer Entzündung mit dem hier entwickelten Modell analysiert werden. Untersucht wurde hier der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression und Aktivität der Chloridtransporter NKCC1 und KCC2, sowie auf die Chloridkonzentration selbst. Um die beiden Signaltransduktionskomponenten in Verbindung zu bringen, sollte im Abschlussexperiment dieser Arbeit herausgefunden werden, ob die Öffnung des TRPV1-Kanals durch den Calciumeinstrom zur

Aktivierung Calcium-gesteuerter Chloridkanäle führt, und ob sich die dadurch entstehenden Chloridströme durch Entzündungsmediatoren modulieren lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dabei helfen, die grundlegenden Mechanismen der Schmerztransduktion und ihrer Beeinflussung durch Entzündungen zu verstehen, um auf dieser Basis neue Schmerzmedikamente zu entwickeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Spinalganglienpräparation

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden an Spinalganglienzellen von weiblichen Wistar Ratten ( $\geq 6$  Wochen) durchgeführt. Die Tiere wurden von der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg bezogen.

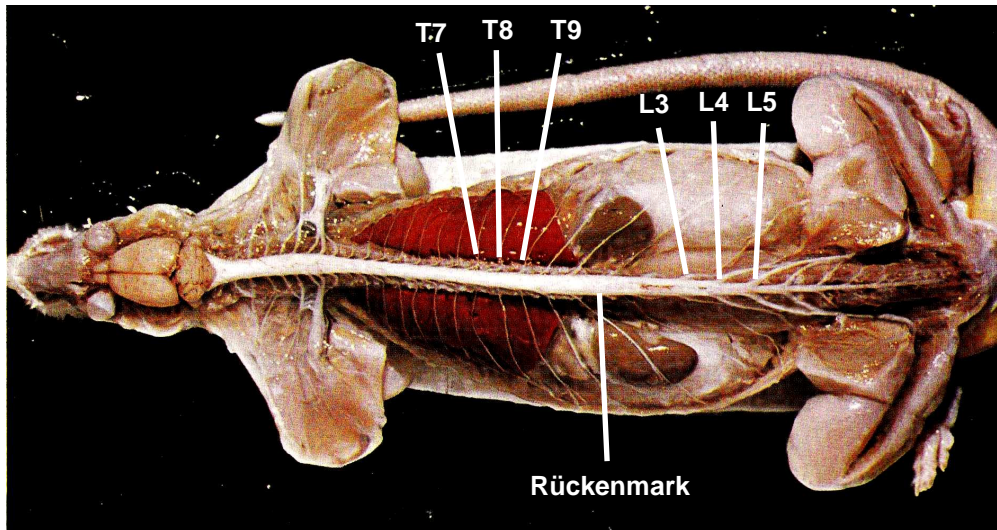
Zur Präparation der Spinalganglien wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und dekapitiert. Die Wirbelsäule wurde durch die Entfernung des Fells freigelegt und dann im Bereich der Schulterblätter und des Beckens durchtrennt. Zur leichteren Identifizierung der Spinalganglienposition und besseren Fixierung wurden die Rippenbögen nicht entfernt. Anschließend erfolgte die horizontale Öffnung der Wirbelsäule mit einer kleinen Schere. Bei möglichst flacher Führung der Schere und Schnittsetzung in Höhe der Querfortsätze eines Wirbels, ist das Verletzungsrisiko für die Spinalganglien minimal. Durch das Abheben des Wirbelbogenverbandes wurden sowohl Rückenmark als auch Spinalganglien unverletzt freigelegt, da diese vollständig an der ventralen Hälfte der Wirbelsäule haften bleiben.

Die Spinalganglien selbst liegen in kleinen Vertiefungen der Wirbelsäule und wurden deshalb unter dem Binokular (SMZ 800; Nikon) mithilfe einer Federschere und einer feinen Pinzette präpariert. In positionsungebundenen Experimenten und für die Primärkultur wurden in der Regel alle thorakalen und lumbalen Spinalganglien präpariert. Zu beachten ist, dass in diesem Prozess die Spinalnerven durchtrennt wurden. Bis zur weiteren Behandlung wurden die Spinalganglien dann in Kulturschalen (35mm; Greiner Bio-One, #627120) in eiskalter ES aufbewahrt.

#### **DRG-Pärchen**

Um Spinalganglien und Zellen mit möglichst ähnlicher Innervierung des Körpers zu vergleichen, wurden sogenannte DRG-Pärchen präpariert. Für die Experimente in den Kapiteln 3.1.3, 3.2., 3.3, 3.4 und 3.5 wurden also nur die Ergebnisse aus DRGs der gleichen Position und des gleichen Tiers direkt miteinander verglichen. Hierfür wurden die thorakalen Spinalganglien der Positionen T7-T9 und die lumbalen DRGs L3-L5 präpariert und anschließend nach dem *in vivo* Entzündungsprotokoll (Kapitel 2.3) behandelt. Da thorakale

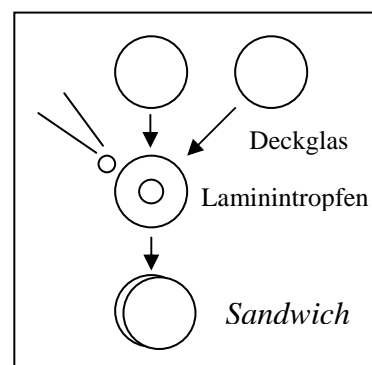
und lumbale Spinalganglien unterschiedliche Bereiche des Körpers innervieren, müssen die Ergebnisse getrennt analysiert werden.



**Abbildung 2.1:** Rückansicht einer aufpräparierten Ratte  
Vom Rückenmark in der Mitte gehen die Spinalnerven nach links und rechts ab. Markiert sind hier die Spinalnerven der Spinalganglien T7-T9 und L3-L5.

## 2.2 Primärkultur

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Imaging Experimente wurde eine Primärkultur aus Spinalganglienzellen angelegt. Zur Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband wurden die Spinalganglien nach der Präparation mit einer Rasierklinge auf dem Deckel einer Kulturschale zerkleinert und dann für 40 min. in 2 ml Collagenase-Lösung bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Suspension 5 min. bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Z323K; Hermle). Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 2 ml Trypsin-Lösung mit einer feuerpolierten Pipette resuspendiert. In diesem und in den folgenden Schritten ist die gründliche Resuspension entscheidend um die Zellen aus dem Verband zu lösen. Die Inkubation in Trypsin-Lösung erfolgte für 20 min. im Wasserbad bei 37 °C. Nach einem



**Abbildung 2.2:** Herstellung eines *Sandwiches* zur Beschichtung von Deckgläsern mit Laminin.

weiteren Zentrifugationsschritt wurde in 2 ml DNaseI-Lösung resuspendiert und 10 min. bei 37 °C inkubiert. Auf die anschließende Zentrifugation folgte die Resuspension des Pellets in 6 ml warmen M10. Die Zellen wurden dann auf Poly-L-Lysin (PLL) und Laminin beschichteten Deckgläsern ausplattiert und bis zum Experiment im Inkubator (Heraeus, Typ BB6060, Kendro Laboratory Products) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zur Beschichtung der Deckgläser mit Laminin wurden diese zunächst mindestens 20 min. mit PLL beschichtet und dann im Trockenschrank getrocknet. Danach wurden *Sandwiches* aus jeweils zwei Deckgläsern geformt, die in der Mitte mit Laminin-Lösung (50 µl/2 Deckgläser mit Ø 13 mm von Knittelgläser, 100 µl/2 Deckgläser mit Ø 25 mm von Menzel Gläser) bedeckt waren (Abb. 2.2). Bis zur Verwendung erfolgte eine Inkubation für zwei bis drei Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Für die Vitalitätstests wurden 300 µl Zellsuspension auf runde 13 mm Deckgläser in 4 Well-Platten ausplattiert. Um im Fall der Imaging Experimente Material zu sparen, wurden Zylinder (*Cloning Cylinders*, 250 µl; SIGMA ALDRICH, #C2059) verwendet, die mit einer Silikon-Paste (*Dow Corning<sup>®</sup> high vacuum silicone grease*; SIGMA ALDRICH, #Z273554-1EA) in der Mitte der 25 mm Deckgläser befestigt wurden. In die Zylinder wurden dann 300 µl Suspension ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die Zellen wurden nur an den zwei Tagen nach der Präparation für Experimente verwendet, da sich die Expression und damit der physiologische Zustand der Zellen in Kultur verändern. Ebenso wurde auf die Zugabe von NGF zur Kultivierung verzichtet, da dieses im Entzündungsassay als Entzündungsmediator eingesetzt wird. Die Vitalfunktionen und Reaktionen der Zellen waren trotz des Fehlens von NGF normal.

## 2.3 Vitalitätstests

Die optimalen Konzentrationen der im *ex vivo* Entzündungsmodell verwendeten Entzündungsmediatoren wurden in verschiedenen Vitalitätstests ermittelt. Dabei war es von entscheidendem Interesse, dass die Zellen eine möglichst lange Behandlung mit den Entzündungsmediatoren *ex vivo* überleben.

Die Vitalität der Neurone wurde deshalb in zwei unabhängigen Tests an dissoziierten Zellen (Kapitel 2.2) und Lebendgewebsschnitten nach 1-4 h überprüft.

### 2.3.1 Lebendgewebeschnitte

Da die immunhistochemischen Färbungen und die FLIM-Messungen an Zellen durchgeführt wurden, die sich noch im Gewebeverband befanden und von der Dura mater umhüllt waren, wurden die Vitalitätstests auch an Gewebeschnitten durchgeführt.

Vor Anfertigung dieser Schnitte wurden die Spinalganglien wie in 2.1 beschrieben präpariert und in 4-Well Platten (Nunc<sup>TM</sup>, #176740) nach dem Protokoll des Entzündungsmodells inkubiert. Nach einer, zwei und drei Stunden Inkubation wurden immer zwei unbehandelte und zwei behandelte DRGs in einer Petrischale mit 4 % Agarose fixiert und in eiskalter, mit Carbogengas perfundierter ES-Lösung aufbewahrt. Die 150-170 µm dicken Gewebeschnitte wurden dann am Vibratom (VT 1000S; Leica Microsystems) angefertigt und ebenfalls in eiskalter, perfundierter ES-Lösung aufbewahrt.

### 2.3.2 Prinzip der Vitalitätstests

Es wurden zwei unabhängige Tests zur Untersuchung der Zellvitalität eingesetzt. Das *LIVE/DEAD<sup>®</sup> Cell Vitality Assay Kit* ((Invitrogen Cat.#L34951) identifiziert metabolisch aktive Zellen, da das als Marker verwendete C12-Resazurin nur in lebenden Zellen durch NADH zu seiner rot fluoreszierenden Form, C12-Resorufin, reduziert werden kann. Der zweite Test diente zur Darstellung toter Zellen durch Propidiumiodid (PI), welches Membran impermeabel ist und nur über die poröse Membranen toter Zellen ins Zellinnere gelangen und dort mit der DNA interkalieren kann. Durch die Interaktion mit der DNA steigert sich die



Fluoreszenzintensität um das 20-30 fache und das Emissionsmaximum verschiebt sich von 590 nm auf 617 nm.

Sowohl dissoziierte Zellen als auch Gewebeschnitte wurden nach demselben Protokoll inkubiert. Die Inkubation für die Versuche mit PI (1,5  $\mu$ M in ES) erfolgte bei Raumtemperatur für 1-2 min. Für den Lebendtest wurden die Zellen für 10-15 min. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator mit C12-Resazurin (10  $\mu$ M in ES) inkubiert. Beide Inkubationen wurden durch einen Lösungswechsel mit ES gestoppt.

### **2.3.3 Bilddokumentation**

Die Fluoreszenzbilder zur Überprüfung der Vitalität von dissoziierten Zellen und Lebendgewebeschnitten wurden an dem Epi-Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 von Zeiss mit dem 10x Objektiv und einer digitalen Farbkamera (ColorView II Soft Imaging System) aufgenommen. Verwendet wurde folgender Filtersatz: Anregungsfilter 540-552 nm, Dichroischer Spiegel 580 nm, Emissionsfilter 590 nm. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampfampe (HBO100, Typ ebq 100 isolated) eingesetzt.

## **2.4 Immunhistochemie**

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Neuropeptide, Rezeptoren für Entzündungsmediatoren, Chloridtransporter und Transduktionskanäle auf Proteinebene wurden immunhistochemische Färbungen und Analysen durchgeführt. Auch der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression dieser Proteine wurde immunhistochemisch analysiert.

### **2.4.1 Fixierung und Schneiden von Spinalganglien**

Nach der Behandlung der Spinalganglien nach dem Protokoll des *ex vivo* Entzündungsmodells wurden diese zunächst in PBS gewaschen, um das Medium und die Entzündungsmediatoren zu entfernen. Das Gewebe wurde dann in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min. fixiert. Darauf folgten drei Waschschrte in PBS und die Entwässerung der

DRGs in einem ansteigenden Saccharosegradienten. Die Inkubation in 10 % Saccharose bei Raumtemperatur dauerte zwei bis drei Stunden. Anschließend entwässerten die Spinalganglien in 30 % Saccharose bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Saccharose von dem Gewebe entfernt, das Spinalganglion in einem Tropfen Medium (Tissue Tek Freezing; Leica Microsystems) eingebettet und im Kryostaten (CM 30505, Leica Microsystems) bei -20 °C eingefroren. Die Spinalganglien wurden entweder sofort verwendet oder bei -20 °C eingelagert.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 14 µm dicke Kryoschnitte bei -20 °C Objekttemperatur am Kryostat angefertigt und auf Superfrost® Plus Objektträger der Firma Menzel-Gläser aufgezogen. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

### **2.4.2 Immunhistochemische Färbung**

Vor der Färbung wurden die Schnitte 20-30 min. bei Raumtemperatur getrocknet und mit einem hydrophoben Stift (Super HT PapPen, Polysciences Inc.) umrandet, der das Auslaufen der Flüssigkeit verhindert. Anschließend folgte die Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger mit 4 % PFA für 8-9 min.. Nach dreimaligem Waschen für 6 min. in PBS wurden die Schnitte in einer feuchten Box für eine Stunde mit CT präinkubiert, um die Permeabilisierung der Zellmembran und das Abblocken unspezifischer Bindestellen zu gewährleisten. Die zweistündige Inkubation mit in CT verdünntem Erstantikörper folgte im nächsten Schritt. Danach wurde drei Mal für 6 min. mit PBS gewaschen und dann 90 Minuten mit in C verdünnten Zweitantikörpern im Dunkeln in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 6 min. mit PBS wurden die Schnitte entweder in einem Tropfen *Aqua PolyMount* (Polysciences Inc.) eingebettet und mit einem Deckglas (24x60 mm, Menzel Gläser) bedeckt oder mit DAPI gefärbt. Im Fall der DAPI-Färbung wurden die Schnitte mit einer 0,3 µM DAPI-Lösung für ein bis zwei Minuten im Dunkeln inkubiert und dann drei Mal für 6min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Einbettung wie oben beschrieben. Bis zur Bilddokumentation wurden die Objektträger im Dunkeln aufbewahrt.

#### **P-NKCC1 Färbung:**

Zur Färbung der phosphorylierten Form des NKCC1-Transporters wurde während der Präinkubation mit CT ein Peptid, dessen Sequenz dem nicht phosphorylierten Zustand von NKCC1 entspricht, zum Erstantikörper gegeben. Somit wurden Antikörper, die diese Form

von NKCC1 erkennen, präadsorbiert. Im Gewebe wird dann nur noch der phosphorylierte Zustand des Transporters detektiert. Dabei wurde das Peptid in Bezug auf den Erstantikörper 4x konzentriert eingesetzt. Die Präinkubation von Peptid und Antikörper betrug 30-40 min..

**Tabelle 2.1:** Verwendete Erstantikörper

Name	Spender	Spezifität	Verdünnung	Katalognummer	Peptid	Firma
$\alpha$ NKCC1	gt	ms, rt, hm, cow	1:20	C-14 sc-21547	sc-21547P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ NKCC1	gt	ms, rt, hm, cow	1:20	N-16 sc-21545	sc-21545P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ KCC2	gt	ms, rt, hm	1:20	R-14 sc-19420	sc-19420P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ SP	rb	rt	1:50	PC232L		Oncogene <sup>TM</sup> Research Products; San Diego/CA
$\alpha$ CGRP	rb	ms, rt	1:50	PC205L		Oncogene <sup>TM</sup> Research Products; San Diego/CA
$\alpha$ p- NKCC1	sh	Phosphorylierte Thr203, Thr207; Thr212	1:20			The University of Dundee; Schottland
$\alpha$ ASIC3	gt	hm, ms, rt	1:50	K-13 sc-21845	sc-21845P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ P2X3	gt	ms, rt, hm	1:20	A-16 sc-12215	sc-12215P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ TRPV1 (VR-1)	rb	ms, rt, hm	1:100	R-130 sc-28759		Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ TRPV2 (VRL-1)	gt	ms, rt, hm	1:50	G-20 sc-22521	sc-22521P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ TRPV4	gt	ms, rt, hm	1:100	K-18 sc-47527	sc-47527P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA

$\alpha$ B <sub>2</sub> R	gt	ms, rt, hm, mink	1:20	C-20 sc-15050	sc-15050P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ TrkA	rb	ms, rt, hm	1:20	763 sc-118	sc-118P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA
$\alpha$ EP1	gt	ms, rt, hm	1:20	E16 sc-22648	sc-22648P	Santa Cruz Biotechnology Inc.; USA

**Tabelle 2.2:** Verwendete Alexa Fluor<sup>®</sup> Zweitantikörper

Name	Spender	Spezifität	Verdünnung	Katalognummer	Firma
A488	dk	rb IgG (H+L)	1:500	A-21206	Molecular Probes (Invitrogen Corporation; USA)
A488	dk	gt IgG (H+L)	1:500	A-11055	Molecular Probes (Invitrogen Corporation; USA)
A568	dk	gt IgG (H+L)	1:500	A-11057	Molecular Probes (Invitrogen Corporation; USA)
A488	dk	sh IgG (H+L)	1:500	A-11015	Molecular Probes (Invitrogen Corporation; USA)

### 2.4.3 Spezifität der Antikörper

Kontrollen zur Spezifität eines Antikörpers in immunhistochemischen Färbungen können nach verschiedenen Ansätzen durchgeführt werden (Saper, 2005). Dazu zählt unter anderem die Präadsorptionskontrolle mit dem Antigen. Ein weiterer Ansatz ist die Co-Färbung mit einem Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Zielproteins gerichtet ist und das gleiche Färbemuster aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antikörperspezifität, soweit möglich, mit der Präadsorptionskontrolle überprüft. Hierbei wird ein Peptid eingesetzt, dessen Sequenz dem Antigen des jeweiligen Antikörpers entspricht. Die verwendeten Peptide wurden im 5-10 fachen Überschuss im Verhältnis zum Antikörper eingesetzt und 2-20 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antikörper präinkubiert. Die Präinkubation kann in CT oder PBS stattfinden, wobei im letzteren Fall vor dem Auftragen auf das Gewebe dann mit CT auf das Endvolumen aufgefüllt wird. Dieser Ansatz wird dann während der Erstantikörperinkubation

aufgetragen. Ist der Antikörper spezifisch, wurden alle Antikörpermoleküle an das Kontrollpeptid gebunden und im Gewebe tritt keine Färbung auf.

Die Spezifität für folgende Antikörper konnte mit der Präinkubation in CT nachgewiesen werden:  $\alpha$ NKCC1 (N-16),  $\alpha$ KCC2 (R-14),  $\alpha$ TRPV4 (K-18),  $\alpha$ ASIC2 (G-20),  $\alpha$ EP1 und  $\alpha$ P2X3 (A-16). Im Fall der Präinkubation in PBS konnte die Spezifität von  $\alpha$ TRPV2 (G-20),  $\alpha$ ASIC3 (K-13),  $\alpha$ B<sub>2</sub>R (C-20) und  $\alpha$ TrkA (763) bewiesen werden.

Für TRPV1 steht vom Hersteller kein Peptid zur Verfügung, allerdings wurde ein Western Blot mit diesem Antikörper an verschiedenen Zellarten von Santa Cruz durchgeführt, der dessen Spezifität zeigt. Außerdem stimmt das Färbemuster des hier verwendeten Antikörpers mit anderen in der Literatur dargestellten Antikörperfärbungen überein.

Das Kontrollpeptid für den NKCC1-Antikörper (C-14) war nicht funktionsfähig, daher wurde eine Co-Färbung mit dem p-NKCC1-Antikörper angefertigt, die eine hundertprozentige Überlagerung der Färbemuster zeigt. Daher ist davon auszugehen, dass beide Antikörper spezifisch den NKCC1-Transporter erkennen.

Die spezifische Erkennung des phosphorylierten Zustands von NKCC1 durch den p-NKCC1-Antikörper bei Präadsorption durch das mitgelieferte Peptid wurde im *ex vivo* Entzündungsmodell nachgewiesen. Wird das Peptid nicht eingesetzt, erkennt auch der p-NKCC1-Antikörper beide Zustände des Transporters und verhält sich bei der Untersuchung der Fluoreszenzintensität genau wie  $\alpha$ NKCC1 (C-14). In diesem Fall war bei beiden Antikörpern erst nach drei Stunden Inkubation mit Entzündungsmediatoren eine Fluoreszenzzunahme zu erkennen, während der p-NKCC1-Antikörper nach Präinkubation mit dem Peptid schon nach einer Stunde Inkubation einen Anstieg in der Fluoreszenz zeigt.

Zur Kontrolle des Zweitantikörpers wurde in jeder Färbung eine Negativkontrolle durchgeführt, wobei nur der Zweitantikörper ohne den Erstantikörper auf das Gewebe gegeben wird, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Da in keinem Fall eine Färbung in den Negativkontrollen auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten Zweitantikörper spezifisch binden.

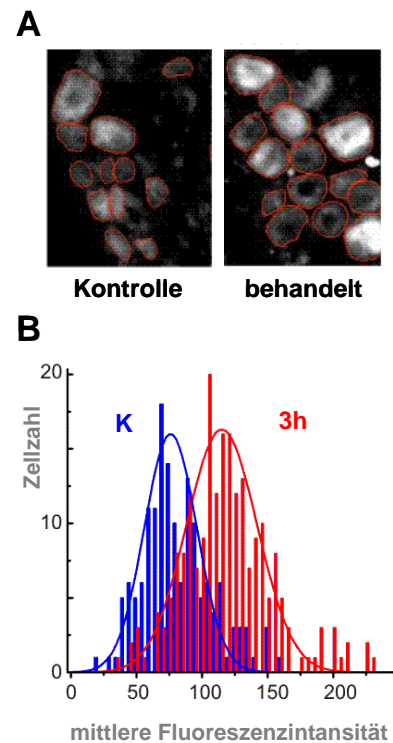
### 2.4.4 Datenanalyse

Für die Verteilung der Transduktionskanäle und der SP und CGRP exprimierenden Zellen in den Spinalganglien wurde die Anzahl der positiv gefärbten Zellen in einem Schnitt gezählt und in Bezug auf die Gesamtanzahl der Zellen im Schnitt in Prozent angegeben. Als positiv gefärbt gelten Zellen, deren Fluoreszenz über dem Hintergrund liegt und deren Färbung den gesamten Zellkörper ausfüllt.

Für die Auswertung wurden DRG-Pärchen aus den Bereichen T7-T9 und L3-L5 aus drei verschiedenen Tieren verwendet. Von jedem Spinalganglion wurden mindestens zwei Schnitte gefärbt. Die ermittelten Prozentzahlen einer Färbung wurden gemittelt und werden im Fall von SP und CGRP mit dem Fehler des Mittelwerts und im Fall der Transduktionskanäle mit der Standardabweichung angegeben. Insgesamt wurden für SP 3178 unbehandelte und 3467 behandelte Zellen ausgewertet. Im Fall von CGRP waren es 6755 unbehandelte und 4596 behandelte Zellen.

Für die Auswertung der Chloridtransporter wurde nicht die Anzahl der positiv gefärbten Zellen ausgewertet, sondern die Fluoreszenzintensität. Es gelten die gleichen oben genannten Kriterien, um eine Zelle als positiv gefärbt zu bewerten. Die mittlere Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle wurde durch Markierung der äußeren Zellgrenze im Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) bestimmt. Ausgewertet wurden 3583 unbehandelte und 3353 behandelte Zellen im Fall von NKCC1 und 1839 unbehandelte und 1701 behandelte Zellen für KCC2. In den Experimenten mit ungepaarten Spinalganglien wurden für NKCC1 3098 behandelte und 1944 unbehandelte und für KCC2 3186 behandelte und 3028 unbehandelte Zellen analysiert. Bei der Verwendung des p-NKCC1 Antikörpers wurden 598 nicht behandelte und 576 behandelte Zellen untersucht.

Anschließend wurde mit dem Programm Origin® 7G SR1 (OriginLab Corporation, MA, USA) eine Häufigkeitsverteilung über die mittleren Fluoreszenzintensitäten aller Zellen eines



**Abbildung 2.4:** Datenauswertung  
 A: Markierung der äußeren Zellgrenzen (orange). B: Darstellung zweier Intensitäts-häufigkeitsverteilungen. Unbehandelt (blau), drei Stunden behandelt (rot).  
 Y-Achse: Zellzahl in Prozent, X-Achse: mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen.

Schnittes erstellt. Im Anschluss wurde eine Gauss-Verteilung der Häufigkeiten eines Schnittes gebildet, deren Mittelwert für die weitere Auswertung verwendet wurde.

In der Auswertung wurden immer die Mittelwerte eines unbehandelten und eines behandelten Schnittes aus der gleichen Färbung und des gleichen Tieres und, im Fall von DRG-Pärchen auch von der gleichen Position direkt miteinander verglichen. Die Fluoreszenzaufnahmen mussten am gleichen Tag angefertigt worden sein. Dabei wurde der Mittelwert des Kontrollschnitts als 100 % bestimmt und der Mittelwert der Gauss-Verteilung des behandelten Schnittes dazu in Bezug gesetzt. Für eine Inkubationszeit wurden jeweils drei Tiere untersucht. Der Mittelwert der Änderungen in Bezug auf die Kontrolle wird hier in Prozent mit dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Signifikanz der Änderungen zwischen unbehandelten und behandelten Spinalganglien wurde mit einem Student-t Test überprüft mit einer Grenze von  $p \leq 0,05$ . In allen Fällen wurden für die statistische Auswertung die Ergebnisse aus drei Tieren und mindesten zwei Färbungen gemittelt.

### **2.4.5 TMEM16A – Färbung**

Für die immunhistochemische Darstellung des TMEM16A-Proteins, das als Kandidat für den Calcium-gesteuerten Chloridkanal in Schmerzzellen gilt, musste zunächst das zu erkennende Epitop demaskiert werden. Die 14  $\mu\text{m}$  Kryoschnitte wurden wie zuvor beschrieben für 25 min. getrocknet und mit einem hydrophoben Stift umrandet. Anschließend erfolgte dann die Fixierung der Schnitte mit 4 % PFA auf dem Objektträger für 45 min.. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in PBS wurden die Schnitte bei 81 °C für 30 min. in Citrat-Puffer inkubiert. Dieser Schritt diente der Demaskierung des Epitops, so dass der Erstantikörper später daran binden konnte. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden die Schnitte während der Inkubation immer wieder mit MilliQ-Wasser befeuchtet. Reste des Citrat-Puffers wurden im Anschluss durch Waschen mit MilliQ-Wasser (2 min.) und PBS (3x5 min.) entfernt. Darauf folgte die Präinkubation in CT für eine Stunde und anschließend die Erstantikörperinkubation in CT für drei Stunden. Es wurden zwei  $\alpha$ TMEM16A-Antikörper getestet, ein monoklonaler (Abcam, #ab64085) und ein polyklonaler (Abcam, #ab53212) Antikörper. Der monoklonale Antikörper wurde 1:100 verdünnt eingesetzt, während der polyklonale Antikörper 1:50 verdünnt wurde.

Nach drei fünfminütigen Waschschritten in PBS erfolgte die Zweitantikörperinkubation in C für 90 min.. In beiden Fällen wurde ein A488dkorb Antikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt.

Im Anschluss wurde wieder drei Mal für 5 min. in PBS gewaschen und die Schnitte dann in *AquaPoly Mount* eingebettet. Alle Schritte ab der Zweitantikörperinkubation wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Fluorochroms zu verhindern. Bis zur Bilddokumentation wurden die Objektträger dunkel gelagert. Eine Präadsorptionskontrolle war nicht möglich, da kein Peptid zur Verfügung steht.

#### 2.4.6 Bilddokumentation

Alle Aufnahmen zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Antikörperfärbungen wurden im Nikon Imaging Center der Universität Heidelberg mikroskopiert und fotografiert. Verwendet wurden das aufrechte automatisierte Mikroskop Nikon Eclipse 90i mit einer gekühlten Schwarz-Weiß-Kamera (Nikon DS-1QM) und das aufrechte Mikroskop Nikon Eclipse 80i mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (Nikon DS-Qi1Mc). Aufgenommen wurden die Bilder mit dem 10x Objektiv und folgenden Filtersätzen:

Filtersatz 1 (DAPI)	Anregungsfilter:	340-380nm
	Dichroischer Spiegel:	400nm
	Emissionsfilter:	435-484nm
Filtersatz 2 (FITC)	Anregungsfilter:	465-495nm
	Dichroischer Spiegel:	505nm
	Emissionsfilter:	515-555nm
Filtersatz 3 (Texas Red Chroma 31004)	Anregungsfilter:	540-580nm
	Dichroischer Spiegel:	595nm
	Emissionsfilter:	600-660nm

Mit Hilfe der Software NIS-Elements, Version 2.30 build 325, wurden „Large Scans“ am Nikon Eclipse 90i angefertigt, die es ermöglichen einen kompletten Schnitt in einem Bild darzustellen.



## 2.5 Calcium Imaging Experimente

Eine Auswirkung der Entzündungsmediatoren auf die Spinalganglienzellen und deren Transduktionskanäle wurde auch in Calcium Imaging Experimenten untersucht. Hierfür wurden in den Versuchsreihen die Calciumindikatoren Fluo4-AM und Fluo5f-AM eingesetzt, die auf die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Intensitätszunahme des Fluoreszenzsignals reagieren. Dabei hat Fluo4-AM einen  $K_d$  von 345 nM und deshalb schon sehr geringe Calciumänderungen wahr. Fluo5F-AM dagegen ist weniger sensitiv ( $K_d = 2,3 \mu\text{M}$ ), detektiert jedoch Änderungen des intrazellulären Calciums, die ausreichen um den Calcium gesteuerten Chloridkanal zu öffnen. Alle Versuche fanden an Zellen statt, die wie in 2.2 beschrieben dissoziiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24-48 h kultiviert wurden.

### 2.5.1 Vorbereitung der Zellen

Vor den Messungen wurden die Zellen zunächst für 25 min. mit DNaseI-Lösung behandelt, um DNA-Reste von abgestorbenen Zellen zu entfernen. Dieser Schritt erleichtert die anschließende Beladung mit den Farbstofflösungen. Beide Farbstoffe wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die Zellen für 30-60 min. inkubiert. Alle Vorbereitungsschritte fanden dabei in den Zylindern im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt.

Für die Messung wurde das Deckglas in die Messkammer (RC-40LP und QE-1, Warner Instruments) eingebaut und diese mit 3 ml ES gefüllt. Die Kammer wurde so beheizt (*Dual Channel Bipolar Temperature Controller*, CL-200, Warner Instruments), dass die Lösung in der Kammer bei der Messung eine Temperatur zwischen 28 °C und 31 °C besaß.

In allen Calcium Imaging Experimenten wurde der Farbstoff mit Licht einer Wellenlänge von 493 nm angeregt (Polychrome 5000, TILL Photonics). Emittiert wurde das Licht durch einen Filterblock mit Dichroischem Spiegel bei 510 nm und einem Emissionsfilter bei 515-800 nm. Die Messungen wurden an einem Axiovert-200 Mikroskop von Zeiss durchgeführt und die Bilder mit einem 20x Objektiv (20x/NA0,75, Zeiss), einer gekühlten Kamera (*Sensi Cam 12 Bit cooled Imaging*, PCO Imaging) und dem Programm TILL Vision aufgenommen. Zur Synchronisation von Geräten und Computer wurde die Kontrolleinheit (ICU, TILL Photonics) eingesetzt. Das verwendete Perfusionssystem (PF8, *8 Channel Perfusion System*) stammt von E.S.F. electronic.

### **2.5.2 Direkte Stimulation mit Entzündungsmediatoren**

Die immunhistochemische Untersuchung der Rezeptorexpression für Entzündungsmediatoren gibt nur Aufschluss über deren Vorhandensein, jedoch kann so nicht geklärt werden, welche physiologischen Reaktionen die Mediatoren in den Zellen hervorrufen. Deshalb wurden die Reaktionen der Zellen auf die direkte Stimulation mit Entzündungsmediatoren mittels Calcium Imaging analysiert.

Die Zellen wurden wie in 2.6.1 vorbehandelt und mit 10  $\mu$ M Fluo4-AM beladen. Nach Aufnahme der Ruhefluoreszenz für 1min. bei einer Aufnahme Frequenz von 5 Sekunden (d.h. alle 5 s wird ein Bild aufgenommen), wurden die Entzündungsmediatoren hinzugegeben. Verwendet wurden dabei die Konzentrationen des *ex vivo* Entzündungsmodells. In den Experimenten wurden sowohl die komplette „Entzündungssuppe“ mit der Kombination aller Entzündungsmediatoren als auch die Einzelkomponenten getestet.

Direkt nach der Zugabe wurde für den Fall schneller Reaktionen für 5 min. alle 5 s ein Bild aufgenommen. Danach wurde die Aufnahme Frequenz auf 30 s erniedrigt und die Reaktion weitere 55 min. aufgenommen.

### **2.5.3 Aktivierung von Transduktionskanälen vor und nach der Behandlung mit Entzündungsmediatoren**

In allen bisherigen Experimenten fanden Kontrollmessungen und Behandlung an unterschiedlichen Zellen statt, die in der Auswertung dann miteinander verglichen wurden. Um jedoch die direkte Verhaltensänderung einer Zelle auf die Behandlung mit Entzündungsmediatoren zu beobachten, wurde ein Langzeitprotokoll entwickelt. Dieses erlaubt die gleichzeitige Behandlung und Aufnahme der Reaktionen in einer Messung.

Diese Experimente sollten zeigen, ob ein physiologischer Stimulus, in diesem Fall Capsaicin (0,5  $\mu$ M), eine Zelle mehrfach aktivieren kann und ob ausreichend Calcium in die Zelle fließt, um den Calcium-gesteuerten Chloridkanal zu öffnen. Zusätzlich wurde analysiert, welchen Einfluss die Behandlung mit Entzündungsmediatoren auf die Calciumreaktion hat.

Hierfür wurden die Zellen wie in 2.6.1 beschrieben vorbereitet und mit dem Farbstoff Fluo5f-AM (10  $\mu$ M) beladen, da dieser eine geringere Calciumsensitivität besitzt und nur Veränderungen in der Calciumkonzentration anzeigt, die auch ausreichen, um den Calcium-gesteuerten Chloridkanal zu öffnen.

### **Messprotokoll**

Zu Beginn der Messung wurde die Ruhefluoreszenz mit einer Frequenz von 5 s für 1 min. aufgezeichnet. Anschließend werden die Zellen für 2 min. mit 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin perfundiert (Aufnahmefrequenz 5 s). Im darauf folgenden Spülschritt (2 min., Frequenz 5 s) wurde das Capsaicin durch die Perfusion mit ES entfernt. Dieser Zyklus schließt die Kontrollreaktion ab. Darauf folgte eine Inkubation der Zellen in ES mit den Entzündungsmediatoren (EM) für 55 min. (Aufnahmefrequenz 1 min.). Hierbei wurde langsam perfundiert, um den Zellen immer wieder frische Lösung über den gesamten Zeitraum zuzuführen. Danach begann der nächste Zyklus, der dann die Reaktionen nach 1 h Behandlung aufnahm. Auch hier wurde wieder die Ruhefluoreszenz gemessen, dann mit Capsaicin stimuliert und mit ES gespült. Der Ablauf erfolgte wie für die Kontrollreaktion beschrieben und wiederholt anschließend auch für die zwei- und dreistündige Behandlung. Zwischen den Zyklen wurden ES und Entzündungsmediatoren langsam perfundiert. Nach dem letzten Zyklus wurde die Fluoreszenz für 30 min. gemessen.

In Versuchen mit Kontrollzellen wurde das gleiche Protokoll verwendet. Allerdings wurde zwischen den Zyklen nur mit ES und ohne Entzündungsmediatoren perfundiert.

### **2.5.4 Auswertung**

Für alle hier durchgeführten Calcium Imaging Experimente gilt: Als spezifische Reaktion einer Zelle auf einen Stimulus wurden solche Signale gewertet, deren Amplitude größer war, als die Amplitude des Rauschens in der Ruhefluoreszenz der gemessenen Zelle. Da sowohl Fluo4-AM als auch Fluo5f-AM keine ratiometrischen Farbstoffe sind, kann die Amplitude allerdings keine Aussage über die genaue Größe des Signals geben. Die Größe des Signals wird bei diesen Experimenten sowohl von Zellgröße, Beladungseffizienz, Kanalanzahl und -aktivität als auch von den Leckströmen bestimmt.

In den Experimenten aus Kapitel 2.5.2 wurde bewertet ob, die Zelle eine Reaktion auf die Perfusion mit Entzündungsmediatoren zeigt, wann diese Reaktion einsetzt und wie lange sie anhält. Die Messungen aus Kapitel 2.5.3 zeigen die Reaktionen einer Zelle auf Capsaicin vor und nach der Behandlung mit Entzündungsmediatoren. Die erste Reaktion wurde jeweils als Kontrolle verwendet, da noch keine Beeinflussung durch die Mediatoren stattgefunden hat, und spiegelt somit das Normalverhalten der Zelle auf Capsaicinstimulierung wider. In den Auswertungen wurde die erste Reaktion daher als 100 % gesetzt und die folgenden

Reaktionen für die Auswertung der Amplitude darauf bezogen. Dabei wurden nur die Zellen mit einer Reaktion in die Auswertung mit einbezogen. Als Amplitude wurde die Spanne von der minimalen bis zur maximalen Fluoreszenzänderung einer Reaktion gemessen. Im Fall der Anzahl reagierender Zellen wurde die Gesamtzahl der gemessenen Zellen bestimmt und die Zahl der Zellen mit Reaktion darauf bezogen und in Prozent angegeben. Die Werte der Zellen aus den Einzelmessungen wurden gemittelt und anschließend wurden diese Mittelwerte aller Messungen nochmals gemittelt. Daher sind die Werte der statistischen Auswertungen hier mit dem Fehler des Mittelwerts (se) angegeben. Zur Untersuchung der Signifikanz wurde ein Student-t-Test mit einer Signifikanzgrenze von  $p \leq 0,05$  verwendet.

Für alle Experimente wurden Kontrollmessungen durchgeführt, in denen jeweils das gleiche Messprotokoll verwendet wurde. Mit den Belichtungsmessungen sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Reaktionen der Zellen um Photoeffekte handelt. Bei der zweiten Form der Kontrollmessung wurden alle Perfusionsschritte mit ES durchgeführt, um mechanische Reaktionen der Zellen auf die Perfusionströme auszuschließen.

## 2.6 Chlorid Imaging Experimente

### 2.6.1 Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging-Mikroskopie (2P-FLIM)

Physiologische Untersuchungen zur Chloridhomöostase in der Zelle und zu Chloridsignalen nach Aktivierung des TRPV1-Kanals wurden mittels 2P-FLIM (*two-photon fluorescence-lifetime-imaging-microscopy*) durchgeführt. Zur Messung der intrazellulären Chloridkonzentration wurde der Farbstoff MQAE (N(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium Bromid, #E3101) verwendet, der bei 350 nm angeregt wird und dessen Fluoreszenzlebenszeit abhängig von der intrazellulären Chloridkonzentration ist.

#### A) Messprinzip

Vorteile dieser Messtechnik sind die Anregung des Farbstoffs MQAE durch zwei Photonen und die Auswertung der Fluoreszenz-Lebenszeit. Normalerweise wird der Transfer eines Elektrons auf ein freies, energiereicheres Orbital durch die Absorption eines Photons herbeigeführt, dessen Wellenlänge dem Absorptionsmaximum des angeregten Moleküls

entspricht. Nach einigen Nanosekunden kehrt das Elektron entweder durch Emission eines Fluoreszenzphotons oder durch die Abgabe von Wärme wieder in seinen Grundzustand zurück.

Da der in den hier durchgeführten Experimenten verwendete Chlorid sensitive Farbstoff MQAE Licht im hochenergetischen, kurzwelligigen Bereich (350 nm) absorbiert, kann es bei einer Ein-Photonenanregung zu Zellschäden kommen kann. Die auftretenden Photoschäden äußern sich häufig in der Zerstörung und Modifikation von Nukleinsäuren. Zur Vermeidung solcher Schäden wird bei der 2P-FLIM Methode das Elektron mit zwei Photonen niederer Energie (750 nm) angeregt. Das erste Photon versetzt das Elektron in einen „virtuell angeregten“ Zustand, der von kurzer Dauer ist (ca.  $10^{-16}$  s) und nicht zur Abgabe eines Fluoreszenzphotons ausreicht. Durch die Verwendung eines fokussierten, gepulsten Lasers kann das virtuell angeregte Elektron in der Fokusebene ein zweites Photon mit einer Wellenlänge von 750 nm absorbieren. Dadurch erhält das Elektron die Gesamtenergie von 350 nm und wird in den „echten angeregten“ Zustand (S1) versetzt. Die Anregung durch zwei niederenergetische Photonen vermindert Photoschäden außerhalb des Fokus, da die Anregung durch den verwendeten Laser auf das fokale Volumen begrenzt bleibt. Gleichzeitig erlaubt die Anregung mit niederenergetischem Licht eine tiefere Penetration ins Gewebe mit hoher Detektionseffizienz, da Streueffekte vermindert auftreten.

Als Fluoreszenzlebenszeit wird die Zeitspanne bezeichnet, die das Elektron im angeregten Zustand verweilt. Sie liegt im Bereich von 0,1-50 ns. Ihre Größe wird in der Zerfallsrate  $\tau$  angegeben. Im Gegensatz zu anderen Messmethoden, ist die Fluoreszenzlebenszeit allein von der intrazellulären Ionenkonzentration abhängig, nicht aber von Zellgröße, Beladung der Zelle oder Leckströmen.

Im Fall von MQAE bildet das Farbstoffmolekül im angeregten Zustand mit einem Chloridion einen transienten Komplex, wodurch das Elektron schneller wieder in seinen Grundzustand zurückkehrt und sich die Dauer der Fluoreszenz verkürzt. Je höher die Chloridkonzentration ist, desto kürzer ist die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$ . Über die Fluoreszenzlebenszeit eines Indikators kann somit die intrazelluläre Konzentration eines Ions bestimmt werden.

Die Fluoreszenzlebenszeit wird durch die exakte Messung des Zeitunterschieds zwischen zwei elektronischen Pulsen gemessen. Sendet der Anregungslaser einen Lichtblitz aus, wird die Probe angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht fällt auf einen Photodetektor, den PMT (*Photomultiplier tube*). Dort wird vom ersten ankommenden Photon ein Stoppsignal generiert und die zeitliche Differenz zwischen Anregungspuls und Stopppuls errechnet. Dieser Zyklus wird in einer Messung bis zu einer Million Mal wiederholt und die Zeitunterschiede

anschließend in einem Histogramm dargestellt (*time-correlated single-photon-counting*; TCSPC). Im Anschluss an eine Messung erhält man eine Fluoreszenz-Intensitäts-Abklingkurve, in der die Abklingrate  $\tau$ , das heißt die mittlere Fluoreszenzlebenszeit, ermittelt werden kann.

### **B) Aufbau des 2P-FLIM Messstandes**

Die Experimente wurden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (BX50,WI von Olympus) mit Wasser-Immersion-Objektiven mit 20x und 60x Vergrößerung durchgeführt. Das Anregungslicht wurde mit einem Titan-Saphir-Laser (Mira900, Coherent) generiert, der von einem Festkörper-Laser (Nd: Vanadate, Verdi, 5.5W, Coherent) mit zeitlich konstanter Leistung optisch unterstützt wird. Die Messungen wurden bei weniger als 10 % (2-5 mW) Laserleistung und Licht von 750 nm durchgeführt. Zur Generierung des Starpulses wurde ein kleiner Teil des Anregungslichtes auf eine schnelle Photodiode geleitet. Über einen Beamschanner (T.I.L.L. Photonics, München) ließ sich das auf die Probe treffende Anregungslicht sowohl in der x- als auch in der y-Ebene des Objektes bewegen. Die Detektion des Fluoreszenzlichtes geschah über ein PMT100 (Becker und Hickl, Berlin). Elektronik und Software für TCSPC und die Apparatur zur Messung der Fluoreszenzlebenszeit wurden von Becker und Hickl (Berlin) konstruiert. Die gesamte Messapparatur wurde unter der Anleitung von Dr. Thomas Gensch (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) in Zusammenarbeit mit TILL Photonics entworfen.

### **2.6.2 Experimente zur Chloridhomöostase in Spinalganglienzellen**

Die Chloridhomöostase der Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung von Chloridsignalen. Eine Behandlung mit Entzündungsmediatoren kann zu Änderungen in der intrazellulären Chloridkonzentration führen und damit vielleicht auch zu einer veränderten Signaltransduktion. Deshalb wurde in diesen Experimenten die intrazelluläre Chloridkonzentration bei unbehandelten und behandelten DRGs untersucht und verglichen.

#### **Messprotokoll**

Die Ratten für die 2P-FLIM-Experimente wurden in einem Becherglas mit 1 ml Isofluran (100 %, DeltaSelect, Dreieich) betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach der Dekapitierung wurden die Spinalganglien wie in Kapitel 2.1 beschrieben präpariert. Bis zur weiteren Behandlung wurden hier die Spinalganglien in eiskalter ACSF-Lösung aufbewahrt.

Präpariert wurden die Spinalganglien von den Positionen T7 (1 h Inkubation), T8 (2 h Inkubation) und T9 (3 h Inkubation) und als Pärchen behandelt (siehe Kapitel 2.1).

Alle Inkubationsschritte der Spinalganglien fanden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Die Inkubationszeit für MQAE (5 mM) betrug zwei Stunden. Für eine einstündige Behandlung der Spinalganglien mit Entzündungsmediatoren wurden sowohl die unbehandelte Spinalganglien als auch die behandelten DRGs eine Stunde mit MQAE in M10 beladen. Anschließend wurde die Lösung gewechselt und die behandelten Spinalganglien wurden eine weitere Stunde in M10 mit Entzündungsmediatoren (M10E) und MQAE inkubiert, während die unbehandelten DRGs in M10 mit MQAE aufbewahrt wurden.

Im Fall der zweistündigen Behandlung mit Entzündungsmediatoren, wurden die unbehandelten DRGs zwei Stunden in M10 mit MQAE beladen und die behandelten Spinalganglien in M10E und MQAE. Um drei Stunden mit Entzündungsmediatoren zu behandeln, wurde zunächst eine Stunde in M10 für die Kontrolle, beziehungsweise M10E für die Behandlung, inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gewechselt und es wurde zwei Stunden in M10 mit MQAE oder M10E mit MQAE beladen.

Nach Behandlung und Beladung wurden die Spinalganglien für die Messung in 4 % Agarose fixiert und in Natrium-Bicarbonat-Puffer (NBP) aufbewahrt, der durch die ständige Perfusion mit 95 % O<sub>2</sub> – 5 % CO<sub>2</sub> auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde. Die Verwendung eines Bicarbonat-Puffers spielt eine wichtige Rolle, da so die Bicarbonat-Transporter einer Zelle aktiv bleiben. Diese Transporter tragen entscheidend zur Chloridhomöostase in der Zelle bei, da sie im Austausch von Bicarbonat auch Chlorid transportieren (Nickell et al., 2006; Nickell et al., 2007).

Für die Messung wurde zunächst eine Stelle mit Zellkörpern gesucht und anschließend die Beladung der Zellen in verschiedenen z-Ebenen im Fluoreszenzmodus überprüft. Für die Messung der Fluoreszenzlebenszeit wurden jeweils drei z-Ebenen im Abstand von 40 µm gescannt, um die doppelte Messung von Zellen auszuschließen, und mit dem 60x Objektiv aufgenommen.

### 2.6.3 Chloridsignale nach Capsaicinstimulierung

Es ist bisher nicht erforscht, ob die somatosensorischen Zellen der Spinalganglien auf einen physiologischen Stimulus hin Chloridsignale produzieren. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit in 2P-FLIM-Experimenten intakte Spinalganglien mit 5  $\mu\text{M}$  Capsaicin stimuliert und Veränderungen in der intrazellulären Chloridkonzentration mittels dem Chloridsensor MQAE gemessen. Dabei wurden sowohl unbehandelte als auch DRGs nach 3 h Behandlung analysiert.

#### Messprotokoll

Für die Versuche wurden Ratten im Alter von ca. 8 Wochen mit 1 ml Isofluran im Becherglas betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Präpariert wurden die Spinalganglien der Positionen T7-T9 (siehe Kapitel 2.1), wobei T7 und T8 für Kontrollmessungen und Messungen an unbehandelten DRGs verwendet wurden. Die Spinalganglien der Position T9 wurden für drei Stunden mit Entzündungsmediatoren inkubiert und anschließend gemessen.

Alle Messungen fanden daher an ungepaarten DRGs statt.

Bis zur Beladung oder Behandlung wurden die Spinalganglien in eiskalter ES aufbewahrt. Die unbehandelten Spinalganglien wurden im Anschluss an die Präparation für eine Stunde mit 5 mM MQAE im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> beladen und dann für die Messung in 4 % Agarose eingebettet und mit Natrium-Bicarbonat-Puffer (NBP; pH 7,4) umspült. Behandelte DRGs wurden zunächst zwei Stunden mit M10 und den Entzündungsmediatoren (M10E) und anschließend für eine Stunde mit den M10E und 5 mM MQAE im Inkubator inkubiert. Auch sie wurden für die Messung in 4 % Agarose eingebettet und mit NBP umspült. Zunächst wurde eine Stelle mit gut beladenen Zellen in einer Tiefe von 50-100  $\mu\text{m}$  Tiefe mit dem 20x Objektiv gesucht. Die Beladung wurde in Fluoreszenzaufnahmen überprüft und *Scans* der gemessenen Position wurden für die spätere Auswertung gespeichert. Danach wurde zuerst die Ruhelebenszeit der Zellen gemessen und dann, sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten DRGs, die Messlösung (5  $\mu\text{M}$  Capsaicin in NBP, pH 7,4) appliziert. Direkt danach wurde die Lebenszeit zum zweiten Mal aufgenommen. Anschließend wurde die Lebenszeit für 25 min. im Abstand von jeweils 5 min. gemessen. Das Capsaicin blieb über die gesamte Messung hinweg in der Messkammer.

Für die Kontrollmessungen wurde NBP in die Kulturschale pipettiert, um die Reaktion der Zellen auf die mechanische Belastung der Lösungszugabe zu testen. Gleichzeitig erlaubt dies



die Bestimmung der Schwelle, welche die Reaktion auf die Capsaicinzugabe als spezifisch definiert.

### 2.6.4 Datenanalyse

Die Auswertung der Fluoreszenzlebenszeiten erfolgte mit den Programmen Becker und Hickel, sowie ImageJ. Dabei wurden die Daten eines optischen Schnittes zunächst an die Messparameter angepasst und es wurde die Qualität der *Fits* für die Fluoreszenzlebenszeiten der Zellen überprüft. Dann wurde das Fluoreszenzbild in eine Matrize umgewandelt, in der die Zellen erkennbar sind, jedoch ist jedem Pixel nun die entsprechende Fluoreszenzlebenszeit und nicht die Fluoreszenzintensität zugeordnet. Durch markieren der äußeren Zellgrenzen konnte in ImageJ die mittlere Fluoreszenzlebenszeit einer Zelle bestimmt werden. Allerdings wurde der Zellkern bei der Auswertung ignoriert, da er mit MQAE anders reagiert als das Cytoplasma.

Für die Untersuchung der Chloridhomöostase wurden wie unter 2.4.4 beschrieben Häufigkeitsverteilungen der mittleren Fluoreszenzlebenszeiten aller Zellen eines optischen Schnittes gebildet und deren Mittelwerte über eine Gauss-Funktion ermittelt. Diese Mittelwerte wurden dann zwischen unbehandelten und behandelten Spinalganglien aus dem gleichen Tier und der gleichen Position verglichen. Für die Auswertung nach einer Stunde Inkubation wurden 126 unbehandelte und 102 behandelte Zellen bewertet. Nach zwei Stunden Behandlung waren es 88 unbehandelte und 107 behandelte Zellen und nach drei Stunden 151 Kontroll- und 152 entzündete Zellen. Für jede Inkubationszeit wurden jeweils DRG-Pärchen aus drei verschiedenen Tieren gemessen. Die Ergebnisse sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

In den Experimenten zur Stimulation mit Capsaicin wurde die auszuwertende Zelle im Fluoreszenzscan markiert, da diese Bilder hochauflösend sind und eine bessere Abgrenzung der Zellen voneinander erlauben. Die Markierung wurde dann mittels einer Funktion („*Redirect to*“ in „*Set Measurements*“) in ImageJ auf die Fluoreszenzlebenszeitbilder übertragen. Somit konnte von jedem Zeitpunkt der Messreihe und genau der gleichen Position die Lebenszeit bestimmt und als Graph dargestellt werden (siehe Seiten 68 und 70).

Zunächst wurde hier die Reaktion der Zellen auf die Zugabe von NBP ausgewertet. Dafür wurde die maximale Änderung der Fluoreszenzlebenszeit über den Messverlauf jeder einzelnen Zelle bestimmt, wobei zwischen Chlorideinstrom (Abnahme der Lebenszeit) und Chloridausstrom (Zunahme der Lebenszeit) unterschieden wurde. Die Werte aller Zellen für

jeweils Chlorideinstrom und –ausstrom wurden gemittelt. Die resultierenden Mittelwerte wurden als Schwellenwert gesetzt. Im Fall der Capsaicinstimulation musste daher die Änderung der Lebenszeit über den Messverlauf größer sein als der Schwellenwert, um als spezifisches Signal auf den Stimulus gewertet zu werden. Auch hier wurde die Änderung der Lebenszeit für jede Zelle gemessen und zwischen Einstrom und Ausstrom unterschieden. Die Werte eines DRGs wurden dann gemittelt. Die Werte für Einstrom und Ausstrom aus den jeweils behandelten, beziehungsweise unbehandelten Spinalganglien wurden wieder gemittelt und sind mit dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Standardabweichung wurde für die Berechnung der Anzahl der Zellen mit Einstrom und Ausstrom verwendet, die in Bezug auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen und in Prozent angegeben werden. Insgesamt wurden 1032 Zellen aus 4 unbehandelten und 692 Zellen aus 3 behandelten Spinalganglien aus drei verschiedenen Tieren ausgewertet. Die Prüfung auf Signifikanz der Änderungen zwischen unbehandelten und behandelten Spinalganglien wurde mittels eines Student-t-Tests mit einer Grenze von  $p \leq 0,05$  durchgeführt. Auch die Änderung der Lebenszeit nach Capsaicinstimulierung in Bezug zur Ruhelebenszeit wurde ermittelt. Damit sollte überprüft werden, ob Zellen mit niedriger intrazellulärer Chloridkonzentration starke Einströme und solche mit hoher Chloridkonzentration starke Ausströme zeigen, und somit die Ruhelebenszeit auf die Richtung des Chloridstroms hinweist.

## 2.7 Lösungen

### Puffer-Lösungen und Medien

ES	140 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Glucose 10 mM HEPES pH 7,4
ACSF	120 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM Glucose 10 mM HEPES pH 7,4
Natrium-Bicarbonat-Puffer (NBP)	120 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM NaHCO <sub>3</sub> 25 mM Glucose mischen und dann 1 mM MgCl <sub>2</sub> aus einer 1 M Stammlösung 2 mM CaCl <sub>2</sub> aus einer 1 M Stammlösung tropfenweise zugeben pH 7,4 (durch Begasung mit 95 % O <sub>2</sub> und 5 % CO <sub>2</sub> )
PBS	130 mM NaCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O pH 7,4

---

M10	500 ml MEM (SIGMA, #M2279) 50 ml FBS (SIGMA, #F7524) 5 ml Glutamin-Penicillin-Streptomycin (SIGMA, #G6784) 5 ml <i>non-essential Amino-Acids</i> (SIGMA, #M7145)
Citrat-Puffer (10 mM)	8,2 mM Zitronensäure (Stocklösung 100mM) 1,8 mM Natriumcitrat (Stocklösung 100mM) pH 6
<b>Primärkultur</b>	
Poly-L-Lysin- Lösung	Stocklösung 1 mg/ml (SIGMA, #P-1399) Gebrauchslösung 0,1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Laminin-Lösung	Stocklösung 200 µg/ml in PBS Gebrauchslösung 20 µg/ml in PBS
Collagenase-Lösung	0,3 % Collagenase (SIGMA, #C-9891) in DMEM (Gibco, #31966)
Trypsin-Lösung	gebrauchsfertig (SIGMA, #T-1426)
DNaseI-Lösung	0,4 mg/ml DNaseI (SIGMA, #DN25) in ES
<b>Entzündungsmodell</b>	
NGF-Lösung	Stocklösung 10 µg/ml in PBS + 0,1 % BSA Gebrauchslösung 100 ng/ml in M10 oder ES
ATP-Lösung	Stocklösung 1,8 mM in H <sub>2</sub> O Gebrauchslösung 1,8 µM in M10 oder ES
Bradykinin-Lösung	Stocklösung 0,9 mM in H <sub>2</sub> O Gebrauchslösung 0,9 µM in M10 oder ES

PGE <sub>2</sub> -Lösung	Stocklösung 2,8 mM in 100 % Ethanol Gebrauchslösung 1,4 µM in M10 oder ES
<b>Vitalitätstests</b>	
Propidiumiodid	1,5 µM (SIGMA, #P4170) in ES
C <sub>12</sub> -Resazurin	LIVE/DEAD <sup>®</sup> Cell Vitality Assay Kit von Invitrogen 10 µM (Invitrogen, #L34951) in 1 mM Probenecid-ES
Probenecid-ES	1 mM Probenecid in ES, pH 7,4
<b>Immunhistochemie</b>	
Paraformaldehyd	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
C-Lösung	5 % (v/v) ChemiBLOCKER (Chemicon, #2170-S) in PBS
CT-Lösung	5 % (v/v) ChemiBLOCKER 0,5 % (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100 in PBS
10% Saccharose-Lösung	10 % (w/v) Saccharose 0,05 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS
30% Saccharose-Lösung	30 % (w/v) Saccharose 0,05 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS
DAPI-Lösung	Stocklösung 90 µM 4,6-Diamidino-2-phenylindol in PBS Gebrauchslösung 0,3 µM DAPI in PBS
<b>Calcium-Imaging</b>	
ATP-Lösung	Stocklösung 100 mM in H <sub>2</sub> O Gebrauchslösung 100 µM in ES

Capsaicin-Lösung	Stocklösung 5 mM in 100 % DMSO Gebrauchslösung 5 µM in ES, bzw. 0,5 µM in ES
Fluo4-AM-Lösung	Stocklösung 10 mM Fluo4-AM (Molecular Probes, #F14201) in 4,5 µl 100 % DMSO Gebrauchslösung 10 µM in ES
Fluo5f-AM-Lösung	Stocklösung 10 mM Fluo5f-AM (Molecular Probes, #F14222) in 4,5 µl 100 % DMSO Gebrauchslösung 10 µM in ES
DNaseI-Lösung	siehe Primärkultur
<b>Chloridimaging</b>	
MQAE-Lösung	Stocklösung 500 mM MQAE (Molecular Probes, #E3101) in ddH <sub>2</sub> O Gebrauchslösung 5 mM in M10
Capsaicin-Lösung	Stocklösung 5 mM in 100 % DMSO Gebrauchslösung 5µM in Natrium-Bicarbonat-Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Appli-Chem GmbH (Darmstadt), Neolab Migge (Heidelberg), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemie GmbH (Steinheim), Chemicon (Temecula/CA), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma Aldrich Chemikalien GmbH (Steinheim), Riedel de Haen GmbH (Seelze), Polysciences Inc. (Washington/USA) bezogen. Zum Ansetzen von Puffer und Lösungen wurde destilliertes Wasser oder Wasser aus der Anlage Milli-Q<sup>UF</sup> Plus der Firma Millipore (APS Water Services Inc., Van Nuys, CA, USA) verwendet.

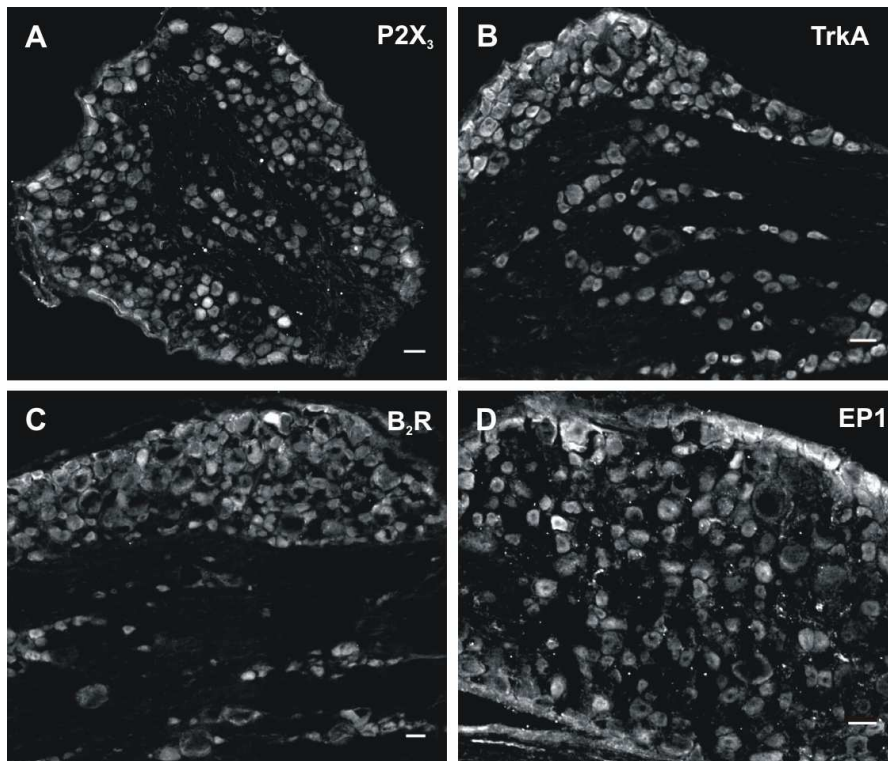
## 3 Ergebnisse

Im ersten Kapitel des Ergebnisteils (3.1) werden die Ergebnisse zur Etablierung des *ex vivo* Entzündungsmodells durch immunhistochemische Untersuchungen, Vitalitätstests und Calcium Imaging Experimente besprochen. Kapitel 3.2 beschreibt die Verteilung von Transduktionskanälen in verschiedenen Spinalganglien und die Beeinflussung ihrer Expression durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren. Zusätzlich wird gezeigt, dass Entzündungsmediatoren die Aktivierbarkeit des TRPV1-Kanals erhalten. Den Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die intrazelluläre Chloridkonzentration und die Regulation der Chloridhomöostase durch die Transporter NKCC1 und KCC2 beschreiben die Ergebnisse in Abschnitt 3.3 und 3.4. Der Zusammenhang zwischen Transduktionskanälen und Chloridsignalen in Spinalganglienzellen wird in den Kapiteln 3.5 und 3.6 erklärt. In 3.5 wird die Expression des Calcium-gesteuerten Chloridkanals TMEM16A in Spinalganglienzellen nachgewiesen. Dass eine Stimulierung mit Capsaicin Chloridsignale induziert und diese ebenfalls durch Entzündungsmediatoren beeinflusst werden, beschreibt Abschnitt 3.6.

### 3.1 Etablierung des *ex vivo* Entzündungsmodells

#### 3.1.1 Spinalganglienzellen exprimieren funktionelle Rezeptoren für Entzündungsmediatoren

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, mit dem die Interaktionen zwischen Entzündungsmediatoren und somatosensorischen Zellen untersucht werden kann. In dem hier entwickelten *ex vivo* Entzündungsmodell (Kapitel 1.4) wurden die Entzündungsmediatoren ATP, NGF, Bradykinin und Prostaglandin E<sub>2</sub> verwendet. Immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten von Rattenspinalganglien zeigen, dass die Zellen der Ganglien die Rezeptoren für diese Mediatoren exprimieren (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1:** Expression der Rezeptoren für Entzündungsmediatoren in Rattenspinalganglien.

A: P2X<sub>3</sub> Rezeptor für ATP. B: TrkA-Rezeptor für NGF. C: B<sub>2</sub>R-Rezeptor für Bradykinin. D: EP1-Rezeptor für PGE<sub>2</sub>.

Erstantikörper jeweils 1:20. Zweitantikörper: A488dkarb und A488dkagt, jeweils 1:500. 14 µm Kryoschnitte. Größenbalken 50 µm. 10x Objektiv.

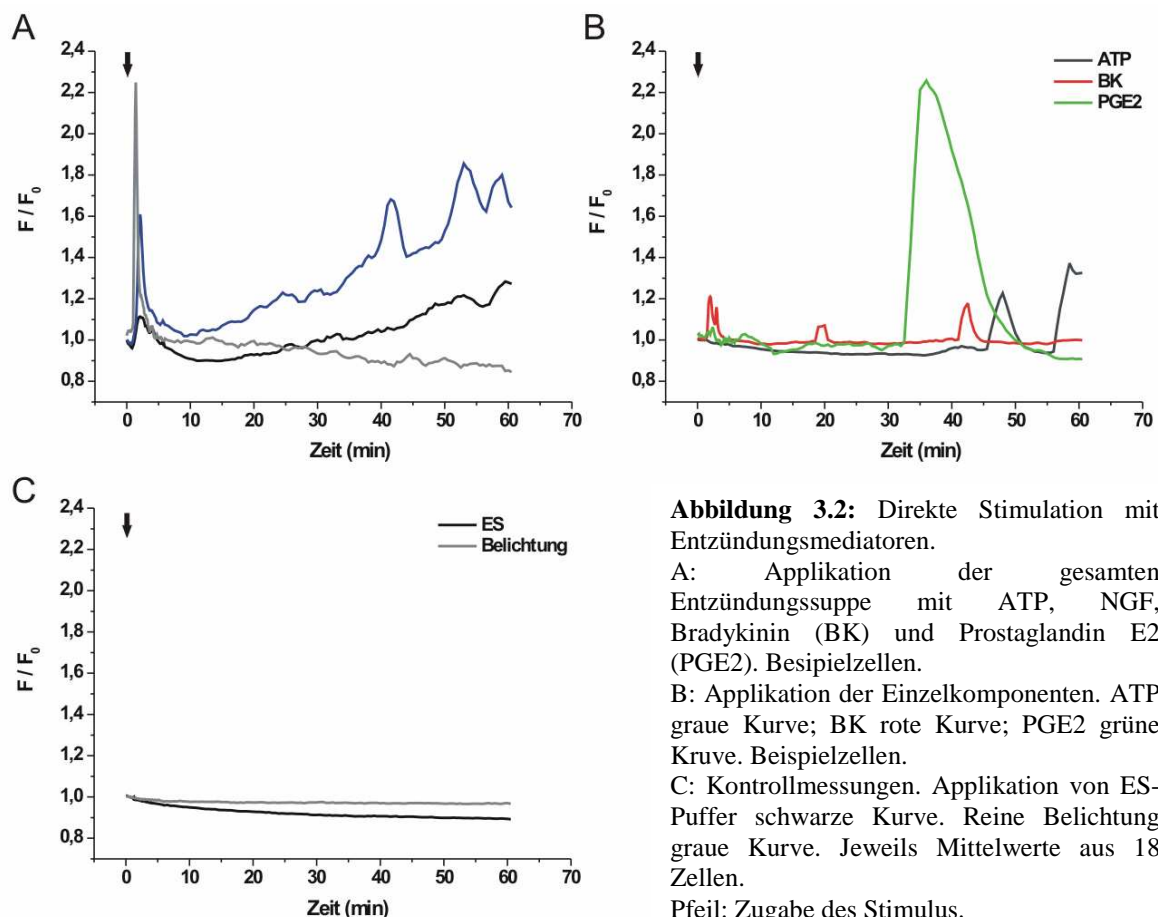
Funktionell wurde die Reaktion isolierter DRG-Neurone auf Entzündungsmediatoren in Calcium Imaging Experimenten mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fluo4-AM (10 µM) überprüft. Dieser Farbstoff reagiert auf eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (F). Die Zellen wurden mit der im *ex vivo* Entzündungsmodell verwendeten Entzündungssuppe (Kapitel 1.4) stimuliert. Gemessen wurde die Änderung der Fluoreszenz (F) in Bezug auf die Ruhefluoreszenz (F<sub>0</sub>). Dabei sind schnelle Reaktionen direkt nach Zugabe (Pfeil) der Entzündungssuppe zu erkennen, die wenige Minuten dauern (Abb. 3.2 A). Gleichzeitig sind auch langsame Calciumanstiege zu beobachten die erst zehn Minuten nach der Stimulation beginnen und sich über die gesamte Messdauer hinziehen (Abb. 3.2 A, schwarze und blaue Kurve). Eine Zelle (blau) zeigte zusätzlich kurze Calciumeinströme über der stetig steigenden Calciumkonzentration nach 40 Minuten und 50 Minuten Inkubation.

Um zu klären, ob auch die Einzelkomponenten der Entzündungssuppe in der Lage sind, Calciumreaktionen hervorzurufen, wurden diese in weiteren Experimenten gesondert appliziert. ATP in einer Konzentration von 1,8 µM verursachte kurze Calciumeinströme nach



einer Inkubationszeit von 45 – 55 Minuten (Abb. 3.2 B, graue Kurve). Bradykinin (BK, 0,9  $\mu\text{M}$ ) hingegen erzeugte über den gesamten Messverlauf hinweg immer wieder mehrere Minuten andauernde Calciumsignale (Abb. 3.2 B, rote Kurve). Auch bei Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 1,4  $\mu\text{M}$ ) wurden mehrere Reaktionen über die gesamte Messung aufgezeichnet (Abb. 3.2 B, grüne Kurve). Die stärkste Reaktion wurde erst nach 30 minütiger Inkubation hervorgerufen und dauerte ungefähr 25 Minuten. Nur auf die Stimulation mit NGF (100 ng/ml) erfolgte keine Calciumreaktion. Die Substanzen blieben sowohl in diesen als auch in den vorangegangenen Messungen über die gesamte Messdauer in der Messkammer. Die Kontrollmessungen (ES, Licht) beweisen, dass die beobachteten Reaktionen auf die Stimulation mit Entzündungsmediatoren zurückzuführen sind und schließen eine Reaktion auf die mechanische Belastung der Lösungszugabe und Photoeffekte aus (Abb. 3.2 C). Durch Ausbleichen des Farbstoffs nimmt die Fluoreszenzintensität um 5-10 % über den Messverlauf hinweg ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Spinalganglienzellen Rezeptoren für die hier verwendeten Entzündungsmediatoren exprimieren und bei Stimulierung mit unterschiedlichen Calciumsignalen reagieren. Somit ist eine Beeinflussung der Signaltransduktion in den Neuronen durch die Entzündungsmediatoren möglich.



**Abbildung 3.2:** Direkte Stimulation mit Entzündungsmediatoren.

A: Applikation der gesamten Entzündungssuppe mit ATP, NGF, Bradykinin (BK) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Beispielzellen.

B: Applikation der Einzelkomponenten. ATP graue Kurve; BK rote Kurve; PGE<sub>2</sub> grüne Kurve. Beispielzellen.

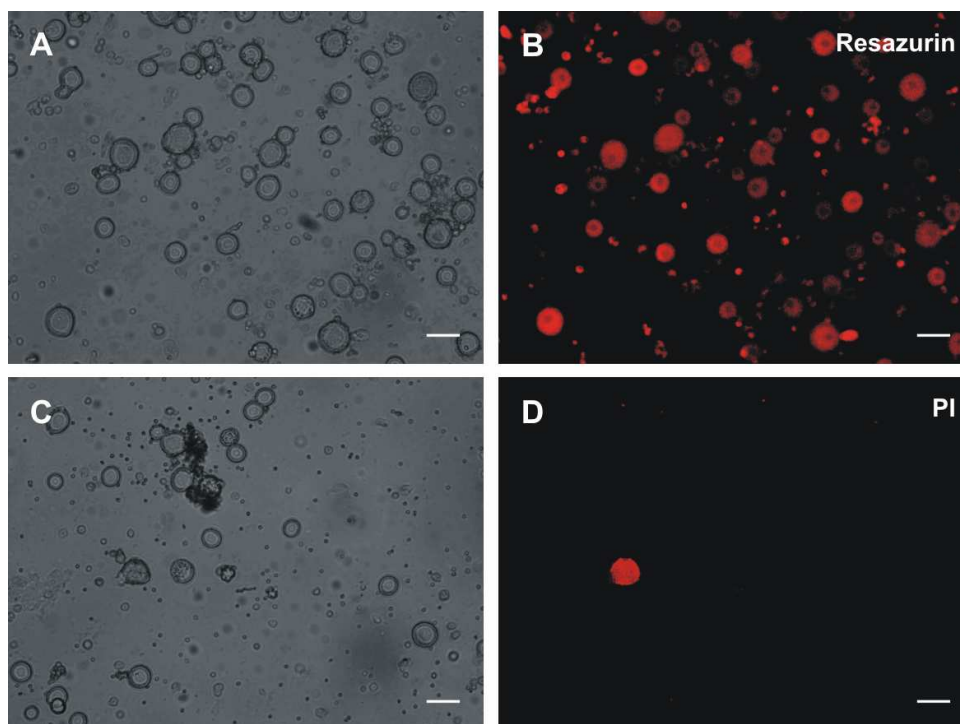
C: Kontrollmessungen. Applikation von ES-Puffer schwarze Kurve. Reine Belichtung graue Kurve. Jeweils Mittelwerte aus 18 Zellen.

Pfeil: Zugabe des Stimulus.

### 3.1.2 Spinalganglienzellen überleben die Behandlung mit Entzündungsmediatoren

Zum Nachweis der Überlebensfähigkeit von Spinalganglienzellen im *ex vivo* Entzündungsmodell wurden zwei Vitalitätstests durchgeführt. Beide Nachweise wurden sowohl an Lebendgewebeschnitten als auch an Zellen der Primärkultur durchgeführt. Lebende Zellen wurden durch Resazurin (10  $\mu\text{M}$ ) dargestellt, das durch NADH zum rotfluoreszierenden Resorufin reduziert werden muss. Tote Zellen dagegen wurden mittels Propidiumiodid (PI, 1,5  $\mu\text{M}$ ) markiert. Es kann nur über die poröse Membran toter Zellen in den intrazellulären Raum eindringen und sich in die DNA einlagern.

Abbildung 3.3 zeigt Aufnahmen der Primärkultur nach dreistündiger Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell. Sowohl der Lebendtest als auch der Test mit PI weisen die Überlebensfähigkeit von 96-97 % der Neurone nach drei Stunden Inkubation nach. Inkubationszeiten von 3,5 - 4 Stunden führten allerdings zu einem Verlust von 50 % der lebenden Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.3:** Vitalitätstests an der Primärkultur nach 3 h Inkubation.

A und B: Lebendtest mit Resazurin (10  $\mu\text{M}$ ). Resazurin muss im Stoffwechsel reduziert werden um seinen fluoreszierenden Zustand zu erlangen.

A: Durchlichtaufnahme. B: Fluoreszenzbild.

C und D: Tottest mit Propidiumiodid (PI; 1,5  $\mu\text{M}$ ). PI kann nur die poröse Membran toter Zellen überqueren, die dann durch ein Fluoreszenzsignal markiert werden. C: Durchlichtaufnahme. D: Fluoreszenzbild.

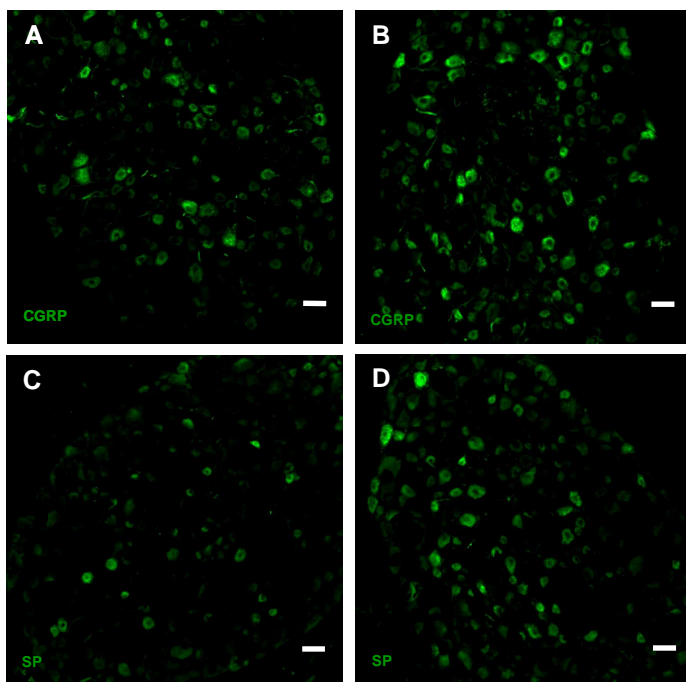
Zellen 24 h in Kultur. Größenbalken: 50  $\mu\text{m}$ . 10x Objektiv.

Daher wurden die Spinalganglien und Zellen der Primärkultur in den Experimenten der vorliegenden Arbeit maximal drei Stunden mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell behandelt.

Die Untersuchungen an Lebendgewebeschnitten zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier überlebten über 90 % der Zellen eine Inkubation von drei Stunden. Längere Inkubationszeiten führten ebenfalls zum schnellen Absterben der Zellen.

### 3.1.3 Die Reaktion auf die Behandlung mit Entzündungsmediatoren ist vergleichbar mit physiologischen Entzündungsreaktionen

*Substance P* (SP) und *Calcitonin Gene related Peptide* (CGRP) gelten als Entzündungsmarker, da sie in einer Entzündung verstärkt ausgeschüttet werden und ihre Expression hochreguliert wird (Bulling et al., 2001; Kuniyoshi et al., 2007; Staton et al., 2007). Um die Vergleichbarkeit zu physiologischen Entzündungsprozessen zu untersuchen, wurde zur Etablierung des *ex vivo* Entzündungsmodells die Expression der beiden Peptide in unbehandelten und behandelten Spinalganglien (DRG-Pärchen) mittels immunhistochemischer Experimente verglichen.



**Abbildung. 3.4:** Die Expression von Entzündungsmarkern in Rattenspinalganglien nach 2 h Inkubationszeit.

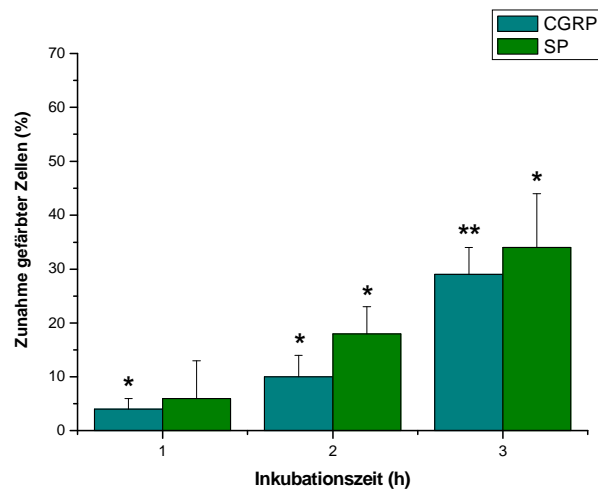
A und C: unbehandelte DRGs.  
 B und D: behandelte DRGs.  
 A und B: CGRP 1:50.  
 C und D: *Substance P* (SP) 1:50.  
 Zweitantikörper A488dkarb, 1:500.  
 Größenbalken; 50  $\mu\text{m}$ . 14  $\mu\text{m}$  Kryoschnitte.  
 Objektiv 10x.

Hierbei wurde die Anzahl der Zellen ermittelt, welche die Entzündungsmarker exprimieren. Abbildung 3.4 zeigt die immunhistochemische Färbung unbehandelter Schnitte (A und C) im Vergleich zu behandelten Schnitten (B und D) nach zwei Stunden Inkubation. Schon hier wird deutlich, dass nach der Inkubation mit Entzündungsmediatoren mehr Zellen *Substance P* und CGRP exprimieren.

Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung, die in Kapitel 2.4.4 detailliert beschrieben ist. In

unbehandelten Spinalganglien exprimieren 33 % der Zellen SP und 35 % der Zellen CGRP. Bereits nach einstündiger Inkubation mit Entzündungsmediatoren nimmt die Anzahl CGRP-exprimierender Zellen im Vergleich zu unbehandelten DRGs signifikant um 4 % ( $\pm 2$ ) zu. Auch die Zahl der SP positiven Zellen steigt um 6 % ( $\pm 7$ ). Nach zwei Stunden Behandlung ist die Zunahme gegenüber der Kontrolle in beiden Fällen signifikant (CGRP: 10 %  $\pm 4$ ; SP: 18 %  $\pm 5$ ). Eine weitere Zunahme in der Anzahl Substance P (34 %  $\pm 10$ ) und CGRP (29 %  $\pm 5$ ) positiver Zellen ist nach 3h Inkubation zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen die Experimente zur Etablierung des *ex vivo* Entzündungsmodells, dass die meisten Zellen der Spinalganglien Rezeptoren für die Entzündungsmediatoren exprimieren und diese auf direkte Stimulation durch die Mediatoren mit einem Calciumeinstrom reagieren (Kapitel 3.1.1). Durch die Vitalitätstests konnte nachgewiesen werden, dass 96 % - 97 % der Zellen eine Behandlung mit Entzündungsmediatoren für drei Stunden überleben. In den folgenden Experimenten wurden daher alle Versuche nach maximal dreistündiger Inkubation durchgeführt (Kapitel 3.1.2). Die statistische Analyse der Anzahl CGRP und SP exprimierender Zellen weist signifikante Anstiege schon nach einstündiger Inkubation im Fall von CGRP und nach 2 h für SP nach (Kapitel 3.1.3). Trotz der *ex vivo* Bedingungen zeigen die Zellen daher ein ähnliches Verhalten auf den Kontakt mit Entzündungsmediatoren, wie es auch in physiologischen Entzündungen zu beobachten ist.



**Abbildung 3.5:** Zunahme CGRP- und SP-gefärbter Zellen in 9 behandelten DGRs im Vergleich zu 9 unbehandelten Spinalganglien. Zunahme in Prozent nach 1, 2 und 3 Stunden Inkubation.

Blau: CGRP. Grün: SP. Signifikanzkriterien:

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

## 3.2 Beeinflussung der Expression von Transduktionskanälen durch Entzündungsmediatoren

Nach der Etablierung des Modells wurde zunächst der Einfluss der Entzündungsmediatoren auf die Expression unterschiedlicher Transduktionskanäle untersucht. Verschiedene Studien zeigen, dass eine Entzündung die Expression und Aktivität von Transduktionskanälen beeinflussen kann (Amaya et al., 2004; Ji et al., 2002; Mamet et al., 2003; Shimosato et al., 2005; Zhang et al., 2005). In Experimenten mit DRG-Pärchen der Positionen T7-T9 und L3-L5, sollte nun untersucht werden, ob auch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren zu einer Beeinflussung Expression der Transduktionkanäle TRPV1, TRPV2, TRPV4, ASIC3 und P2X<sub>3</sub> in intakten Spinalganglien führt. Dabei wurde sowohl die Einzelexpression als auch die Co-Expression verschiedener Transduktionskanäle mit TRPV1 analysiert.

### Einzelexpression

Die Abbildungen 3.6 bis 3.8 zeigen, dass alle der hier untersuchten Transduktionskanäle in den Spinalganglien exprimiert werden. Ebenso wurde die Co-Expression aller hier untersuchten Kanäle mit TRPV1 nachgewiesen. Insgesamt wurden Färbungen aus 18 unbehandelten Spinalganglien von drei verschiedenen Tieren analysiert.

Die Expression der Transduktionskanäle ist dabei sehr unterschiedlich und hängt von der Position des verwendeten Spinalganglions ab (Abb. 3.6). Eine Ausnahme stellt der TRPV1-Kanal dar. Er wird mit einer Verteilung von 32,5% bis 37% in thorakalen und lumbalen Spinalganglien sehr gleichmäßig exprimiert. Im Vergleich zu den anderen Kanälen kommt er zudem am häufigsten vor. Der ASIC3-Kanal wird im Gegensatz dazu nur von durchschnittlich 11% der Zellen exprimiert und die Expression zeigt eine eindeutige Abhängigkeit der Spinalganglienposition.

Der Einfluss der Entzündungsmediatoren auf die Expression der Transduktionskanäle ist in der Abbildung 3.6 dargestellt (je 9 unbehandelte und 9 behandelte Spinalganglien für den thorakalen und den lumbalen Bereich). Die Abbildungen zeigen jeweils die Anzahl der gefärbten Zellen in Prozent für verschiedene Transduktionskanäle. Die grauen Balken stehen dabei für unbehandelte Zellen und die schwarzen Balken für behandelte Spinalganglien. Gezeigt werden die Ergebnisse nach einer, zwei und drei Stunden Inkubation.

Nach einstündiger Behandlung bleibt die Expression aller Kanäle im thorakalen und im lumbalen Bereich unbeeinflusst. Erst nach zwei Stunden Behandlung ist eine signifikante Steigerung der Expression von TRPV1 in beiden Bereichen und von TRPV2 in den

thorakalen Spinalganglien zu erkennen. Die Anzahl TRPV1 exprimierender Zellen wird durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren im thorakalen Bereich von 36 % auf 41,5 % erhöht und im lumbalen Bereich von 32,5 % auf 37,5 %. Auch wurden 4,5 % mehr TRPV2 positive Zellen in den T8 DRGs nachgewiesen.

Nach dreistündiger Behandlung steigt die Anzahl TRPV1 und TRPV2 exprimierender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Spinalganglien weiter an. Die Zunahmen von 8,5 % (T9) und 9 % (L5) für TRPV1 sind höchstsignifikant und auch für TRPV2 sind jetzt in beiden Bereichen hochsignifikante Anstiege (8 % und 10 %) zu erkennen. Zudem wird der ASIC3 Kanal nach drei Stunden Inkubation mit den Entzündungsmediatoren von mehr Zellen exprimiert. Die Zunahme ASIC3 positiver Zellen im thorakalen Bereich von 3 % ist signifikant, während der Anstieg von 5 % im L5 DRG sogar höchstsignifikant ist.

Sowohl für TRPV4 als auch für P2X<sub>3</sub> konnte keine eindeutige Beeinflussung der Kanalexpression nachgewiesen werden. Zwar wurden nach drei Stunden in beiden Bereichen mehr P2X<sub>3</sub> positive Zellen gefärbt, allerdings war der Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Spinalganglien nicht signifikant. Der Anstieg TRPV4 exprimierender Zellen um 4,5 % nach drei Stunden in L5 ist ebenfalls nicht eindeutig.

### **Co-Expression mit TRPV1**

Neben dem Einfluss auf die Einzelexpression wurde auch die Beeinflussung der Co-Expression verschiedener Transduktionskanäle mit dem TRPV1-Kanal untersucht (Abbildung 3.7). Verglichen wurden für jeden Bereich 9 unbehandelte und 9 behandelte DRGs. Die Co-Expression mehrerer Kanäle spielt ebenfalls eine Rolle in Entzündungsprozessen, da die Expression unterschiedlicher Kanäle es der Zelle erlaubt auf verschiedene Schmerzreize zu reagieren. Die kann ebenfalls zu einer gesteigerten Schmerzwahrnehmung beitragen.

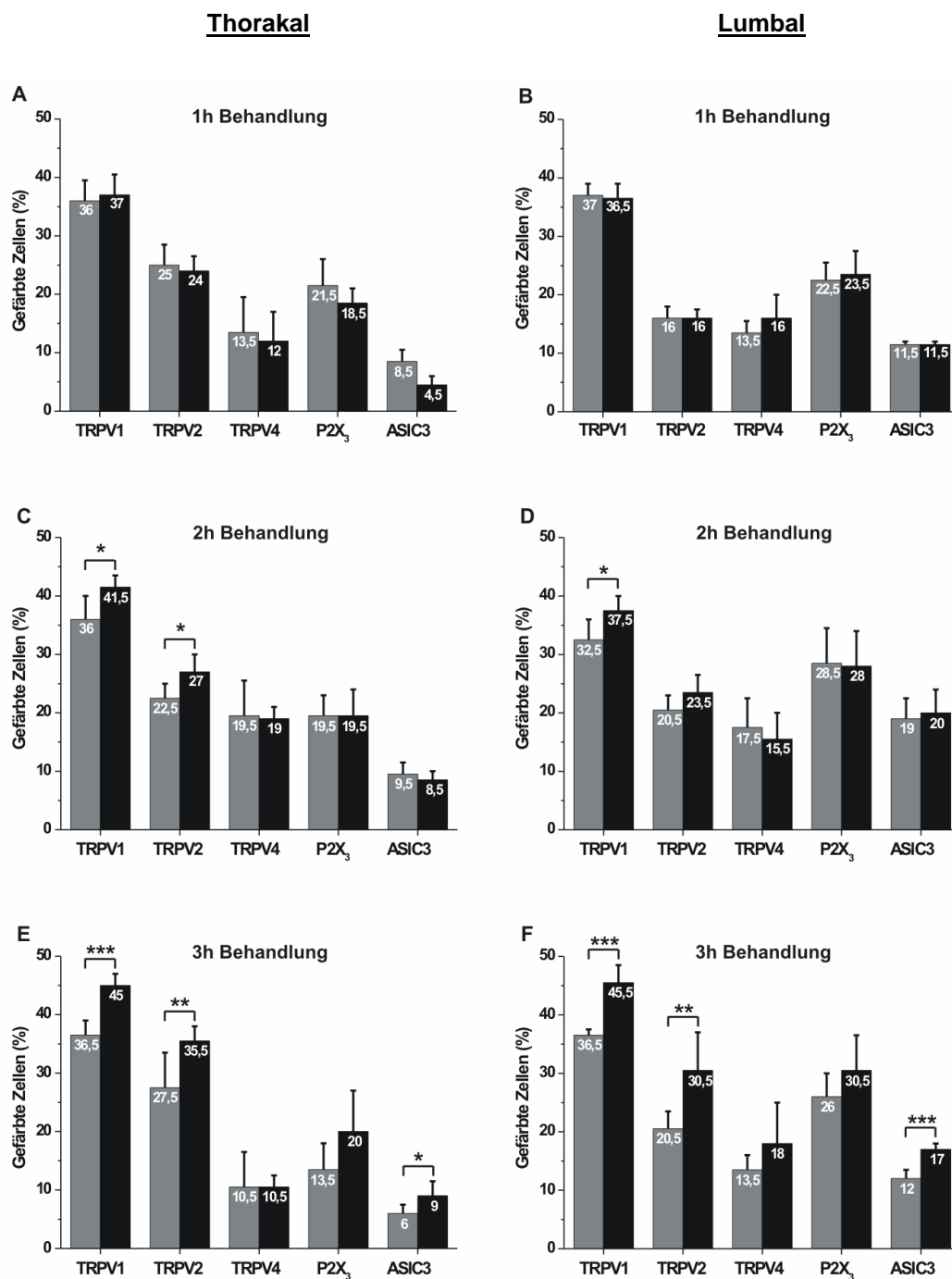
Die Analyse der Co-Expression spiegelt die Ergebnisse aus der Untersuchung zu den Einzelexpressionen wider. Auch hier fand keine Beeinflussung nach einer Stunde Behandlung statt. Nach zweistündiger Inkubation mit Entzündungsmediatoren konnte ein signifikanter Anstieg TRPV2 und TRPV1 exprimierender Zellen (4,5 %) im thorakalen Bereich, jedoch nicht im lumbalen Bereich, nachgewiesen werden. Eine Steigerung der Zunahme wurde nach drei Stunden erreicht (6 %) und auch in L5 konnte eine signifikanter Zuwachs von 6 % gezeigt werden. Im Fall von ASIC3 wurde zwar in T9 und in L5 ein Anstieg co-exprimierender Zellen beobachtet, allerdings war dieser nur in L5 eindeutig. Erstaunlicherweise wurde in der Co-Expression von TRPV1 und P2X<sub>3</sub> eine signifikante Zunahme gefärbter Zellen nach drei Stunden im thorakalen Bereich von 5,5 % nachgewiesen.

In der Einzelexpression dagegen nahm die Anzahl P2X<sub>3</sub>-exprimierender Zellen nicht eindeutig zu.

Wie schon in den Untersuchungen zu Einzelexpression zeigte TRPV4 auch in der Co-Expression mit TRPV1 keine Änderung durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren.

Die genauen Prozentzahlen aller Untersuchungen sind in der Tabelle 3.1 als Übersicht dargestellt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die Expression von verschiedenen Transduktionskanälen durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren gesteigert wird. Es konnte ein signifikanter Anstieg von TRPV1 und TRPV2 exprimierenden Zellen schon nach zwei Stunden Inkubation beobachtet werden. Im Fall von ASIC3 war der Anstieg positiver Zellen nach drei Stunden signifikant. Für die Kanäle TRPV4 und P2X<sub>3</sub> konnte jedoch keine eindeutige Beeinflussung der Expression durch Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. Auch für die Co-Expression von Transduktionskanälen wurde gezeigt, dass diese durch die Behandlung mit den Entzündungsmediatoren hochreguliert wird. Alle der hier untersuchten Co-Expressionen, mit Ausnahme von TRPV1 und TRPV4, zeigten einen signifikanten Anstieg in gefärbten Zellen nach zwei oder drei Stunden Inkubation.



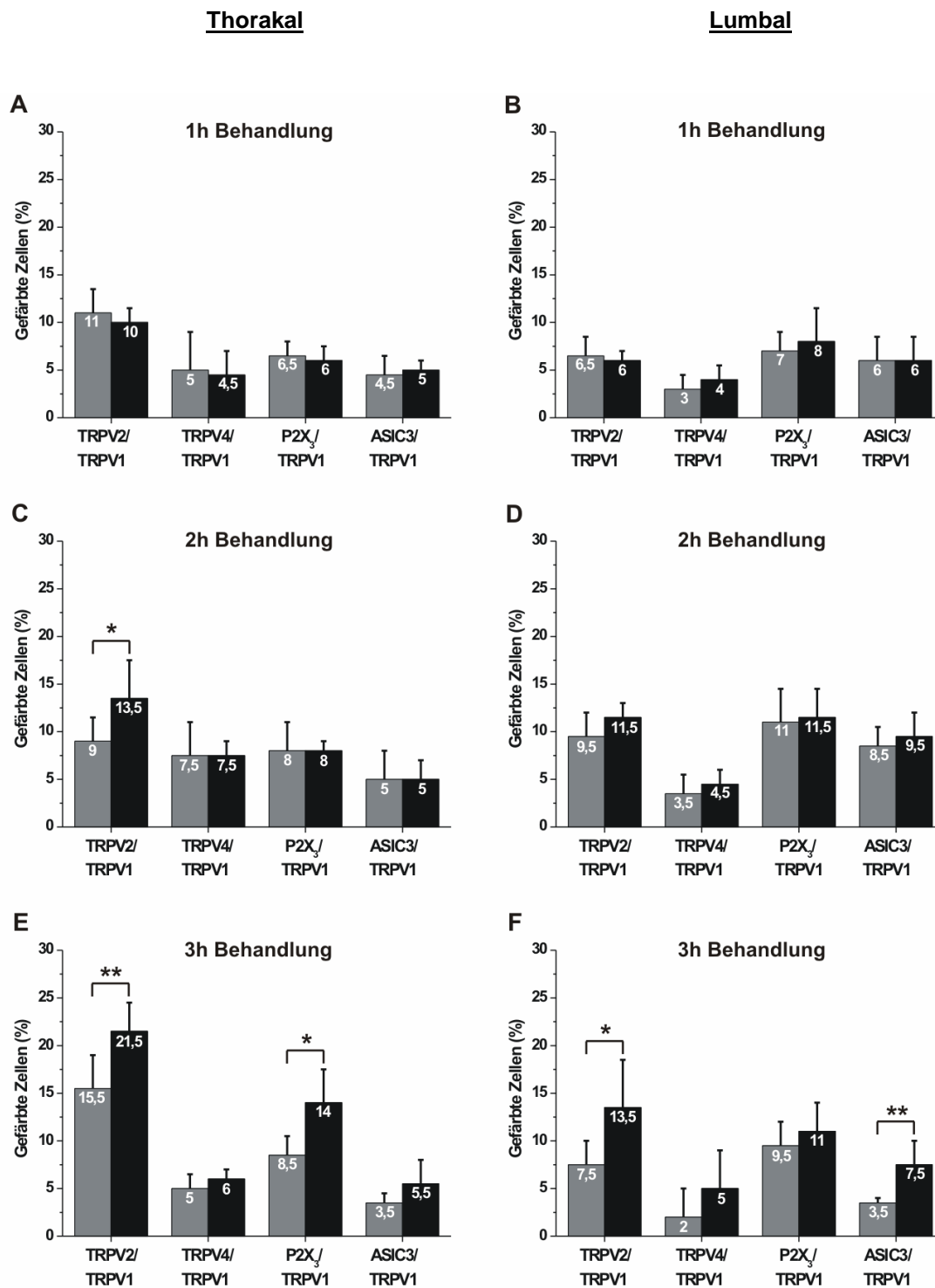
**Abbildung 3.6:** Beeinflussung der Kanalexpression durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren. Verglichen wurden 9 unbehandelte und 9 behandelte DRGs für den thorakalen und den lumbalen Bereich. Gezeigt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen in Prozent in Bezug auf die Gesamtzahl ausgewerteter Zellen. Direkt verglichen werden hier unbehandelte (grau) und behandelte (schwarz) DRG-Pärchen nach verschiedenen Inkubationszeiten.

A und B: Expression der Kanäle nach einer Stunde in T7 (links) und L3 (rechts).

C und D: Expression der Kanäle nach zwei Stunden in T8 (links) und L4 (rechts).

E und F: Expression der Kanäle nach drei Stunden in T9 (links) und L5 (rechts).



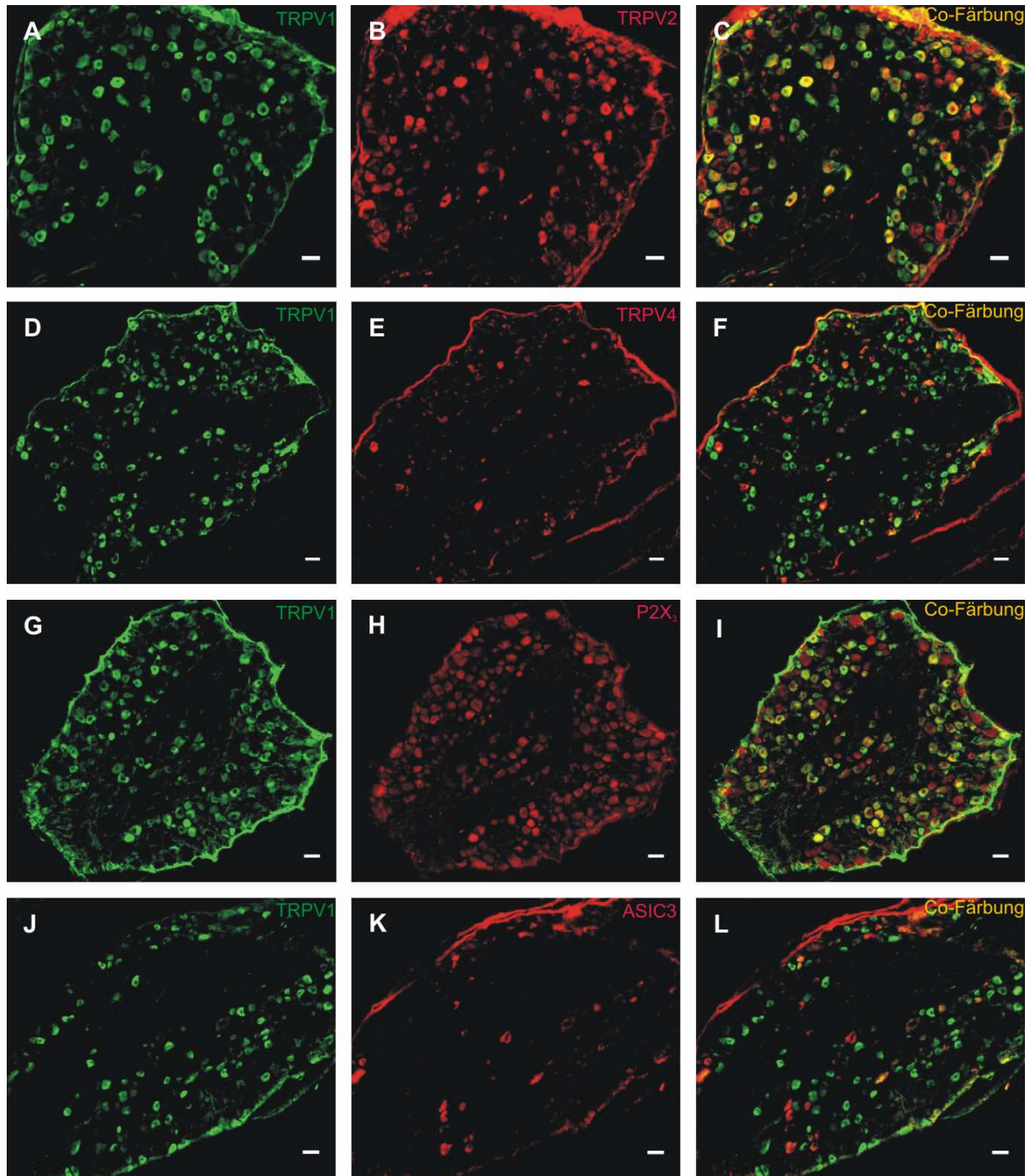


**Abbildung 3.7:** Beeinflussung der Co-Expression mit TRPV1 durch Entzündungsmediatoren. Verglichen wurden 9 unbehandelte und 9 behandelte DRGs für den thorakalen und den lumbalen Bereich. Gezeigt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen in Prozent in Bezug auf die Gesamtzahl ausgewerteter Zellen. Direkt verglichen werden hier unbehandelte (grau) und behandelte (schwarz) DRG-Pärchen nach verschiedenen Inkubationszeiten.

A und B: Co-Expression der Kanäle nach einer Stunde in T7 (links) und L3 (rechts).

C und D: Co-Expression der Kanäle nach zwei Stunden in T8 (links) und L4 (rechts).

E und F: Co-Expression der Kanäle nach drei Stunden in T9 (links) und L5 (rechts).



**Abbildung 3.8:** Immunhistochemische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener Transduktionskanäle in Spinalganglien der Ratte.

A: TRPV1, B: TRPV2, C: Co-Lokalisation von TRPV1 und TRPV2.

D: TRPV1, E: TRPV4; F: Co-Lokalisation von TRPV1 und TRPV4.

G: TRPV1, H: P2X<sub>3</sub>; I: Co-Lokalisation von TRPV1 und P2X<sub>3</sub>.

J: TRPV1, K: ASIC3, L: Co-Lokalisation von TRPV1 und ASIC3.

Erstantikörper: TRPV1 1:100, TRPV2 1:50, TRPV4 1:100, P2X<sub>3</sub> 1:20, ASIC3 1:50. Zweitantikörper: A488dkarb 1:500, A568dkagt 1:500.

Größenbalken 50 µm. 14 µm Kryoschnitte. 10x Objektiv.

**Tabelle 3.1:** Übersicht über alle Expressionsmuster der verschiedenen Transduktionskanäle in Prozent.

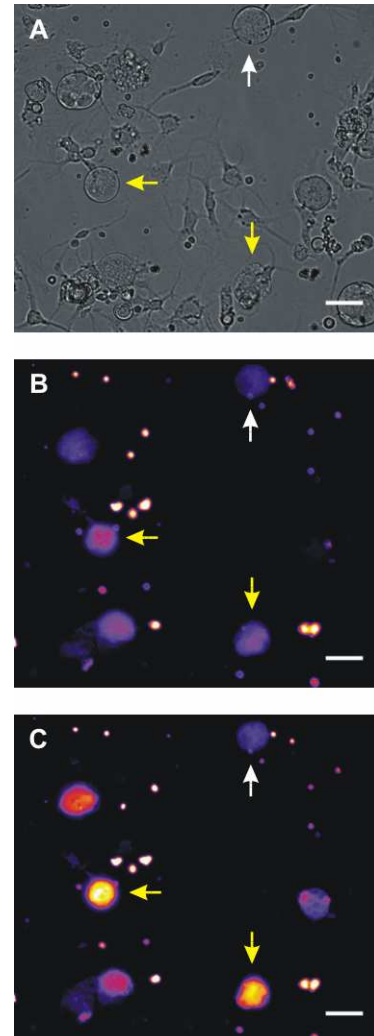
Kanal	K/B	T7 (1h)	T8 (2h)	T9 (3h)	L3 (1h)	L4 (2h)	L5 (3h)
TRPV1	K	36 ± 3,5	36 ± 4	36,5 ± 2,5	37 ± 2	32,5 ± 3,5	36,5 ± 1
	B	37 ± 3,5	41,5 ± 2	45 ± 2	36,5 ± 2,5	37,5 ± 2,5	45,5 ± 3
TRPV2	K	25 ± 3,5	22,5 ± 2,5	27,5 ± 6	16 ± 2	20,5 ± 2,5	20,5 ± 3
	B	24 ± 2,5	27 ± 3	35,5 ± 2,5	16 ± 1,5	23,5 ± 3	30,5 ± 6,5
TRPV4	K	13,5 ± 6	19,5 ± 3,5	10,5 ± 2,5	13,5 ± 2	17,5 ± 5	13,5 ± 2,5
	B	12 ± 5	19 ± 2	10,5 ± 2	16 ± 4	15,5 ± 4,5	18 ± 7
P2X <sub>3</sub>	K	21,5 ± 4,5	19,5 ± 3,5	13,5 ± 4,5	22,5 ± 3	28,5 ± 6	26 ± 4
	B	18,5 ± 2,5	19,5 ± 4,5	20 ± 7	23,5 ± 4	28 ± 6	30,5 ± 6
ASIC3	K	8,5 ± 2	9,5 ± 3	6 ± 1,5	11,5 ± 0,5	19 ± 3,5	12 ± 1,5
	B	4,5 ± 1,5	8,5 ± 1,5	9 ± 2,5	11,5 ± 0,5	20 ± 4	17 ± 1
TRPV2/ TRPV1	K	11 ± 2,5	9 ± 2,5	15,5 ± 3,5	6,5 ± 2	9,5 ± 2,5	7,5 ± 2,5
	B	10 ± 1,5	13,5 ± 4	21,5 ± 3	6 ± 1	11,5 ± 1,5	13,5 ± 5
TRPV4/ TRPV1	K	5 ± 4	7,5 ± 3,5	5 ± 1,5	3 ± 1,5	3,5 ± 2	2 ± 3
	B	4,5 ± 2,5	7,5 ± 1,5	6 ± 1	4 ± 1,5	4,5 ± 1,5	5 ± 4
P2X <sub>3</sub> / TRPV1	K	6,5 ± 1,5	8 ± 3	8,5 ± 2	7 ± 2	11 ± 3,5	9,5 ± 2,5
	B	6 ± 1,5	8 ± 1	14 ± 3,5	8 ± 3,5	11,5 ± 3	11 ± 3
ASIC3/ TRPV1	K	4,5 ± 2	5 ± 3	3,5 ± 1	6 ± 2,5	8,5 ± 2	3,5 ± 0,5
	B	5 ± 1	5 ± 2	5,5 ± 2,5	6 ± 2,5	9,5 ± 2,5	7,5 ± 2,5

### 3.3 Entzündungsmediatoren reduzieren die Desensitivierung des TRPV1-Kanals in der Primärkultur

Neben der Expression der Transduktionskanäle spielt auch deren Aktivität eine Rolle in der Signaltransduktion und in der Ausbildung entzündungsbedingter Schmerzen, da gerade die Aktivität der Kanäle stark reguliert sein kann. Deshalb wurde der Einfluss von Entzündungsmediatoren funktionell und *in vitro* auf die Aktivität des TRPV1-Kanals in Calcium Imaging Experimenten mit dem Farbstoff Fluo5f-AM überprüft. Die Experimente sollten zunächst zeigen, ob durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals mit 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin ausreichend Calcium in die Zelle fließt, um den Calcium-gesteuerten Chloridkanal zu aktivieren. Wie der Kanal besitzt auch dieser Farbstoff für Calcium einen  $K_{1/2}$  von 2,3  $\mu\text{M}$  und detektiert daher nur Calciumsignale, die den Chloridkanal öffnen können.

Abbildung 3.9 zeigt Zellen in Primärkultur (A) und ihre Ruhefluoreszenz (B). In der Falschfarbendarstellung entsprechen kalte Farben niedrigen Calciumkonzentrationen und warme Farben hohen Calciumkonzentrationen. Nach der Stimulation mit Capsaicin reagieren zwei Zellen (gelbe Pfeile) mit starken Calciumeinströmen (C). Die weiß markierte Zelle dagegen bleibt blau und zeigt somit keine Reaktion auf die Capsaicinstimulation. Diese Ergebnisse zeigen, dass 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin in dissoziierten Spinalganglienzellen Calciumeinströme hervorrufen, die ausreichen, um den Calcium-aktivierten Chloridkanal zu öffnen.

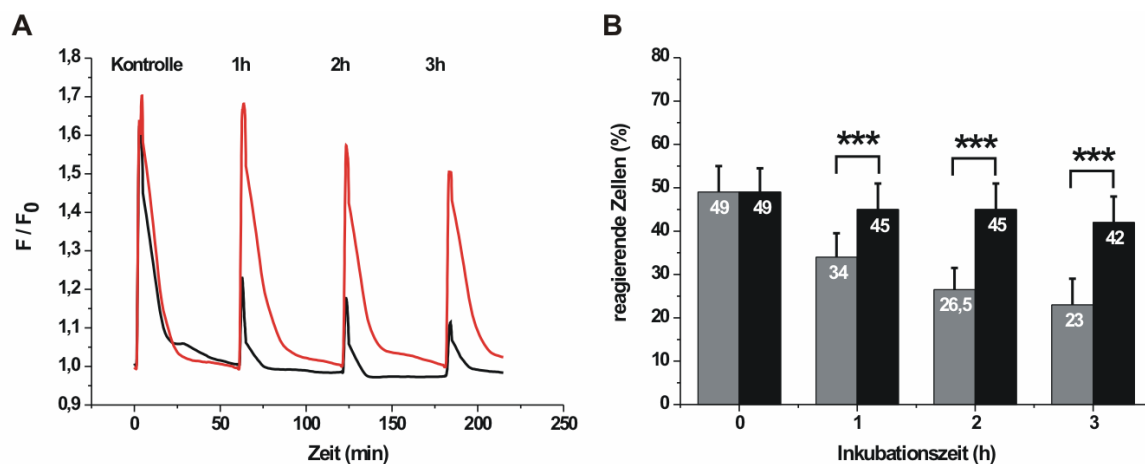
Zusätzlich sollte die Beeinflussung der TRPV1-Aktivität durch die Entzündungssuppe nach ein, zwei und drei Stunden untersucht werden. Dies setzt voraus, dass eine Zelle mehrfach durch 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin aktiviert werden kann. Hierfür wurden unbehandelte Zellen im Abstand von einer Stunde vier Mal stimuliert und in den Zwischenphasen mit ES perfundiert, um das Capsaicin wieder zu entfernen. Ausgewertet wurde die Änderung der



**Abbildung 3.9:** Calciumreaktion verschiedener Zellen auf 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin.

A: Durchlicht. B: Ruhefluoreszenz. C: Fluoreszenz nach Stimulierung mit 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin. Farbstoff: Fluo5f-AM 10 $\mu\text{M}$ . Größenbalken: 30  $\mu\text{m}$ . Weißer Pfeil: keine Reaktion. Gelbe Pfeile: starke Reaktionen.

Fluoreszenzintensität ( $F$ ) in Bezug auf die Ruhefluoreszenz ( $F_0$ ) gegen die Zeit. Die schwarze Kurve der Abbildung 3.10 A zeigt die Reaktion einer unbehandelten Zelle nach vierfacher Capsaicinstimulation. Auch nach mehrfacher Stimulation kann der TRPV1-Kanal noch aktiviert werden und leitet Calcium in das Zellinnere. Allerdings wird auch deutlich, dass die Amplitude und damit die Reaktionsstärke nach der ersten Aktivierung (Referenz) stark abnimmt. Wird in den Zwischenphasen jedoch mit der Entzündungsmediatoren statt mit ES perfundiert, ist die Abnahme weniger stark ausgeprägt und die Signalstärke bleibt weitgehend erhalten (Abb. 3.10 A, rote Kurve). Die Reaktionen sind spezifisch auf die Aktivierung des TRPV1-Kanals zurückzuführen, da die Kontrollmessungen (Abb. 3.11 C), nur eine leichte Abnahme des Fluoreszenzsignals zeigen, die durch das Ausbleichen des Farbstoffs bedingt ist.

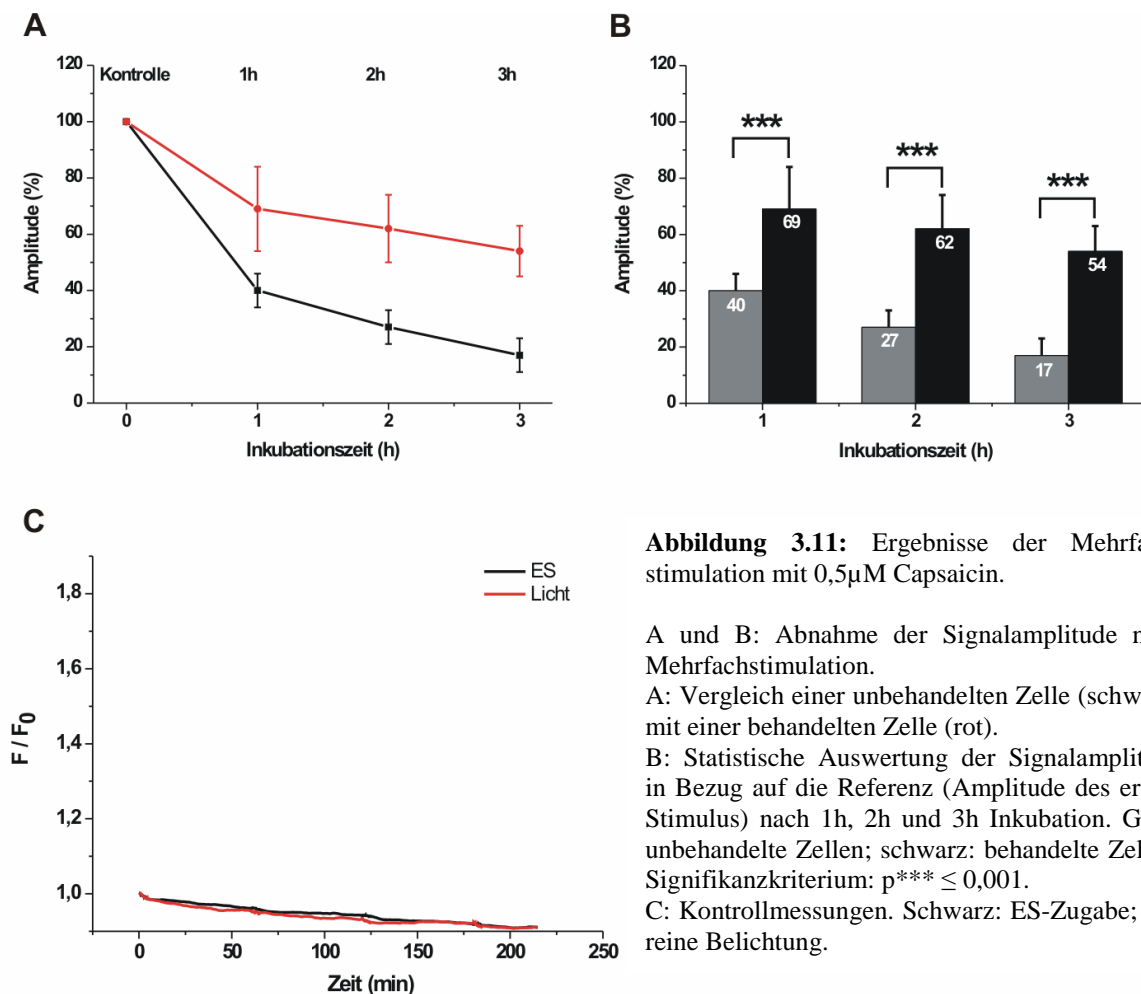


**Abbildung 3.10 A:** Beispielhafte Darstellung der Mehrfachstimulation unbehandelter (schwarz) und behandelter (rot) Zellen mit Capsaicin ( $0,5 \mu\text{M}$ ). Der erste Stimulus wurde in der Auswertung als Referenzwert verwendet (Kontrolle). Danach wurde im Abstand von einer Stunde drei Mal stimuliert.

**Abbildung 3.10 B:** Anzahl der Zellen mit Reaktion auf die Stimulation mit  $0,5 \mu\text{M}$  Capsaicin in Prozent. Grau: unbehandelte Zellen; schwarz: behandelte Zellen. Signifikanzgrenze:  $p^{***} < 0,001$

Eindeutig ist der Einfluss der Entzündungsmediatoren auch auf die Anzahl der reagierenden Zellen (Abb. 3.10 B). Der Anteil der reagierenden Zellen ist in Prozent angegeben. Wie zu erwarten zeigt die gleiche Anzahl der Zellen eine Reaktion auf den ersten Stimulus (49 %). Insgesamt wurden für die Messungen 118 unbehandelte Zellen aus 5 Tieren und 145 behandelte Zellen aus 6 Tieren gemessen. Bei unbehandelten Zellen (grau) nimmt die Anzahl der reagierenden Zellen jedoch schon bei der zweiten Stimulierung stark ab (34 %). Nach drei Stunden werden nur noch 23 % der Zellen durch Capsaicin aktiviert. Im Unterschied dazu reagieren nach Behandlung mit der Entzündungssuppe (schwarz) über drei Stunden immer noch 42 % der Zellen auf Capsaicin. Dieser Unterschied zwischen unbehandelten und

behandelten Zellen ist nach einer, zwei und drei Stunden jeweils höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ).



Für die statistische Auswertung der Reaktionsamplitude wurde die Reaktion auf die erste Aktivierung als Referenz (100 %) gesetzt. Die anschließend gemessenen Reaktionen wurden auf diesen Wert bezogen und sind hier in Prozent angegeben. Abbildung 3.11. A und B zeigen die Abnahme der Reaktionsamplitude in Bezug auf die Referenz in unbehandelten (grau) und behandelten Zellen (A: rot, B: schwarz) in einer Messung über drei Stunden. Es wurde insgesamt vier Mal mit 0,5 µM Capsaicin stimuliert. Es wird deutlich, dass die Amplitude auch nach mehrfacher Aktivierung durch die Behandlung mit den Entzündungsmediatoren nur auf ungefähr die Hälfte (54 % ± 9) der Kontrollreaktion abfällt. Dagegen bleiben nach der vierten Stimulation bei unbehandelten Zellen nur 17 % (± 6) der ursprünglichen Amplitude erhalten. Der Unterschied in der Abnahme der Amplitude im Vergleich zur Kontrollreaktion zwischen behandelten und unbehandelten Zellen ist nach allen Inkubationszeiten höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulierung mit 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin in dissoziierten Spinalganglienzellen mehrfach Calciumsignale hervorruft, die ausreichen um den Calcium-gesteuerten Chloridkanal zu aktivieren. Zudem wird die Aktivität des TRPV1-Kanals durch die Inkubation der Zellen mit den Entzündungsmediatoren des *ex vivo* Entzündungsmodells signifikant beeinflusst. Die hier durchgeführten Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Entzündungsmediatoren die Inaktivierung des Kanals reduzieren, da sowohl die Reaktionsamplitude als auch die Anzahl reagierender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen weniger stark abnimmt.

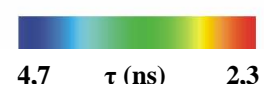
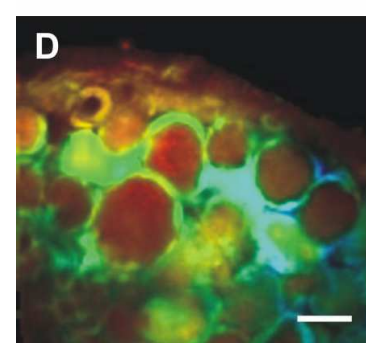
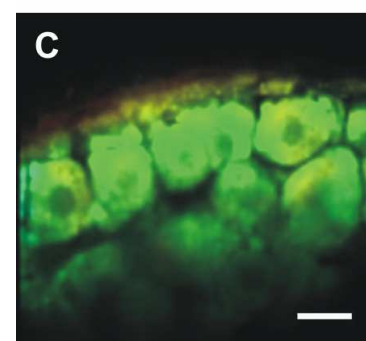
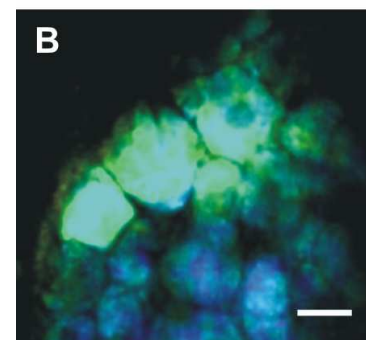
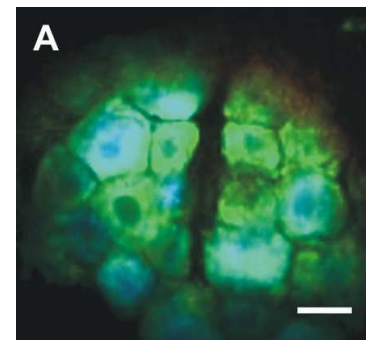
### 3.4 Die Chloridhomöostase wird durch Entzündungsmediatoren beeinflusst

#### 3.4.1 Die intrazelluläre Chloridkonzentration wird durch Entzündungsmediatoren erhöht

Spinalganglienzellen nutzen Chlorid in der Signaltransduktion. Die intrazelluläre Chloridkonzentration wird durch die Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 reguliert. Deshalb wird Chloridefflux als Mechanismus zur Signalverstärkung in der Schmerztransduktion schon lange diskutiert (Andre et al., 2003; de Koninck, 2007; Pieraut et al., 2007). In welchem Umfang die intrazelluläre Chloridkonzentration eine Rolle in Entzündungsreaktionen spielt, wurde hier durch die Behandlung von Zellen intakter Spinalganglien mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell untersucht.

Mit Hilfe der 2-Photonen-Fluoreszenz-Lebenszeit Mikroskopie (2P-FLIM) wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration indirekt über die Fluoreszenzlebenszeit (FL) analysiert. Beladen wurden die Zellen mit dem Chlorid-sensitiven Farbstoff MQAE, dessen Fluoreszenzlebenszeit mit steigender Chloridkonzentration abnimmt. Eine kurze Lebenszeit ( $\tau$ ) von MQAE entspricht somit einer hohen Chloridkonzentration. Für die 2P-FLIM-Messungen wurden DRG-Pärchen präpariert, wobei das Pärchen der Position T7 eine Stunde inkubiert wurde, das der Position T8 zwei Stunden und das der Position T9 drei Stunden. Direkt verglichen wurden unbehandelte und behandelte Spinalganglien, da eine Kalibrierung der intrazellulären Chloridkonzentration nicht möglich war.

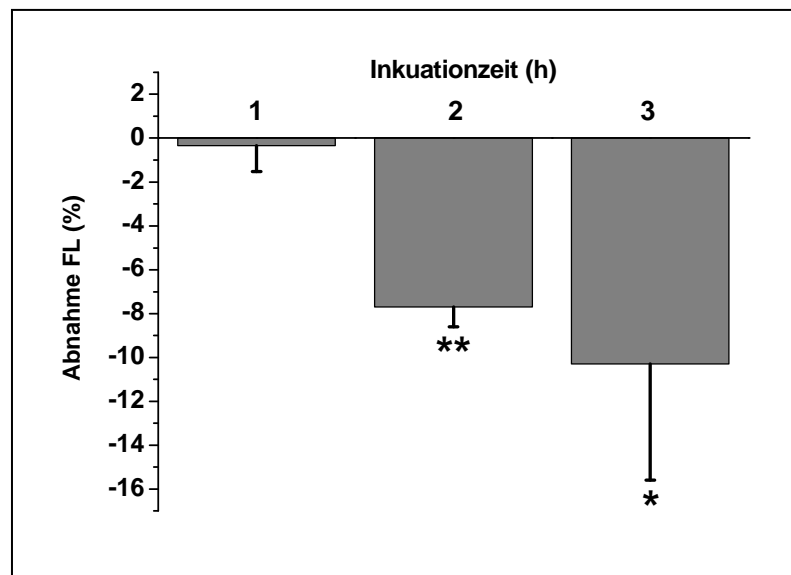
**Abbildung 3.12:** Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzlebenszeit. A: unbehandelte Zellen; B. eine Stunde Behandlung; C. zwei Stunden Behandlung; D. drei Stunden Behandlung  
Farbstoff: MQAE 5 mM; 60x Objektiv; Anregung 750 nm;  
Größenbalken 25  $\mu\text{m}$ .





In der Auswertung sind daher nur Änderungen der Chloridkonzentration im Vergleich zu unbehandelten DRGs angegeben.

Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch die Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration, dargestellt durch die Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ) aufgrund der Inkubation mit Entzündungsmediatoren. In Falschfarben ist hier die Fluoreszenz-



**Abbildung 3.13:** Abnahme der Fluoreszenzlebenszeit (FL) in 9 behandelten DRGs im Vergleich zu 9 unbehandelten Spinalganglien durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren nach ein, zwei und drei Stunden Inkubation. Signifikanzkriterien: \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,01$ .

lebenszeit (FL) dargestellt, wobei kalte Farben für lange Lebenszeiten und niedrige Chloridkonzentrationen stehen. Warme Farben dagegen zeigen kurze FL und hohe Chloridkonzentrationen. Während in unbehandelten DRGs und nach einer Stunde Behandlung (3.12 A und B) kalte Farben und damit niedrige Chloridkonzentrationen ( $\tau = 3,4 \text{ ns} - 4,8 \text{ ns}$ ) vorherrschen, sind nach zwei Stunden (3.12 C) schon grüne und gelbe Zellen ( $\tau = 3,35 \text{ ns} - 4,2 \text{ ns}$ ) zu erkennen. Nach drei Stunden (3.12 D) erscheinen auch tiefrote Zellen und eine Verschiebung zu noch kürzeren Lebenszeiten ( $\tau = 2,75 \text{ ns} - 4,2 \text{ ns}$ ) ist zu beobachten. Da es jedoch zu allen Zeitpunkten Zellen mit langen Lebenszeiten und somit niedrigen Chloridkonzentration gibt, bleibt die Verteilung der intrazellulären Chloridkonzentration auch nach der Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell heterogen.

In der statistischen Auswertung wurden die Änderungen der Fluoreszenzlebenszeit in Bezug auf die unbehandelten DRGs der gleichen Position und des gleichen Tieres ermittelt (Kapitel 2.5.4 und 2.7.4). Abbildung 3.13 zeigt die statistische Auswertung der Lebenszeitänderung in Abhängigkeit von der Zeit. Dabei bedeutet steht die Abnahme der Lebenszeit für einen Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration. Nach einer Stunde Inkubation ist die Abnahme der mittleren Lebenszeit ( $-0,33 \% \pm 1,2$ ), noch nicht signifikant. Dagegen ist die Verkürzung der Lebenszeit um  $7,7 \% (\pm 0,9)$  nach zwei Stunden höchst signifikant und nimmt nach dreistündiger Inkubation noch auf  $10,3 \% (\pm 5,3)$  zu.

Die Behandlung mit Entzündungsmediatoren führt damit in Zellen intakter Spinalganglien zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration nach zwei und drei Stunden Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

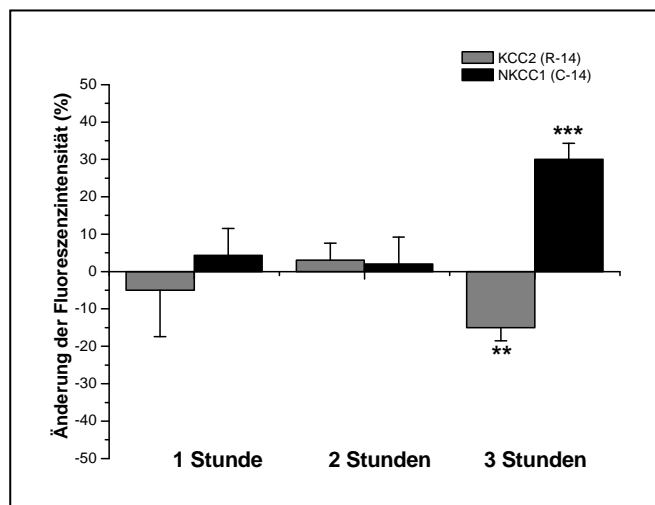
### 3.4.2 Die Chloridhomöostase wird durch NKCC1 und KCC2 reguliert

Da die intrazelluläre Chloridkonzentration durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren gesteigert wird, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus zur Beeinflussung der Chloridkonzentration. Diese wird in Spinalganglienzellen durch die Chloridtransporter, NKCC1 und KCC2 reguliert. NKCC1 ist ein Importer und sorgt für die Akkumulation von Chlorid. KCC2 dagegen exportiert Chlorid und ist damit für die Erniedrigung der intrazellulären Chloridkonzentration verantwortlich.

Die immunhistochemischen Färbungen der Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen, dass beide Transporter von fast allen Zellen exprimiert werden. In den Experimenten wurde deshalb die Fluoreszenzintensität (FI) jeder gefärbten Zelle ausgewertet. Dabei wird vorausgesetzt, dass eine höhere FI für die verstärkte Expression der Proteine steht. Die Änderung der FI ist in Bezug auf die unbehandelten Spinalganglien angegeben (siehe auch Kapitel 2.4.4). Die statistische Auswertung beweist, dass auch die Expression dieser beiden Transporter durch eine Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell beeinflusst wird.

Die Spinalganglien der Position T7 wurden 1 h inkubiert, die der Position T8 zwei Stunden und von T9 drei Stunden.

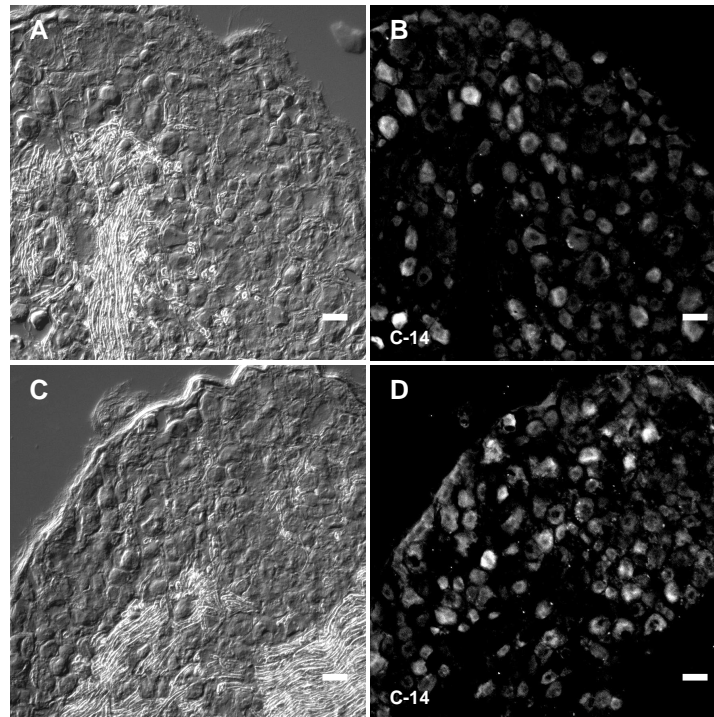
Nach einer und zwei Stunden Inkubation bleibt die Expression der beiden Transporter im Vergleich zu unbehandelten Spinalganglien unverändert. Eine signifikante Änderung der Expression tritt erst nach drei Stunden Inkubation sowohl bei NKCC1 als auch bei KCC2 ein. Die Fluoreszenzintensität nimmt im Fall von NKCC1 im Vergleich zu Kontrollzellen



**Abb. 3.14:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitätsänderung von KCC2 und NKCC1 in 18 gepaarten DRGs.

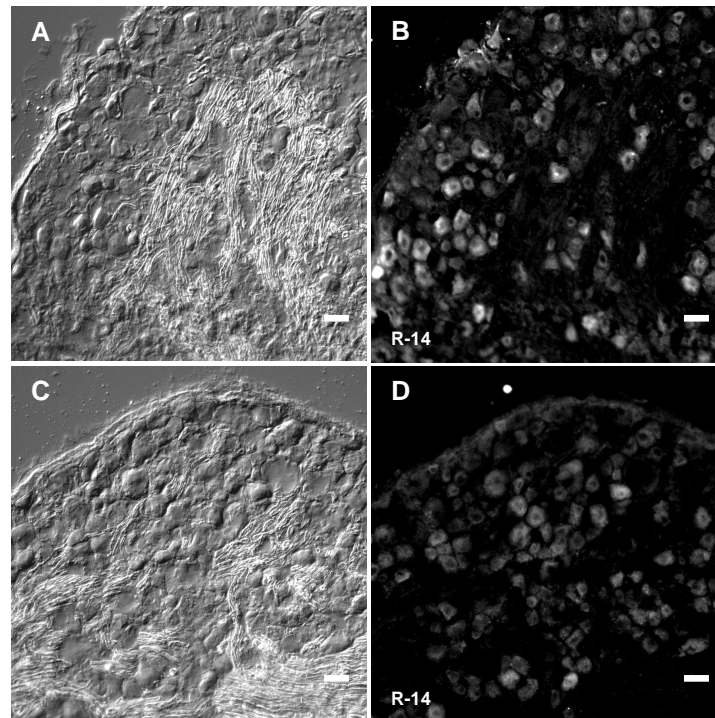
Abgebildet ist die Änderung der Intensitäten der behandelten Zellen bezogen auf die nicht behandelten Zellen (100%) in Prozent für KCC2 (graue Balken) und NKCC1 (schwarze Balken) nach einer, zwei und drei Stunden Inkubation. Signifikanzkriterien: \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

höchstsignifikant um 30 % ( $\pm 4,3$ ) zu. Dagegen nimmt die Intensität von KCC2 hochsignifikant um 15 % ( $\pm 3,5$ ) ab.



**Abbildung 3.15:** Immunhistochemische Darstellung von NKCC1 an 14  $\mu\text{m}$  Kryoschnitten eines DRG-Pärchens (Position T9) mit dem Antikörper gegen NKCC1 (C-14).

Exemplarischer Vergleich zwischen einem Kontroll-DRG (A und B) und einem behandelten DRG (C und D) nach drei Stunden Inkubation. In A und C sind die Durchlichtbilder abgebildet, B und D zeigen die Fluoreszenzaufnahmen. 1. Antikörper NKCC1 1:20, 2. Antikörper A568donkey $\alpha$ goat 1:500 verdünnt; Größenbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Objektiv: 10x.



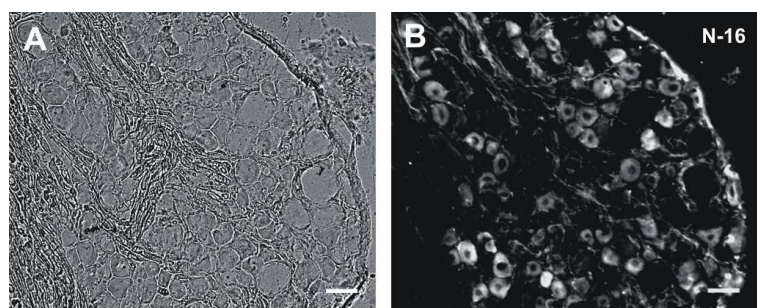
**Abbildung 3.16:** Immunhistochemische Darstellung von KCC2 an 14 µm Kryoschnitten eines DRG-Pärchens (Position T9) mit dem Antikörper gegen KCC2 (R-14).

Exemplarischer Vergleich zwischen einem Kontroll-DRG (A und B) und einem behandelten DRG (C und D) nach drei Stunden Inkubation. In A und C sind die Durchlichtbilder abgebildet, B und D zeigen die Fluoreszenzaufnahmen. 1. Antikörper KCC2 1:20, 2. Antikörper A568donkey $\alpha$ goat 1:500 verdünnt; Größenbalken: 50 µm. Objektiv: 10x.

### Frei gewählte Spinalganglien

Um eine Positionsabhängigkeit der in 3.4.2 erlangten Ergebnisse zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment an frei gewählten Spinalganglien durchgeführt. Dafür wurden behandelte und unbehandelte Spinalganglien von verschiedenen Positionen verglichen. Zudem wurde zusätzlich ein anderer NKCC1-Antikörper eingesetzt um zu sehen, ob dieser das gleiche Färbemuster wie der zuvor verwendete NKCC1 Antikörper (C-14) aufweist.

Abbildung 3.17 zeigt deutlich, dass auch der hier verwendete Antikörper fast alle Zellen, bis auf solche mit großem Durchmesser färbt. Die Experimente wurden nach der gleichen statistischen Vorgehensweise wie in 2.4.4 beschrieben ausgewertet.

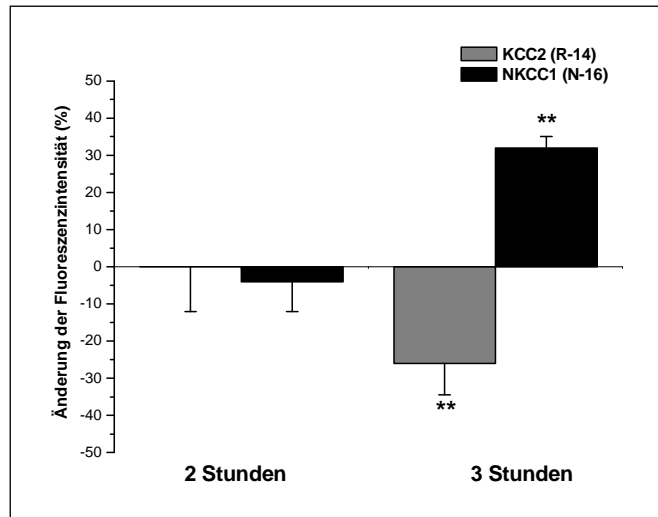


**Abbildung 3.17:** Immunhistochemische Darstellung des NKCC1-Antikörpers N-16. A. Durchlichtbild; B. Fluoreszenzbild

1. Antikörper NKCC1 (N-16) 1:20; 2. Antikörper A488donkey $\alpha$ goat 1:500. Größenbalken: 50 µm. Schnitte 14 µm. 10x Objektiv.

Allerdings wurde diesmal auf Experimente nach einer Stunde Inkubation verzichtet, da hier in den vorangegangenen Studien zu diesem Zeitpunkt keine Beeinflussung nachweisbar war.

Im Vergleich zu unbehandelten Spinalganglien zeigen die Zellen behandelter DRGs einen hochsignifikanten Fluoreszenzanstieg nach drei Stunden von 32 % ( $\pm 3$ ), während die Fluoreszenzintensität im Fall von KCC2 nach drei Stunden hochsignifikant um 26 % ( $\pm 8,5$ ) abnimmt (Abb. 3.18).



**Abbildung. 3.18:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitätsänderung von KCC2 und NKCC1 aus 12 frei gewählten DRGs.

Abgebildet ist die Änderung der Intensitäten der behandelten Zellen bezogen auf die nicht behandelten Zellen (100%) in Prozent für KCC2 (graue Balken) und NKCC1 (schwarze Balken) nach zwei und drei Stunden Inkubation. Signifikanzkriterien: \*\* =  $p \leq 0,01$ .

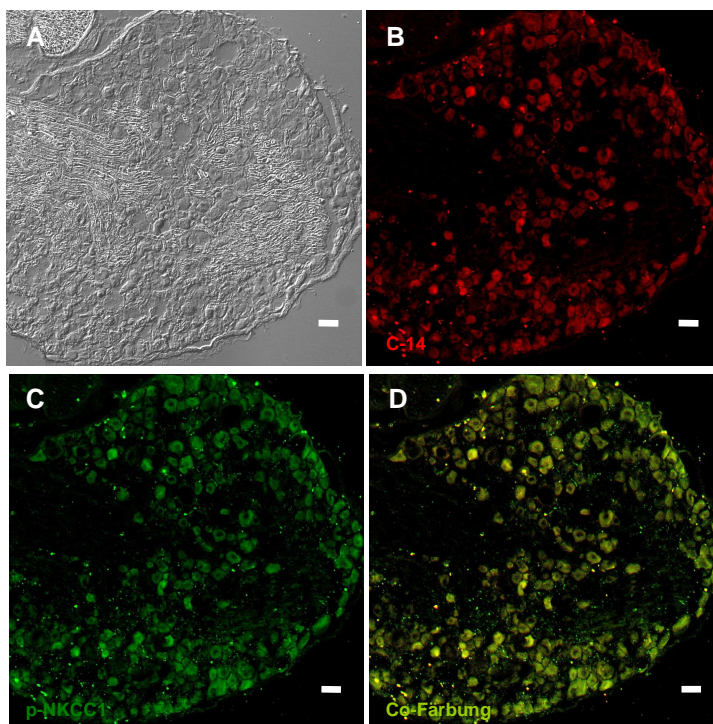
Diese Ergebnisse sind mit denen aus den Studien mit DRG-Pärchen vergleichbar. Daher ist die Beeinflussung der Chloridtransporterexpression nicht positionsabhängig, sondern dient wahrscheinlich als allgemeiner Mechanismus zur dynamischen Regulation der Chloridhomöostase in Spinalganglienzellen.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse zeigen, dass auch die Expression der Chloridtransporter durch eine dreistündige Behandlung mit Entzündungsmediatoren beeinflusst wird. Entzündungsmediatoren führen zu einer Hochregulation von NKCC1 und einer Reduzierung KCC2-spezifischer Fluoreszenzsignale. Die Positionsunabhängigkeit dieser Änderungen deutet auf einen allgemeinen Mechanismus zur Regulierung der Chloridhomöostase in Spinalganglienzellen hin. Somit stützen diese Ergebnisse die Beobachtungen aus den 2P-FLIM Experimenten, da auch hier das Gleichgewicht zur Chloridakkumulation hin verschoben wird. Allerdings bleibt die Frage offen, warum sich die intrazelluläre Chloridkonzentration schon nach zwei Stunden Behandlung ändert, die Expression der Transporter jedoch erst nach drei Stunden beeinflusst wird.

### 3.5 Phosphorylierung von NKCC1 als schnelle Reaktion auf Entzündungsmediatoren

Der zeitliche Unterschied zwischen dem Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration nach zwei Stunden Inkubation und der Expressionsänderung von NKCC1 und KCC2 nach drei Stunden Behandlung weist auf einen weiteren Regulationsmechanismus in der Chloridsignaltransduktion hin. Eine mögliche Erklärung bietet die phosphorylierungsabhängige Aktivierung von NKCC1 (Darman und Forbush, 2002).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Entzündungsmediatoren einen Einfluss auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivität des Transporters besitzt, wurde ein spezieller Antikörper eingesetzt. Er erkennt spezifisch eine dreifach phosphorylierte Sequenz des NKCC1-Proteins (p-NKCC1).

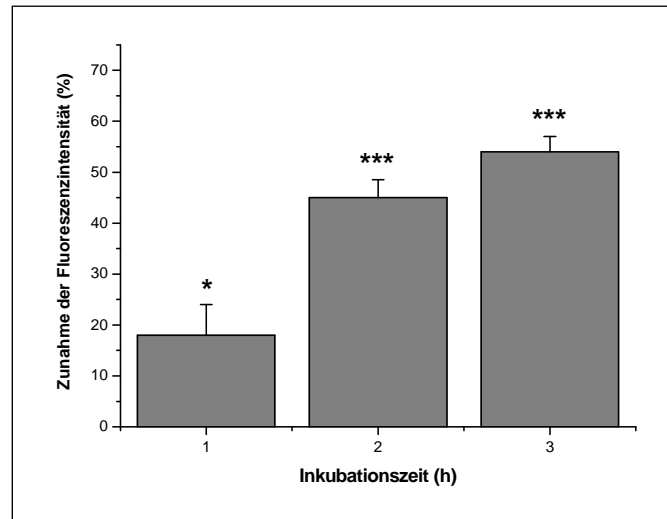


**Abbildung. 3.19:** Immunhistochemische Darstellung von NKCC1 (C-14) in Co-Färbung mit dem phospho-NKCC1 Antikörper (p-NKCC1) eines behandelten Spinal-ganglions (Position T9) nach drei Stunden Inkubation.

A Durchlichtbild; B NKCC1 (C-14); C phospho-NKCC1; D Co-Färbung. 1. Antikörper jeweils 1:20. 2. Antikörper A568donkey $\alpha$ goat, Adonkey $\alpha$ sheep: 1:500. Größenbalken: 50  $\mu$ m. Schnitte 14  $\mu$ m. Objektiv: 10x.

Die Abbildung 3.19 zeigt den Schnitt eines behandelten Spinalganglions nach einer Co-Färbung mit einem Antikörper gegen alle Formen des NKCC1-Transporters (C-14) und gegen den phosphorylierten Zustand des NKCC1-Transporters (p-NKCC1). Es ist zu erkennen, dass zwischen der NKCC1-Färbung (C-14; Abb. 3.19B) und der phospho-NKCC1-Färbung (p-NKCC1; Abb. 3.19C) 100 %ige Co-Lokalisation vorliegt. Auch in unbehandelten Zellen ist eine absolute Co-Lokalisation der beiden Antikörper zu beobachten. Das bedeutet, dass auch

in unbehandelten Zellen die phosphorylierte Form des NKCC1-Transporters vorliegt. Erst eine quantitative Analyse (Kapitel 2.4.4) der Fluoreszenzintensitäten des p-NKCC1-Antikörpers von 2074 Zellen aus 9 behandelten DRGs und 1771 Zellen aus 9 unbehandelten Spinalganglien, macht den Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrollzellen deutlich. Die Zusammenfassung der Analyse der immunhistochemischen Färbungen zur Phosphorylierung des NKCC1-Transporters (Abb. 3.20)



**Abb. 3.20:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitätszunahme des phospho-NKCC1 Antikörpers.

Abgebildet ist die Änderung der Intensitäten der behandelten Zellen bezogen auf die Kontrollzellen (100%) in Prozent nach einer, zwei und drei Stunden Inkubation. Signifikanzkriterien: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

zeigt eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensitäten nach allen drei Inkubationszeitpunkten im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Schon nach einer Stunde Inkubation ist die Zunahme um 18 % ( $\pm 5,9$ ) im Bezug auf unbehandelte Spinalganglien signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Nach zwei Stunden kommt es zu einem starken Anstieg um 45 % ( $\pm 3,5$ ) bezüglich der Kontrolle und nach drei Stunden sogar um 54 % ( $\pm 3,3$ ). Beide Änderungen sind höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

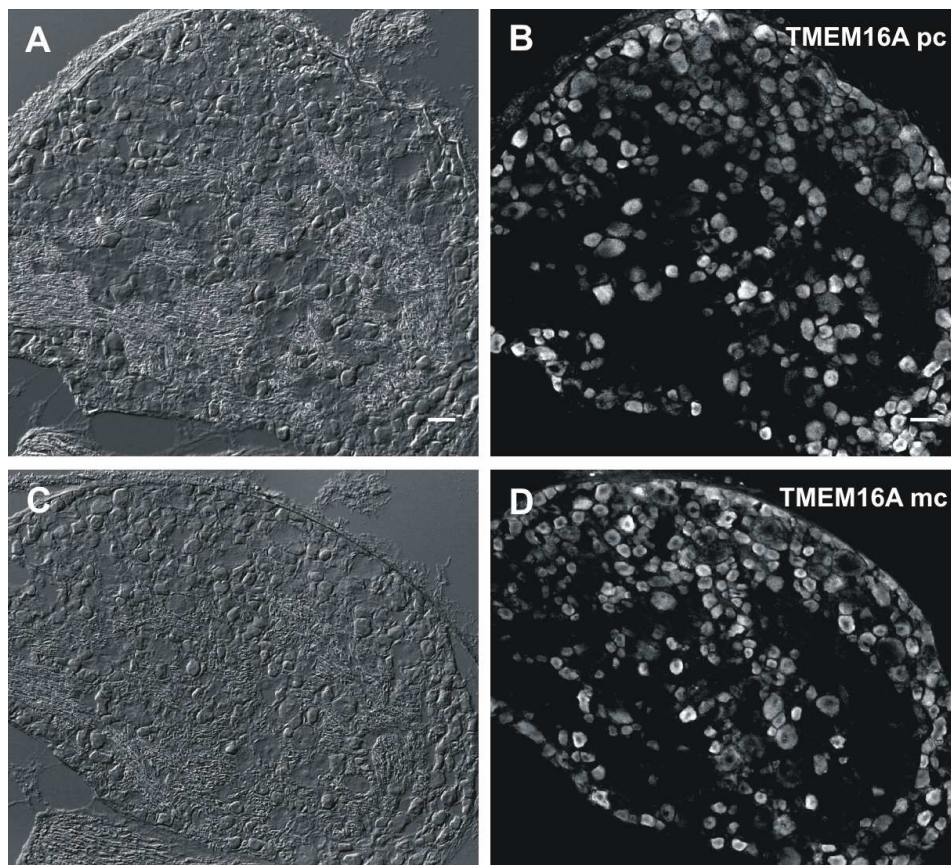
Die Ergebnisse der Abbildungen 3.19 und 3.20 zeigen zunächst eine absolute Co-Lokalisation der Antikörper NKCC1 (C-14) und p-NKCC1 (Abb. 3.19). Durch die Quantifizierung der Expression des phosphorylierten NKCC1-Transporters konnte jedoch gezeigt werden, dass schon nach einer Stunde vermehrt phosphorylierter NKCC1 in behandelten Zellen vorliegt (Abb. 3.20).

Durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren wird die Phosphorylierung und damit die Aktivität von NKCC1 signifikant erhöht, was zu einer verstärkten Chloridakkumulation in die Zelle führt. Diese Beobachtungen erklären die zeitliche Diskrepanz zwischen dem schnellen Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration nach Behandlung mit Entzündungsmediatoren (Kapitel 3.3.1) und der langsameren Änderung der Expression von NKCC1 und KCC2 (Kapitel 3.3.2). Da Phosphorylierungsprozesse als schnelle Mechanismen zur Aktivitätskontrolle von Kanälen und Transportern eingesetzt werden, ist es

wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von NKCC1 zur schnellen Akkumulation von Chlorid in DRGs führt.

### 3.6 Spinalganglienzellen exprimieren den Chloridkanal TMEM16A

In den vorangegangenen Kapiteln wurde nachgewiesen, dass die Zellen der Spinalganglien die intrazelluläre Chloridkonzentration über die Aktivität und Expression der Transporter NKCC1 und KCC2 regulieren. Außerdem führt die Behandlung mit Entzündungsmediatoren zur Akkumulation von Chlorid. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Chlorid an der Signaltransduktion in DRG-Zellen. Daher wurde mittels Immunhistochemie überprüft, ob die Zellen den Chloridkanal TMEM16A exprimieren. Dieser gilt als Kandidat für den Calcium-aktivierten Chloridkanal in Schmerzzellen (Yang et al., 2008).



**Abbildung 3.21:** Expression von TMEM16A in Spinalganglienzellen der Ratte  
 A: Durchlichtbild zu B. B: Nachweis von TMEM16A mit einem polyklonalen Antikörper (1:50). C: Durchlichtbild zu D. D: Nachweis von TMEM16A mit einem monoklonalen Antikörper (1:100).  
 Zweitantikörper A488dkarb 1:1000. Größenbalken 50 µm. Schnitte 14 µm. Objektiv 10x.



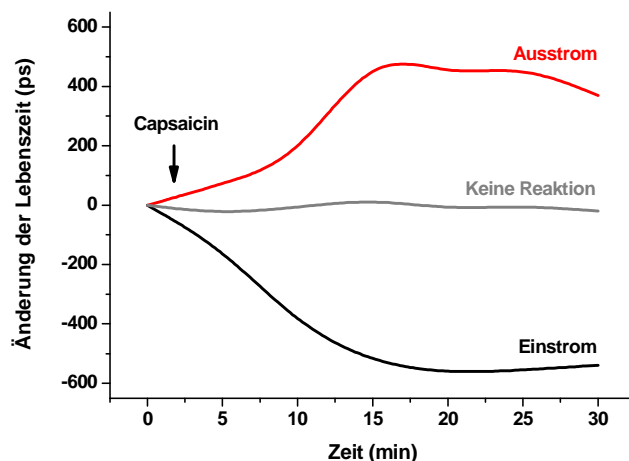
Für die immunhistochemischen Experimente wurden zwei verschiedene TMEM16A-Antikörper verwendet, ein monoklonaler (mc) und ein polyklonaler (pc) Antikörper. Abbildung 3.21 zeigt, dass TMEM16 von den meisten Zellen exprimiert wird und weist somit Ähnlichkeiten zu dem Expressionsmuster der Chloridtransporter auf.

### **3.7 Erste Versuche zu Capsaicin-induzierten Chloridströmen in Spinalganglienzellen**

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Spinalganglienzellen alle notwendigen Komponenten zur Verwendung von Chlorid in der Signaltransduktion besitzen. Diese spielen aufgrund der Beeinflussung durch Entzündungsmediatoren möglicherweise eine Rolle in der verstärkten Schmerzwahrnehmung und damit bei der Ausbildung von Hyperalgesie. So wird vermehrt die aktive Form des NKCC1-Transporters exprimiert, während der Chloridexporter KCC2 herunterreguliert wird. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration. Gleichzeitig wird von den Spinalganglienzellen der Chloridkanal TMEM16A exprimiert. Ob die Spinalganglienzellen, auf die Aktivierung eines Transduktionskanals hin mit Chloridströmen reagieren und diese ebenfalls durch Entzündungsmediatoren beeinflusst werden, wurde in 2P-FLIM-Messungen untersucht.

Hierfür wurden die Zellen mit dem Chlorid sensitiven Farbstoff MQAE (5 mM) beladen und anschließend mit 5  $\mu$ M Capsaicin stimuliert. Zunächst wurde die Ruhelebenszeit vor der Capsaicinstimulation aufgenommen. Nach der Stimulation wurde dann für 25 Minuten alle 5 Minuten die Lebenszeit gemessen. So konnte die Änderung der Chloridkonzentration nach Aktivierung eines Transduktionskanals über die Zeit aufgezeichnet werden. Abbildung 3.22 zeigt exemplarisch die Reaktion dreier Zellen einer Messung. Die Zellen lassen sich in drei Kategorien einteilen: Zellen mit Chloridausstrom (AS-Zellen), Zellen mit Chlorideinstrom (ES-Zellen) und Zellen, welche keine Reaktion zeigten (KR-Zellen).

Aufgrund technischer Limitierungen konnten spontane Chloridfluktuationen in der Ruhephase nicht gemessen werden. Es war zudem nur in Abständen von fünf Minuten möglich Messungen der Fluoreszenzlebenszeit (FL) durchzuführen. In Abbildung 3.22 scheinen die Zellen deshalb schon vor der Capsaicinstimulierung Chloridströme zu zeigen, die dann durch das Capsaicin in die gleiche Richtung verstärkt werden. Allerdings kann aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung hierzu keine eindeutige Aussage gemacht werden.



**Abbildung 3.22:** Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration nach Stimulierung mit 5  $\mu\text{M}$  Capsaicin.

Gemessen wurde die Änderung der Lebenszeit in Pikosekunden (ps) über die Zeit in Minuten (min.).

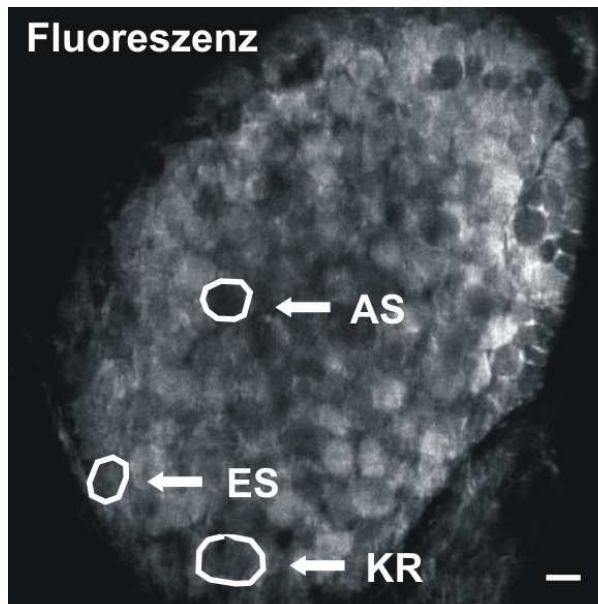
Rot: Die Fluoreszenzlebenszeit (FL) der Zelle nimmt zu. Die Zelle reagiert mit einem Chloridausstrom.

Grau: Die Zelle zeigt keine Reaktion.

Schwarz: Die Zelle reagiert mit einem Chlorideinstrom, da die FL abnimmt.

Da intakte DRGs gemessen wurden, muss Capsaicin erst die das Spinalganglion umgebenden Häute überqueren, um zu den Zellen zu gelangen und um diese in verschiedenen Tiefen zu erreichen. Übereinstimmend hiermit zeigt die Auswertung aller Zellen sehr große Unterschiede in den Chloridströmen, bezüglich Geschwindigkeit und Dauer der Reaktionen. Die Auswertung der Daten ist in Kapitel 2.6.4 detailliert beschrieben.

Abbildung 3.23 zeigt die Zeitreihe eines optischen Schnittes aus einem gemessenen DRG in einer Falschfarbendarstellung. Der hochauflösende *Scan* der Fluoreszenz wurde als Matrize verwendet, um einzelne Zellen zu erkennen und zu markieren. Die dort gesetzten Markierungen wurden dann auf die Lebenszeitbilder zur Auswertung der Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  und damit indirekt der Chloridkonzentration übertragen. Markiert sind ebenfalls drei Zellen, von denen eine mit einem Ausstrom (AS-Zelle), eine mit einem Einstrom (ES-Zelle) und eine nicht reagiert (KR-Zelle). Die Zelle mit Chloridausstrom zeigt in der Ruhefluoreszenz eine rote Färbung (hohe intrazelluläre Chloridkonzentration) und wird nach der Capsaicinstimulation grün (niedriges Chlorid). Dagegen verändert sich die Färbung der Zelle mit Einstrom von gelb nach rot. Die Zelle ohne Reaktion behält über die gesamte Messung eine rote Färbung. Deutlich zu sehen ist die heterogene Verteilung der intrazellulären Chloridkonzentration, die auch nach der Stimulierung mit Capsaicin erhalten bleibt.



**Abbildung 3.23:** Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration nach Capsaicinstimulation.

Fluoreszenz: Hochauflösender Fluoreszenzscan zur Markierung der Zellen.

Ruhe: Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ) vor Capsaicinzugabe.

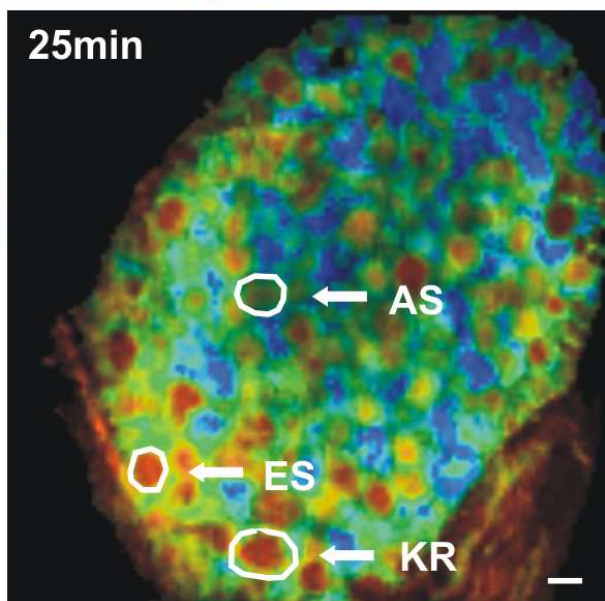
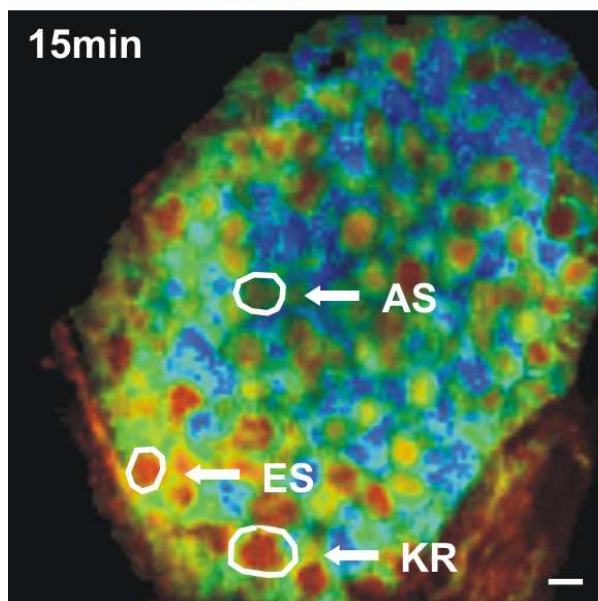
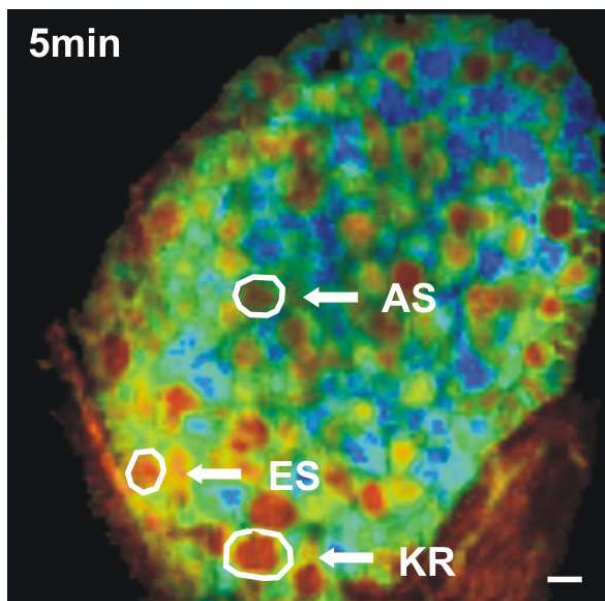
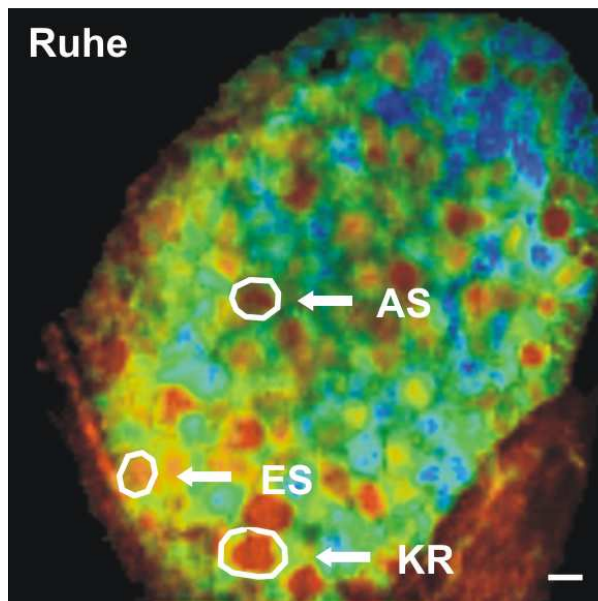
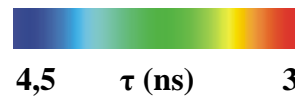
5 min, 15 min, 25 min: Falschfarbendarstellung von  $\tau$  nach Capsaicinzugabe.

AS: Zelle mit Ausstrom; ES: Zelle mit Einstrom;

KR: Zelle ohne Reaktion

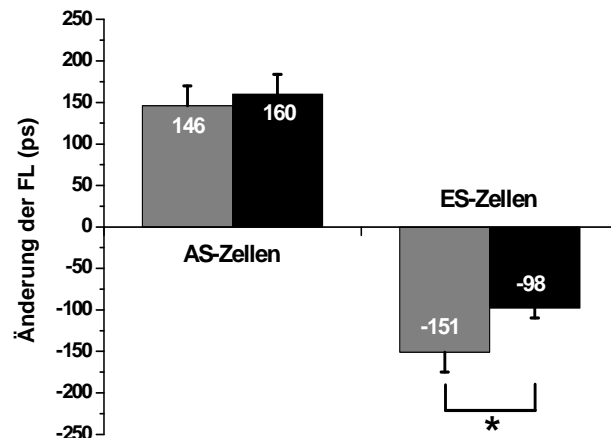
Farbstoff zur Detektion von Chlorid: 5 mM MQAE

Größenbalken 50  $\mu\text{m}$ . 20x Objektiv.



In der statistischen Auswertung (Abbildung 3.24) wurde zum einen zwischen unbehandelten und behandelten Zellen unterschieden, zum anderen wurden auch die Anzahl der Zellen mit Chlorideinstrom (ES-Zellen) und mit Chloridausstrom (AS-Zellen) getrennt ausgewertet. Analysiert wurde auch die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit dieser Zellen nach Capsaicinzugabe in behandelten und unbehandelten Spinalganglienzellen. Insgesamt wurden 692 behandelte und 1032 unbehandelte Zellen aus sieben Spinalganglien ausgewertet.

**AS-Zellen:** Die statistische Auswertung zeigt, dass 39,5 % ( $\pm 11$ ) der unbehandelten Zellen und 41 % ( $\pm 8$ ) der behandelten Zellen mit einem Chloridausstrom reagieren. Damit hat die Inkubation mit Entzündungsmediatoren keinen Einfluss auf die Anzahl der Zellen, die mit einem Chloridausstrom auf Capsaicinstimulierung reagieren. Das gleiche gilt für die mittlere Zunahme der Fluoreszenzlebenszeit. Diese betrug in unbehandelten Zellen 146 ps ( $\pm 24$ ) und in inkubierten Zellen 160 ps ( $\pm 24$ ). Auch hier ist der Unterschied nicht signifikant.



**Abbildung 3.24:** Beeinflussung der Chloridströme durch Entzündungsmediatoren.

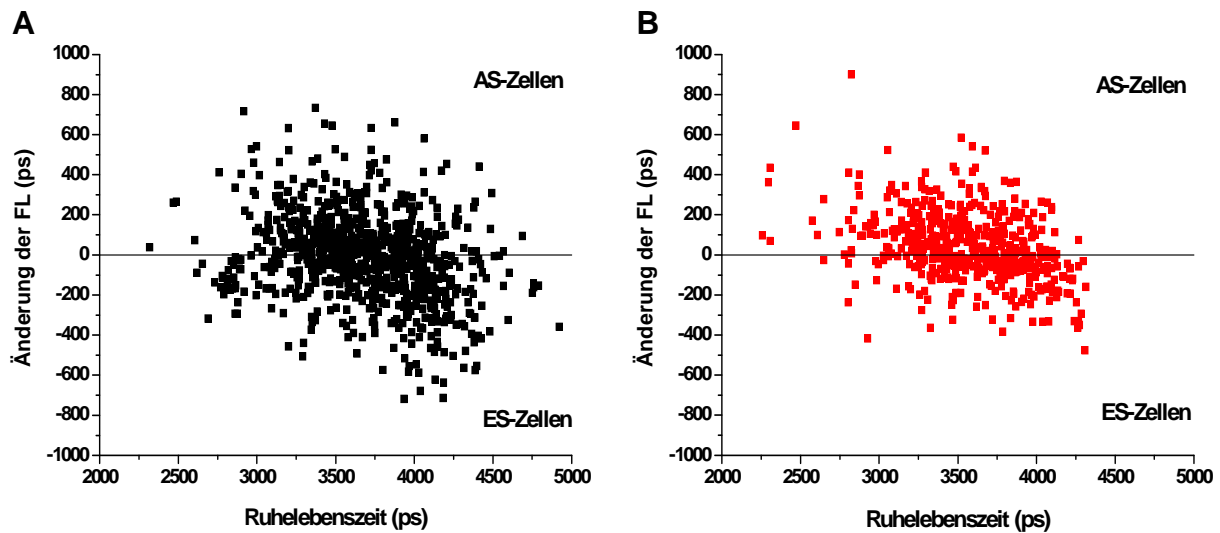
Links: Zunahme der FL (ps) in unbehandelten (grau) und 3 h behandelten (schwarz) AS-Zellen.

Rechts: Abnahme der FL (ps) in unbehandelten (grau) und 3 h behandelten (schwarz) ES-Zellen.

Signifikanzkriterium:  $p^* \leq 0,05$ .

**ES-Zellen:** Im Gegensatz zu den AS-Zellen reduziert die Behandlung mit Entzündungsmediatoren die Abnahme der FL signifikant. Diese nimmt im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach drei Stunden Inkubation von -151 ps ( $\pm 24$ ) auf -98 ps ( $\pm 24$ ) ab. Ebenso nimmt die Anzahl der mit einem Einstrom reagierenden Zellen, wenn auch nicht signifikant, von 51 % ( $\pm 10$ ) auf 37 % ( $\pm 20$ ) ab. Gleichzeitig nimmt zudem die Anzahl der Zellen ohne Reaktion zu (unbehandelt: 15% ( $\pm 2,5$ ); behandelt: 27 % ( $\pm 18$ )).

In Abbildung 3.25 ist die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit unbehandelter (A) und behandelter (B) Zellen in Bezug auf ihre Ruhelebenszeit dargestellt. Zellen mit einem Chloridausstrom (AS-Zellen) liegen oberhalb der Nulllinie, da sie eine Zunahme der Fluoreszenzlebenszeit zeigen. Ein Chlorideinstrom wird durch die Abnahme der FL gekennzeichnet. Deshalb liegen diese Zellen (ES-Zellen) unter der Nulllinie.



**Abbildung 3.25:** Änderung der FL unbehandelter Zellen (896) und behandelter Zellen (512) in Bezug auf ihre Ruhelebenszeit.

Zellen mit Chloridausstrom (AS-Zellen) liegen oberhalb der Nulllinie, Zellen mit Chlorideinstrom (ES-Zellen) liegen unterhalb der Nulllinie.

A: Unbehandelte Zellen. B: 3h behandelte Zellen

Die meisten Reaktionen zeigen sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Spinalganglien Zellen mit Ruhelebenszeiten zwischen 3200ps und 4200ps. Im Fall der Chloridausströme scheint die Behandlung mit Entzündungsmediatoren zu mehr Zellen mit kurzen Ruhelebenszeiten und damit einer erhöhten intrazellulären Chloridkonzentration zu führen. Diese Zellen zeigen starke Chloridausströme. Allerdings treten bei unbehandelten Spinalganglien auch vermehrt große Chloridausströme in Zellen mit langen Ruhelebenszeiten (4000 ps – 4700 ps) auf, die in behandelten DRGs nicht mehr beobachtet werden.

Eindeutiger ist auch hier der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Chlorideinstrome. Die stärksten Einstrome zeigen unbehandelte Zellen mit langen Ruhelebenszeiten (3700 ps - 4500 ps) und damit niedriger intrazellulärer Chloridkonzentration. Schwache Chlorideinstrome treten auch bei Zellen mit kürzeren Lebenszeiten (2500 ps – 3000 ps) auf. Nach der Behandlung mit Entzündungsmediatoren für drei Stunden, treten Chlorideinstrome nur noch vereinzelt in Zellen mit diesen kurzen Ruhelebenszeiten auf. Auch nimmt insgesamt die Stärke der Einstrome nach Behandlung ab. Während unbehandelte Zellen Abnahmen in der FL bis zu -800 ps zeigen, erreichen behandelte Zellen nur vereinzelt eine maximale Abnahme von 500 ps.

Diese vorläufigen Messungen weisen daraufhin, dass die Aktivierung des TRPV1-Kanals Chloridströme in Spinalganglienzellen induzieren kann. Die Zellen der DRGs reagieren sowohl mit Ein- als auch mit Ausströmen auf Capsaicin. Dabei wird die Stärke der Einstrome durch eine dreistündige Inkubation mit Entzündungsmediatoren signifikant verringert,

während die Ausströme unbeeinflusst bleiben. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Beobachtung, dass Entzündungsmediatoren zu einer verstärkten Chloridakkumulation und damit möglicherweise zu einer Disinhibition der Zellen führen.

Allerdings lässt sich die Stärke des Ausstroms nicht mit kurzen Ruhelebenszeiten und damit erhöhten intrazellulären Chloridkonzentrationen korrelieren. Sowohl Zellen mit niedriger als auch solche mit erhöhter Chloridkonzentration zeigen Chloridausströme in gleicher Stärke. Die Behandlung mit Entzündungsmediatoren führt zu mehr starken Ausströmen in Zellen mit kurzen Ruhelebenszeiten, wohingegen solche mit langen Lebenszeiten nur noch schwache oder keine Chloridausströme mehr zeigen.

In unbehandelten Spinalganglien zeigen vermehrt Zellen mit niedrigen Chloridkonzentrationen und langen Ruhelebenszeiten starke Chlorideinströme. Die Behandlung mit Entzündungsmediatoren führt eindeutig zu einer Reduzierung der Einstromstärke in diesen Zellen.

### 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ist in der vorliegenden Arbeit gelungen ein Modell auf zellulärer Basis zu etablieren, welches die Untersuchung des Einflusses von Entzündungsmediatoren auf die Signaltransduktion in Spinalganglienneuronen erlaubt. Die hier verwendeten Entzündungsmediatoren ATP, NGF, Bradykinin und PGE<sub>2</sub> können durch Bindung an ihre Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (Kapitel 3.1.1) und führen so zu einer verstärkten Expression der Entzündungsmarker *Substance P* und CGRP (Kapitel 3.1.3). Diese Hochregulation der beiden Entzündungsmarker in behandelten Spinalganglien zeigt, dass die Reaktionen der Zellen ähnlich denen physiologischer Entzündungsreaktionen sind. Auch die Expression der Transduktionskanäle TRPV1, TRPV2 und ASIC3 wird durch den Einfluss von Entzündungsmediatoren gesteigert (Kapitel 3.2). Experimente an der Primärkultur zeigen zudem eine reduzierte Desensitivierung des TRPV1-Kanals durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren, die zu einer gesteigerten TRPV1-Aktivität führt (Kapitel 3.3).

Allerdings ist die Anwendung des *ex vivo* Entzündungsmodells auf drei Stunden limitiert, da in den Vitalitätstests ein Absterben der Zellen bei Inkubationszeiten über dreieinhalb Stunden beobachtet wurde (Kapitel 3.1.2).

Eine wichtige und in Spinalganglien noch kaum erforschte Komponente der Signaltransduktion ist die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration. Sie spielt ebenfalls in Entzündungen eine Rolle und wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch (Kapitel 3.4 bis 3.6) und physiologisch (Kapitel 3.4 und 3.7) untersucht. Die Chloridhomöostase wird in den Spinalganglienzellen von den Transportern NKCC1 und KCC2 bestimmt. Entzündungsmediatoren führen zu einer schnellen phosphorylierungsabhängigen Aktivierung und einer langsamen Expressionsteigerung von NKCC1. Die Expression von KCC2 wird dagegen herunterreguliert (Kapitel 3.4 und 3.5). Dies resultiert in einer verstärkten Chloridakkumulation und erhöhten intrazellulären Chloridkonzentration in den Zellen der Spinalganglien (Kapitel 3.4).

In ersten Versuchen wurde auch die Öffnung Calcium-gesteuerter Chloridkanäle durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals untersucht. Diese werden möglicherweise durch den TMEM16A-Kanal vermittelt, welcher als Kandidat für den Calcium-aktivierten Chloridkanal in DRGs gilt und von den Spinalganglienzellen exprimiert wird (Kapitel 3.6). Die Aktivierung des TRPV1-Kanals führt in den Spinalganglienzellen sowohl zu Chloridausströmen als auch zu Chlorideinströmen. Unerwarteterweise kann die Stärke der

Ströme nicht mit der Ruhelebenszeit der Zellen korreliert werden. So zeigen auch Zellen mit niedrigen Chloridkonzentrationen Ausströme und solche mit hohem Chlorid starke Einströme. Die Behandlung mit Entzündungsmediatoren führt zu einer signifikanten Reduzierung in der Stärke der Einströme, während die Ausströme unbeeinflusst bleiben (Kapitel 3.7). Weitere Versuche sind hier notwendig, um die Verwendung von Chlorid in der Signaltransduktion der Spinalganglienzellen zu verstehen.

Das *ex vivo* Entzündungsmodell bietet insgesamt die Möglichkeit einen entzündungsähnlichen Zustand in einem zellulären System zu induzieren. Die Sensibilität der Zelle für Schmerzreize wird gesteigert, da mehr Transduktionskanäle exprimiert werden und die Zelle möglicherweise durch eine verstärkte Chloridakkumulation „enthemmt“ wird. Diese Veränderungen in der Signaltransduktion der Zelle können zu entzündungsbedingten Schmerzen und Hyperalgesie beitragen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Ein *ex vivo* Entzündungsmodell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Spinalganglienzellen und Entzündungsmediatoren

Verschiedene Studien untersuchen den direkten Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Zellen der Spinalganglien in *ex vivo* und *in vitro* Modellen. Sie zeigen die Modulation der Neuropeptidfreisetzung und Aktionspotentialgenerierung in einem kurzen Zeitraum von maximal dreißig Minuten (Averbeck et al., 2000; Kessler et al., 1992; Ma et al., 2006; Song et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit ist es jetzt gelungen ein neues Modell zu etablieren, das den langfristigen Einfluss der Entzündungsmediatoren ATP, Bradykinin, PGE<sub>2</sub> und NGF auf die Signaltransduktion in Spinalganglienzellen über einen Zeitraum von drei Stunden analysiert. Das Modell kann sowohl *ex vivo* an intakten DRGs als auch *in vitro* an dissoziierten Zellen angewendet werden. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Analyse der Beeinflussung von Transduktionskanälen und Chlorid als Komponente der Signaltransduktion.

Zur Etablierung des Modells wurde zunächst die Expression der Rezeptoren für die Entzündungsmediatoren im Gewebe und in dissoziierten Zellen nachgewiesen. Die Zellen exprimieren funktionelle Rezeptoren, da dissoziierte Spinalganglienneurone auf ATP, Bradykinin und PGE<sub>2</sub> mit Calciumeinströmen reagieren. Dies steht im Einklang mit den oben genannten Modellen. Da NGF über die Bindung an seinen Rezeptor die Transkription im Zellkern reguliert (Hefti et al., 2006; Ji et al., 2002; Zhang et al., 2005), wurden wie erwartet keine direkten Calciumantworten gemessen. Vitalitätstests begrenzen die Anwendung des Modells auf drei Stunden, da bei längerer Inkubation die Zellen schnell absterben. Die immunhistochemischen Expressionstudien von SP und CGRP zeigen einen signifikanten Anstieg der beiden Neuropeptide. Damit lassen sich die Reaktion in diesem Modell mit physiologischen Entzündungsprozessen vergleichen, da sie auch in *in vivo* Modellen als Entzündungsmarker verwendet werden und sowohl ihre Expression als auch ihre Freisetzung in Entzündungen verstärkt ist (Bulling et al., 2001; Harrison und Geppetti, 2001; Joachim et al., 2007; Smith et al., 2000; Staton et al., 2007; Weissner et al., 2006; Xu et al., 2005).

Mit der *ex vivo* und *in vitro* Langzeitanwendung des Modells und der Vergleichbarkeit zu physiologischen Entzündungsprozessen bietet das Modell ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur Untersuchung der Mechanismen in der Schmerztransduktion.

## 4.2 Entzündungsmediatoren steigern die Expression von TRPV1, TRPV2 und ASIC3

Eine erhöhte Expression von TRPV1 zeigen vor allem *in vivo* Modelle, die eine periphere Entzündung unter anderem durch die Injektion von CFA erzeugen. Auch konnte ein verstärkter Einbau von TRPV1-Rezeptoren in die Membran von Schmerzzellen nachgewiesen werden. Expression und Einbau werden dabei von NGF reguliert (Amaya et al., 2003; Amaya et al., 2004; Greffrath et al., 2003; Ji et al., 2002; Morenilla-Palao et al., 2004; Xu et al., 2009; Zhang et al., 2005). Die Manifestation einer Entzündung *in vivo* dauert jedoch Tage. Mit dem hier entwickelten *ex vivo* Modell ist es gelungen, die Änderung der Expression verschiedener Transduktionskanäle auf zellulärer Basis und wenige Stunden nach Induzierung der Entzündung zu untersuchen.

Die immunhistochemischen Studien zeigen, dass das hier etablierte Modell ebenfalls einem Anstieg in der Anzahl TRPV1- und TRPV2-exprimierender Zellen nach 2 bis 3 Stunden Inkubation hervorruft (Abb. 4.1). Die Ergebnisse zu TRPV2 decken sich mit einer Studie von Shimosato et al. (2005). Zwei Tage nach CFA-Injektion wurde auch hier eine Steigerung der TRPV2-Expression beobachtet, die aber im Gegensatz zur TRPV1-Expression nicht über NGF reguliert wird. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg in der Anzahl ASIC3-exprimierender Zellen nach dreistündiger Inkubation (Abb. 4.1). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen anderer Studien an unterschiedlichen Entzündungsmodellen (Ikeuchi et al., 2009; Mamet et al., 2002; Ohtori et al., 2006). Dagegen blieb die Expression der Kanäle TRPV4 und P2X<sub>3</sub> durch die Behandlung mit dem *ex vivo* Modell unverändert.

Die Expression verschiedener Transduktionskanäle führt zu polymodalen Nozizeptoren, die unterschiedliche Schmerzreize detektieren können (Greffrath et al., 2003; Kobayashi et al., 2005; Molliver et al., 2005; Ugawa et al., 2005). Wird die Co-Expression von Transduktionskanälen gesteigert, kann dies zu einer verstärkten Schmerzwahrnehmung beitragen. Auch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren erhöht die Anzahl der Zellen mit Co-Expression von TRPV1 mit TRPV2, ASIC3 und P2X<sub>3</sub>. Die Co-Expression mit P2X<sub>3</sub> ist auffällig, da der Kanal in der Einzelexpression nur einen nicht eindeutigen Anstieg zeigte. Dies könnte darauf hindeuten, dass nur vorher schon P2X<sub>3</sub>-exprimierende Zellen nach der Behandlung mit Entzündungsmediatoren jetzt auch TRPV1 exprimieren.

Ähnlich den *in vivo* Modellen kann auch das hier etablierte Modell eingesetzt werden, um den Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression von Transduktionskanälen zu untersuchen.

### **4.3 Entzündungsmediatoren reduzieren die Desensitivierung von TRPV1**

Die Aktivierung des TRPV1-Kanals führt zu einem Calciumeinstrom. Das einströmende Calcium aktiviert Calcineurin, welches den Rezeptor dephosphoryliert und damit desensitiviert. Erst die darauf folgende Phosphorylierung von TRPV1 durch PKA und CAMKII versetzen den Kanal wieder in den aktivierbaren Zustand (Jung et al., 2004; Mohapatra und Nau, 2003; Mohapatra und Nau, 2005). Eine Studie an TRPV1-transfizierten HEK-Zellen zeigt jedoch, dass die verstärkte Aktivierung der PKA die Calcium-abhängige Desensitivierung reduziert und so die mehrfache Aktivierung des TRPV1-Kanals im Abstand weniger Sekunden ermöglicht (Mohapatra und Nau, 2003).

Auch die Calcium Imaging Experimente dieser Arbeit an dissoziierten Spinalganglienzellen zeigen eine kontinuierliche Abnahme der Calciumamplitude nach mehrfacher Stimulierung mit 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin bei unbehandelten Zellen. Zusätzlich nimmt die Anzahl der reagierenden Zellen ohne Behandlung im Verlauf von drei Stunden gleichmäßig ab. Dies spricht für eine Desensitivierung des Kanals. Behandelte Zellen zeigen dagegen im Vergleich eine signifikant weniger starke Abnahme der Amplitude und die Anzahl der reagierenden Zellen bleibt in Bezug auf den ersten Reiz fast unverändert. Die im hier etablierten Modell verwendeten Entzündungsmediatoren  $\text{PGE}_2$  und NGF aktivieren die Proteinkinase A (PKA), wirken damit der Desensitivierung entgegen, erhalten so die TRPV1-Aktivität auch nach mehrfacher Aktivierung und können deshalb vielleicht zu verstärkten Calciumeinstromen führen (Abb. 4.1).

#### **4.4 Entzündungsmediatoren führen zu einem Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration**

Sowohl im zentralen Nervensystem als auch in den Spinalganglien ist die intrazelluläre Chloridkonzentration nicht statisch und wird in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes im Gewebe reguliert. In Epilepsie-Modellen zeigen kortikale und hippocampale Neurone erhöhte Chloridkonzentrationen, die zu einem Verlust der GABAergen Inhibition und der Übererregbarkeit dieser Zellen führen (Cohen et al., 2002; Jin et al., 2005; Palma et al., 2006; Rivera et al., 2004). Spinalganglien weisen nach einer Axotomie der Nerven ebenfalls erhöhte Chloridkonzentrationen auf, die in exzitatorischen Chloridströmen resultieren (Andre et al., 2003; Pieraut et al., 2007). Aufgrund der großen Zahl ähnlicher Beobachtungen wird der Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration durch verstärkte Chloridakkumulation und die dadurch reduzierte GABAerge und glycinerge Inhibition als allgemeiner Mechanismus zur Entstehung neuronaler Übererregbarkeit und Hyperalgesie angesehen (de Koninck, 2007). Die Untersuchungen zum Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die intrazelluläre Chloridkonzentration in Spinalganglienzellen wurden hier an intakten DRGs durchgeführt. Die Erhaltung des Gewebeverbands spielt eine wichtige Rolle, da vor allem der Verlust der Interaktion zwischen Neuronen und Satellitenzellen in einer Veränderung der Reaktionen der Nervenzellen resultiert (Tang et al., 2007). Die 2P-FLIM Experimente zeigen einen Anstieg der Chloridkonzentration in den Spinalganglienzellen nach zwei und drei Stunden Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine genaue Kalibrierung der Chloridkonzentration war nicht möglich, da die dazu verwendeten cytotoxischen Ionophore Tributylzinn und Nigericin die Zellen so stark schädigten, dass die Anpassung an die extrazelluläre Chloridkonzentration nicht gewährleistet werden konnte. Wie groß dieser Anstieg in der Chloridkonzentration wirklich ist, konnte daher nicht bestimmt werden. Deshalb wurde nur die relative Änderung der Chloridkonzentration im Vergleich zu unbehandelten DRGs analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass auch der Einfluss von Entzündungsmediatoren über den Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration zu einer Verstärkung der Signaltransduktion in Spinalganglienzellen und damit möglicherweise zu Hyperalgesie führt (Funk et al., 2008). Der Einfluss dieses Anstiegs auf Chloridströme in Spinalganglienzellen wurde zusätzlich in ersten Experimenten zur Aktivierung Calcium-gesteuerter Chloridkanäle durch TRPV1-induzierte Calciumeinströme untersucht.

## 4.5 Mechanismen zur Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration

Zur Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration werden die Transporter KCC2 und NKCC1 eingesetzt. In Spinalganglienzellen wird Chlorid von NKCC1 akkumuliert (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Gilbert et al., 2007; Sung et al., 2000) und durch dessen phosphorylierungsabhängige Aktivität konstant gehalten (Darman und Forbush, 2002; Rocha-Gonzalez et al., 2008). Dagegen wird die Rolle von KCC2 in den Spinalganglien kontrovers diskutiert. Einige Studien fanden keinen Nachweis für die Expression von KCC2 (Kanaka et al., 2001; Morales-Aza et al., 2004; Price et al., 2006), während andere eindeutig KCC2 mRNA und Protein nachwiesen (Gilbert et al., 2007; Lu et al., 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Expression beider Transporter auf Proteinebene nachgewiesen und zusätzlich eine Regulation der Transporter-Expression durch Entzündungsmediatoren beobachtet (Funk et al., 2008).

Nach dreistündiger Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell wurde in immunhistochemischen Untersuchungen ein deutlicher Anstieg von NKCC1 und eine eindeutige Abnahme von KCC2 im Vergleich zu unbehandelten Spinalganglien gezeigt (Abb. 4.1). Da diese regulatorischen Einflüsse auf die Expression der beiden Transporter nicht nur in DRGs der gleichen Position (DRG-Pärchen) auftreten, sondern auch beim Vergleich unterschiedlicher Positionen (frei gewählte DRGs) beobachtet wurden, kann diese Expressionskontrolle durch Entzündungsmediatoren als allgemeiner Mechanismus zur Steigerung der Chloridakkumulation gedeutet werden (Funk et al., 2008). Im Rückenmark zeigen verschiedene Schmerzmodelle eine ähnliche Regulation der Chloridtransporter. Hier spielt vor allem die Regulation der KCC2-Expression eine wichtige Rolle. In verschiedenen Modellen wird die KCC2-Expression stark herunterreguliert (Cramer et al., 2008; Miletic und Miletic, 2008; Nomura et al., 2006; Zhang et al., 2008). Diese Beobachtungen können durch die hohe *Turnover*-Rate des KCC2-Transporters erklärt werden. Rivera et al. (2004) beobachteten den Abbau von 50% der in der Membran enthaltenen KCC2-Moleküle innerhalb von 20 Minuten. Der Abbau von KCC2-Molekülen und die Herunterregulation der Expression des Chloridexporters im Rückenmark und den DRGs unterstützen somit die gesteigerte Chloridaufnahme in pathophysiologischen Zuständen.

Die hier durchgeführten Expressionsstudien erklären allerdings nicht den Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration nach zweistündiger Behandlung mit dem *ex vivo* Entzündungsmodell, der in den FLIM-Experimenten beobachtet wurde. Es ist jedoch bekannt, dass der Aktivitätszustand von NKCC1 über Phosphorylierung kontrolliert wird (Darman und

Forbush, 2002; Flemmer et al., 2002; Liedtke et al., 2005; Rocha-Gonzalez et al., 2008; Smith et al., 2008). Mit einem Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte Form des NKCC1-Transporters (p-NKCC1) erkennt, wurde in immunhistochemischen Untersuchungen ein signifikanter Anstieg von p-NKCC1 schon nach einstündiger Inkubation mit den Entzündungsmediatoren im Vergleich zu unbehandelten DRGs nachgewiesen (Funk et al., 2008). Da die Phosphorylierung den NKCC1-Transporter aktiviert führt dies zu einer verstärkten Chloridakkumulation.

Diese Ergebnisse weisen auf einen zweistufigen Mechanismus zur Steigerung der intrazellulären Chloridkonzentration hin. Als schnelle Reaktion auf die Behandlung mit Entzündungsmediatoren wird NKCC1 phosphoryliert, dadurch aktiviert und so die Chloridakkumulation gesteigert. Bei andauernder Interaktion von Entzündungsmediatoren und Spinalganglienzellen wird wie bei den Transduktionskanälen auch die Expression der Chloridtransporter beeinflusst. Da vermehrt NKCC1 exprimiert und die KCC2-Expression reduziert wird, führt dies zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration, was möglicherweise in einer Verstärkung der Signaltransduktion resultiert.

#### **4.6 Capsaicin induziert Chloridströme in Zellen intakter Spinalganglien**

Die Inkubation mit Entzündungsmediatoren in dieser Arbeit schafft über die gesteigerte Expression verschiedener Transduktionskanäle, die reduzierte Desensitivierung des TRPV1-Kanals und eine verstärkte Chloridakkumulation die Voraussetzungen für eine potenzierte Signaltransduktion in Spinalganglienzellen.

Bisher nicht geklärt war jedoch, ob die Aktivierung von Transduktionskanälen wirklich zur Öffnung von Chloridkanälen führt. Im Mittelpunkt stand hier die Untersuchung Calcium-aktivierter Chloridkanäle. Die Calcium Imaging Experimente zum Einfluss der Entzündungsmediatoren auf die TRPV1-Aktivität zeigen, dass 0,5  $\mu$ M Capsaicin Calciumeinströme induziert, deren Stärke ausreicht um Calcium-aktivierte Chloridkanäle zu öffnen. Die Identität dieser Chloridkanäle wurde bis heute noch nicht eindeutig geklärt, doch seit kurzer Zeit rückt der TMEM16A-Kanal in den Fokus der Forschung (Caputo et al., 2008; Hartzell, 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008). Immunhistochemische Untersuchungen dieser Arbeit konnten die Expression von TMEM16A in fast allen Spinalganglienzellen nachweisen, wobei auch hier übereinstimmend mit den Ergebnissen von

Yang et al. (2008) der Kanal verstärkt in kleinen Spinalganglienneuronen exprimiert wurde. Diesen werden nozizeptive Eigenschaften zugesprochen.

Einige funktionelle Studien zeigen, dass Bradykinin und die Axotomie der Nerven zur Öffnung Calcium-aktivierter Chloridkanäle und einer damit verbundenen Übererregbarkeit der Neurone führen (Andre et al., 2003; Hilaire et al., 2005; Oh und Weinreich, 2004). Alle Untersuchungen fanden allerdings an dissoziierten Zellen statt. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit erste 2P-FLIM-Messungen mit 5  $\mu$ M Capsaicin an intakten DRGs durchgeführt. Sie zeigen, dass die Aktivierung des TRPV1-Kanals im unbehandelten Gewebe zu Calcium-abhängigen Chloridströmen führt. Im Vergleich zu den Calcium Imaging Experimenten an dissoziierten Zellen wurde zur Aktivierung der Zellen in intakten DRGs eine höhere Capsaicinkonzentration gewählt, da diese noch von der Dura mater umhüllt waren. Die Dura Mater erschwert das Vordringen von Capsaicin zu den Neuronen. Wie das heterogene Muster der intrazellulären Chloridverteilung vermuten lässt (Gilbert et al., 2007), wurden sowohl Chloridausströme als auch Chlorideinströme verschiedener Stärke gemessen (Abb. 4.1). Jedoch kann die Richtung des Chloridstroms nicht eindeutig mit der intrazellulären Chloridkonzentration korreliert werden. So zeigen zum Beispiel Zellen mit langer Ruhelebenszeit und damit niedriger Chloridkonzentration ebenfalls Ausströme und solche mit hohem intrazellulärem Chlorid Einströme. Technische Limitierungen ermöglichten zudem nur eine geringe zeitliche Auflösung zur Aufnahme der Signale. Die fehlende Kalibrierung macht es auch in diesen Untersuchungen unmöglich Aussagen über die exakte Größe der Ströme zu treffen.

Auffällig ist ebenfalls die große Anzahl der Zellen mit Chloridsignal. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen eine TRPV1-Expression in nur 36 % der Zellen. Auch in den Experimenten an dissoziierten Zellen reagieren nur 49 % der Neurone mit einem Calciumeinstrom. Die 2P-FLIM-Experimente zeigen jedoch Chloridsignale in beinahe 90 % der Zellen. Ob wirklich alle Zellen auf Capsaicin reagiert haben, oder sich die Zellen über einen nicht bekannten Mechanismus bei Aktivierung gegenseitig erregen können ist nicht klar, da das Chloridsignal nicht definitiv der Aktivierung von TRPV1 zugeordnet werden konnte.

Diese ersten Untersuchungen zu Chloridströmen in den Spinalganglienzellen weisen daraufhin, dass die Öffnung des TRPV1-Kanals zu Aktivierung Calcium-gesteuerter Chloridkanäle führt und die Neurone Chlorid in ihrer Signaltransduktion einsetzen. Allerdings sind weitere Studien notwendig, um die Entstehung und Bedeutung dieser Chloridsignale zu entschlüsseln.

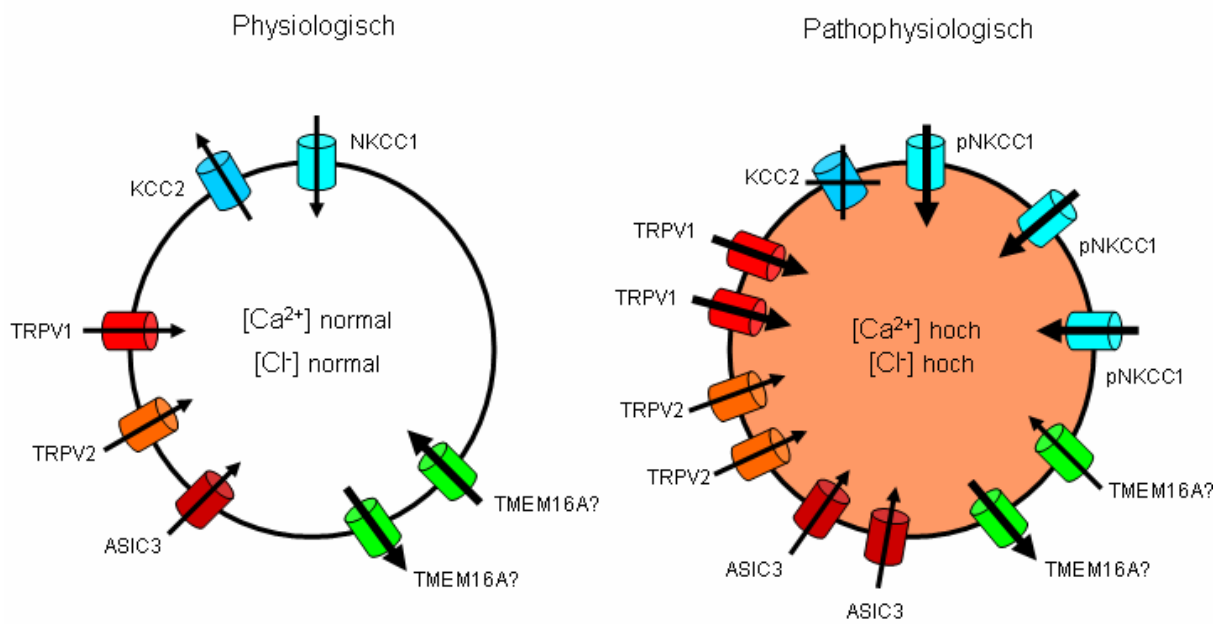
## **4.7 Entzündungsmediatoren beeinflussen Chloridströme in Zellen intakter Spinalganglien**

Die direkte Aktivierung der Spinalganglienzellen mit Capsaicin resultiert sowohl in Chlorideinströmen als auch in Chloridausströmen. Die Beeinflussung dieser Ströme durch Entzündungsmediatoren wurde ebenfalls in 2P-FLIM-Messungen an intakten Spinalganglien untersucht.

Nach dreistündiger Behandlung Entzündungsmediatoren bleiben zwar die Chloridausströme in Anzahl und Stärke unverändert, die Einstromstärke dagegen nimmt im Vergleich zu unbehandelten DRGs signifikant ab. Auch die Anzahl der Zellen, die mit einem Einstrom reagieren nimmt zwar nicht signifikant aber doch deutlich ab.

Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen eine Rolle von Chlorid in der Signaltransduktion von Spinalganglienzellen, die abhängig vom Zustand des Gewebes kontrolliert wird. Im Rückenmark resultiert ein Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration in einer Abnahme der Inhibition durch verringerten Chlorideinstrom (de Koninck, 2007). Da auch in den Spinalganglien die Chlorideinströme beeinflusst werden, liegt hier eventuell ebenfalls die Disinhibition der Neurone der verstärkten Schmerzwahrnehmung und Hyperalgesie zugrunde.





**Abbildung 4.1:** Veränderung der Signaltransduktion in Spinalganglien durch Entzündungsmediatoren.

Im physiologischen Zustand leiten Transduktionskanäle (warme Farben) nach der Aktivierung durch Schmerzreize Calciumionen ins Zellinnere. Die intrazelluläre Chloridkonzentration wird durch die ausbalancierte Aktivität der Transporter KCC2 (blau) und NKCC1 (hellblau) konstant gehalten. Der Calciumeinstrom öffnet Calcium-gesteuerte Chloridkanäle (grün), möglicherweise TMEM16A, und die Zelle reagiert mit einem Chlorideinstrom oder einem Chloridausstrom.

Entzündungsinduzierte pathophysiologische Veränderungen führen zu einer verstärkten Expression der Transduktionskanäle TRPV1, TRPV2 und ASIC3 (warme Farben). Zusätzlich wird die Desensitivierung von TRPV1 reduziert und damit die Kanalaktivität erhöht. Die Zelle wird durch den Calciumeinstrom durch zusätzliche Kanäle und die verlängerte Aktivität von TRPV1 stärker depolarisiert.

Gleichzeitig wird die Expression von KCC2 reduziert, während NKCC1 hochreguliert und phosphoryliert wird. Die dadurch gesteigerte Chloridakkumulation resultiert in einer erhöhten intrazellulären Chloridkonzentration. Der verstärkte Calciumeinstrom öffnet ebenfalls Calcium-gesteuerte Chloridkanäle, die aufgrund der gestiegenen intrazellulären Chloridkonzentration weniger Chlorid ins Zellinnere leiten und so die Zelle weniger stark inhibiert wird. Das Zusammenspiel beider Transduktionsignalkomponenten führt zu einer Verstärkung des Schmerzsignals in den Spinalganglienzellen.

Die Pfeile geben Richtung und Stärke der Ionenströme durch Kanäle und Transporter an.

## 4.8 Ausblick

Das hier etablierte *ex vivo* Entzündungsmodell stellt eine Möglichkeit dar, sowohl an intaktem Gewebe als auch an dissoziierten Spinalganglienzellen einen entzündungsähnlichen Zustand über eine Zeitspanne von drei Stunden zu induzieren. Die Behandlung der Zellen nach diesem Modell schafft die Basis für eine entzündungsbedingte Verstärkung der Signaltransduktion, da die Expression verschiedener Transduktionskanäle gesteigert, die Desensitivierung von TRPV1 reduziert und die Chloridakkumulation in die Zelle verstärkt wird. Gleichzeitig werden auch Capsaicin-induzierte Chlorideinströme in die Zelle durch die Inkubation mit Entzündungsmediatoren reduziert. Dies führt möglicherweise zu einer Disinhibition der Nozizeptoren und einer damit verbundenen Verstärkung der Schmerzwahrnehmung. Jedoch bleiben noch viele Fragen offen, die in fortführenden Experimenten zu klären sind.

Es war bisher nicht möglich, das Chloridsignal der Aktivierung des TRPV1-Kanals definitiv zuzuweisen, da die verwendeten Calciumsensoren (Fluo4-AM, Fluo3 und Calcium Green) die Dura mater intakter Spinalganglien nicht überqueren konnten. Dissoziierte Zellen dagegen lassen sich sowohl mit Calciumsensoren als auch mit MQAE beladen und ermöglichen daher eine parallele Messung von Calcium- und Chloridsignalen. Die verwendete Capsaicinkonzentration war zudem sehr hoch und könnte die Zellen geschädigt und damit zu nicht physiologischen Reaktionen geführt haben. Die Experimente sollten daher mit einer niedrigeren Konzentration wiederholt werden.

Es sollte auch die Aktivität anderer Transduktionskanäle und ihre Beeinflussung durch Entzündungsmediatoren in Calcium Imaging Experimenten untersucht werden. Zusätzlich könnte die Interaktion des ASIC3- und P2X<sub>3</sub> mit Chlorid in 2P-FLIM-Messungen analysiert werden, um einen genaueren Einblick in das Zusammenspiel von Transduktionskanälen und Chloridströmen zu bekommen.

Nicht geklärt ist, ob TMEM16A wirklich der gesuchte Calcium aktivierte Chloridkanal in den Spinalganglien ist und welchen Anteil GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an den hier beobachteten Chloridsignalen haben. Gleichzeitig gilt es auch den Einfluss des Modells auf die Expression des TMEM16A-Kanals selbst in immunhistochemischen Experimenten zu analysieren.

Trotz der offenen Fragen, bietet das *in vivo* Entzündungsmodell eine gute Basis zur Erforschung der grundlegenden Mechanismen, die zu entzündungsbedingten Veränderungen der Signaltransduktion und Hyperalgesie führen.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
2P-FLIM	<i>Two-photon fluorescence-lifetime-imaging-microscopy</i>
ACSF	<i>Artificial cerebrospinal fluid</i>
ASIC3	<i>Acid sensing ionchannel 3</i>
ATP	Adenosin Triphosphat
BK	Bradykinin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Chemiblocker
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related protein</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Chemiblocker und Triton X-100
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i>
EM	Entzündungsmediatoren
FI	Fluoreszenzintensität
FL	Fluoreszenzlebenszeit
GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	<i>γ-aminobutyric acid A</i> Rezeptor
h	Stunden
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
KCC2	Kalium-Chlorid Co-Transporter 2
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
mc	<i>monoclonal</i>

---

min	Minuten
mM	Millimolar
MQAE	<i>N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide</i>
nm	Nanometer
NBP	Natriumbicarbonatpuffer
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
ns	Nanosekunden
Ø	Durchmesser
P2X <sub>3</sub>	<i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3</i>
PAD	<i>Primary afferent depolarization</i>
PAR <sub>2</sub>	<i>Proteinase activated receptor 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pc	<i>polyclonal</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
ps	Pikosekunden
s	Sekunden
SP	<i>Substance P</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid receptor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\tau$	Lebenszeit

## 6 Referenzen

Alessandri-Haber,N., Dina,O.A., Joseph,E.K., Reichling,D., and Levine,J.D. (2006). A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J. Neurosci.* *26*, 3864-3874.

Alessandri-Haber,N., Joseph,E., Dina,O.A., Liedtke,W., and Levine,J.D. (2005). TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* *118*, 70-79.

Alessandri-Haber,N., Yeh,J.J., Boyd,A.E., Parada,C.A., Chen,X., Reichling,D.B., and Levine,J.D. (2003). Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* *39*, 497-511.

Almeida,T.A., Rojo,J., Nieto,P.M., Pinto,F.M., Hernandez,M., Martin,J.D., and Candenas,M.L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2045-2081.

Alvarez-Leefmans,F.J., Gamino,S.M., Giraldez,F., and Nogueron,I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J. Physiol* *406*, 225-246.

Alvarez-Leefmans,F.J., Leon-Olea,M., Mendoza-Sotelo,J., Alvarez,F.J., Anton,B., and Garduno,R. (2001). Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience* *104*, 569-582.

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

Amaya,F., Shimosato,G., Nagano,M., Ueda,M., Hashimoto,S., Tanaka,Y., Suzuki,H., and Tanaka,M. (2004). NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2303-2310.

Andre,S., Boukhaddaoui,H., Campo,B., Al Jumaily,M., Mayeux,V., Greuet,D., Valmier,J., and Scamps,F. (2003). Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* *90*, 3764-3773.

- Averbeck,B., Izydorczyk,I., and Kress,M. (2000). Inflammatory mediators release calcitonin gene-related peptide from dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neuroscience* 98, 135-140.
- Ben Ari,Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728-739.
- Binshtok,A.M., Wang,H., Zimmermann,K., Amaya,F., Vardeh,D., Shi,L., Brenner,G.J., Ji,R.R., Bean,B.P., Woolf,C.J., and Samad,T.A. (2008). Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J. Neurosci.* 28, 14062-14073.
- Bulling,D.G., Kelly,D., Bond,S., McQueen,D.S., and Seckl,J.R. (2001). Adjuvant-induced joint inflammation causes very rapid transcription of beta-preprotachykinin and alpha-CGRP genes in innervating sensory ganglia. *J. Neurochem.* 77, 372-382.
- Cadiou,H., Studer,M., Jones,N.G., Smith,E.S., Ballard,A., McMahon,S.B., and McNaughton,P.A. (2007). Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J. Neurosci.* 27, 13251-13260.
- Cao,D.S., Yu,S.Q., and Premkumar,L.S. (2009). Modulation of transient receptor potential Vanilloid 4-mediated membrane currents and synaptic transmission by protein kinase C. *Mol. Pain* 5, 5.
- Caputo,A., Caci,E., Ferrera,L., Pedemonte,N., Barsanti,C., Sondo,E., Pfeffer,U., Ravazzolo,R., Zegarra-Moran,O., and Galletta,L.J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-594.
- Carlton,S.M., Zhou,S., and Coggeshall,R.E. (1999). Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience* 93, 713-722.
- Caterina,M.J. and Julius,D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487-517.
- Caterina,M.J., Rosen,T.A., Tominaga,M., Brake,A.J., and Julius,D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.
- Cevikbas,F., Steinhoff,A., Homey,B., and Steinhoff,M. (2007). Neuroimmune interactions in allergic skin diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7, 365-373.

- Chen,C.C., Zimmer,A., Sun,W.H., Hall,J., Brownstein,M.J., and Zimmer,A. (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 8992-8997.
- Chen,Y. and Sommer,C. (2007). Activation of the nociceptin opioid system in rat sensory neurons produces antinociceptive effects in inflammatory pain: involvement of inflammatory mediators. *J. Neurosci. Res.* 85, 1478-1488.
- Cohen,I., Navarro,V., Clemenceau,S., Baulac,M., and Miles,R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298, 1418-1421.
- Cortright,D.N., Krause,J.E., and Broom,D.C. (2007). TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 978-988.
- Cramer,S.W., Baggott,C., Cain,J., Tilghman,J., Allcock,B., Miranpuri,G., Rajpal,S., Sun,D., and Resnick,D. (2008). The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol. Pain* 4, 36.
- Currie,K.P., Wootton,J.F., and Scott,R.H. (1995). Activation of Ca(2+)-dependent Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen. *J. Physiol* 482 ( Pt 2), 291-307.
- Dai,Y., Fukuoka,T., Wang,H., Yamanaka,H., Obata,K., Tokunaga,A., and Noguchi,K. (2004a). Contribution of sensitized P2X receptors in inflamed tissue to the mechanical hypersensitivity revealed by phosphorylated ERK in DRG neurons. *Pain* 108, 258-266.
- Dai,Y., Moriyama,T., Higashi,T., Togashi,K., Kobayashi,K., Yamanaka,H., Tominaga,M., and Noguchi,K. (2004b). Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* 24, 4293-4299.
- Darman,R.B. and Forbush,B. (2002). A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J. Biol. Chem.* 277, 37542-37550.
- Davis,J.B., Gray,J., Gunthorpe,M.J., Hatcher,J.P., Davey,P.T., Overend,P., Harries,M.H., Latcham,J., Clapham,C., Atkinson,K., Hughes,S.A., Rance,K., Grau,E., Harper,A.J., Pugh,P.L., Rogers,D.C., Bingham,S., Randall,A., and Sheardown,S.A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187.

- de Koninck, Y. (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 93-99.
- Dray, A. (1995). Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 75, 125-131.
- Flemmer, A.W., Gimenez, I., Dowd, B.F., Darman, R.B., and Forbush, B. (2002). Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J. Biol. Chem.* 277, 37551-37558.
- Funk, K., Woitecki, A., Franjic-Wurtz, C., Gensch, T., Mohrlen, F., and Frings, S. (2008). Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pain* 4, 32.
- Galan, A. and Cervero, F. (2005). Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience* 133, 245-252.
- Gallagher, J.P., Higashi, H., and Nishi, S. (1978). Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. *J. Physiol* 275, 263-282.
- Garcia-Nicas, E., Laird, J.M., and Cervero, F. (2001). Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent A beta-fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia. *Pain* 94, 283-291.
- Geuna, S., Borrione, P., Corvetti, G., Poncino, A., and Giacobini-Robecchi, M.G. (1998). Types and sub-types of neurons in dorsal root ganglia of the lizard *Podarcis sicula*: a light and electron microscope study. *Eur. J. Morphol.* 36, 37-47.
- Gilbert, D., Franjic-Wurtz, C., Funk, K., Gensch, T., Frings, S., and Mohrlen, F. (2007). Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 479-489.
- Granados-Soto, V., Arguelles, C.F., and Alvarez-Leefmans, F.J. (2005). Peripheral and central antinociceptive action of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain* 114, 231-238.
- Grant, A.D., Cottrell, G.S., Amadesi, S., Trevisani, M., Nicoletti, P., Materazzi, S., Altier, C., Cenac, N., Zamponi, G.W., Bautista-Cruz, F., Lopez, C.B., Joseph, E.K., Levine, J.D.,



- Liedtke,W., Vanner,S., Vergnolle,N., Geppetti,P., and Bunnett,N.W. (2007). Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J. Physiol* 578, 715-733.
- Greffrath,W., Binzen,U., Schwarz,S.T., Saaler-Reinhardt,S., and Treede,R.D. (2003). Co-expression of heat sensitive vanilloid receptor subtypes in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 14, 2251-2255.
- Haddad,J.J. (2007). On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 217-224.
- Hamilton,S.G., McMahon,S.B., and Lewin,G.R. (2001). Selective activation of nociceptors by P2X receptor agonists in normal and inflamed rat skin. *J. Physiol* 534, 437-445.
- Harrison,S. and Geppetti,P. (2001). Substance p. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 555-576.
- Hartzell,H.C. (2008). Physiology. CaCl-ing channels get the last laugh. *Science* 322, 534-535.
- Hefti,F.F., Rosenthal,A., Walicke,P.A., Wyatt,S., Vergara,G., Shelton,D.L., and Davies,A.M. (2006). Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 85-91.
- Hilaire,C., Campo,B., Andre,S., Valmier,J., and Scamps,F. (2005). K(+) current regulates calcium-activated chloride current-induced after depolarization in axotomized sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1073-1080.
- Ikeuchi,M., Kolker,S.J., and Sluka,K.A. (2009). Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *J. Pain* 10, 336-342.
- Ji,R.R., Samad,T.A., Jin,S.X., Schmoll,R., and Woolf,C.J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36, 57-68.
- Jin,X., Huguenard,J.R., and Prince,D.A. (2005). Impaired Cl- extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *J. Neurophysiol.* 93, 2117-2126.
- Joachim,R.A., Kuhlmei,A., Dinh,Q.T., Handjiski,B., Fischer,T., Peters,E.M., Klapp,B.F., Paus,R., and Arck,P.C. (2007). Neuronal plasticity of the "brain-skin connection": stress-

- triggered up-regulation of neuropeptides in dorsal root ganglia and skin via nerve growth factor-dependent pathways. *J. Mol. Med.* 85, 1369-1378.
- Julius,D. and Basbaum,A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Jung,J., Shin,J.S., Lee,S.Y., Hwang,S.W., Koo,J., Cho,H., and Oh,U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* 279, 7048-7054.
- Kanaka,C., Ohno,K., Okabe,A., Kuriyama,K., Itoh,T., Fukuda,A., and Sato,K. (2001). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104, 933-946.
- Kaneko,H., Putzier,I., Frings,S., Kaupp,U.B., and Gensch,T. (2004). Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* 24, 7931-7938.
- Kasai,M. and Mizumura,K. (2001). Effects of PGE(2) on neurons from rat dorsal root ganglia in intact and adjuvant-inflamed rats: role of NGF on PGE(2)-induced depolarization. *Neurosci. Res.* 41, 345-353.
- Kenyon,J.L. (2000). The reversal potential of Ca(2+)-activated Cl(-) currents indicates that chick sensory neurons accumulate intracellular Cl(-). *Neurosci. Lett.* 296, 9-12.
- Kessler,W., Kirchhoff,C., Reeh,P.W., and Handwerker,H.O. (1992). Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. *Exp. Brain Res.* 91, 467-476.
- Kobayashi,K., Fukuoka,T., Yamanaka,H., Dai,Y., Obata,K., Tokunaga,A., and Noguchi,K. (2005). Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J. Comp Neurol.* 481, 377-390.
- Kress,M., Reeh,P.W., and Vyklicky,L. (1997). An interaction of inflammatory mediators and protons in small diameter dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neurosci. Lett.* 224, 37-40.
- Kuniyoshi,K., Ohtori,S., Ochiai,N., Murata,R., Matsudo,T., Yamada,T., Ochiai,S.S., Moriya,H., and Takahashi,K. (2007). Characteristics of sensory DRG neurons innervating the wrist joint in rats. *Eur. J. Pain* 11, 323-328.

- Laird, J.M., Garcia-Nicas, E., Delpire, E.J., and Cervero, F. (2004). Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361, 200-203.
- Leffler, A., Monter, B., and Koltzenburg, M. (2006). The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139, 699-709.
- Li, D., Ren, Y., Xu, X., Zou, X., Fang, L., and Lin, Q. (2008). Sensitization of primary afferent nociceptors induced by intradermal capsaicin involves the peripheral release of calcitonin gene-related Peptide driven by dorsal root reflexes. *J. Pain* 9, 1155-1168.
- Liedtke, C.M., Wang, X., and Smallwood, N.D. (2005). Role for protein phosphatase 2A in the regulation of Calu-3 epithelial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>, type 1 co-transport function. *J. Biol. Chem.* 280, 25491-25498.
- Lin, Q., Li, D., Xu, X., Zou, X., and Fang, L. (2007). Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Mol. Pain* 3, 30.
- Lin, Q., Wu, J., and Willis, W.D. (1999). Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J. Neurophysiol.* 82, 2602-2611.
- Lu, J., Karadsheh, M., and Delpire, E. (1999). Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J. Neurobiol.* 39, 558-568.
- Ma, C., Greenquist, K.W., and LaMotte, R.H. (2006). Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 95, 2098-2107.
- Ma, W. and Quirion, R. (2007). Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 11, 307-320.
- Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J. Neurosci.* 22, 10662-10670.

- Mamet,J., Lazdunski,M., and Voilley,N. (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 48907-48913.
- Massaad,C.A., Safieh-Garabedian,B., Poole,S., Atweh,S.F., Jabbur,S.J., and Saade,N.E. (2004). Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J. Neuroimmunol.* 153, 171-182.
- Messlinger,K. (1997). [What is a nociceptor?]. *Anaesthesist* 46, 142-153.
- Miletic,G. and Miletic,V. (2008). Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain* 137, 532-539.
- Moalem,G. and Tracey,D.J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* 51, 240-264.
- Mohapatra,D.P. and 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, 50080-50090.
- Mohapatra,D.P. and 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, 13424-13432.
- Molliver,D.C., Immke,D.C., Fierro,L., Pare,M., Rice,F.L., and McCleskey,E.W. (2005). ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol. Pain* 1, 35.
- Morales-Aza,B.M., Chillingworth,N.L., Payne,J.A., and Donaldson,L.F. (2004). Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol. Dis.* 17, 62-69.
- Morenilla-Palao,C., Planells-Cases,R., Garcia-Sanz,N., and Ferrer-Montiel,A. (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 279, 25665-25672.

- Nickell, W.T., Kleene, N.K., Gesteland, R.C., and Kleene, S.J. (2006). Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J. Neurophysiol.* 95, 2003-2006.
- Nickell, W.T., Kleene, N.K., and Kleene, S.J. (2007). Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *J. Physiol* 583, 1005-1020.
- Nomura, H., Sakai, A., Nagano, M., Umino, M., and Suzuki, H. (2006). Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neurosci. Res.* 56, 435-440.
- O'Neil, R.G. and Heller, S. (2005). The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch.* 451, 193-203.
- Oh, E.J. and Weinreich, D. (2004). Bradykinin decreases K(+) and increases Cl(-) conductances in vagal afferent neurones of the guinea pig. *J. Physiol* 558, 513-526.
- Ohtori, S., Inoue, G., Koshi, T., Ito, T., Doya, H., Saito, T., Moriya, H., and Takahashi, K. (2006). Up-regulation of acid-sensing ion channel 3 in dorsal root ganglion neurons following application of nucleus pulposus on nerve root in rats. *Spine* 31, 2048-2052.
- Oliveira, M.C., Pelegrini-da-Silva, A., Tambeli, C.H., and Parada, C.A. (2009). Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>3,2/3</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain* 141, 127-134.
- Palma, E., Amici, M., Sobrero, F., Spinelli, G., Di Angelantonio, S., Ragozzino, D., Mascia, A., Scoppetta, C., Esposito, V., Miledi, R., and Eusebi, F. (2006). Anomalous levels of Cl- transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 8465-8468.
- Paukert, M., Osteroth, R., Geisler, H.S., Brandle, U., Glowatzki, E., Ruppertsberg, J.P., and Grunder, S. (2001). Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X<sub>3</sub> subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 21077-21082.
- Pieraut, S., Laurent-Matha, V., Sar, C., Hubert, T., Mechaly, I., Hilaire, C., Mersel, M., Delpire, E., Valmier, J., and Scamps, F. (2007). NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 27, 6751-6759.

- Pitcher, M.H., Price, T.J., Entrena, J.M., and Cervero, F. (2007). Spinal NKCC1 blockade inhibits TRPV1-dependent referred allodynia. *Mol. Pain* 3, 17.
- Price, T.J., Cervero, F., and de Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 547-555.
- Price, T.J., Cervero, F., Gold, M.S., Hammond, D.L., and Prescott, S.A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res. Rev.* 60, 149-170.
- Price, T.J., Hargreaves, K.M., and Cervero, F. (2006). Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res.* 1112, 146-158.
- Reuter, D., Zierold, K., Schroder, W.H., and Frings, S. (1998). A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J. Neurosci.* 18, 6623-6630.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., and Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 24, 4683-4691.
- Rocha-Gonzalez, H.I., Mao, S., and Alvarez-Leefmans, F.J. (2008). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *J. Neurophysiol.* 100, 169-184.
- Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., and Steinhoff, M. (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 86, 1309-1379.
- Rudomin, P. and Schmidt, R.F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Res.* 129, 1-37.
- Saper, C.B. (2005). An open letter to our readers on the use of antibodies. *J. Comp Neurol.* 493, 477-478.

- Schaible,H.G. (2007). [Pathophysiology of pain]. *Orthopade* 36, 8, 10-8, 16.
- Scholz,J. and Woolf,C.J. (2002). Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 5 *Suppl*, 1062-1067.
- Schroeder,B.C., Cheng,T., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-1029.
- Serhan,C.N. and Savill,J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191-1197.
- Shimosato,G., Amaya,F., Ueda,M., Tanaka,Y., Decosterd,I., and Tanaka,M. (2005). Peripheral inflammation induces up-regulation of TRPV2 expression in rat DRG. *Pain* 119, 225-232.
- Sluka,K.A., Willis,W.D., and Westlund,K.N. (1993). Joint inflammation and hyperalgesia are reduced by spinal bicuculline. *Neuroreport* 5, 109-112.
- Smith,E.S., Cadiou,H., and McNaughton,P.A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145, 686-698.
- Smith,J.A., Davis,C.L., and Burgess,G.M. (2000). Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3250-3258.
- Smith,L., Smallwood,N., Altman,A., and Liedtke,C.M. (2008). PKCdelta acts upstream of SPAK in the activation of NKCC1 by hyperosmotic stress in human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 22147-22156.
- Song,X.J., Zhang,J.M., Hu,S.J., and LaMotte,R.H. (2003). Somata of nerve-injured sensory neurons exhibit enhanced responses to inflammatory mediators. *Pain* 104, 701-709.
- Staton,P.C., Wilson,A.W., Bountra,C., Chessell,I.P., and Day,N.C. (2007). Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *Eur. J. Pain* 11, 283-289.
- Stein,V., Hermans-Borgmeyer,I., Jentsch,T.J., and Hubner,C.A. (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J. Comp Neurol.* 468, 57-64.

- Sung, K.W., Kirby, M., McDonald, M.P., Lovinger, D.M., and Delpire, E. (2000). Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J. Neurosci.* 20, 7531-7538.
- Suzuki, M., Watanabe, Y., Oyama, Y., Mizuno, A., Kusano, E., Hirao, A., and Ookawara, S. (2003). Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci. Lett.* 353, 189-192.
- Tandrup, T. (2004). Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. *J. Neurocytol.* 33, 173-192.
- Tang, H.B., Li, Y.S., Miyano, K., and Nakata, Y. (2008). Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 55, 1405-1411.
- Tang, H.B., Li, Y.S., and Nakata, Y. (2007). The release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons requires the non-neuronal cells around these neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 264-271.
- Thacker, M.A., Clark, A.K., Marchand, F., and McMahon, S.B. (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth. Analg.* 105, 838-847.
- Tominaga, M. and Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* 61, 3-12.
- Tominaga, M., Wada, M., and Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6951-6956.
- Ugawa, S., Ueda, T., Yamamura, H., and Shimada, S. (2005). In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 136, 125-133.
- Valencia-de Ita, S., Lawand, N.B., Lin, Q., Castaneda-Hernandez, G., and Willis, W.D. (2006). Role of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *J. Neurophysiol.* 95, 3553-3561.
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., and McNaughton, P.A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol* 534, 813-825.



- Vyklicky,L., Knotkova-Urbancova,H., Vitaskova,Z., Vlachova,V., Kress,M., and Reeh,P.W. (1998). Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J. Neurophysiol.* 79, 670-676.
- Wang,C., Li,G.W., and Huang,L.Y. (2007). Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pain* 3, 22.
- Wang,H., Ehnert,C., Brenner,G.J., and Woolf,C.J. (2006). Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol. Chem.* 387, 11-14.
- Weissner,W., Winterson,B.J., Stuart-Tilley,A., Devor,M., and Bove,G.M. (2006). Time course of substance P expression in dorsal root ganglia following complete spinal nerve transection. *J. Comp Neurol.* 497, 78-87.
- Willis,W.D., Jr. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp. Brain Res.* 124, 395-421.
- Willis,W.D. (2006). John Eccles' studies of spinal cord presynaptic inhibition. *Prog. Neurobiol.* 78, 189-214.
- Woolf,C.J. and Costigan,M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 7723-7730.
- Wu,L.A., Huang,J., Wang,W., Wang,W., Wang,X.J., and Wu,S.X. (2009). Down-regulation of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter 2 in mouse medullary dorsal horn contributes to the formalin-induced inflammatory orofacial pain. *Neurosci. Lett.* 457, 36-40.
- Wynn,G., Ma,B., Ruan,H.Z., and Burnstock,G. (2004). Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287, G647-G657.
- Xiang,Z., Xiong,Y., Yan,N., Li,X., Mao,Y., Ni,X., He,C., LaMotte,R.H., Burnstock,G., and Sun,J. (2008). Functional up-regulation of P2X 3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain* 140, 23-34.
- Xu,G.Y. and Huang,L.Y. (2002). Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 22, 93-102.

- Xu,P., Van Slambrouck,C., Berti-Mattera,L., and Hall,A.K. (2005). Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation. *J. Neurosci.* 25, 9227-9235.
- Xu,X., Wang,P., Zou,X., Li,D., Fang,L., and Lin,Q. (2009). Increases in transient receptor potential vanilloid-1 mRNA and protein in primary afferent neurons stimulated by protein kinase C and their possible role in neurogenic inflammation. *J. Neurosci. Res.* 87, 482-494.
- Yang,Y.D., Cho,H., Koo,J.Y., Tak,M.H., Cho,Y., Shim,W.S., Park,S.P., Lee,J., Lee,B., Kim,B.M., Raouf,R., Shin,Y.K., and Oh,U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215.
- Yu,L., Yang,F., Luo,H., Liu,F.Y., Han,J.S., Xing,G.G., and Wan,Y. (2008). The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol. Pain* 4, 61.
- Zhang,H., Cang,C.L., Kawasaki,Y., Liang,L.L., Zhang,Y.Q., Ji,R.R., and Zhao,Z.Q. (2007). Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J. Neurosci.* 27, 12067-12077.
- Zhang,J.M. and An,J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27-37.
- Zhang,W., Liu,L.Y., and Xu,T.L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152, 502-510.
- Zhang,X., Huang,J., and McNaughton,P.A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 24, 4211-4223.