

Chlorid-basierte Signalverstärkung
in Capsaicin-sensitiven
Schmerzzenen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom Biologe Daniel Gilbert
Juli 2006

Chlorid-basierte Signalverstärkung
in Capsaicin-sensitiven
Schmerzzenellen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom Biologe Daniel Gilbert
aus Wuppertal

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in der Zeit von Januar 2003 bis Juli 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. Stephan Frings angefertigt

Gutachter:

Prof. Dr. Stephan Frings

Prof. Dr. Gabriele Petersen

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; 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 des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg,

Daniel Gilbert

Bereits veröffentlichte Publikation:

Kruger W., Gilbert D., Hawthorne R., Hryciw D.H., Frings S., Poronnik P., Lynch J.W. (2005); A yellow fluorescent protein-based assay for high-throughput screening of glycine and GABAA receptor chloride channels; *Neurosci Lett.*; 380(3):340-5

Kongressbeiträge:

Gilbert D., Hagen V., Gensch T., Kaupp U.B., Frings S.; The role of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in the generation of somatosensory signals. 25th Blankenese Conference, „Signalling in Sensory Systems“, 21. – 25. Mai 2005, Hamburg. (Vortrag & Poster)

Gilbert D., Runz H., Pepperkok R.; "DetecTiff[®]": A universal image analysis software package for high content screening microscopy; 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 8. - 11. März 2006, Heidelberg. (Poster)

Teilpublikation in Vorbereitung:

Gilbert D., Funk K., Frings S., Hagen V.; Caged-Capsaicin – A Tool for Kinetic Examinations of TRPV1 channels in Somatosensory Neurons.

Danke!

Mein Dank gilt **allen** Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Physiologie des Instituts für Zoologie für die gute Zusammenarbeit im Laufe der letzten Jahre. Mein Dank gilt insbesondere:

- Prof. Dr. Stephan Frings für die Überlassung des bearbeiteten Themas und für sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an meiner Arbeit hat sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen,
- Prof. Dr. Gabriele Petersen für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie die Anregung und die Möglichkeit zur Entwicklung YFPI152L-kodierender Adenoviren,
- Dr. Pamela Okun für die Herstellung YFPI152L-kodierender Adenoviren,
- Diplom Biologe Michael Behr für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Hilfestellungen,
- Dr. Thomas Gensch vom Forschungszentrum Jülich, für die Anleitung und Unterstützung bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen,
- Dr. Hiroshi Kaneko für seine Hilfe bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen und elektrophysiologischen Experimenten,
- Dr. Volker Hagen für die Bereitstellung von caged Capsaicin,
- Prof. Dr. Joe Lynch für die Bereitstellung des Anionen-sensitiven YFPI152L,
- Gabriele Günther für die Unterstützung bei histologischen- und immunzytochemischen Färbungen,
- meinem Mitbewohner und Mitarbeiter Diplom Biologie Clemens Prinz zu Waldeck für seine Diskussionsbereitschaft und seine Hilfestellungen bei mathematischen Herausforderungen,
- Heike Link für ihre wertvolle Unterstützung bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen,
- Dr. Frank Möhrle und Diplom Biologin Nicole Ungerer für ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Korrektur-Lesearbeiten,
- Dr. Rainer Pepperkok vom EMBL für die Möglichkeit, meine Fähigkeiten der LabView-Programmierung zu vertiefen,
- überhaupt allen, die mich während der Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben!

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung	1
1.1 Somatosensorik.....	2
1.2 Die DRG-Primärzellkultur – Das Standardmodell der Schmerzforschung.....	5
1.3 Arbeitshypothese der Signaltransduktion in Schmerzzellen	7
1.4 Signaltransduktion in Riechzellen (OSNs).....	8
1.5 Signaltransduktion in somatosensorischen Neuronen	10
1.6 Cl ⁻ -Switch in somatosensorischen Neuronen	13
1.7 Fragestellungen dieser Arbeit.....	14
1.8 Zielsetzungen dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Lösungen und Chemikalien.....	18
2.2 Histologische Methoden.....	18
2.2.1 Fixation.....	18
2.2.2 Paraffineinbettung	18
2.2.3 Schneiden der Paraffinblöcke.....	19
2.2.4 Azan-Färbung nach Heidenhain	19
2.3 Herstellung der DRG-Primärzellkulturen.....	20
2.4 Immunzytochemie, DAPI- und IB ₄ -Färbung.....	22
2.4.1 Antikörperfärbung	22
2.4.2 DAPI –Färbung	23
2.4.3 Isolektin B ₄ -Färbung	24
2.5 Patch-Clamp-Technik.....	24
2.5.1 Prinzip der Messtechnik	24
2.5.2 Patch-Clamp-Konfigurationen	25
2.5.3 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente und Aufbau des Messplatzes.....	26
2.5.4 Patch-Clamp-Untersuchungen mit Capsaicin und Caged-Capsaicin	27
2.6 Capsaicin und Caged-Capsaicin	28
2.6.1 Capsaicin	28
2.6.2 Na-CDMNB- und DMNB-Caged-Capsaicin	29
2.7 Fluoreszenzmikroskopie.....	30
2.7.1 Ca ²⁺ - und Cl ⁻ -Imaging	30
2.7.2 Der Ca ²⁺ -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM	30
2.7.3 Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM	31
2.7.4 Ca ²⁺ -Imaging mit kultivierten Spinalganglienzellen und Capsaicin	32
2.8 Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging-Mikroskopie (2P-FLIM)	33
2.8.1 Zwei-Photonen-Anregung	33
2.8.2 Fluoreszenz-Lebenszeit	35
2.8.3 2P-FLIM Messung der intrazellulären Chloridkonzentration	36
2.8.4 Aufbau der 2P-FLIM Apparatur.....	36
2.9 Cl ⁻ -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe	37
2.9.1 MQAE	38
2.9.2 Clomeleon.....	39
2.9.3 Ratiometrisches Cl ⁻ -Imaging mit Clomeleon	41

2.9.4 Das Anionen-sensitive YFP1152L.....	42
2.10 2P-FLIM mit Spinalganglienzellen (<i>in situ, in vitro</i>).....	43
2.10.1 Kalibrierung der Fluoreszenz-Lebenszeit an Mäuse-DRG-Neuronen.....	43
2.10.2 Wirbelkörper-Spinalganglien-Präparation für FLIM-Messungen der $[Cl^-]_i$	44
2.10.3 Vitalitäts-Test mit Mäuse-Spinalganglien in Wirbelpräparationen.....	44
2.10.4 2P-FLIM-Messung an Mäuse-Spinalganglien.....	45
2.11 Methoden der genetischen Manipulation kultivierter DRG-Zellen.....	46
2.11.1 Transfektions-Plasmid.....	46
2.11.2 YFP1152L-Kalziumphosphat-Transfektion.....	46
2.11.3 TRPV1-RFP-Kalziumphosphat-Co-Transfektion.....	47
2.11.4 Effectene [©] -Transfektion.....	49
2.11.5 Nukleofektion.....	50
2.11.6 Herstellung YFP1152L-kodierender Adenoviren.....	51
2.11.7 Adenovirale Infektionen mit DRG-Neuronen.....	53
2.12 LabView-Software.....	54
2.12.1 Roi2Tau [©]	54
2.12.2 StatBuddy [©]	56
2.12.3 CellDetect [©]	57
2.12.4 PCDetect [©]	59
3. Ergebnisse.....	62
3.1 Anatomie und Eigenschaften der untersuchten Gewebe und Kulturen.....	62
3.1.1 Wirbelkörper adulter Tiere.....	63
3.1.2 Wirbelkörper neugeborener Tiere.....	63
3.1.4 Antikörperfärbung mit kultivierten Spinalganglienzellen.....	66
3.2 Fotolyse-Experimente mit caged Capsaicin.....	68
3.2.1 Identifizierung funktioneller DRG-Neurone.....	68
3.2.2 Spannungsklemme-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin.....	69
3.2.3 Stromklemme-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin.....	70
3.2.4 Mehrfach-Aktivierungs-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin.....	71
3.2.5 Verwendung von caged Capsaicin für kinetische Untersuchungen.....	72
3.2.6 Vergleich zwischen Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin.....	74
3.3 Ca^{2+} -Imaging mit IB ₄ -gefärbten DRG-Neuronen und Capsaicin.....	75
3.4 Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme in DRG-Neuronen.....	78
3.4.1 Cl^- -Imaging mit kultivierten CLM-1-DRG-Neuronen.....	79
3.4.2 NFA-sensitive, Capsaicin induzierte Cl^- -Ströme in DRG-Neuronen.....	80
3.4.3 NFA-Sensitivität von TRPV1-Kanälen.....	81
3.5 2P-FLIM-Messung der $[Cl^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen der Maus.....	81
3.5.1 Kalibrierung der Fluoreszenz-Lebenszeit an Mäuse-Spinalganglienzellen.....	82
3.5.2 2P-FLIM mit kultivierten Spinalganglienzellen der Maus.....	84
3.5.3 Vitalitätstests mit Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen der Maus.....	86
3.5.4 Trypan-Blau-Färbungen.....	86
3.5.5 MTT-Färbungen.....	87
3.5.6 2P-FLIM mit Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen adulter Mäuse.....	88
3.5.7 2P-FLIM mit Spinalganglien neugeborener Mäuse.....	91
3.5.8 Vergleich der $[Cl^-]_i$ von DRG-Neuronen neugeborener und adulter Mäuse.....	92
3.6 2P-FLIM mit Spinalganglien adulter, Clomeleon-exprimierender Mäuse.....	94
3.7 Größenanalysen verschiedener CLM-DRG-Neurone.....	97
3.7.1 CLM-1.....	98
3.7.1.1 IB ₄ -Färbung mit kultivierten DRG-Neuronen der Mauslinie CLM-1.....	98

3.7.2 CLM-11	100
3.7.3 CLM-12	100
3.7.4 CLM-13	101
3.8 Genetische Manipulationen von DRG-Neuronen für Cl ⁻ -Imaging	102
3.8.1 Nukleofektion von DRG-Neuronen mit dem Anionen-sensitiven YFP152L ..	103
3.8.2 Infektionen von DRG-Neuronen mit YFP152L-kodierenden Adenoviren.....	104
4. Diskussion	105
4.1 Charakterisierende Untersuchungen mit kultivierten DRG-Neuronen	106
4.2 Capsaicin-induzierte Ströme nach Fotolyse von caged Capsaicin	107
4.2.1 Na-CDMNB-caged Capsaicin	107
4.2.2 Vergleich zwischen Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin	109
4.2.3 Mögliche Anwendungen für caged Capsaicin in der Schmerzforschung.....	109
4.3 Capsaicin-induzierte Cl ⁻ -Ströme in kultivierten DRG-Neuronen	110
4.3.1 Cl ⁻ -Imaging mit kultivierten CLM-1-DRG-Neuronen	110
4.3.2 NFA-sensitive, Capsaicin-induzierte Cl ⁻ -Ströme in DRG-Neuronen.....	111
4.4 2P-FLIM-Messung der [Cl ⁻] _i in somatosensorischen Neuronen der Maus	112
4.5 Ratiometrische Bestimmung der [Cl ⁻] _i	114
4.6 Größenanalysen von CLM-DRG-Neuronen.....	115
4.6.1 CLM-1	116
4.6.2 CLM-11, -12 und -13	116
4.7 Genetische Manipulationen von DRG-Neuronen für Cl ⁻ -Imaging	117
4.8 LabView-Software	118
4.9 Das Funktionelle Modell der Signaltransduktion in Schmerzzellen / Ausblick.....	119
5. Zusammenfassung / Summary	122
6. Literaturangaben.....	123

II Abkürzungsverzeichnis

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von Dezimalen und Teilen verwendet.

∅	Durchmesser
τ	Zerfallskonstante
AM	Acetoxymethyl (-Ester)
AP	Aktionspotenzial
AR	Axoplasmatisches Retikulum
ASIC	Transduktionskanal (<i>acid sensing ion channel</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
bit	<i>binary digit</i>
BMP	digitales Bildformat (<i>Bitmap</i>)
BP	Bandpass-Filter
bp	Basenpaare
BS	Bandscheibe
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
Caps	Capsaicin
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cDNA	revers-transkribierte copyDNA
CFP	cyan-fluoreszierendes Protein
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	<i>Calcitonin-gene-related peptide</i>
[Cl ⁻]	Chlorid-Ionen-Konzentration
[Cl ⁻] _i	intrazelluläre Chlorid-Ionen-Konzentration
CLM	Clomeleon
CNG	zyklisch Nukleotid-gesteuert (<i>cyclic nucleotide-gated</i>)
CPE	zytopathischer Effect (<i>cytopathic effect</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

DEG/ENAC	<i>DEGenerin family of proteins, Epithelial Na^+-Channel</i>
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMNBOC	4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl-capsaicin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DRG	Spinalganglion (<i>dorsal root ganglion</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDXA	Elektronen-dispersive Röntgenstruktur-Mikroanalyse (<i>electro-dispersive x-ray microanalysis</i>)
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-1	Extrazelluläre Lösung 1 (<i>extracellular solution</i>)
EYFP	<i>Enhanced YFP</i>
FLIM	Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging-Mikroskopie (<i>fluorescence-lifetime imaging-microscopy</i>)
FRET	Fluoreszenz- oder Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>gamma-aminobutyric-acid</i>)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
hAd5	Adenovirus vom humanen Subtyp 5
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES-buffered saline</i>)
HEK293	menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (<i>human embryonal kidney-derived</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HER911	menschliche, embryonale, retinale Zelllinie 911 (<i>human embryonal retina-derived</i>)
HH	Hinterhorn
IB ₄	Isolektin B ₄
IgG	Immunglobulin G
JPEG	digitales Bildformat (<i>Joint Photographic Experts Group</i>)
KCC2	K^+/Cl^- -Kotransporter 2
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton

K _{SV}	Stern-Volmer-Konstante
L2	Lumbalwirbel Nr. 2
LB / KAN	<u>K</u> anamycin-haltiges <u>L</u> uria <u>B</u> ertrani-Medium
LP	Langpass-Filter
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanylsulfonsäure
MQAE	N-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium Bromid
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NA	Numerische-Apertur
Na-CDMNB	α - <u>C</u> arboxy-4,5- <u>D</u> imethoxy-2 <u>N</u> itro- <u>b</u> enzyl(-Capsaicin-Ester)
Na _v	Spannungs-gesteuerter Natriumkanal
Nd:YAG	<u>N</u> eodym-Laser mit <u>Y</u> ttrium- <u>A</u> luminium- <u>G</u> ranat-Kristall
NFA	Nifluminsäure (<i>Niflumic acid</i>)
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter 1
n.P.	nach der Präparation
OD	optische Dichte
OE	olfaktorisches Epithel
OSN	olfaktorisches Neuron, Riehzelle (<i>olfactory sensory neuron</i>)
<i>p</i>	Signifikanzniveau (<i>probability</i>)
P	postnatal
P2X	purinergere Rezeptor der P2-Rezeptorfamilie
PA	Paraformaldehyd
pA	Pikoampère
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PLL	Poly-L-Lysin
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
PNG	digitales Bildformat (<i>Portable Network Graphic</i>)
Q	Quencher
[Q]	Quencher-Konzentration

RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
s/w	schwarz/weiß
S ₁	Singulett-Zustand des angeregten Elektrons
Scn10a	Gen für den TTX-sensitiven, Spannungs-gesteuerten Natriumkanal (<i>sodium channel, voltage-gated, type 10, alpha polypeptide</i>)
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Temperatur
TBT	Tributylzinn (<i>Tributyltin</i>)
TCSPC	<i>time-correlated single-photon counting</i>
Thy-1	Promotor für ein neuronales-, fibroblastäres- und endotheliales Glykoprotein
TIFF	digitales Bildformat (<i>Tagged Image File Format</i>)
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
TRITC	Fluorophor (<i>Tetramethylrhodamine Isothiocyanate</i>)
TrkA	NGF-Rezeptor (<i>Thyrosin-Kinase A</i>)
TRP	Transduktionskanal-Großfamilie mit transientem Rezeptorpotenzial (<i>transient receptor potential</i>)
TRPC	<i>classic</i> oder <i>canonical-like</i> TRP
TRPM	TRP vom Melastatin-Typ
TRPV	TRP vom Vanilloid-Typ
TRPV1	erster klonierter TRP vom Vanilloid-Typ
TTX	Tetrodotoxin
TXT	digitales Textformat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
vi	LabView-Programm (<i>Virtual Instrument</i>)
V _m	Membranpotenzial
WK	Wirbelkörper
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

- YFPH148Q gelb fluoreszierendes Protein mit Mutation an Position 148 (Glutamin ersetzt Histidin)
- YFPI152L gelb fluoreszierendes Protein mit Mutation an Position 152 (Leucin ersetzt Isoleucin)

1. Einleitung

Nervenzellen sind elektrisch aktiv. Erhalten Nervenzellen einen adäquaten Reiz aus der Umwelt oder von einer vorgeschalteten Nervenzelle, werden sie erregt und können Aktionspotenziale an nachgeschaltete Nervenzellen weiterleiten. Aktionspotenziale werden mit Hilfe von Ionenströmen über die Zellmembran erzeugt. Damit Ionen über die Zellmembran fließen, muss ein elektrochemisches Potenzial über die Membran aufgebaut werden. Dieses so genannte Ruhepotenzial der Nervenzelle kommt durch die Ungleichverteilung verschiedener Ionen (vor allem Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und organischen Anionen) beiderseits der Zellmembran zu Stande. Diese Ungleichverteilung kann durch die selektive Permeabilität der Zellmembran für die verschiedenen Ionensorten aufrechterhalten werden. Das Ruhepotenzial vieler Nervenzellen liegt zwischen -40 und -70 mV. Zwei Arten integraler Membranproteine bestimmen das Membranpotenzial: *Ionenpumpen*, die Ionen aktiv (unter Energieverbrauch) gegen ihren elektrochemischen Gradienten transportieren, und *Ionenkanäle*, die selektiv Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten die Membran passieren lassen. Die elektrische Erregung einer Nervenzelle wird durch die Depolarisation des Membranpotenzials erreicht. Das geschieht oft dadurch, dass Na^+ -Ionen in das Zellinnere der Nervenzelle strömen. Die elektrische Hemmung der Nervenzelle wird dagegen durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials erreicht, was in der Regel durch den Fluss von Cl^- -Ionen in die Nervenzelle geschieht. Aktivierung und Hemmung einer Nervenzelle finden generell an der elektrischen Verschaltstelle zweier Nervenzellen, der Synapse, statt. Schüttet die signalgebende Nervenzelle die Botenstoffe GABA oder Glyzin in den synaptischen Spalt aus, binden diese an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Dadurch wird die Leitfähigkeit für Cl^- erhöht; Cl^- fließt in die postsynaptische Zelle und hemmt die nachgeschaltete Nervenzelle.

Es gibt aber auch Nervenzellen, bei denen ein Cl^- -Strom keine Herabsetzung der elektrischen Aktivität bewirkt, sondern im Gegenteil ihre Aktivierung vermittelt. Dieser Mechanismus ist bisher nur bei Riechsinneszellen und somatosensorischen Nervenzellen der Spinalganglien (DRG, *dorsal root ganglia*) genauer untersucht worden. In beiden Nervenzell-typen ist die Aktivierung eines Cl^- -Stroms an zytoplasmatische Kalzium (Ca^{2+})-Signale gekoppelt. Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle liefern den depolarisierenden Cl^- -Fluss aus der Zelle. Die Rolle der Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanäle in somatosensorischen

Neuronen und ihre Funktion bei der Generierung somatosensorischer Signale sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1 Somatosensorik

Somatosensorische Neurone vermitteln Sinnesmodalitäten wie Schmerz, Temperatur und Berührung. Es sind pseudounipolare Neurone, deren Axon mit weit verzweigten, freien Nervenendigungen in der Haut und anderen Organen beginnt und über die Spinalganglien in das Hinterhorn (*Cornu dorsale*) des Rückenmarks führt, wo es mit anderen Neuronen verschaltet wird (Abbildung 1.1 (A)). Diese Neurone leiten die Information in das Gehirn, wo sie verarbeitet und der Wahrnehmung zugeführt werden.

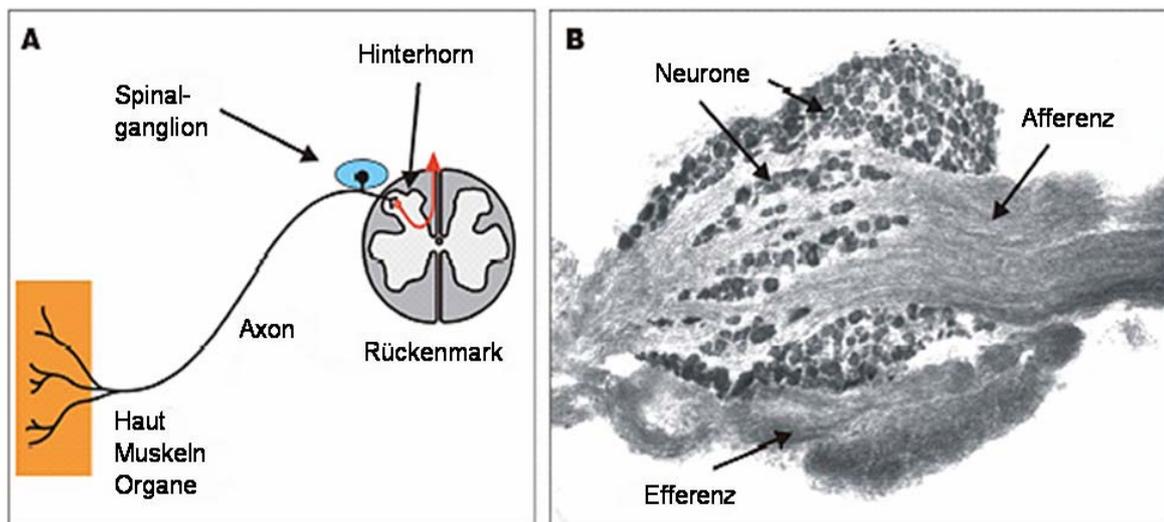


Abbildung 1.1: Aufbau und Verschaltung somatosensorischer Neurone. (A) Die Zellkörper der pseudounipolaren Neurone befinden sich im Spinalganglion (blau). Ihr Axon nimmt Informationen über Schmerz, Temperatur und Berührung, sowie chemische Reize aus der Haut, den Muskeln oder den inneren Organen auf. Die Verschaltung findet im Hinterhorn des Rückenmarks statt, wo eingehende Informationen auf nachgeschaltete Zellen übertragen werden. Die Informationsverarbeitung findet in den somatosensorischen Bereichen des Thalamus und des Cortex statt. (B) Längsschnitt durch ein Spinalganglion (*dorsal root ganglion*, DRG) der Ratte. Die Neurone erscheinen dunkel, da der Schnitt mit einer Nisselfärbung (Richardson-Blau) angefärbt wurde. Man erkennt sowohl die gebündelten Axone der somatosensorischen Neurone (Afferenz), die zentral durch das DRG ziehen, als auch die Axone der Motoneurone (Efferenz), die vom Rückenmark zu den Muskeln in der Haut und den inneren Organen projizieren. (Modifiziert nach: Ilva Putzier, 2003)

Man unterscheidet drei Typen somatosensorischer Neurone. Als Unterscheidungskriterium dient der Grad der Myelinisierung und damit die Leitungsgeschwindigkeit der Nervenfasern.

Die langsamsten Axone sind vollständig unmyelinisiert, sie werden als C-Fasern bezeichnet. Diese Nervenfasern haben einen Durchmesser von $<2\mu\text{m}$ und eine Leitungsgeschwindigkeit von $<2\text{ m/s}$. Sie ermöglichen die Perzeption von Schmerzreizen und dienen der bewussten Schmerzwahrnehmung. Die Erregung von C-Faser-Neuronen führt zu einem dumpfen, schlecht lokalisierbaren und spät einsetzenden Schmerz. Ihre zentralen Fortsätze enden in den Laminae I, II und V im Hinterhorn des Rückenmarks (Handwerker, 1999).

A δ -Fasern sind dünne (\varnothing : 2 - 5 μm), myelinisierte Axone mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 2 - 40 m/s. Diese Fasern übermitteln vor allem schmerzhafte Sinneseindrücke, die durch Hitze, Kälte und mechanische Reize ausgelöst werden. Sie vermitteln ein helles, gut lokalisierbares und schnell auftretendes Schmerzempfinden (Handwerker, 1999). A δ -Fasern projizieren in die Laminae I und V des Hinterhorns und von dort über Interneurone auf Motoneurone. Sie bilden einen polysynaptischen Reflexbogen, dessen wichtigste Aufgabe es ist, ein gefährdetes Körperteil noch vor Bewusstwerden des Schmerzes von der Gefahrenquelle zu entfernen (z.B. die Hand von der heißen Herdplatte zu nehmen). Neben diesen somatomotorischen Reflexen können über efferente Neurone im Seitenhorn auch vegetative Reflexe wie eine Vasodilatation der Hautgefäße ausgelöst werden. Die weitere Fortleitung der Informationen erfolgt über die zweiten Neurone der Schmerzleitung, die den *Tractus spinothalamicus* oder *Tractus spinoreticularis* beziehungsweise den ipsilateral weiterleitenden *Tractus spinocervicalis* bilden. Das spinothalamische System endet im *Nucleus ventralis posterolateralis* des Thalamus und wird von hier auf den somatosensorischen Kortex weitergeleitet (drittes Neuron). In diesem Gebiet der Großhirnrinde findet die bewusste Schmerzwahrnehmung statt. Sie ist für die Lokalisation und die Stärke der Schmerzen zuständig. Der *Tractus spinoreticularis* wird in der *Formatio reticularis* umgeschaltet. Die Verknüpfung von dort zu höheren Zentren ist für die Schmerz-induzierten vegetativen Reaktionen wie Schweißausbruch und erhöhten Sympathikotonus verantwortlich. Eine Verbindung zum limbischen System (Hippocampus, Amygdala) und dem Frontalkortex (Assoziationsareal) ermöglicht die affektive Bewertung des Schmerzes als negatives Erlebnis und eine Erinnerung daran.

C- und A β -Faser-Neurone ermöglichen die Wahrnehmung gewebeschädigender (noxischer), schmerzhafter Reize. Sie werden auch als Nozizeptoren („Schmerzzellen“) zusammengefasst und bilden das nozizeptive System.

Der dritte Typ somatosensorischer Neurone wird von A β -Fasern gebildet. Sie dienen der Wahrnehmung mechanischer Stimuli (Berührung, leichter Druck). Ihre Axone sind dick (8 - 14 μ m), myelinisiert und daher sehr schnell (40 - 90 m/s) (Handwerker, 1999). A β -Fasern sind nicht Teil des nozizeptiven Systems. Das somatosensorische System besteht hauptsächlich (~90%, Stucky et al., 1999) aus C- und A δ -Faser-Neuronen. A β -Fasern machen nur einen geringen Anteil aller somatosensorischer Zellen aus. Das somatosensorische System ist damit hauptsächlich auf die Wahrnehmung schmerzhafter Reize (Nozizeption) ausgelegt. In meiner Arbeit habe ich ausschließlich mit nozizeptiven Zellen oder „Schmerzzellen“ gearbeitet, weshalb im Folgenden repräsentativ für C- und A δ -Faser-Neurone der Terminus „Schmerzzellen“ verwendet wird.

Was ist Schmerz? Die „*International Association for the Study of Pain*“ definiert Schmerz folgendermaßen:

„Schmerz ist eine unangenehme sensorische und gefühlsmäßige Erfahrung, die mit bereits eingetretenen oder drohenden Verletzungen einhergeht oder als solche empfunden wird.“

Schmerzen werden durch Gewebeschäden ausgelöst, die einen intakten Zellverband bedrohen. An der Schmerzentstehung sind mehrere Prozesse beteiligt. Einerseits werden schmerzhaft Reize von Transduktionskanälen (siehe Abschnitt 1.4) direkt in elektrische Signale umgewandelt, zum Anderen werden von geschädigten Zellen Schmerzverursachende Substanzen in den Extrazellulärraum freigesetzt, wodurch Nozizeptoren zusätzlich stimuliert, bzw. moduliert werden. Die Gewebeschädigung kann unterschiedlicher Natur sein: Traumatische Zerstörung, thermische Schädigung und entzündliche Veränderungen kommen hierbei in Frage. Die aus zerstörten Zellen freigesetzten schmerzfördernd wirkenden Substanzen sind unter anderem K⁺-Ionen und Protonen, Serotonin und Histamin. Bei Entzündungsprozessen werden auch Arachidonsäuremetabolite (z.B. Prostaglandine) freigesetzt. Diese haben keine direkte Wirkung auf Nozizeptoren, erhöhen jedoch die Sensibilität für andere freigesetzte Metabolite und verstärken beziehungsweise ermöglichen so erst deren Wirkung. An den in der Peripherie freiliegenden Nervenendigungen entsteht auf die oben beschriebenen Reize

hin die „Information Schmerz“, die durch Aktionspotentiale zum Zentralnervensystem weitergeleitet wird. Die Stärke des Schmerzes wird durch die Anzahl der Aktionspotenziale pro Zeiteinheit kodiert, die Lokalisation wird vermittelt durch die zum geschädigten Gewebe gehörenden Fasern.

1.2 Die DRG-Primärzellkultur – Das Standardmodell der Schmerzforschung

Um einen Einblick in die Generierung der „Information Schmerz“ zu bekommen, müsste man die Prozesse, die bei der Schmerzentstehung ablaufen, an den sensorischen Endigungen untersuchen. Allerdings sind die „Sensoren“ somatosensorischer Neurone stark verzweigte Axonterminalen mit einem Durchmesser von nur $\sim 0,25 - 1,5 \mu\text{m}$ (Whitear, 1960). Wegen ihres geringen Durchmessers sind sie nur mit großem präparativem Aufwand zugänglich und können daher nicht mit konventionellen Methoden wie Patch-Clamping oder Fluoreszenz-Imaging untersucht werden. Einen Ausweg aus dieser Beschränkung bieten die Zellkörper (Perikaryen) somatosensorischer Neurone. Sie befinden sich in den Spinalganglien und Trigeminalganglien. Die Spinalganglien („Hinterwurzelganglien“ oder „*dorsal root ganglia*“, DRG; Abb. 1.1) liegen als Abschnitt der Hinterwurzel an den *Foramina spinalia* in der Nähe des knöchernen *Canalis vertebralis* innerhalb der *Dura mata*. Sie werden von einer Bindegewebskapsel, dem *Perineurium*, umgeben und von einem gefäßhaltigen Bindegewebe durchzogen. Ihre Ganglienneurone sind die ersten Neurone der afferenten sensiblen Fasern. Die dicht gepackten Nervenzellen liegen häufig am Rand der Spinalganglien, die austretenden Fasern bilden den inneren Teil des Ganglions (Andres, 1961). Die Perikaryen der primären Neurone können mit geringem präparativem Aufwand isoliert und kultiviert werden (Primärzellkultur) und dienen seit Jahrzehnten als *in vitro*-Standardmodell der Schmerzforschung. Ein Großteil der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurde daher an kultivierten DRG-Neuronen vorgenommen.

Der Nachteil dieses Modells ist in seiner Komplexität begründet: Spinalganglien enthalten die Perikaryen funktionell unterschiedlicher sensorischer Afferenzen. Etwa 25 unterschiedliche Subpopulationen wurden *in vivo* identifiziert und charakterisiert (Darian-Smith, 1984a,b; Iggo, 1985). Davon sind mindestens 12 nozizeptive Subpopulationen (Belmonte & Giraldez, 1981; Tanelian & Beuerman, 1984; Campbell et al., 1990; Cooper & Sessle, 1993; Mense, 1993; Schaible & Grubb, 1993; Cervero, 1994). Möchte man eine dieser Subpopulationen *in vitro* gezielt untersuchen, benötigt man Hilfsmittel zur

Identifizierung der entsprechenden Subpopulation. Bei der Isolierung der Perikaryen werden die Zellen aus ihrem Gewebeverband gelöst. Dabei reißen die Axone der Neurone ab, sodass eine Unterscheidung der einzelnen Fasertypen mit Hilfe des Axondurchmessers *in vitro* nicht mehr möglich ist. Allerdings unterscheiden sich die DRG-Perikaryen der verschiedenen Fasertypen in ihrem Durchmesser. In der Literatur findet man diesbezüglich zum Teil stark variierende Angaben (z.B. Lee et al., 1986; Scroggs & Fox, 1992; Zhang et al., 1999; Rola et al., 2003; Ma, 2005), daher habe ich aus den verfügbaren Veröffentlichungen einen Querschnitt gebildet, der die Größenbereiche der Zelldurchmesser für die verschiedenen Fasertypen wie folgt definiert: Die Zellkörper der C-Faser-Zellen sind am kleinsten ($\leq 30 \mu\text{m}$). Die Perikaryen der A δ -Faser-Neurone haben eine Größe zwischen 30 - 45 μm . Die größte Population ($>45 \mu\text{m}$) wird von A β -Faser-Zellen gebildet.

Durch die verschiedenen Perikaryen-Durchmesser ist eine grobe Diskriminierung der unterschiedlichen Fasertypen somatosensorischer Neurone auch *in vitro* möglich. Diese Unterscheidung ist sehr hilfreich, wenn man in DRG-Primärkulturen die physiologischen Eigenschaften eines Fasertyps gezielt untersuchen möchte.

In dieser Arbeit wurde mit kultivierten Schmerzzellen gearbeitet, also mit C- und A δ -Faser-Neuronen. Die beiden Fasertypen enthalten wiederum mehrere Subpopulationen unterschiedlicher sensorischer Modalitäten. Da Schmerzzellen die Fähigkeit haben, auf unterschiedliche Reize zu reagieren, ist eine scharfe Abgrenzung der einzelnen Modalitäten nur eingeschränkt möglich. Man bezeichnet Schmerzzellen daher auch als polymodal (Bessou et al., 1969). Um das Problem der Modalitäten-Vielfalt in DRG-Primärkulturen in den Griff zu bekommen, wird in der Schmerzforschung fortwährend nach Werkzeugen gesucht, die die Identifizierung der unterschiedlichen Modalitäten *in vitro* erleichtert. Der Perikaryen-Durchmesser ist ein Beispiel für ein solches Werkzeug. In der Schmerzforschung wird häufig versucht, einen Zusammenhang zwischen Modalität und Zellgröße (Durchmesser) herzustellen. Auf diese Weise soll die Identifizierung und damit die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften einer DRG-Subpopulation erleichtert werden. In dieser Arbeit wurde am *in vitro*-Modell mit der Hitze-sensitiven DRG-Subpopulation (s.u.) gearbeitet. Daher ist ein Kapitel der Frage gewidmet, ob diese Subpopulation mit Hilfe des Perikaryen-Durchmessers identifiziert werden kann.

Darüber hinaus wird in dieser Arbeit die Verwendbarkeit des Pflanzenlektins Isolektin B₄ [IB₄ aus *Griffonia simplicifolia* (*Bandeiraea simplicifolia*)], für die Identifizierung der Hitze-sensitiven Modalität ausgetestet. Mit Hilfe der IB₄-Spezifität

können Schmerzzellen in zwei Gruppen unterteilt werden. In der Literatur werden sie als „peptiderge“ und „nicht-peptiderge“ (Snider & McMahon, 1998; Julius & Basbaum, 2001; Kashiba et al., 2001), bzw. als „Peptid-reiche“ und „Peptid-arme“ Schmerzzellen bezeichnet (Carlton & Herggett, 2002). Peptiderge Nozizeptoren exprimieren Neuropeptide, wie CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) und Substance P, und den NGF-Rezeptor (*nerve growth factor, NGF*) TrkA (*Thyrosin-Kinase A oder neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 1*). Nicht-peptiderge Schmerzzellen exprimieren Rezeptoren für den *glia cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und enthalten dagegen keine, bzw. nur geringe Konzentrationen an Neuropeptiden. Diese Zellen binden IB₄ (Snider & McMahon, 1998; Priestley et al., 2002). Mit Fluoreszenz-markiertem IB₄ lassen sich diese Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen. Inwieweit die IB₄-Selektivität zur funktionellen Unterscheidung somatosensorischer Neurone genutzt werden kann, ist noch nicht hinreichend geklärt. Trotz der Unsicherheit über die funktionelle Rolle der IB₄-positiven Subpopulation wird das Pflanzenlektin in der Schmerzforschung häufig zur Charakterisierung kultivierter DRG-Neurone verwendet.

1.3 Arbeitshypothese der Signaltransduktion in Schmerzzellen

Wird eine somatosensorische Zelle durch ihren adäquaten Reiz aktiviert, wird dieser in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieser Prozess wird als Signaltransduktion bezeichnet. Die Schemazeichnung in Abbildung 1.2 zeigt das Modell, wie die Signaltransduktion in Schmerzzellen nach der Hypothese unserer Arbeitsgruppe aussehen könnte. Nach dieser Hypothese nutzen Schmerzzellen einen Verstärkungsmechanismus, der auf exzitatorischen Cl⁻-Strömen basiert. Dieser Mechanismus beinhaltet Ca²⁺-permeable Transduktionskanäle, Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle und Cl⁻-akkumulierende Transporter.

Transduktionskanäle leiten bei ihrer Aktivierung einen einwärtsgerichteten Kationenstrom, der hauptsächlich von Ca²⁺-Ionen getragen wird (siehe Abschnitt 1.4). Der Ca²⁺-Einstrom führt zum Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und zur Aktivierung Ca²⁺-gesteuerter Cl⁻-Kanäle. Durch eine hohe intrazelluläre Cl⁻-Konzentration, die von Cl⁻-akkumulierenden Transportern aufrecht gehalten wird, leiten Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle einen auswärtsgerichteten Cl⁻-Strom, der eine weitere Depolarisation des Membranpotenzials bewirkt und das initiale Rezeptorpotenzial verstärkt.

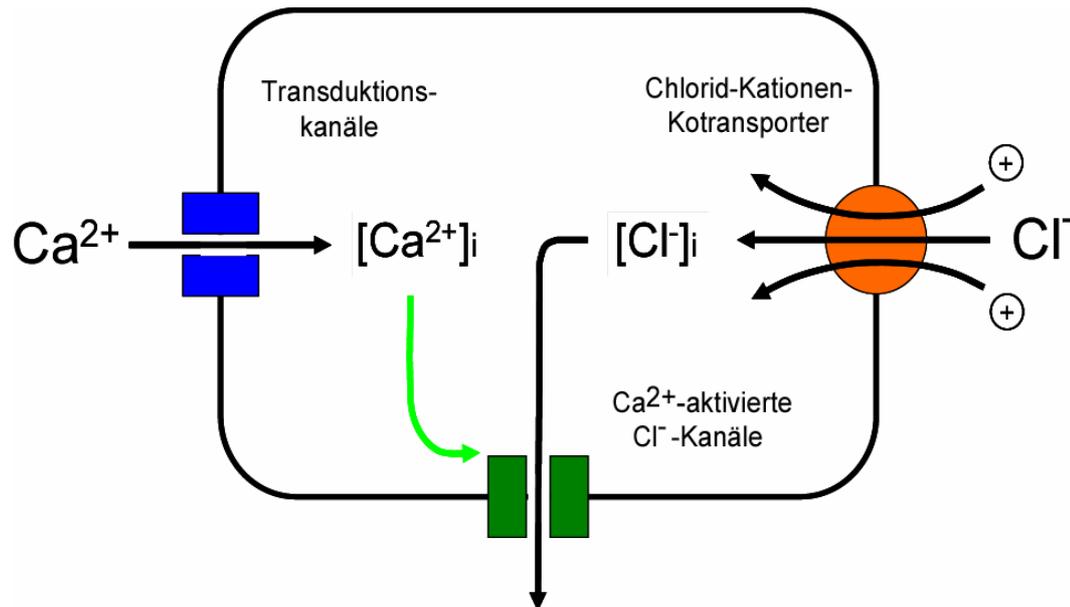


Abbildung 1.2: Modell der Cl⁻-basierten Signalverstärkung in somatosensorischen Neuronen. Transduktionskanäle (blau) leiten bei ihrer Aktivierung Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Der Anstieg der [Ca²⁺]_i führt zur Depolarisation des Membranpotenzials und bedingt die Öffnung Ca²⁺-gesteuerter Cl⁻-Kanäle. Eine hohe [Cl⁻]_i, die von Cl⁻-akkumulierenden Transportern aufrecht gehalten wird, liefert die treibende Kraft für den exzitatorischen Cl⁻-Ausstrom, der die Verstärkung des Sensorpotenzials bedingt.

Dieser Verstärkungsmechanismus wurde in den Zilien olfaktorischer Sinneszellen (OSNs: olfactory sensory neurons) nachgewiesen (Reisert et al., 2003, 2005; Kaneko et al., 2004). Nach der Hypothese unserer Arbeitsgruppe verwenden somatosensorische Neurone den gleichen Cl⁻-basierten Verstärkungsmechanismus, wie er in OSNs identifiziert wurde. Diese Hypothese zu überprüfen war ein Ziel meiner Arbeit. Wie diese Hypothese zustande kommt wird im Folgenden erklärt.

1.4 Signaltransduktion in Riechzellen (OSNs)

Abbildung 1.3 zeigt eine Schemazeichnung des Transduktionsapparates in den Zilien von OSNs. Die Zilien der Riechzellen sind sehr kleine, spezialisierte Zellkompartimente, die auf die Detektion von Duftstoffen, mit Stimulation einer Adenylatzyklase und einem Anstieg der ziliären cAMP-Konzentration (cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat) reagieren (Pace et al., 1985; Firestein et al., 1991). cAMP öffnet Ca²⁺-permeable CNG-Kanäle (CNG: cyclic nucleotide gated) (Firestein et al., 1991; Frings et al., 1992; Nakamura et al., 1997) die, neben monovalenten Kationen einen einwärtsgerichteten Ca²⁺-

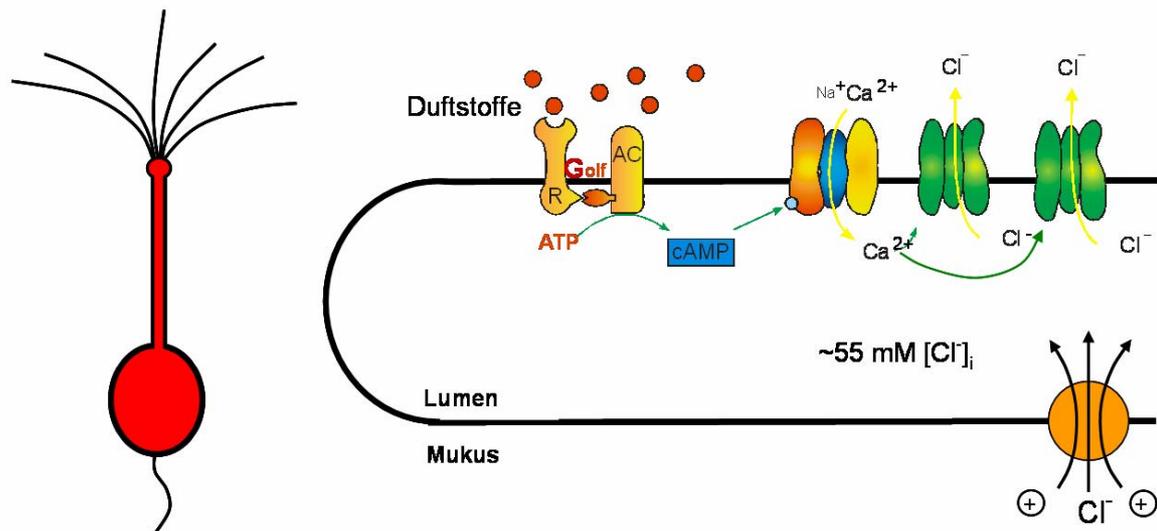


Abbildung 1.3: Transduktionsapparat von Riechzellen (OSNs). Die Detektion von Duftstoffen führt G-Protein-gekoppelt zum Anstieg der ziliären cAMP-Konzentration. cAMP aktiviert CNG-Kanäle, die Ca^{2+} -Ionen aus dem Mukus in die Zilien leiten. Der initiale, depolarisierende Kationenstrom wird anschließend ~ 10 -fach, durch einen Ca^{2+} -induzierten Cl^- -Strom verstärkt und generiert einen Rezeptorstrom, der die elektrische Erregung des Neurons auslöst.

Strom leiten (Kleene, 1995; Frings et al., 1995; Zufall und Firestein, 1996; Dzeja et al., 1999; Seifert et al., 1999) und damit einen Anstieg der ziliären Ca^{2+} -Konzentration bewirken (Leinders-Zufall et al., 1997). Dadurch werden Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle geöffnet, die den auswärtsgerichteten Cl^- -Strom leiten und das Membranpotenzial der Zelle zusätzlich depolarisieren (Reisert et al., 2003). Cl^- -Akkumulation wird in diesen Zellen wahrscheinlich von dem $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Transporter NKCC1 verwirklicht (Kaneko et al., 2004; Reisert et al., 2005). Die in OSNs gemessene Cl^- -Konzentration liegt im Mittel bei 55 mM (Kaneko et al., 2004).

Der metabolische, G-Protein gekoppelte Transduktionsmechanismus in den Zilien der Riechzellen trägt nicht zur Verstärkung des Rezeptorstroms bei, da das Konzentrationsverhältnis der aktivierenden Duftstoffe zum synthetisierten cAMP etwa gleich groß ist (Takeuchi & Kurahashi, 2005; Bhandawat et al., 2005). Die Verstärkung des initialen Rezeptorstroms wird ausschließlich durch den exzitatorischen Cl^- -Ausstrom vermittelt, der von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen getragen wird. Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle wurden das erste Mal in OSNs von Fröschen nachgewiesen (Kleene et al. 1991). Die Hypothese, dass diese Kanäle als Verstärker des Rezeptorstroms in OSNs agieren könnten, wurde 1993 von Lowe & Gold formuliert. Außer in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen wurden Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle auch in anderen Nervenzellen, wie

Fotorezeptoren und Geschmackszellen identifiziert. Welche Funktion sie in diesen Sinneszellen erfüllen, ist bisher nicht bekannt (Frings et al., 2000).

1.5 Signaltransduktion in somatosensorischen Neuronen

Im Gegensatz zur Signaltransduktion in Riechzellen wird der Rezeptorstrom in somatosensorischen Sinneszellen nicht durch metabolische Prozesse verstärkt. Hier wirken adäquate Stimuli direkt auf Ca^{2+} -permeable Transduktionskanäle, die einen Ca^{2+} -Einstrom in die sensorischen Endigungen leiten. Viele somatosensorische Neuronen exprimieren Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle (Bader et al., 1987; Scott et al., 1988; Stapleton et al., 1994; Currie et al., 1995; Kenyon, 2000). Die Zellen akkumulieren Chlorid in Zellkörpern (Alvarez-Leefmans et al., 2001) und den sensorischen Endigungen (Granados-Soto et al., 2005), mit Hilfe des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporters NKCC1 (Sung et al., 2000). Die intrazelluläre Cl^- -Konzentration liegt im Mittel bei 31 mM (Kaneko et al., 2002). In somatosensorischen Neuronen wurden exzitatorische Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme das erste Mal von Mayer (1985) gemessen. Am Tiermodell (Rückenmark-Hautpräparationen der Ratte), sowie durch *in vivo*-Experimente am Menschen wurde später gezeigt, dass Schmerz-Reaktionen durch exzitatorische Cl^- -Ströme induziert werden können (Ault & Hildebrand, 1994) und diese durch Inhibierung der Cl^- -akkumulierenden Transporter abgeschwächt werden (Willis et al., 2004). Von Morales-Aza (2004) wurde gezeigt, dass die NKCC1-Expression durch Entzündungsprozesse in Nozizeptoren gesteigert wird - möglicherweise um den Verstärkungsgrad und die elektrische Erregbarkeit der Zellen zu erhöhen.

Abbildung 1.4 zeigt einige Transduktionskanäle, die in somatosensorischen Neuronen nachgewiesen wurden. Dargestellt sind chemo-sensitive Transduktionskanäle (P2X-, ASIC-Kanäle), sowie mechano- (DEG/ENaC) und Temperatur-sensitive Kanäle der TRP-Familie.

- P2X-Rezeptoren (purinerge Rezeptoren) sind Ionenkanäle, die durch extrazelluläres ATP geöffnet werden. ATP gelangt bei mechanischer Belastung aus dem Zellinneren in die interstitielle Flüssigkeit. Obwohl die purinergen Rezeptoren durch ATP aktiviert werden, dienen sie der Mechanoperzeption.

- ASIC-Kanäle (*acid sensing ion channels*) werden bei Gewebsazidose durch Protonen aktiviert und führen zur Erregung von Nozizeptoren. Der Schmerz bei Herzinfarkten entsteht vor allem durch Ansäuerung von ischämischem Gewebe im Herzmuskel.
- DEG/ENaC-Kanäle (*DEGenerin family of proteins, Epithelial Na⁺-Channel*) bilden eine Superfamilie, der u.a. auch die ASIC-Kanäle angehören. Sie bilden Ionenkanäle, die bei der Geschmacksempfindung und der Perzeption mechanischer Reize eine Rolle spielen.

- TRP-Kanäle (transient receptor potential) bilden eine Großfamilie von Transduktionskanälen. Die TRP-Familie umfasst bei Säugetieren mittlerweile 22 Mitglieder, die in vier Subfamilien eingeteilt werden: die klassischen TRP-Kanäle mit sieben Mitgliedern (TRPC, „classic“ oder „canonical-like“ TRP), die Vanilloid-

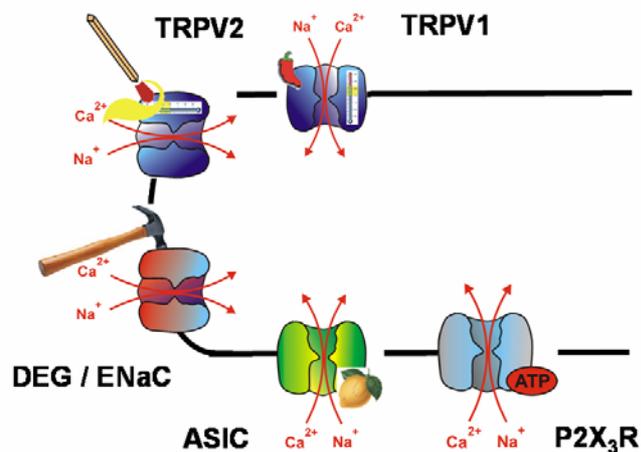


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von Schmerzreiz-aktivierten Transduktionskanälen in sensorischen Endigungen von Schmerzzellen. (Verändert nach: www.sinnesphysiologie.de/download/schmerz1.ppt)

Rezeptor-ähnlichen TRP-Kanäle mit sechs Mitgliedern (TRPV, „vanilloid“ TRP), die Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle (TRPM, „melastatin“ TRP) mit acht Mitgliedern und ANKTM1 (TRPA, „ankyrin-repeat“ TRP) (Montell et al., 2002). Ein Mitglied der TRPV-Subfamilie, der Transduktionskanal TRPV1, ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, wie im Folgenden gezeigt wird.

Alle hier gezeigten Transduktionskanäle sind Ca^{2+} -permeabel und erzeugen bei ihrer Aktivierung ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal, das die Öffnung Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle zur Folge haben kann. Bisher ist nicht bekannt, welche Population somatosensorischer Neurone, d.h., welche sensorische Modalität den Cl^- -basierten Verstärkungsmechanismus nutzt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle bei der

Generierung von Schmerzsignalen mit dem Transduktionskanal TRPV1 kooperieren. TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid receptor 1*) ist ein nicht-selektiver Kationenkanal der von etwa 50% der Schmerzzellen exprimiert wird (Szallasi & Blumberg, 1999). Er wurde aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch das Vanilloid Capsaicin (siehe 2.7.1) entdeckt und ist mittels einer cDNA-Bibliothek aus sensorischen Neuronen der Hinterwurzel- und Trigeminalganglien der Ratte kloniert worden (Caterina et al., 1997). TRPV1 wird neben Capsaicin auch durch noxische Hitze $>42^{\circ}\text{C}$ und Protonen aktiviert (Caterina et al., 1997; Welch et al., 2000). Von Rosenbaum et al. (2004) wurde gezeigt, dass der Kanal durch einen Calmodulin-vermittelten Rückkopplungsmechanismus inhibiert wird. Der Ca^{2+} -permeable Transduktionskanal in den Zilien der Riechzellen wird interessanterweise auch durch einen Calmodulin-vermittelten, negativen Rückkopplungs-Mechanismus inhibiert (Reisert & Matthews, 2001).

Die sensorischen Endigungen somatosensorischer Sinneszellen sind sehr kleine Zellkompartimente. Die Zilien olfaktorischer Sinneszellen sind ebenfalls sehr klein ($\varnothing < 1\mu\text{m}$) (Lidow & Menco, 1984). Möglicherweise ist die geringe Größe der sensorischen Kompartimente der Grund für die Entwicklung des Cl^{-} -basierten Verstärkungsmechanismus. Die Zilien von OSNs sind nicht mit Mitochondrien ausgestattet, daher ist das Angebot an ATP, für die cAMP-Synthese limitiert. Außerdem enthalten sie kein endoplasmatisches Retikulum (ER), sodass eine Signalverstärkung durch Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER nicht möglich ist. Im Gegensatz zu anderen sensorischen Transduktionsmechanismen ist die Generierung somatosensorischer Signale nicht an eine biochemische Verstärkung durch G-Protein / Second Messenger-Pathways gekoppelt. Diese Art der Signalverstärkung kommt für die Generierung somatosensorischer Signale also nicht in Frage. Allerdings enthalten die sensorischen Endigungen von Schmerzzellen axoplasmatisches Retikulum (AR) sodass eine Verstärkung des Rezeptorpotenzials durch Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung vermittelt werden könnte. Die geringe Größe der sensorischen Kompartimente von OSNs und Schmerzzellen erzeugt Limitierungen (ATP-Nachschub oder fehlende metabolische Transduktionsapparate) die möglicherweise durch den Cl^{-} -basierten Verstärkungsmechanismus kompensiert werden.

Die physiologischen- und anatomischen Gemeinsamkeiten von Riechzellen und somatosensorischen Neuronen führten zu der Hypothese, dass somatosensorische Nervenzellen den gleichen Cl^{-} -basierten Signal-Verstärkungsmechanismus nutzen wie olfaktorische Neurone. Diese Hypothese wurde während meiner Arbeit auch von Granados-Soto (2005) postuliert. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass in

Schmerzzellen TRPV1-, und Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle bei der Generierung von Hitze-Schmerzsignalen kooperieren. Diese Hypothese zu überprüfen ist ein Ziel dieser Arbeit.

1.6 Cl^- -Switch in somatosensorischen Neuronen

Wieso unterscheidet sich die $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Neurone von der $[\text{Cl}^-]_i$ der meisten anderen Neurone des adulten Zentralnervensystems (Übersicht: Cherubini et al., 1991)? In allen embryonalen Neuronen des Zentralnervensystems von Wirbeltieren ist die $[\text{Cl}^-]_i$ hoch. Während der postnatalen Entwicklung des Zentralnervensystems findet in den meisten Nervenzellen eine grundlegende Veränderung des Chlorid-Haushalts statt (retinale Ganglion- und Amakrinzellen, ab Tag 6 nach der Geburt (P6), Zhang et al., 2006; Hippocampus-Neuronen, ab P5, Khirug et al., 2005; pyramidale Hippocampus-Neuronen, ab ~P12, Rivera et al., 2005), die eine Abnahme der intrazellulären Cl^- -Konzentration zur Folge hat (Kaila et al. 1994; Li et al., 1998). Dieser Übergang wird durch den K^+/Cl^- -Kotransporter KCC2 vermittelt und als „ Cl^- -Switch“ bezeichnet. KCC2 transportiert Cl^- -Ionen mit Hilfe des K^+ -Gradienten aus der Zelle und sorgt auf diese Weise für eine niedrige intrazelluläre Cl^- -Konzentration (Rivera et al., 1999; Hubner et al., 2001; Stein et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass während der postnatalen Entwicklung der somatosensorischen Neurone KCC2 nicht exprimiert wird und sich auch im adulten Organismus nicht nachweisen lässt (Kanaka et al., 2001). Daher wurde für alle somatosensorische Neurone das Fehlen des Cl^- -Switches und eine lebenslang hohe Chlorid-Konzentration postuliert (Gallagher et al., 1978; Alvarez-Leefmans et al., 1988). Andererseits wurde nachgewiesen, dass nicht alle somatosensorischen Neurone Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle exprimieren (45 - 90% aller Spinalganglienzellen). Es ist nicht bekannt, ob nur diejenigen Neurone $[\text{Cl}^-]_i$ akkumulieren, die auch Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle exprimieren. Da die $[\text{Cl}^-]_i$ die elektrische Erregbarkeit somatosensorischer Neurone beeinflusst und den Anteil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms am Rezeptorstrom bestimmt, ist die Messung der $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Neurone im intakten Gewebe unbedingt erforderlich.

1.7 Fragestellungen dieser Arbeit

Wie groß ist der Anteil TRPV1-exprimierender Schmerzstellen in DRG-Primärkulturen der Ratte?

In der Literatur wird der Anteil der TRPV1-positiven Schmerzstellen-Population auf 50% beziffert (Szallasi & Blumberg, 1999). Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, wie viele Neurone in den von mir verwendeten Kulturen TRPV1-Kanäle exprimieren. Dieser Anteil sollte mit Hilfe einer immunzytochemischen Charakterisierung ermittelt werden.

Eignen sich Na-CDMNB-, bzw. DMNB-caged Capsaicin für die kinetische Untersuchung von TRPV1-Kanälen in Schmerzstellen?

Um die Prozesse, die bei der Signaltransduktion in Schmerzstellen ablaufen genauer verstehen zu können, müssen die Eigenschaften der molekularen Komponenten des Transduktionsapparates in kinetischen Experimenten analysiert werden. Bei der Charakterisierung der Signaltransduktion von Riechzellen wurde die Aktivierungskinetik von CNG-Kanälen mit Hilfe von „caged compounds“ untersucht (Dzeja et al., 1999). Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. V. Hagen (Forschungs-Institut für molekulare Pharmakologie, Campus Berlin-Buch) hat unsere Arbeitsgruppe die caged Compounds Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin entwickelt. Ob sich diese Substanzen für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen in Schmerzstellen eignen, soll in meiner Arbeit geprüft werden.

Kann die TRPV1-exprimierende Schmerzstellen-Population mit Hilfe des Pflanzenlektins IB₄, oder durch ihre Zellgröße (Durchmesser) identifiziert werden?

Damit TRPV1-Kanäle in kultivierten Schmerzstellen mit der Patch-Clamp-Technik gezielt untersucht werden können, benötigt man Hilfsmittel, die die Identifizierung der TRPV1-exprimierenden Zellpopulation erleichtert. In der Schmerzforschung wird zur Charakterisierung von Schmerzstellen häufig Fluoreszenz-markiertes Isolektin B₄ verwendet. Es bindet spezifisch an die Glycocalyx einer Schmerzstellen-Subpopulation, die zum Teil auch den Capsaicin-sensitiven Hitzerezeptor TRPV1 exprimiert (Guo et al., 1999). Mit Fluoreszenz-markiertem IB₄ kann diese Subpopulation fluoreszenz-

mikroskopisch identifiziert werden und ermöglicht eine gezielte Untersuchung, z.B. mit der Patch-Clamp-Technik. Ob das Pflanzenlektin für die Identifizierung der TRPV1-positiven Schmerzzell-Population in DRG-Primärkulturen verwendet werden kann, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Perikaryen der drei verschiedenen Fasertypen (C-, A δ - und A β -Fasern), somatosensorischer Neurone unterscheiden sich in ihrer Größe. Die Größe der nozizeptiven Neurone variiert zwischen ~20 - 45 μm . Möglicherweise lassen sich innerhalb dieser Gruppe Zellen unterschiedlicher sensorischer Modalität mit Hilfe der Größe in weitere Subpopulationen unterteilen. Sollte dies zutreffen, wäre eine morphologische Identifizierung von DRG-Neuronen verschiedener Modalitäten in Primärkulturen möglich. Dies würde die gezielte Auswahl von Neuronen für elektrophysiologische Experimente erheblich vereinfachen, da auf die Verwendung fluoreszenzoptischer Methoden zur Diskriminierung der verschiedenen Zelltypen verzichtet werden könnte. Eine Größen-basierte Analyse kultivierter DRG-Neurone soll Aufschluss darüber geben, ob sich Zellen unterschiedlicher Modalität mit Hilfe des Zelldurchmessers unterscheiden lassen.

Kooperieren TRPV1-, und Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle bei der Generierung Hitzeschmerz-vermittelter Signale in Schmerzzellen?

Aufgrund der vielen physiologischen und anatomischen Gemeinsamkeiten von Riechzellen und somatosensorischen Neuronen (siehe Abschnitt 1.4), hat unsere Arbeitsgruppe die Hypothese entwickelt, dass Schmerzzellen den gleichen Cl⁻-basierten Signalverstärkungsmechanismus nutzen wie die Sinneszellen des olfaktorischen Epithels. Die Frage, an welche sensorische Modalität die Expression Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle gekoppelt ist, konnte bisher nicht beantwortet werden. Der Transduktionskanal TRPV1 ist wegen seiner physiologischen Eigenschaften (siehe Abschnitt 1.4) ein guter Kandidat für eine funktionelle Kopplung mit Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanäle bei der Generierung Hitzeschmerz-vermittelter Signale. Mit Cl⁻-Imaging und durch elektrophysiologische Untersuchungen an kultivierten Schmerzzellen soll diese Hypothese überprüft und eine mögliche funktionelle Kopplung der beiden Kanäle nachgewiesen werden.

Stimmt die $[Cl^-]_i$, die in isolierten DRG-Neuronen gemessen wurde mit der $[Cl^-]_i$ somatosensorischer Neurone im intakten Gewebe überein?

Die Methoden, die zur Messung der $[Cl^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen verwendet wurden, sind invasiv (Cl^- -sensitive Mikroelektroden: Alvarez-Leefmans et al., 1988; Alvarez-Leefmans, 1990) und zudem oft indirekt (Messung des Umkehrpotenzials: Deschenes et al., 1976; Gallagher et al., 1978; Kenyon, 2001). Außerdem wurden die Messungen der $[Cl^-]_i$ nur an wenigen isolierten und kultivierten Neuronen vorgenommen (Alvarez-Leefmans et al., 1988: 53 DRG-Neuronen des Frosches; Kaneko et al., 2002: 31 DRG-Neuronen der Ratte). Es ist möglich, dass die Anzahl der untersuchten Neurone in den genannten Arbeiten nicht repräsentativ war und dadurch ein falsches Bild über den Cl^- -Haushalt somatosensorischer Neurone entstand. Außerdem ist bekannt, dass DRG-Neuronen das Expressionsmuster ihrer Proteine in Kultur verändern (Scott & Edwards, 1980). Man muss daher davon ausgehen, dass sich auch die $[Cl^-]_i$ in Kultur verändert. Mit 2P-FLIM (*two-photon fluorescence-lifetime-imaging microscopy*) und dem Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MQAE kann die $[Cl^-]_i$ (1.) in vielen Zellen und (2.) im nativen Gewebe gemessen werden. Mit dieser Methode soll die Cl^- -Konzentration somatosensorischer Neurone in Spinalganglien ermittelt werden.

Wie kann die sensorische Modalität von DRG-Neuronen, die Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle exprimieren, identifiziert werden?

Neben der von uns angenommenen funktionellen Kopplung von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen mit TRPV1-Kanälen, könnten Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle auch von DRG-Neuronen anderer Modalitäten exprimiert werden. Cl^- -Imaging ist eine geeignete Methode, viele Schmerzzellen in kurzer Zeit auf die Expression Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle zu untersuchen. Um Cl^- -Imaging mit Schmerzzellen durchführen zu können, müssen sie mit einem Cl^- -Indikator ausgestattet sein. Seit einigen Jahren gibt es GFP-Varianten mit verstärkter Affinität zu Anionen. Ein Beispiel dafür ist YFP152L (Galiotta et al., 2001), eine gelb-fluoreszierende Variante des GFP, die bereits erfolgreich für Untersuchungen von Cl^- -Kanälen (GABA-, Glycin-Rezeptoren) verwendet wurde (Kruger et al., 2005). Ein anderes Beispiel für einen Cl^- -Sensor ist Clomeleon. Clomeleon ist ein auf FRET basierender, ratiometrischer Chlorid-Indikator, der die Bestimmung absoluter Werte der $[Cl^-]_i$ ermöglicht (Kuner et al., 2000).

Stimuliert man kultivierte Schmerzzellen, die zuvor mit YFP1152L oder Clomeleon ausgestattet wurden, mit einer Schmerz-auslösenden Substanz, so nimmt in denjenigen Zellen, die den spezifischen Transduktionskanal für diese Substanz exprimieren, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu. In der Folge werden Ca^{2+} -gesteuerte Cl^- -Kanäle aktiviert, die ihrerseits einen auswärtsgerichteten Cl^- -Fluß leiten. Diese Zellen können leicht identifiziert werden, da sich die Fluoreszenzintensität des Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs ändert. Wenn die sensorische Modalität der somatosensorischen Neurone, die Ca^{2+} -gesteuerte Cl^- -Kanäle exprimieren, bekannt ist, können die Prozesse, die bei der Generierung somatosensorischer Signale ablaufen, gezielt untersucht werden.

1.8 Zielsetzungen dieser Arbeit

Aus den angegebenen Fragestellungen ergeben sich für meine Arbeit folgende Zielsetzungen:

- Immunzytochemische Charakterisierung der verwendeten DRG-Primärkulturen, mit Antikörpern gegen den Transduktionskanal TRPV1
- Test der Verwendbarkeit von caged Capsaicin für Fotoaktivierungs-Experimente mit kultivierten Schmerzzellen
- Korrelationsanalyse der IB_4 -Selektivität, TRPV1-exprimierender, Capsaicin-sensitiver DRG-Neurone
- Größenanalyse kultivierter, TRPV1-exprimierender, Capsaicin-sensitiver DRG-Neurone
- Untersuchung Capsaicin-sensitiver DRG-Neurone auf eine funktionelle Kopplung von TRPV1 mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen bei der Generierung von Schmerzsignalen
- Messung der $[\text{Cl}^-]_i$ kultivierter DRG-Neurone mit 2P-FLIM
- Messung der $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Neurone im nativen Gewebe (Spinalganglien) mit 2P-FLIM
- Ausarbeitung einer geeigneten Methode des Gentransfers, um Schmerzzellen für Cl^- -Imaging-Experimente mit dem Anionen-sensitiven YFP-I152L auszustatten

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

Bezugsquellen und Artikelbezeichnungen verwendeter Chemikalien, sowie Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern sind in den verschiedenen Abschnitten beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien in p.a.-Qualität bezogen.

Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde deionisiertes Wasser (Restleitfähigkeit $5,5 \cdot 10^{-8}$ S) aus dem Gerät Milli-Q UF Plus der Firma Millipore verwendet.

2.2 Histologische Methoden

Histologische Gewebefärbungen wurden durchgeführt, um die in dieser Arbeit fluoreszenzoptisch detektierten Strukturen anschaulich beschreiben zu können.

2.2.1 Fixation

Paraformaldehyd ist das Polymerisationsprodukt von Formaldehyd. Es dient als wasserlösliches Fixationsmittel, das Gewebe gut durchdringt. Dabei vernetzt es die Aminogruppen von Proteinen, ohne die Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören. Frisch präparierte Spinalganglien wurden für 18 Stunden, Wirbelpräparate für 48-72 Stunden in einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung bei 4 °C fixiert.

2.2.2 Paraffineinbettung

Paraffin ist ein Gemisch aus aliphatischen Alkanen mit der allgemeinen Summenformel C_nH_{2n+2} . Die Kettenlänge (n) liegt zwischen 20 und 30 und das Molekulargewicht zwischen 275 und 400 g/Mol. Da Paraffin wasserunlöslich ist, musste den Geweben vor ihrer Einbettung das Wasser durch Alkohol entzogen werden. Um der Zerstörungen der Präparate durch die alkoholische Entwässerung vorzubeugen, wurde ein stufenweise aufsteigender Alkoholgradient gewählt. Zunächst wurden die Gewebe dreimal, für jeweils 20 Minuten in 70% Ethanol vorbehandelt und anschließend für jeweils eine Stunde in einer

aufsteigenden Ethanol-Konzentrationsreihe (80%, 90%, 96%) entwässert. Danach wurden die Präparate zweimal für je 30 Minuten mit 100 % Isopropanol behandelt und im Anschluss in Methylbenzoat inkubiert. Methylbenzoat entzieht den Geweben, neben Alkohol auch letzte Wasseranteile (Romeis, 1968). In einem ersten Behandlungsschritt wurden die Präparate in Methylbenzoat sedimentiert, anschließend in ein anderes, mit frischem Methylbenzoat gefülltes Gefäß überführt und darin über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag folgte eine dreistündige Inkubation in erneuerter Methylbenzoat-Lösung. Um die Gewebe vollständig mit dem Einbettmedium zu durchtränken, wurden sie in 57 °C warmes Paraplast Plus (Tyco Healthcare Group LP, Mansfield) überführt, nach 3,5 Stunden in frisches Paraplast Plus gegeben und darin über Nacht belassen. Zum Einbetten der Präparate dienten Formen der Firma Leica Microsystems Nussloch GmbH. Gemeinsam mit dem Paraplast Plus wurden die Gewebe in die Form gegossen, dort in die gewünschte Orientierung gebracht und im Kühlschrank bei 4 °C abgekühlt, wodurch das Paraplast Plus erstarrte und sich gut schneiden ließ.

2.2.3 Schneiden der Paraffinblöcke

Das eingebettete Gewebe wurde mit einem Schlittenmikrotom der Firma Jung AG Heidelberg geschnitten. Das Gerät erlaubt eine mikrometeregenaue Einstellung der Schnittdicke. Die Präparate wurden bei RT geschnitten, in einem auf 40 °C temperierten Wasserbad (GFL 1052, Burgwedel) gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezo-gen. Die Objektträger wurden auf einer Heizplatte (40°C) getrocknet und bis zu ihrer Weiterverwendung staubfrei in einer Objektträgerbox bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.4 Azan-Färbung nach Heidenhain

Die Azan-Färbung ist eine Mehrfachfärbung, die der Differenzierung extrazellulärer Bindegewebsfasern und Zellbestandteilen dient. Die Azan-Färbelösung besteht aus den Farbstoffen Azokarmin und Anilinblau-Orange G. Azokarmin ist ein roter Farbstoff, der vorwiegend Zellkerne, aber auch Zytoplasma, Gliafasern und Erythrozyten färbt. Anilin-Orange G färbt kollagenes- und retikuläres Gewebe blau.

Vor der Färbung wurden die Präparate für 15 Minuten in Anilinalkohol gelagert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Azokarmin-Färbung wurden zu 200 ml vorgewärmter (56°C) Azokarmin-Lösung 2 ml Eisessig pipettiert und die Präparate

in dieser Lösung für 10-15 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 30 Minuten in Anilinalkohol gebleicht. Um ein Nachbleichen zu vermeiden wurden die Schnitte nach Ablauf der Inkubationszeit für 5 Minuten in essigsauerm Alkohol gewaschen und danach mit destilliertem Wasser gespült. Nach einer 45-minütigen Inkubation in 5%iger Phosphorwolframsäure wurde erneut mit destilliertem Wasser gespült. Für die zweite Färbung wurden die Objektträger für 2-2,5 Minuten in konzentrierte Anilinblau-goldorange-Essigsäure gegeben, anschließend kurz mit destilliertem Wasser gespült und danach in Ethanol (96%) solange inkubiert, bis das Gewebe deutlich gefärbt war. Abschließend wurde das Gewebe zweimal in 100% Isopropanol und zweimal in Orangenterpenen entwässert. Die gefärbten Schnitte wurden mit DePex (Serva, Heidelberg) eingedeckt und konnten so als Dauerpräparate bei Raumtemperatur gelagert werden. Histologische Färbungen wurden mit dem Binokop SMZ800, der Firma Nikon GmbH (Düsseldorf) dokumentiert. Die Bildakquisition erfolgte mit der Digitalkamera DN100 (Nikon) und der Steuerungseinheit DN100 Digital Net Camera, Camera Control (Nikon).

2.3 Herstellung der DRG-Primärzellkulturen

Für Ca^{2+} -Imaging und elektrophysiologische Untersuchungen wurden Ratten-, für FLIM-Messungen und Cl^- -Imaging Mäuse-Spinalganglienzellen verwendet. Um eine Einzelzell-Suspension von Hinterwurzelganglien herzustellen wurden präparierte Ganglien (Putzier, 2001) mechanisch und mit Hilfe von Enzymen dissoziiert und auf doppelt Poly-L-Lysin- (PLL) und Laminin-beschichteten (s.u.) Glasplättchen (13 mm, Knittel Gläser) ausgesät. Dazu wurden ca. 60 Spinalganglien von zwei, ca. 3 Monaten alten Wistar-Ratten bzw. NMRI-Mäusen (Mauslinie des Naval Medical Research Institute, USA) in kalter Ringer-Lösung (ES-1: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH 7,4) gesammelt, mit einer Rasierklinge zerteilt und in 2 ml Collagenase-Lösung [0,3% Collagenase (C-9891; Sigma) in DMEM] 40 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (200 x g, 5 min) wurde diese Lösung durch 2 ml Trypsin-Lösung [(T-1426, Sigma) in MEM] ersetzt und das Zellpellet darin mit einer Feuerpolierten Pasteurpipette mit großer Öffnung (~3 mm) vorsichtig trituriert. Nach weiterer Inkubation (20 min, 37°C) und Zentrifugation (200 x g, 5 min) wurde die Collagenase-Lösung durch 2 ml DNase-I-Lösung [(DN25, Sigma) 0,4 mg/ml in ES-1] ersetzt, das Zellpellet erneut trituriert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach dem letzten

Zentrifugationsschritt (200 x g, 5 min) wurde die DNase-I-Lösung durch 4 ml M10 [10 % (v/v) FBS (Sigma F7524); 1 % (v/v) Glutamin-Penicillin-Streptomycin (Sigma G6784); 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma M7145); in MEM (Sigma M2279)] ersetzt und die Zellsuspension durch zuvor entfettete (über Nacht in 70% Ethanol) und sterilisierte (10 min unter UV-Licht) Nylongewebe (Verseidag-Techfab, Monodur PA35N, 50- und 150 µm Maschenweite) filtriert. Die Filtrationsschritte dienen dem Zweck, die Zellsuspension von nicht-dissoziierten Gewebefragmenten, Axonen und Neuronen mit einer Größe >50µm zu befreien. Die Einzelzell-Suspension wurde anschließend auf PLL-, sowie Laminin-beschichteten Glasplättchen in einer 4-Wellplatte (Greiner) ausgesät (200µl Zellsuspension pro Well). Zu jedem Well wurden 200 µl vorgewärmte (37°C), NGF-β-Lösung [(N 2513, Sigma), 100 ng/ml in M10] gegeben. Die Zellen wurden bis zu 2 Wochen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Haereus) kultiviert. Für Messungen wurden ausschließlich Primärzellen verwendet, die nicht länger als 12-24 Stunden in Kultur waren. Die Spinalganglien-Neurone wurden auf doppelt-beschichteten Deckgläsern ausgesät, da sie auf einfach PLL-beschichteten Deckgläsern nicht anwachsen. Für die Beschichtung wurden in Ethanol gelagerte Deckgläser im Inkubator bei 100°C getrocknet, in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen gegeben, mit 20 ml Poly-L-Lysin, [(P-1399, Sigma) 0,1 mg/ml in H₂O, steril-filtriert)] übergossen und über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Plättchen erneut im Inkubator für 1-2 Stunden bei 40°C getrocknet und konnten in Petrischalen (Greiner) staubsicher bei 4°C bis zu 6 Monate verwahrt werden. Für die Laminin-Beschichtung wurden 10 PLL-vorbeschichtete Deckgläser in eine 9cm-Petrischale (Greiner) gelegt und jeweils mit 50µl Laminin-haltiger Lösung [(L-2020, Sigma) 20 µg/ml in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung: 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl, pH 7,4)] überschichtet. Anschließend wurde auf jedes der Deckgläser ein weiteres Deckglas gelegt. Diese „Sandwicks“ wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für 1-3 Stunden aufbewahrt. Nach der Inkubation wurden die „Sandwicks“ wieder getrennt, die vorbereiteten Deckgläser (mit der beschichteten Seite nach oben) in 4-Wellplatten gelegt, mit 500µl DMEM überschichtet und bis zur Ausplattierung der dissoziierten Zellen im Inkubator (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) aufbewahrt.

2.4 Immunzytochemie, DAPI- und IB₄-Färbung

2.4.1 Antikörperfärbung

In dieser Arbeit wurden Antikörperfärbungen zum Nachweis des Capsaicin-sensitiven Rezeptors TRPV1 in dissoziierten und kultivierten Spinalganglienzellen durchgeführt. Der verwendete Erstantikörper wurde bei der Firma Oncogene™ Research Products (San Diego, CA) bezogen. Der affinitätsgereinigte, polyklonale IgG-Antikörper α TRPV1 (Kat.-Nr. PC420) wurde aus immunisierten Kaninchen isoliert und ist gegen die Aminosäuren 824-838 des TRPV1-Rezeptors der Ratte gerichtet. Der zum Nachweis des Erstantikörpers verwendete Zweitantikörper Alexa Fluor 568[®] (Kat.Nr. A-11011), wurde von der Firma Molecular Probes Inc. (Eugene, OR) geliefert. Dieser polyklonale Antikörper wurde durch Immunisierung von Ziegen gewonnen und ist gegen IgG (H+L)-Antigene aus Kaninchen gerichtet. Der fluoreszenzoptische Nachweis des Zweitantikörpers erfolgt mit Hilfe eines konjugierten Fluorophors, das bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 568 nm Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 603 nm emittiert.

Vor der Antikörperfärbung wurde zunächst das Kulturmedium aus der 4-Well-Platte entfernt und jedes der mit Zellen bewachsenen Deckgläschen mit einem Tropfen einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung (4% Paraformaldehyd in PBS: 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,9 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 130 mM NaCl, pH 7,4) beschichtet. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal für je zwei Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für eine Stunde in CT-Puffer [5 % Chemiblocker v/v (Chemicon, Cat# 2170-S), 0,5% Triton in PBS] aufbewahrt und nach Absaugen des CT-Puffers für zwei Stunden mit dem in CTA-Puffer [5 % Chemiblocker v/v (Chemicon, Cat# 2170-S), 0,5% Triton, 0,05% (w/v) Natriumazid, in PBS] verdünnten (1:1000) Erstantikörper inkubiert. Die Kontrollen wurden in CTA-Puffer ohne Primärantikörper inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils zwei Minuten wurden die Zellen mit dem in C-Puffer [5% Chemiblocker v/v (Chemicon, Cat# 2170-S) in PBS] verdünnten (1:3000) Zweitantikörper für 90 Minuten, bei Dunkelheit inkubiert. Nach drei zweiminütigen Waschschrritten in PBS wurden die Deckgläschen vorsichtig trocken getupft und eine DAPI-Färbung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.2). Anschließend wurden die Deckgläschen umgekehrt auf einen Tropfen Aqua PolyMount (Polysciences Inc., Warrington), der zuvor auf einen Objektträger (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) geträufelt wurde, eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zu ihrer Auswertung bei

Dunkelheit gelagert, um einem Verblässen der Fluoreszenzintensität der Fluorophore vorzubeugen. Alle Inkubationen und Waschschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Antikörperfärbung wurde mit dem 10x-Objektiv (CFI Fluor, 10x, 0.3, Nikon) eines aufrechten Fluoreszenzmikroskops (Eclipse E600 FN, Nikon, Düsseldorf) dokumentiert. Das Anregungslicht wurde von einer Quecksilberdampfampe (HBO 103 W/2, Osram, München) produziert. Für die Anregung des Alexa Fluor 568[®]-Fluorophors wurde das Spektrum des über den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops eingekoppelten Lichts von einem Anregungsfilter (MBE-34-370, Nikon) auf einen Wellenlängenbereich zwischen 510 nm und 560 nm begrenzt. Über einen dichroischen Filter (MBE-34-272, cut-off: 575 nm, Nikon) wurde das Licht zu den Zellen geleitet und das emittierte, gefilterte (MBE-34-572, >590 nm, Nikon) Fluoreszenzlicht auf den CCD-Chip einer Digitalkamera (DN100, Nikon) geleitet. Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der Steuerungseinheit DN100 Digital Net Camera, Camera Control der Firma Nikon, auf einem Wechselmedium gespeichert.

2.4.2 DAPI-Färbung

Um die Kerne der kultivierten Spinalganglienzellen sichtbar zu machen, wurden die zuvor mit Antikörpern gefärbten Zellen (siehe Kapitel 2.4.1 Antikörperfärbung) für zehn Sekunden in einer DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Lösung (0,3 μ M in PBS, Hoechst) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben eingebettet und aufbewahrt. Die Dokumentation der DAPI-Färbung wurde mit dem in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Mikroskop durchgeführt. Für die Anregung des DAPI-Fluorophors wurde das Spektrum des über den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops eingekoppelten Lichts von einem Anregungsfilter (MBE-34-300, Nikon) auf einen Wellenlängenbereich zwischen 330 nm und 380 nm begrenzt. Über einen dichroischen Filter (MBE-34-230, cut-off: 400 nm, Nikon) wurde das Licht zu den Zellen geleitet und das emittierte, gefilterte (MBE-34-531, >420 nm, Nikon) Fluoreszenzlicht mit der in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Digitalkamera aufgenommen.

2.4.3 Isolektin B₄-Färbung

Das Isolektin B₄ ist ein in der Pflanze *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*) exprimiertes Protein, das in der Schmerzforschung für die Identifizierung bestimmter Subpopulationen von DRG-Neuronen verwendet wird. In dieser Arbeit wurde es zur Identifizierung von Zell-Subpopulationen in Spinalganglienzellen-Präparationen verwendet. Für seine fluoreszenzmikroskopische Darstellung wurde das TRITC-gekoppelte Isolektin B₄ (Sigma Aldrich Chemikalien GmbH, Steinheim) verwendet. Die kultivierten Spinalganglienzellen (siehe Kapitel 2.3) wurden für zehn Minuten in einer 10 µg/ml-IB₄-TRITC-Verdünnung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS (8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,9 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 130 mM NaCl, pH 7,4) standen die gefärbten Kulturen für weitere Experimente zur Verfügung. Für die Dokumentation der IB₄-Färbung wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Nikon) verwendet. Die Anregung erfolgte mit dem von einer Quecksilberdampfampe (HBO 100, Osram) produzierten Licht (eingekoppelt am Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops) der Wellenlänge 546 nm - 558 nm, dessen Spektrum zuvor von einem Anregungsfilter (BP 546 / 12, Zeiss) auf diesen Wellenlängenbereich begrenzt wurde. Über einen dichroischen Spiegel (FT 580, Zeiss) wurde das Licht auf die gefärbten Zellen geleitet. Das emittierte und gefilterte (LP 590, Zeiss) Fluoreszenzlicht wurde auf den CCD-Chip einer Digitalkamera (Olympus Colorview, Soft Imaging System GmbH) geleitet und die Fluoreszenzbilder der Zellen mit der Software (analySIS, Soft Imaging System GmbH) akquiriert. Für die Darstellung wurden aufgenommene Fluoreszenzbilder nachträglich mit der Software Adobe[®] Photoshop[®] 7.0 und ImageJ bearbeitet.

2.5 Patch-Clamp-Technik

In dieser Arbeit wurden kultivierte DRG-Neurone und transfizierte HEK293-Zellen mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Im Folgenden wird das Prinzip der Messtechnik, sowie die mit dieser Methode durchgeführten Experimente beschrieben.

2.5.1 Prinzip der Messtechnik

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981; Neher & Sakmann, 1992) ermöglicht es, das intrazelluläre Potenzial von Zellen zu messen und gleichzeitig den Strom über die

Zellmembran zu steuern (Stromklemme) oder aber ein intrazelluläres Potential vorzugeben, das durch einen Strom in der Zelle eingestellt wird (Spannungsklemme). Bei dieser speziellen Technik wird ein Membranstück in die Öffnung einer polierten, mit Elektrolyt-Lösung (Pipettenlösung) gefüllten Mikropipette ($\varnothing \sim 1 \mu\text{m}$) gesaugt. Der Kontakt zwischen Membran und Glasoberfläche wird so stark, dass sich ein sehr hoher Abdichtwiderstand, das so genannte Gigaseal, bildet (Gigaohm = $10^9 \Omega$), welches das eingesaugte Membranstück von der Umgebung elektrisch isoliert. Die mit Elektrolyt-Lösung gefüllte Mikropipette ist über eine Elektrode (chlorierter Silberdraht) mit einem Vorverstärker verbunden. Das Signal der Messelektrode gelangt über einen Hauptverstärker (Patch-Clamp L/M-EPC 7, List, Darmstadt) sowohl zu einem Oszilloskop (Tektronix 2212), als auch zum Computer. Mit dem Programm ISO2 (MFK, Frankfurt) werden die mit der Patch-Clamp-Technik gemessenen Strom- und Spannungsänderungen aufgezeichnet, verarbeitet und archiviert. Die so genannte Referenzelektrode verbindet die Badlösung, in der die Messungen durchgeführt werden, mit dem Stromkreis. Geschlossen wird der Stromkreis, wenn die Mikropipette in die Badlösung taucht.

2.5.2 Patch-Clamp-Konfigurationen

Nachdem das Gigaseal ausgebildet ist, kann der Strom durch einzelne Kanäle in der Zellmembran in unterschiedlichen Konfigurationen gemessen werden. Abbildung 2.1 zeigt in einer Schemazeichnung die vier wichtigsten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik.

- **on-cell oder cell-attached.** Die Zelle bleibt unversehrt. Es können Ströme gemessen werden, die über das eingesaugte Membranstück fließen.
- **whole-cell** (Ganzzell-Ableitung). Wird in der on-cell-Konfiguration ein Unterdruck an der Pipette angelegt, bricht das eingesaugte Membranstück auf. Dadurch wird die gesamte Zelle mit der Pipette elektrisch gekoppelt, so dass Ströme, die über die Zellmembran fließen, gemessen werden können.

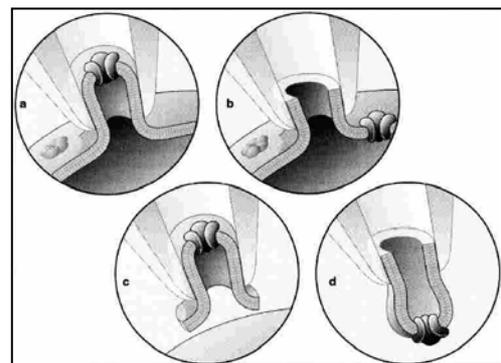


Abbildung 2.1: Die vier wichtigsten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik: a) cell-attached, b) whole-cell, c) inside-out, d) outside-out. (Aus: Numberger & Draguhn, 1996)

- **inside-out.** Die Pipette wird aus der on-cell-Konfiguration von der Zelle abgezogen. Das Gigaseal ist so stabil, dass auch nach Zurückziehen der Pipette die Ableitungskonfiguration erhalten bleibt. Die zytoplasmatische Seite der Zellmembran ist nach außen gerichtet.
- **outside-out.** Wird die Pipette in der Ganzzell-Konfiguration von der Zelle abgezogen, schließt sich die Membran wieder, diesmal aber so, dass die ursprünglich zytoplasmatische Seite dem Innern der Pipette zugekehrt ist. Diese Konfiguration dient vor allem zur Erforschung exogener Einwirkungen auf die Kanäle, z.B. die Wirkung von Toxinen.

Alle Patch-Clamp-Messungen mit dissoziierten Spinalganglienzellen sind ausschließlich in der Ganzzell-Konfiguration durchgeführt worden.

2.5.3 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente und Aufbau des Messplatzes

Die Patch-Clamp-Messungen wurden in einer auf dem Mikroskoptisch (Nikon Diaphot 300) fixierten Plexiglas-Messkammer mit Glasboden durchgeführt. Die Messkammer war während der Messungen mit Badlösung gefüllt. Die mit einem Pipettenhalter am Vorverstärker befestigte Mikropipette wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Luigs & Neumann, Darmstadt) an die Zelle gebracht. Um die Zelle während

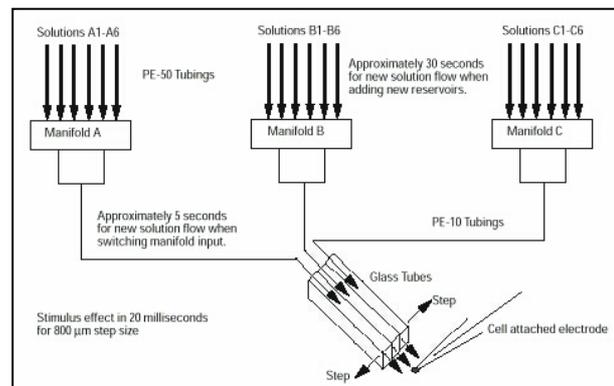


Abbildung 2.2: Mehrere parallel angeordnete Glasröhrchen ermöglichen einen schnellen Lösungswechsel. (Aus: www.warnerinstrument.com)

einer Ganzzell-Ableitung verschiedenen Lösungen aussetzen zu können, wurde ein elektronisch steuerbares Multikanal-Perfusionssystem (SF-77B Perfusion Fast-Step, Warner Instrument Corporation) (Abbildung 2.2) verwendet, welches vor der Zelle positioniert werden konnte. Mit Hilfe einer Absaugvorrichtung wurde das Lösungsniveau in der Kammer konstant gehalten. Zur Abschirmung störender, elektrischer Felder ist der gesamte Messplatz geerdet und von einem Farady-Käfig umgeben. Um den Messplatz vor mechanischen Erschütterungen zu schützen sind Mikroskop und Mikropipettenhalter auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert.

2.5.4 Patch-Clamp-Untersuchungen mit Capsaicin und Caged-Capsaicin

Für Patch-Clamp-Messungen mit kultivierten Spinalganglienzellen wurde die Messkammer der Patch-Clamp-Apparatur mit 1 ml Ringer-Lösung (ES-1: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH 7,4 mit NaOH) gefüllt. Anschließend wurde ein mit Spinalganglienzellen bewachsenes Deckgläschen in die Messkammer überführt und mit dem 40x Objektiv des Mikroskops ein geeignetes Neuron ausgesucht. Für die Messung Capsaicin-induzierter Strom- und Spannungsänderungen wurden ausschließlich kleine und mittelgroße Zellen mit Durchmessern zwischen 20 - 45 µm verwendet, da sie vermutlich polymodale Nozizeptoren sind (Guo et al., 1999). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Messelektroden (3-10 MΩ) wurden mit einem Horizontal-Puller (P-97, Sutter Instruments, Novato, CA) aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt und mit Pipettenlösung (PS-1: 140 mM KCl; 5 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM EGTA; pH 7,4 mit KOH) befüllt. Bei Stromklemme-Versuchen lagen die Membranpotenziale der Zellen zwischen -60 und -80 mV. Für Messungen von Aktionspotenzialen wurde das Membranpotenzial mit Hilfe eines geringen Kommandostroms auf -70 mV eingestellt. Alle Spannungsklemme-Versuche wurden bei einer Spannung von -70 mV durchgeführt. Vor jeder Messung wurden Gesamtzellkapazität und Serienwiderstand mit Hilfe des Verstärkers kompensiert. Bei Stromklemme-Versuchen erfolgte die Akquisition und Digitalisierung der Daten bei 10 kHz, bei Spannungsklemme-Versuchen bei 200 Hz.

Für Ca²⁺-Imaging wurde Capsaicin in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Perfusionsversuche wurden mit 1 µM Capsaicin durchgeführt. Die Pipettenlösung (PS-2) war für diese Experimente wie folgt zusammengesetzt: 140 mM CsCl; 5 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM EGTA; pH 7,4 mit KOH. Für caged Capsaicin-Vergleichsexperimente wurden Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin in einer Konzentration von 5 µM verwendet (siehe Kapitel 2.6.2). Dazu wurde 1 ml einer 10 µM caged Capsaicin-Lösung mit einer 1 ml Pipette zu der in der Messkammer enthaltenen ES-1 Lösung gegeben. Bei allen anderen Messungen wurde Na-CDMNB-caged Capsaicin in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. 10 – 30 Sekunden nach der Zugabe der caged Capsaicin-Lösung wurden die Fotolyse-Versuche gestartet. Bei Vergleichsexperimenten wurde für 5 Sekunden belichtet, alle anderen Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin wurden bei einer Belichtungszeit von 1 Sekunde durchgeführt. Dabei wurden die

caged-Compounds dem ungefilterten Licht (eingekoppelt über den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops) einer Quecksilberdampf-Lampe (AMKO, Tornesch), ausgesetzt. Über ein UV-Filter (WG335, AMKO) wurden Wellenlängen <335 nm zurückgehalten. Das eingekoppelte Licht wurde von einem dichroischen Filter (cut-off: 400 nm, Nikon) reflektiert und durch ein Öl-Immersions-Objektiv (Nikon Fluor 40x, NA 1.3) zur Messkammer geleitet. Alle Kontroll-Messungen wurden in 1 ml Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin-freier, bzw. Capsaicin-freier ES-1 durchgeführt.

2.6 Capsaicin und Caged-Capsaicin

Zum Aktivieren von TRPV1 wurden in dieser Arbeit bei Ca^{2+} -Imaging-Experimenten und elektrophysiologischen Untersuchungen Capsaicin und die caged-Compounds Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin verwendet.

2.6.1 Capsaicin

Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamid) ist ein aus Pflanzen der Gattung *Capsicum*, einer Unterart der Solanaceae, gewonnenes Alkaloid, welches bei Säugetieren durch Wirkung auf TRPV1-Rezeptoren einen Hitze-, bzw. Schärfereiz, z.B. beim Verzehr von Paprika und Chilischoten hervorruft. Abbildung 2.3 zeigt eine Illustration der Capsaicin-produzierenden Pflanze *Capsicum annum*. Capsaicin und andere aus *Capsicum* gewonnene, Schärfe-Schmerz verursachende Stoffe, werden als Capsaicinoide bezeichnet. Die farblosen Capsaicinoide können durch Kochen oder Einfrieren nicht zersetzt werden.

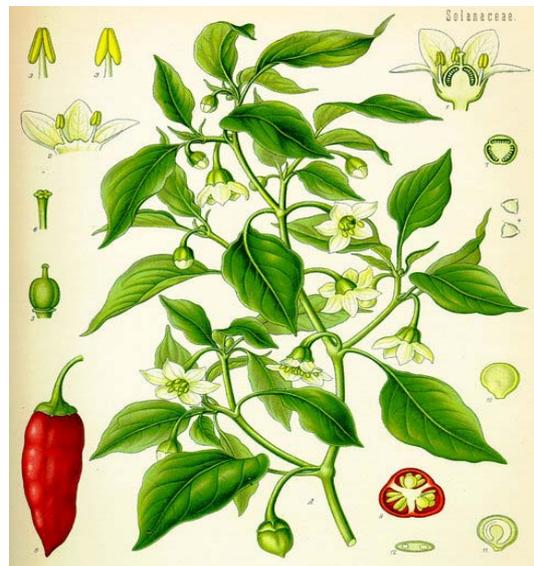


Abbildung 2.3: Illustration von *Capsicum annum*, einer Capsaicin-produzierenden Pflanze. (Aus: de.wikipedia.org/wiki/Capsicum)

Capsaicin ist ein Vanillylamid der 8-Methyl-6-nonensäure. Abbildung 2.4 zeigt die Strukturformel von Capsaicin.

Die biologische Wirksamkeit des Capsaicins wird unter anderem (Walpole et al., 1993) durch die alkoholische Seitengruppe des Phenolrings vermittelt.

Für alle mit Capsaicin (M2028, Sigma) durchgeführten Experimente, wurden die entsprechenden Lösungen durch Verdünnen einer 10 mM Capsaicin-Stammlösung (in 100% DMSO, Fluka) hergestellt.

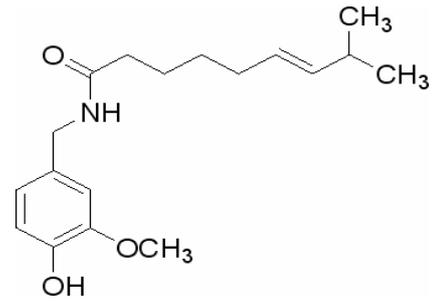


Abbildung 2.4: Strukturformel von Capsaicin. (Aus: www.sigmaaldrich.com)

2.6.2 Na-CDMNB- und DMNB-Caged-Capsaicin

In Patch-Clamp-Experimenten wurden die Substanzen Na-CDMNB-caged Capsaicin (α -Carboxy-4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl-Capsaicin-Ester, Dr. Volker Hagen, Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Campus Berlin-Buch) und DMNB-Caged-Capsaicin (4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl-capsaicin) (Zemelman et al., 2003) verwendet. DMNB-caged Capsaicin wurde von Herrn Hagen synthetisiert und uns freundlicherweise für Vergleichsexperimente zur Verfügung gestellt. Bei beiden oben genannten Verbindungen wurde die für die biologische Aktivität verantwortliche alkoholische Seitengruppe des Capsaicins durch Veresterung maskiert. Na-CDMNB-, sowie DMNB-caged Capsaicin weisen eine reduzierte biologische Aktivität auf. Bei Belichtung mit UV-Licht wird Capsaicin aus dem Derivat freigesetzt. Im Na-CDMNB-caged Capsaicin erfolgt die Fotolyse sehr schnell (<1 ms), wogegen die Freisetzung von

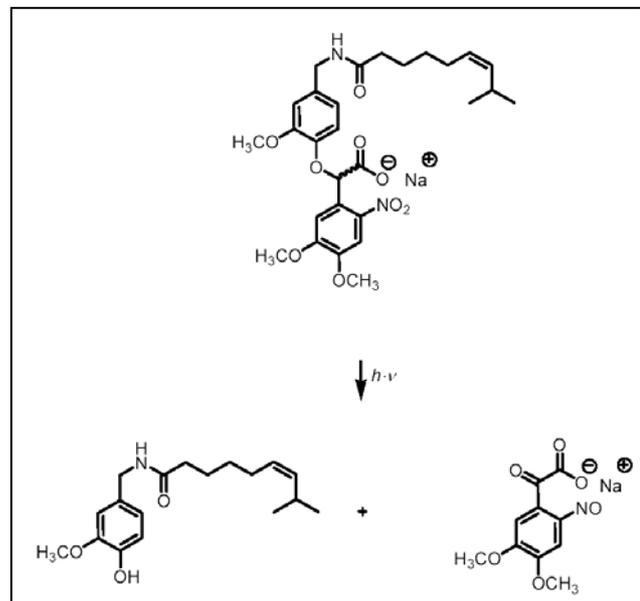


Abbildung 2.5: Fotolyse von Na-CDMNB-caged Capsaicin bei Belichtung mit UV-Licht. (Mit freundlicher Genehmigung von V. Hagen, Berlin)

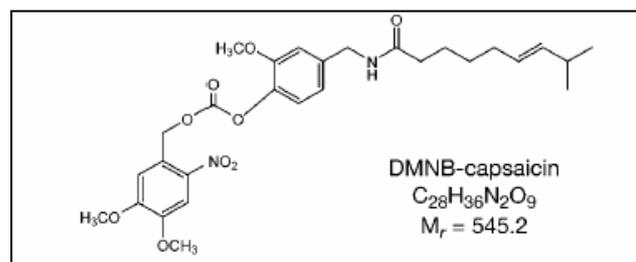


Abbildung 2.6: Struktur des DMNB-caged Capsaicins. (Aus: Zemelman et al., 2003)

Capsaicin aus DMNB-caged Capsaicin verzögert (>1 s) stattfindet. Abbildung 2.5 zeigt die Struktur von Na-CDMNB-caged Capsaicin, sowie die beiden durch UV-Belichtung entstehenden Fotolyseprodukte. In Abbildung 2.6 ist die Struktur von DMNB-caged Capsaicin dargestellt. Alle caged Capsaicin-haltigen Lösungen für elektrophysiologische Experimente wurden aus 10 mM Stammlösungen (in 100% DMSO, 41639, Fluka) hergestellt.

2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bedient sich der Eigenschaft von Fluorophoren, bei Bestrahlung Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Absorptionsspektrum) und Licht einer längeren Wellenlänge abzustrahlen (Emissionsspektrum). Das resultierende Emissionsspektrum kann sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden. Mit der Fluoreszenzmikroskopie können nicht nur intrazelluläre Strukturen oder Proteine fixierter Zellen dargestellt werden. Membrangängige Fluoreszenzfarbstoffe können auch in lebende Zellen eindringen, die sich daraufhin im Fluoreszenzmikroskop darstellen lassen.

2.7.1 Ca^{2+} - und Cl^- -Imaging

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Messung von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} - und Cl^- -Konzentration (Ca^{2+} - bzw. Cl^- -Imaging) in kultivierten Spinalganglienzellen, bei der Aktivierung von TRPV1, verwendet. Damit sollte die Verteilung TRPV1-exprimierender Spinalganglienzellen in Primärkulturen untersucht-, und der Cl^- -basierte Signalverstärkungsmechanismus in TRPV1-exprimierenden Spinalganglien-Neuronen nachgewiesen werden. TRPV1 leitet Ca^{2+} in die Zelle, und seine Aktivierung ist daher mit einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration verbunden.

2.7.2 Der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM

Mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4 (Molecular Probes) (Strukturformel in Abbildung 2.7) können Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dargestellt werden. Für das Ca^{2+} -Imaging wurden kultivierte Spinalganglien-

Neurone mit der fluoreszierenden, membrangängige Verbindung Fluo-4 AM inkubiert. Der Acetoxymethyl (AM) Ester ist ungeladen und kann daher leicht die Zellmembran permeieren. Sobald der Farbstoff in die Zellen diffundiert ist, wird die lipophile Gruppe durch unspezifische Esterasen abgespalten. In der gespaltenen Form ist der Farbstoff geladen und kann die Zellmembran nicht mehr permeieren, er bleibt in den Zellen „gefangen“. Der Fluo-4 AM-Ester ist farblos und nicht fluoreszierend, erst die Hydrolyse bewirkt, dass der Farbstoff Ca^{2+} -Ionen binden kann. Der niedrige K_d -Wert von 345 nM (bei 22°C in 100 mM KCl, 10 mM MOPS, pH 7.2) ermöglicht, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen im Bereich von 0,1 - 1 μM zu detektieren. Die Sättigungskonzentration liegt bei $\geq 1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Das Absorptionsmaximum von Fluo-4 liegt in der Ca^{2+} -gebundenen Form bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm. Abbildung 2.8 zeigt das Spektrum von Fluo-4. Durch die hohe Ca^{2+} -Bindungsaffinität von Fluo-4 ist dieser Farbstoff im Vergleich zu anderen Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen mit niedrigeren Ca^{2+} -Bindungsaffinitäten, wie z.B. Fluo-3 (K_d -Wert ~ 390 nM) (Molecular Probes) ein ideales Werkzeug, um geringe Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu erfassen.

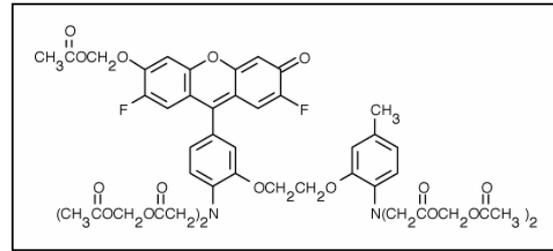


Abbildung 2.7: Strukturformel des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4 AM. (Aus: www.probes.com)

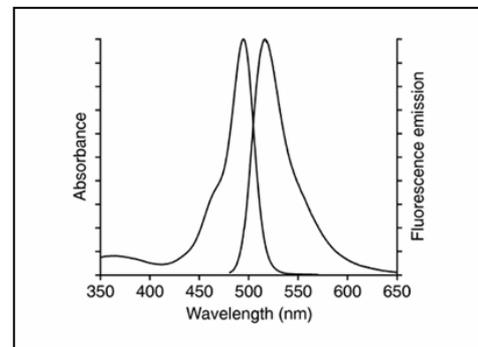


Abbildung 2.8: Anregungs- und Emissionsspektrum des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4, AM. Das Absorptionsmaximum liegt bei 494 nm, die Emission hat ihr Maximum bei 516 nm. (Aus: www.probes.com)

2.7.3 Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM

Vor dem Beladen der Zellen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM, wurden zunächst 50 μg des Farbstoffs in 4,5 μl DMSO (41639, Fluka) gelöst. Diese 10 mM Stammlösung wurde anschließend in Probenecid-haltiger ES-1 (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM D-Glucose, 1 mM Probenecid, pH 7,4 mit NaOH) 1:1000 verdünnt. Probenecid (P8761, Sigma) inhibiert Transporter organischer Anionen, die für den aktiven Export des Farbstoffes aus den Zellen verantwortlich sind.

Um die Löslichkeit des Farbstoffs in der Probenecid-haltigen ES-1 zu erhöhen, wurde vor der Verdünnung der Farbstoff-Stammlösung das Tensid Pluronic[®] [20% in DMSO (P-300, Molecular Probes)] in einem Verhältnis von 1 µl / ml ES-1 zur Probenecid-haltigen ES-1 gegeben und gut gevortext. Zum Beladen der Spinalganglienzellen mit Fluo-4 AM wurde das Kulturmedium aus den Wells der 4-Well-Platte entfernt und durch 200 µl Fluo-4-Farbstofflösung ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit, im Inkubator (Heraeus) beladen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Farbstofflösung aus den Wells abgesogen und jedes Well mit 200 µl Probenecid-haltiger ES-1 befüllt. Anschließend standen die Zellen für Ca²⁺-Imaging zur Verfügung.

2.7.4 Ca²⁺-Imaging mit kultivierten Spinalganglienzellen und Capsaicin

Für das Ca²⁺-Imaging mit kultivierten Spinalganglienzellen wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben, mit Fluo-4 AM beladen. Vor jeder Messung wurde zunächst mit dem 10x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 0,3: ∞; 0,17) des Mikroskops (Zeiss, Axiovert 200) eine geeignete Position im Well der 4-Well-Platte gesucht und anschließend mit einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (Olympus Colorview, Soft Imaging System GmbH) ein Fluoreszenzbild von den Zellen aufgenommen. Danach wurden mit einer 1 ml Pipette 200 µl einer Capsaicin-haltigen Ringerlösung [20 µM Capsaicin (M2028, Sigma) in ES-1] zu den Zellen pipettiert (1:1 Mischung, Endkonzentration 10 µM) und im Anschluss ein weiteres Bild aufgenommen. Beide Bilder wurden mit der Software (analySIS, Soft Imaging System GmbH) akquiriert und auf der Festplatte des Computers gespeichert. Um Fluo-4 AM zur Fluoreszenz anzuregen wurde es mit dem Licht einer Quecksilberdampfampe (HBO100) (eingekoppelt über den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops), belichtet. Über ein Bandpass-Filter (BP 450 - 490, Zeiss) wurde das Anregungslicht auf ein Spektrum von 450 – 490 nm begrenzt. Das eingekoppelte Licht wurde von einem dichroischen Filter (cut-off: 510 nm, FT 510, Zeiss) reflektiert und durch das 10x-Objektiv zum Well der 4-Well-Platte geleitet. Durch einen Emissionsfilter wurden vom emittierten Fluoreszenzlicht Wellenlängen <515 nm (LP 515, Zeiss) zurückgehalten und das gefilterte Licht anschließend auf den CCD-Chip der Digitalkamera geleitet. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Kontrollmessungen wurde Capsaicin-freier ES-1 verwendet.

Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde die Software Adobe® Photoshop® 7.0 und ImageJ verwendet

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

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Chlorid-Konzentration $[Cl^-]_i$ in Zellen und Geweben durch Zwei-Photonen Fluoreszenz Lebenszeit Imaging Mikroskopie (*two-photon fluorescence-lifetime-imaging-microscopy*, 2P-FLIM) bestimmt. Im Folgenden wird das Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung und der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung erklärt.

2.8.1 Zwei-Photonen-Anregung

Die Absorption eines Photons bewirkt, dass ein schwach gebundenes Elektron des absorbierenden Moleküls transient auf ein freies, energiereicheres Orbital (meist S_1) transferiert wird. Nach einigen Nanosekunden kehrt das Elektron in seinen Grundzustand zurück. Dies kann sowohl radiativ, d.h. durch Emission eines Fluoreszenzphotons als auch nicht-radiativ, d.h. durch Abgabe absorbierter Energie in Form von Wärme geschehen. Die Umwandlung der Anregungsenergie erfolgt in beiden Fällen mit einer Rate k (k_f bzw. k_{nr}) (Abb. 2.9).

Neben Emission von Fluoreszenz und Wärmeabgabe kann ein Molekül beim Übergang des Elektrons vom angeregten Zustand in den Grundzustand auch photochemische Modifikationen erfahren. Zum Beispiel eine Umwandlung in einen so genannten Triplettzustand, die Bildung eines Radikals oder die Knüpfung einer stabilen chemischen Bindung zu einem benachbarten Atom oder Molekül. Diese Prozesse werden im Folgenden vernachlässigt, da sie für Fluorophore im Allgemeinen unwahrscheinlich sind.

Die Absorption eines Photons geschieht dann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, wenn die Energie des Photons ($h \cdot c / \lambda$) gleich dem Energieabstand eines schwach gebundenen Elektrons, zu einem freien, energiereicheren Orbital ist. Mit anderen Worten: Die Wellenlänge des einfallenden Lichts (λ) muss mit einem Maximum im Absorptionsspektrum des Moleküls übereinstimmen. Die Absorptionsmaxima verfügbarer, Cl^- -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe liegen zwischen 320 und 520 nm.

Wird von einem Cl^- -sensitiven Farbstoffmolekül ein Photon mit einer Wellenlänge von 750 nm absorbiert, so reicht die Anregungsenergie nicht aus, um ein Elektron in ein

höheres Orbital zu transferieren. Das Elektron befindet sich vielmehr in einem “virtuell angeregten“ Zustand, der ca. 10^{-16} s andauert. Absorbiert das Molekül in diesem Zustand

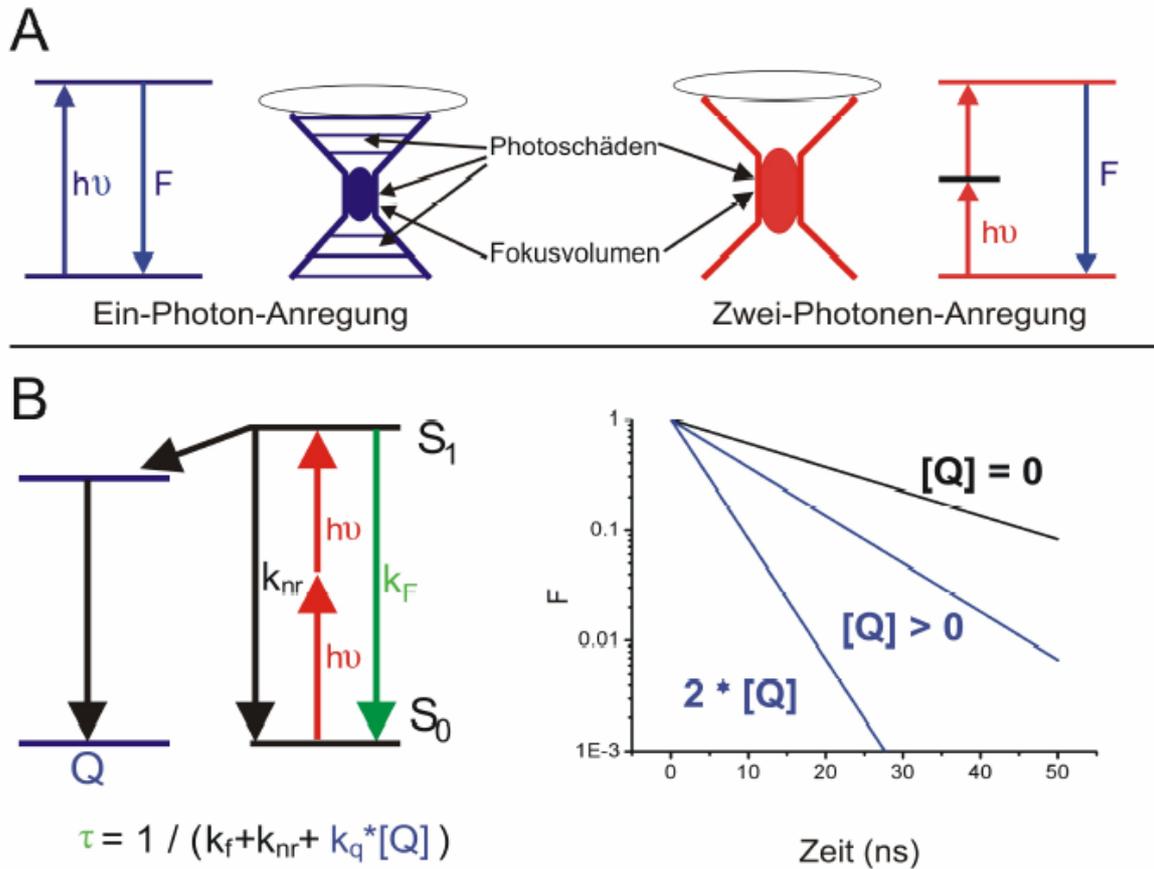


Abbildung 2.9: (A) Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen Ein-Photonen-Anregung (links) und Zwei-Photonen-Anregung (rechts) und Vergleich der Bereiche, in denen in der mikroskopischen Anwendung Schäden durch Licht an der Probe auftreten; (B, links) Abhängigkeit der Fluoreszenz-Lebenszeit τ von den kinetischen Konstanten für Fluoreszenz (k_f), nicht radiativer Prozesse (k_{nr}) und Quenching (k_q). Rechts: Einfluss der Quencher-Konzentration $[Q]$ auf die Lebenszeit τ . (Aus: Kaneko et al., 2002; erschienen in „Calcium-activated chloride channels“, C.M. Fuller, Chapter 8, Academic Press, Boston, 2002)

ein weiteres Photon mit derselben Wellenlänge, so erhält das Elektron eine Gesamtenergie, die der eines einzelnen Photons mit der Wellenlänge von 375 nm entspricht. Durch die doppelte, so genannte Zwei-Photonen-Anregung, mit halber Energie wird das Elektron in den S_1 -Zustand überführt. Dieser nicht-lineare optische Prozess (Piston, 1996) tritt nur bei hoher zeitlicher und räumlicher Photonendichte auf, zum Beispiel bei Anregung durch einen fokussierten und gepulsten Laser. Die Ausdehnung des fokussierten Anregungslichts beträgt ca. $0,5 \mu\text{m}$ in x- und y-Richtung und $1,5 \mu\text{m}$ in z-Richtung.

Bei der Fluoreszenz-Messung an lebendem Gewebe oder lebenden Zellen hat die Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der Anregung mit nur einem Photon der doppelten Energie entscheidende Vorteile. Durch die geringe Ausdehnung des fokalen Volumens (im Femtoliter [fl]-Bereich) und die Verwendung niederenergetischen Anregungslichtes werden großflächige Fotoschäden weitgehend vermieden. Cl⁻-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren meist im nahen UV, blauen und grünen Spektralbereich (z.B.: MQAE (s.u.) bei 350 nm). In diesem Spektralbereich absorbieren auch viele Nukleinsäuren und Kofaktoren von Proteinen, die durch das Licht zerstört oder modifiziert werden können. Die Folge können Zellschädigungen sein. Bei der niederenergetischen Zwei-Photonen-Anregung, mit Licht der doppelten Wellenlänge (z.B. 750 nm) sind Fotoschäden auf das fokale Volumen begrenzt. Die Zwei-Photonen-Anregung bietet noch einen weiteren Vorteil: Bei der Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie werden Detektionseffizienz und Penetrationstiefe in Geweben durch Streuung des einfallenden Lichtes limitiert. Da die Lichtstreuung umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge ist (λ^{-4}), treten Streueffekte bei Verwendung niederenergetischeren Lichtes, im Vergleich zur höherenergetischen Ein-Photonen-Anregung vermindert auf. Die Zwei-Photonen-Anregung ermöglicht daher tiefere Penetration in Gewebepräparate bei höherer Detektionseffizienz.

2.8.2 Fluoreszenz-Lebenszeit

Die Zeit die das Elektron eines Fluoreszenzfarbstoffes im angeregten Zustand verweilt, wird als Fluoreszenz-Lebenszeit bezeichnet und liegt im Bereich zwischen 0.1 – 50 ns. Ihre Größe wird als Zerfallsrate τ angegeben. Sie ist umgekehrt proportional zur Summe der Ratenkonstanten k_{nr} und k_f , ($\tau_0 = (k_{nr} + k_f)^{-1}$). Kollidiert ein Fluorophor, z.B. ein Molekül des Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes MQAE (s.u.) im angeregten Zustand mit einem Cl⁻-Ion, bildet sich ein transientser Komplex aus Ion und Farbstoffmolekül. Dieser Komplex kann einen höheren k_{nr} -Wert haben, wodurch das Elektron im angeregten Zustand durch nicht-radiative Prozesse relaxieren kann (Abb. 2.9 B), und die Wahrscheinlichkeit für Fluoreszenz verringert wird ($\tau = (k_{nr} + k_f + k_q*[Q])^{-1}$). Je höher die Konzentration des Quencher-Moleküls [Q] ist, desto geringer ist sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenz-Lebenszeit τ . Ist die Lebenszeit des Fluorophors in Abwesenheit des Quencher-Moleküls (τ_0) bekannt, lässt sich $k_q*[Q]$ leicht

berechnen. Die Konzentration des Quenchers kann ausgerechnet werden, wenn k_q bekannt ist und ein Fluorophor genutzt wird, das für das Quencher-Molekül hoch spezifisch ist.

2.8.3 2P-FLIM Messung der intrazellulären Chloridkonzentration

Die Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit basiert auf der exakten Bestimmung des Zeitunterschiedes zwischen zwei elektronischen Pulsen - einem Start- und einem Stoppuls. Beide Pulse werden von Fotodetektoren generiert, die an unterschiedlichen Positionen im Strahlengang der Messapparatur installiert sind. Sendet der Anregungslaser einen Lichtblitz aus, so wird ein Teil des Lichtes mit Hilfe eines Strahlteilers auf die den Startpuls generierende Diode geleitet. Das übrige Licht regt die Probe zur Fluoreszenz an. Das emittierte Fluoreszenzlicht fällt auf den zweiten Fotodetektor, einem PMT (Photomultiplier tube), wo vom ersten eintreffenden Fluoreszenz-Photon der Stoppuls generiert wird. Die zeitliche Differenz beider Pulse wird von einer elektronischen Stoppuhr registriert. Bei einer Messung wird dieser Zyklus mehrere zehntausend bis millionen Male wiederholt und die Zeitunterschiede in einem Histogramm dargestellt (*“time-correlated single-photon counting“*, TCSPC). Die Zeitachse des Histogramms ist in 256 Kanäle eingeteilt, wobei ein Kanal einen Bereich von etwa 60 ps abdeckt. Nach erfolgter Messung erhält man eine Fluoreszenz-Abklingkurve, in der durch einen monoexponentiellen Kurvenfit die Abklingrate τ , d.h. die mittlere Fluoreszenz-Lebenszeit bestimmt werden kann.

Für jedes Pixel der aufgenommenen Bilder (128x128) wurden Fluoreszenz-Abklingkurven aus 100 bis 5.000 registrierten Photonen aufgezeichnet. Für ein Bild wurden über einen Zeitraum von einer Minute 30.000 – 1.500.00 Photonen registriert.

2.8.4 Aufbau der 2P-FLIM Apparatur

Abbildung 2.10 zeigt einen schematischen Aufbau der 2P-FLIM Apparatur. Das Anregungslicht wurde von einem Titan-Saphir-Laser (Mira 900, Coherent) geliefert, der von einem Festkörper-Laser (Nd:Vanadate, Verdi, 5.5 W, Coherent) mit zeitlich konstanter Leistung optisch gepumpt wird. Der Titan-Saphir-Laser emittiert Licht im Wellenlängenbereich 720 – 900 nm, und arbeitet mit einer Pulsfrequenz von 75,6 MHz bei einer Pulsdauer von 150 fs. Die erbrachte Laserleistung lag über 500 mW. Die Messungen wurden bei weniger als 1% (2-5 mW) der Maximal-Laserleistung durchgeführt. Es wurde

Laserlicht mit der Wellenlänge 750 nm eingesetzt. Ein kleiner Teil des Anregungslichts wurde auf eine schnelle Photodiode geleitet, um den Startpuls für die TCSPC-Messung zu geben. Das Anregungslicht ließ sich durch einen Strahlenscanner in x- und y- Ebene des Objektes bewegen. Zur Betrachtung des Objektes wurde ein aufrechtes Fluoreszenz-Mikroskop (BX50 WI, Olympus) mit einem Wasser-Immersions-Objektiv mit hohem Arbeitsabstand ($d = 2,5 \text{ mm}$; $NA = 0,9$) verwendet. Die Auflösung betrug, bedingt durch die Abmessungen des Fokus, etwa $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ in x- und y- Ebene und $\sim 1,5 \text{ }\mu\text{m}$ in z-Ebene. Bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen wurde das Fluoreszenzlicht mit PMT1 detektiert. PMT2 wurde für andere Zwei-Photonen-Anwendungen verwendet. Die Elektronik (SPC730) und Software für TCSPC und die Fluoreszenz-Lebenszeit-Apparatur stammen von Becker & Hickl (Berlin). Die Messapparatur wurde unter Leitung von Dr. T. Gensch (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) in Zusammenarbeit mit T.I.L.L. Photonics entworfen.

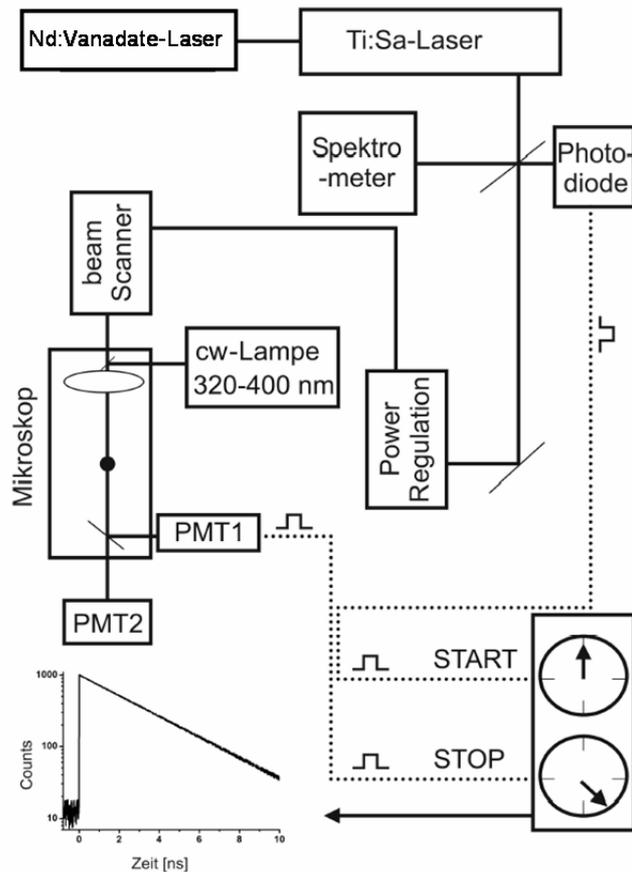


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Messapparatur für Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen und Darstellung des Prinzips des Start-Stopp-Mechanismus für die TCSPC-Messung. (Verändert nach: Kaneko et al., 2002; erschienen in „Calcium-activated chloride channels“, C.M. Fuller, Chapter 8, Academic Press, Boston, 2002)

2.9 Cl⁻-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Chlorid ist das am häufigsten vorkommende Anion in zellulären Kompartimenten. Chloridionen sind an vielen physiologischen Funktionen wie der Regulation des Zellvolumens, des intrazellulären pHs, der Flüssigkeitssekretion und der Stabilisierung des Ruhepotenzials von Zellen beteiligt. Chlorid-Indikatoren sind also wichtige Werkzeuge bei der Untersuchung dieser physiologischen Funktionen. An sie werden hohe Ansprüche

gestellt: Cl⁻-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe für die Fluoreszenz-Mikroskopie an lebenden Geweben und Zellen in Kultur müssen viele Kriterien erfüllen: (1) Sie dürfen nicht toxisch sein; (2) sie müssen schnell und gleichmäßig in das Gewebe diffundieren; (3) sie müssen gegen endogene Enzyme resistent sein; (4) sie dürfen nicht aus der Zelle diffundieren; (5) ihre Fluoreszenzeigenschaften dürfen nicht stark von intrazellulären Komponenten beeinflusst werden; (6) ihr Fluoreszenz-Signal sollte im physiologischen Bereich pH-Wert unabhängig sein; (7) ihre Absorption und Quantenausbeute müssen hoch genug sein, damit auch kleine Kompartimente vermessen werden können; (8) sie müssen Konzentrationsänderungen von wenigen Millimolar detektieren können; (9) sie dürfen nicht von Substanzen, die für die Messungen verwendet werden beeinflusst werden, wie zum Beispiel Nifluminsäure, Furosemid oder Bumetanid, die bei der Untersuchung der Chlorid-Homöostase wichtig sind.

2.9.1 MQAE

In dieser Arbeit wurde der Cl⁻-sensitive Fluoreszenzfarbstoff N(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium Bromid (MQAE, Molecular Probes) verwendet. Das Emissionsspektrum von MQAE ist in Abb. 2.11 gezeigt. Der Vorteil dieses Farbstoffes besteht darin, dass er nicht toxisch ist und gut in Gewebe und Zellen eindringt. In den Zellen wird MQAE durch endogene Esterasen in eine Zellmembran-impermeable Form gespalten, was zu einer Anreicherung der Substanz im Zytoplasma führt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird nur sehr langsam abgebaut und erhält seine Fluoreszenzeigenschaften über eine lange Zeit bei

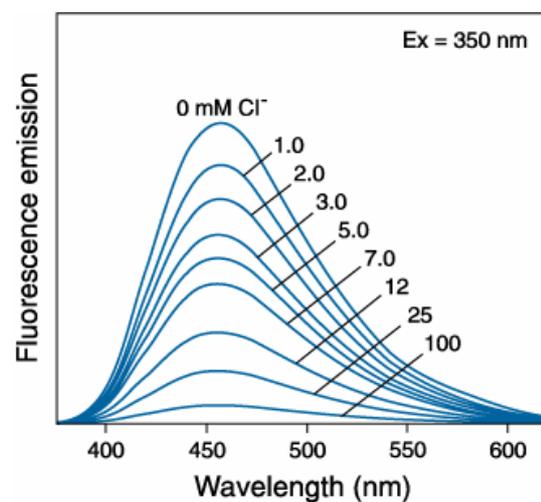


Abbildung 2.11: MQAE-Fluoreszenzspektrum. Die MQAE-Fluoreszenzemission bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 350 nm ist in Abhängigkeit von der freien $[Cl^-]_i$ (in mM) dargestellt. (Aus: <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0585.html>)

Änderungen von Fluoreszenzintensität und Fluoreszenz-Lebenszeit sind bei diesem Farbstoff nicht auf die Bindung von Cl⁻-Ionen zurückzuführen, sondern auf Wechselwirkungen zwischen den Akteuren. Diese Art der Interaktion zwischen Farbstoff und Ion wird als „Kollisions-Quenching“ bezeichnet (Lakowicz, 1999). Der Zusammenhang

zwischen Cl⁻-Konzentration und Fluoreszenz-Lebenszeit wird durch die Stern-Volmer-Funktion beschrieben. Die Steigung dieser über einen weiten Konzentrationsbereich linearen Funktion, bezeichnet man als Stern-Volmer- oder auch Quenching-Konstante K_{SV} ($\tau_0/\tau = 1 + K_{SV} [Cl^-]_i$). τ_0/τ bezeichnet das Verhältnis der Lebenszeit in chloridfreier Lösung, τ_0 , zur gemessenen Fluoreszenz-Lebenszeit bei einer beliebigen freien Chlorid-Konzentration, τ . Somit berechnet sich K_{SV} als Produkt $k_q \cdot \tau_0$. Da mit MQAE nur relative Änderungen der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenz-Lebenszeit gemessen werden können, muss für eine Quantifizierung der Chlorid-Konzentration die Fluoreszenz-Intensität bzw. -Lebenszeit für bestimmte, definierte Chlorid-Konzentrationen in der Zelle kalibriert werden. Die Fluoreszenz-Lebenszeit ist im Gegensatz zur Fluoreszenz-Intensität nicht abhängig von der Farbstoffkonzentration und dem Zellvolumen, und sie ist für einen Zelltyp konstant. Das bedeutet, dass eine für einen bestimmten Zelltyp ermittelte Stern-Volmer-Konstante sowohl auf kultivierte Zellen als auch auf Gewebe, die aus diesem Zelltyp bestehen, angewendet werden kann. K_{SV} muss also nicht vor jeder Messung einer Zellart neu bestimmt werden, wodurch Vergleiche zwischen Zellen in einer, aber auch aus verschiedenen Präparationen möglich sind (Kaneko et al., 2002).

2.9.2 Clomeleon

Um Aussagen über die Verwendbarkeit des Chlorid-Indikators Clomeleon für 2P-FLIM-Messungen und Chlorid-Imaging mit Schmerzzellen machen zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene transgene, Clomeleon-exprimierende Mauslinien untersucht.

Clomeleon ist ein auf FRET (Fluoreszenz-, oder Förster-Resonanz-Energie-Transfer) basierender Chlorid-Indikator, der aus einem CFP-YFP-Fusionsprotein besteht. Der Name Clomeleon leitet sich vom Kalzium-Indikator Cameleon (Miyawaki et al., 1997) ab. Die Paarung aus einem Chlorid-sensitiven YFP (yellow fluorescent protein) und einem Chlorid-insensitiven CFP (cyan fluorescent protein) ermöglicht ratiometrische Messungen und damit die Bestimmung absoluter intrazellulärer Chlorid Konzentrationen (Kuner et al., 2000). Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Chlorid-Indikatoren wie MQAE (s.o.) oder Chlorid-sensitiven YFP-Varianten, wie dem YFP-I152L (s.u.), die außer bei der Verwendung beim Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging keine Berechnungen absoluter Chlorid Konzentrationen zulassen. Die Tatsache, dass Clomeleon ein genetisch kodierbarer Indikator ist, erlaubt einen zielgerichteten Gentransfer durch zellspezifische Promotoren oder durch entsprechende Markierung mit geeigneten Signalsequenzen, die den Transport

in definierte zelluläre Kompartimente vermitteln. Clomeleon hat weitere Eigenschaften, die für die Messung intrazellulären Chlorids von Vorteil sind. (1.) Dieser Indikator wird durch Licht des sichtbaren Spektrums angeregt, wodurch starke Autofluoreszenz und Fototoxizität, Effekte, die bei Beleuchtung mit UV-Licht häufig vorkommen, vermindert werden. (2.) Starke Absorption und hohe Quantenausbeute von CFP und YFP ermöglichen ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis, bei geringer Indikator-Konzentration. Da die Konzentration des Indikators um einige Größenordnungen kleiner ist als die intrazelluläre Chlorid-Konzentration, treten keine Puffereffekte auf, wie bei Messungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Neher and Augustine, 1992). (3.) Clomeleon wird nicht durch andere, physiologisch relevante Anionen beeinflusst. Ionen wie Gluconat, welches häufig bei elektrophysiologischen Messungen Verwendung findet, haben keinen Effekt auf Clomeleon. (4.) Das relativ hohe Molgewicht von Clomeleon (~59 kDa) erschwert die Diffusion und trägt dadurch zu stabilen Messwerten bei, auch bei schnellen Änderungen der intrazellulären Chlorid-Konzentration. Abbildung 2.12 zeigt die Emissionsspektren von YFP und CFP bei verschiedenen Chlorid-Konzentrationen. In Abbildung 2.13 ist die Beziehung zwischen Emissions-Quotient und der Chlorid-Konzentration dargestellt. Aus dieser Kurve ist zu erkennen, dass die halbmaximale Reduktion des Quotienten (K_d) bei ~87 mM liegt. Von Herrn Dr. Kuner (Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg) wurden uns freundlicherweise die transgenen Mauslinien CLM-1, -11, -12, -13 und „Rosa26“ zur Verfügung gestellt. Um Informationen zum Expressionsmuster von Clomeleon in Spinalganglienzellen der verschiedenen CLM-Mauslinien zu erhalten, wurden Spinalganglienzellen wie im Abschnitt 2.3 beschrieben dissoziiert und kultiviert. Anschließend wurde mit der

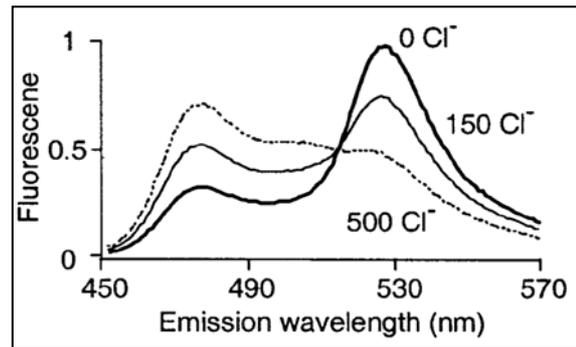


Abbildung 2.12: Emissionsspektrum von Clomeleon bei verschiedenen $[Cl^-]$. In allen Fällen wurde es bei einer Wellenlänge von 434 nm angeregt. Die Emissionsspektren wurden auf ihre Maxima bei 527 nm normalisiert. (Aus: Kuner et al., 2000)

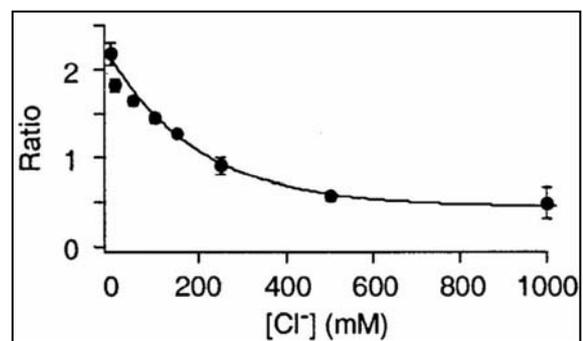


Abbildung 2.13: Beziehung zwischen Emissions-Quotient (527 nm / 485 nm) und $[Cl^-]$. (Aus: Kuner et al., 2000)

Software StatBuddy[®] (Abschnitt 2.12.2) eine Größenanalyse der Clomeleon-exprimierenden Neurone vorgenommen. Auf diese Weise sollte eine geeignete Mauslinie für 2P-FLIM-Messungen und Chlorid-Imaging mit Schmerzszellen identifiziert werden.

2.9.3 Ratiometrisches Cl⁻-Imaging mit Clomeleon

Beim ratiometrischen Fluoreszenz-Imaging wird die Intensität der Fluoreszenz-Emission in kurzer zeitlicher Abfolge zweimal hintereinander gemessen und anschließend der Quotient beider Emissions-Intensitäten gebildet. Mit Hilfe einer Eichkurve, in der die Quotienten für verschiedene, definierte Ionenkonzentrationen aufgetragen sind, kann für einen errechneten Quotienten schnell und zuverlässig die absolute Ionenkonzentration ermittelt werden. Die Vorteile ratiometrischer

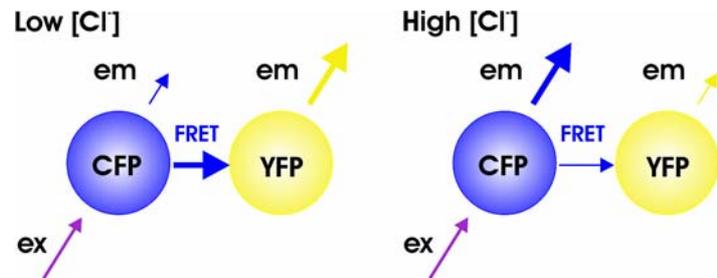


Abbildung 2.14: Chlorid-abhängiger Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen CFP und YFP im Fusionsprotein Clomeleon. Links; niedrige [Cl⁻]: CFP wird durch Licht der Wellenlänge 434 nm angeregt, emittiert aber nur schwach im Bereich von 485 nm, da die Anregungsenergie strahlungsfrei vom CFP auf YFP übertragen wird. YFP emittiert stark im Bereich von 527 nm. Rechts; hohe [Cl⁻]: Das Absorptionsspektrum von YFP verschiebt sich nach Bindung von Cl⁻ zu kürzeren Wellenlängen. Es kann nicht mehr als Akzeptor für FRET von CFP agieren, wodurch sich die Emissionswahrscheinlichkeit von CFP erhöht.

Fluoreszenzmessungen gegenüber herkömmlichem Fluoreszenz-Imaging sind vielfältig: Diffusions-bedingte Änderungen der Farbstoff-Konzentration oder ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffs in verschiedenen Zellkompartimenten, sowie Variationen der Zellgröße, haben keinen Einfluss auf den Quotienten. Auch wirken sich Intensitätsänderungen des Anregungslichtes nicht störend auf den Quotienten aus.

Die Eigenschaft von Clomeleon, als ratiometrischer Indikator genutzt werden zu können, basiert auf FRET-Effekten zwischen CFP und YFP und dem Umstand, dass nur YFP ein Chlorid-sensitives Fluoreszenzverhalten zeigt. FRET ist die strahlungsfreie Übertragung von Photonenenergie von einem angeregten Fluorophor (dem Donor) auf ein anderes Fluorophor (dem Akzeptor), wenn der Abstand zwischen beiden nicht mehr als 1-10 nm beträgt. Diese Energieübertragung erfolgt im Wesentlichen durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor. In Abbildung 2.14 ist der Chlorid-abhängige FRET-Effekt zwischen CFP und YFP im Clomeleon gezeigt. Nur bestimmte

Fluorophor-Paare sind für FRET-Experimente geeignet, da - neben anderen Voraussetzungen wie Dipol-Orientierung und ausreichende Fluoreszenz-Lebensdauer - das Emissionsspektrum des Donors sich mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überdecken muss. Das zyanfarbene CFP als Donor und das gelbe YFP als Akzeptor sind für FRET-Experimente in lebenden Zellen am besten geeignet, da das Emissionsspektrum des CFP und das Anregungsspektrum des YFP gut überlappen. Beim Energietransfer zwischen CFP und YFP wird ein Teil der Anregungsenergie nicht für die Emission von CFP verwendet, sondern auf das YFP übertragen, so dass auch gelbes Licht emittiert wird. Die Stärke der YFP-Emission ist abhängig von der Chlorid-Konzentration. Das Absorptionsspektrum von YFP verschiebt sich nach Bindung von Chlorid zu kürzeren Wellenlängen. Es kann nicht mehr als Akzeptor für FRET von CFP agieren, wodurch sich die Emissionswahrscheinlichkeit von CFP erhöht. Bildet man das Verhältnis aus YFP- (527 nm) und CFP-Emission (485 nm), ergeben sich für unterschiedliche Chlorid-Konzentrationen verschiedene Quotienten. In dieser Arbeit wurde die Quotienten der YFP- und CFP-Emissionen in Spinalganglienzellen in Wirbelpräparationen von Mäusen ratiometrisch bestimmt. Dazu wurden die Präparate mit Licht der Wellenlänge 430 nm angeregt und die Emissionen bei 535 nm und 480 nm gemessen. Mit der Software Roi2Tau[©] wurden für beide Emissions-Wellenlängen die mittleren Intensitäten in Einzelzellen ermittelt und anschließend die Quotienten errechnet.

2.9.4 Das Anionen-sensitive YFP152L

In dieser Arbeit wurde das Anionen-sensitive YFP152L (yellow-fluorescent-protein I152L) verwendet. YFP152L ist eine gelb-fluoreszierende Variante des GFP (*green-fluorescent-protein*). In diesem Protein ist die Aminosäure Leucin an Position 152 durch Isoleucin ersetzt, wodurch, im Vergleich zu YFP148Q, der ersten Anionen-sensitiven GFP-Variante mit einem $K_{d(Cl^-)}$ von 100mM (Wachter et al., 1999), seine Affinität zu Anionen verstärkt ist (Galiotta et al., 2001). Die Selektivitäts-Sequenz für YFP152L lautet $I^- > F^- > NO_3^- > Br^- > Cl^-$, mit K_d -Werten (in mM) von: K_I 1,9; K_F 2,3; K_{NO_3} 10; K_{Br}

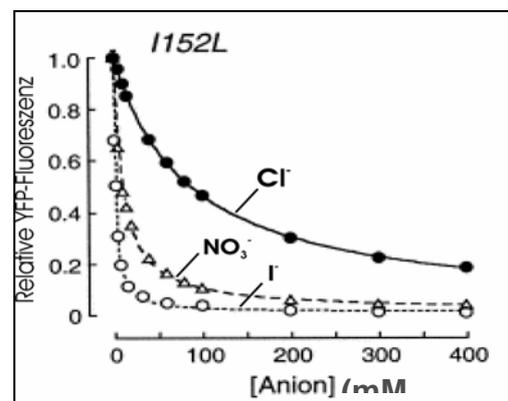


Abbildung 2.15: Relative Fluoreszenz des aufgereinigten YFP152L, in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration. (Modifiziert nach Galiotta et al., 2001)

25 und K_{Cl} 85. YFP152L wird von Anionen gequenchet, seine Fluoreszenz nimmt mit zunehmender Anionenkonzentration ab. In Abbildung 2.15 ist für die Anionen Iodid, Nitrat und Chlorid die relative YFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Anionenkonzentration aufgetragen. YFP152L wurde uns freundlicherweise von Prof. Joe Lynch (School of Biomedical Sciences, Brisbane, Australien) zur Verfügung gestellt.

2.10 2P-FLIM mit Spinalganglienzellen (*in situ*, *in vitro*)

2.10.1 Kalibrierung der Fluoreszenz-Lebenszeit an Mäuse-DRG-Neuronen

Für Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen wurden frisch dissoziierte (siehe 2.3), auf Plättchen ausgesäte DRG-Zellen für 30 min bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit in einer 5 mM MQAE-ES-1 Lösung beladen. Danach wurden sie mit ES-1 gewaschen und in die Messkammer überführt. MQAE blieb über die Dauer der Messungen in der Zelle, da es von endogenen Esterasen in seine Membran-undurchgängige Form gespalten wurde (Kaneko et al., 2002). Die Zwei-Photonen-Anregung des MQAEs geschah mit 150 fs-Pulsen mit Licht der Wellenlänge 750nm.

Um Fluoreszenz-Lebenszeit und $[Cl^-]_i$ in Relation zu bringen, musste das System geeicht werden, d.h. τ_0 und K_{SV} bestimmt werden. Die Kalibrierung erfolgte in Badlösungen unterschiedlicher (15-75 mM) $[Cl^-]$. Die verschiedenen Badlösungen wurden durch Mischen von KCl- (150 mM KCl, 10mM HEPES, 10 mM D-Glukose, pH 7,4) und KNO₃- (150 mM KNO₃, 10mM HEPES, 10 mM D-Glukose, pH 7,4) haltiger Stammlösungen in folgenden Verhältnissen hergestellt: 15 mM: 1:10; 30 mM: 1:5; 45 mM: 1:3,33; 60 mM: 1:2,5; 75 mM: 1:1. Um die intrazelluläre Cl^- -Konzentration der extrazellulären Cl^- -Konzentration anzupassen, wurde eine Doppel-Ionophor-Strategie (Chao et al., 1989) angewandt. Dazu wurden die Zellen nach dem Beladen mit MQAE für 20 min in einer der fünf Eichlösungen inkubiert, die zusätzlich die Ionophore TBT [Tributylzinn (347787, Sigma), 40 μ M] und Nigericin [(72445, Sigma), 20 μ M] enthielten. Tributylzinn ist ein Cl^-/OH^- -Austauscher, Nigericin ein K^+/H^+ -Austauscher. Durch den Transport von OH^- aus der Zelle kommt es zur Ansäuerung des Zytosols. Um der Änderung des intrazellulären pH-Wertes entgegenzuwirken, wurde zusätzlich zu TBT das Ionophor Nigericin verwendet. Es sorgt durch den Auswärtstransport von Protonen für die Stabilisierung des physiologischen, intrazellulären pH-Wertes. Für die Bestimmung der Zeitkonstante τ , für verschiedene Cl^- -Konzentrationen wurden die Fluoreszenz-

Lebenszeiten von 4-16 Zellen gemittelt. Die Fluoreszenz-Lebenszeit für 0 mM $[Cl^-]_i$ (τ_0) wurde durch Extrapolieren bestimmt. Die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} wurde mit einer linearen Regressionsanalyse durch die erhaltenen Messpunkte berechnet.

2.10.2 Wirbelkörper-Spinalganglien-Präparation für FLIM-Messungen der $[Cl^-]_i$

Für FLIM-Messungen an Spinalganglien wurden neugeborene (P1-P4) und 3 Monate alte NMRI-Mäuse durch Genickbruch getötet. Um die intrazelluläre Cl^- -Konzentration in DRG-Neuronen bis zur Messung der Fluoreszenz-Lebenszeiten möglichst unbeeinflusst zu lassen, wurde die gesamte Präparation in kalter Ringer-Lösung (ES-1: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH 7,4, NaOH) durchgeführt. Nach der Tötung der Tiere wurde zunächst die komplette Wirbelsäule aus dem Tier präpariert und anschließend jeder einzelne Wirbel sorgfältig mit einer Rasierklinge von der Wirbelsäule abgetrennt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die in den Zwischenwirbel-Löchern lokalisierten Spinalganglien bei der Präparation nicht aus dem Gewebe gerissen oder verletzt wurden. Dazu wurde die Rasierklinge zwischen zwei Wirbeln angesetzt - von ventral, auf der anterior gelegenen Seite einer Bandscheibe - und vorsichtig ein Wirbel abgeschnitten. Für 2P-FLIM-Messungen wurden ausschließlich Wirbel mit anhaftenden Spinalganglien verwendet, deren Hüllgewebe (*Dura mata*), sowie Spinalnerven und Hinterwurzeln vollständig intakt waren. Diese Wirbel-Spinalganglien-Präparate wurden für 3,5 Stunden in einer 5 mM MQAE-ES-1 Lösung bei Raumtemperatur beladen. Nach der Inkubation wurde die MQAE-ES-1 Lösung durch ES-1 ersetzt und die Präparate bis zur Messung bei 4°C gelagert. Für die Messung wurde ein Wirbel mit einem Tropfen erwärmter „low-melting“ Agarose (Sigma) auf den Boden einer 5cm Petrischale (Greiner) befestigt und die Schale mit ES-1 befüllt, sodass der Wirbel vollständig mit Lösung bedeckt war. Diese Präparationen wurden anschließend für 2P-FLIM-Messungen verwendet.

2.10.3 Vitalitäts-Test mit Mäuse-Spinalganglien in Wirbelpräparationen

Für 2P-FLIM Messungen mussten die Wirbelpräparate mit anhängenden Spinalganglien für mindestens 3,5 Stunden in der MQAE-Farbstofflösung inkubiert werden. Um den Zustand des Gewebes zu diesem Zeitpunkt zu überprüfen, wurden Vitalitätstests mit MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Molecular Probes] und

Trypan Blau (Stain 0,4%, Gibco) durchgeführt. Der Vitalitätsnachweis mit MTT erfolgt über die Bildung des schwer löslichen, violetten Tetrazolium-Salzes Formazan. Es entsteht durch Reduktion von Methyltetrazolium durch mitochondriale Dehydrogenasen. Lebendige Zellen weisen bei diesem Test eine stark violette Färbung auf, abgestorbene Zellen bleiben ungefärbt. Nach der Präparation wurden die Wirbel für 3 – 5 Stunden in ES-1, bei Raumtemperatur stehengelassen und danach für 60 Minuten (RT) in einer MTT-haltigen ES-1 (0,5 mg/ml) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in ES-1 wurde die Färbung mit dem Binokular dokumentiert.

Trypan Blau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Es dringt durch defekte Membranen toter Zellen ins Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen bleiben ungefärbt. Wie beim MTT-Assay wurden die Wirbelpräparationen zunächst für 3 – 5 Stunden in ES-1, bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend für 10 Minuten (RT) in 0,4%iger Trypan Blau-Lösung inkubiert. Danach wurde die Färbelösung durch ES-1 ersetzt, zweimal für 5 Minuten in ES-1 gewaschen und die Färbung mit dem Binokular dokumentiert.

2.10.4 2P-FLIM-Messung an Mäuse-Spinalganglien

Zur Vorbereitung der 2P-FLIM-Messungen musste im Wirbel-Spinalganglien-Präparat zunächst mit dem 10x Objektiv des Mikroskops im Durchlicht ein Spinalganglion ausgesucht werden. Die 2P-FLIM-Messung wurde mit dem 60x Objektiv des Mikroskops durchgeführt. Dazu wurde mit dem Okular auf die äußerste Position der *Dura Mata*, des aus der Wirbelpräparation herausragenden Ganglions, fokussiert und das Gewebe anschließend in optischen Schichten in Abständen von 3 – 5 μm von außen nach innen durchgemessen. Die Zwei-Photonen-Anregung des MQAE wurde mit 150 fs-Pulsen mit Licht einer Wellenlänge von 750nm durchgeführt. Insgesamt wurden 228 Bilder in 12 Spinalganglien aufgenommen. Da bei der Aufzeichnung der 2P-FLIM-Messdaten mit der Akquise-Software SPC730 (Becker & Hickl, Berlin) τ -Wert-Matrizen erstellt werden, die nur von Programmen der Firma Becker & Hickel gelesen werden können, mussten die Matrizen für die weitere Auswertung umformatiert werden. Dazu wurden die Aufnahmen einzeln mit der Software SPCImage (Becker & Hickl, Berlin) importiert und für jede Messung jeweils ein Falschfarben-kodiertes Bild im BMP-, und die dazugehörige τ -Wert-Matrix im TXT-Format exportiert. Diese Bild- und Textdateien wurden mit der von mir entwickelten Software ROI2Tau[©] quantitativ analysiert.

2.11 Methoden der genetischen Manipulation kultivierter DRG-Zellen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden des Gentransfers ausgetestet, um ein geeignetes Verfahren zu finden, dissoziierte Spinalganglienzellen mit dem Anionensensitiven YFP152L auszustatten. Außerdem wurden HEK293-Zellen mit dem Capsaicin-sensitiven Hitzerezeptor TRPV1 transient transfiziert.

2.11.1 Transfektions-Plasmid

Für transiente Transfektionen wurde der Vektor pcDNA3.1 (+) der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Die YFP152L-kodierende Region (724 Basenpaare) ist zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI inseriert. Der Plasmid-Vektor wurde gentechnisch (nach Galiotta et al., 2001) aus dem EYFP-Plasmid der Firma Clontech (Palo Alto, USA) hergestellt. Abbildung 2.16 zeigt die Vektorkarte von pcDNA 3.1 (+). Das YFP152L-tragende Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Prof. Joe Lynch (School of Biomedical Sciences, UQ Brisbane, Australien) zur Verfügung gestellt.

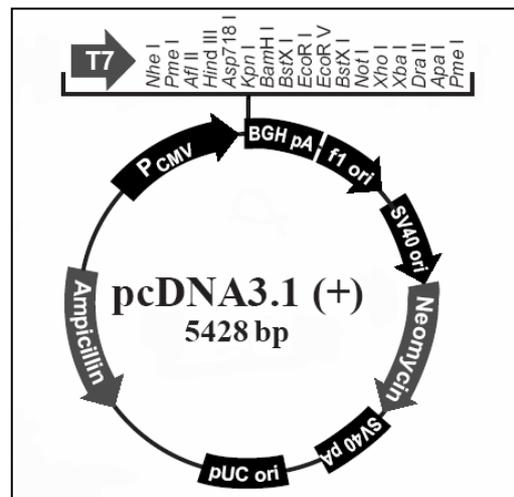


Abbildung 2.16: Karte des für transiente Transfektionen verwendeten Plasmid-Vektors pcDNA 3.1 (+) (Aus: <http://www.invitrogen.com>)

2.11.2 YFP152L-Kalziumphosphat-Transfektion

In dieser Arbeit wurden Spinalganglien-Neurone nach der Kalziumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) mit dem YFP152L-tragenden Konstrukt pcDNA 3.1 (+) transient transfiziert. Als Kontrolle wurde ohne Zugabe von Plasmid-DNA transfiziert ("Mock-Transfektion"). Alle Transfektionsansätze wurden in 4-Well-Platten durchgeführt und etwa 24 Stunden nach der Präparation der Primärzellen gestartet. Da die Transfektionseffizienz von der Menge der eingesetzten DNA abhängt, wurden zunächst verschiedene DNA-Mengen (1-15 µg) ausgetestet. Diejenige DNA-Menge, die die höchste Transfektionseffizienz erzielte, wurde für nachfolgende Transfektionen eingesetzt. Dazu wurde das Volumen der DNA-Lösung, zunächst mit Wasser auf 124 µl aufgefüllt. Zu

dieser Lösung wurden anschließend langsam 41 μ l einer 1 M CaCl_2 -Lösung pipettiert und der Ansatz durchmischt. Nach Zugabe von 165 μ l 2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung: 50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4) wurde der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise in das Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20-22 Stunden, bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit wurde das Kalziumphosphat-DNA-Präzipitat durch Waschen mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung: 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , 130 mM NaCl, pH 7,4) und mit PBS/EDTA (2g EDTA/l PBS, pH 7,4) wieder von den Zellen entfernt. In jedes Well wurden 400 μ l einer auf 37°C vorgewärmten, NGF- β -haltigen Lösung [(N 2513, Sigma), 50 ng/ml in DMEM] gegeben und für weitere 20-22 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Resultat der Transfektion analysiert. Dazu wurden mit dem 10x-Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 0,3: ∞ ; 0,17) des inversen Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss, Axiovert 200) repräsentative Positionen im Well einer 4-Wellplatte ausgewählt und mit einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (Olympus Colorview, Soft Imaging System GmbH) Fluoreszenzbilder von den Zellen aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Software (analysis, Soft Imaging System GmbH) akquiriert und auf der Festplatte des Computers gespeichert. Um YFP zur Fluoreszenz anzuregen wurde es dem Licht einer Quecksilberdampfampe (HBO100) (eingekoppelt über den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops), beleuchtet. Über ein Bandpass-Filter (BP 450 - 490, Zeiss) wurde das Anregungslicht auf ein Spektrum von 450 – 490 nm begrenzt. Das eingekoppelte Licht wurde von einem dichroischen Filter (cut-off: 510 nm, FT 510, Zeiss) reflektiert und durch das 10x-Objektiv zum Well der 4-Well-Platte geleitet. Durch einen Emissionsfilter wurden vom emittierten Fluoreszenzlicht Wellenlängen <515 nm (LP 515, Zeiss) zurückgehalten und das gefilterte Licht anschließend auf den CCD-Chip der Digitalkamera geleitet.

Durch Auszählen nicht-transfizierter und YFPI152L-exprimierender Zellen wurde die Transfektionseffizienz abschließend dokumentiert und quantifiziert.

2.11.3 TRPV1-RFP-Kalziumphosphat-Co-Transfektion

In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) mit dem TRPV1-tragenden Konstrukt pcDNA 3.1 (+) transient transfiziert. Um bei Patch-Clamp-Experimenten TRPV1-exprimierende Zellen fluoreszenzmikroskopisch identifizieren zu können wurde ein RFP-tragendes (rot fluoreszierendes

Protein, RFP) Plasmid [pcDNA 3.1 (+)] Co-transfiziert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 6 cm-Schalen (Greiner) in M10-Medium [10 % (v/v) FBS (Sigma F7524); 1 % (v/v) Glutamin-Penicillin-Streptomycin (Sigma G6784); 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma M7145); in MEM (Sigma M2279)] bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Heraeus). Die Transfektion wurde bei einer Zelldichte von $\sim 1 \times 10^5$ Zellen / Schale durchgeführt.

Da die Transfektionseffizienz von der Menge der eingesetzten DNA abhängt, wurden zunächst verschiedene DNA-Mengen (8 - 15 µg) ausgetestet. Mit 10 µg TRPV1-DNA und 1 µg RFP-DNA wurden die besten Transfektionsergebnisse erzielt (15,1%). Mindestens 30 Minuten vor der Transfektion wurde das Medium durch frisches M10-Medium ersetzt. Für die TRPV1-RFP-Co-Transfektion wurde das Volumen der DNA-Lösungen zunächst mit Wasser auf 158 µl aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 180 µl 2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung: 50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 6,95) gegeben und langsam mit 22 µl einer 2 M CaCl₂-Lösung unterschichtet. Daraufhin wurde der Ansatz durchmischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise in die 6 cm-Schale pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 - 24 Stunden, bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurde das Kalziumphosphat-DNA-Präzipitat durch Waschen mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung: 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl, pH 7,4) und mit PBS/EDTA (2g EDTA / 1 PBS, pH 7,4) wieder von den Zellen entfernt und die Zellen anschließend gesplittet. Dazu wurden die Zellen 3 x mit 2 ml PBS (steril) gewaschen. Anschließend folgten mehrere Waschschrte mit 2 ml PBS-EDTA (steril), bis das gesamte DNA-Präzipitat entfernt war. Um die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen, wurde die Waschlösung durch 400 µl TE-Lösung (Trypsin / EDTA-Lösung, Sigma T3924) ersetzt und einige Minuten auf der Wärmeplatte (Medax 12501, Nagel GmbH) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml M10-Medium (vorgewärmt auf 37°C) wurde die Zellsuspension mit einer 5 ml Glaspipette (Hirschmann EM) langsam durchmischt und die Zellen anschließend auf Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtete Glasplättchen (Ø 13 mm, Knittel Gläser) (siehe Abschnitt 2.3) in 4-Well-Platten (Greiner) ausgesät. Zur Steigerung der Expressionseffizienz wurden die Zellen über Nacht mit 3 mM Na-Butyrat (Sigma B5887; 0,5 M in PBS), bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag standen die Zellen für Patch-Clamp-Experimente zur Verfügung.

2.11.4 Effectene[®]-Transfektion

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit, kultivierte Spinalganglien-Zellen mit dem Effectene[®]-Transfection Kit von Qiagen, transient zu transfizieren, ausgetestet. Die Transfektion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des „Effectene-Reactions-Kits“ der Firma Qiagen. Das Prinzip dieser Transfektionsmethode ist in Abbildung

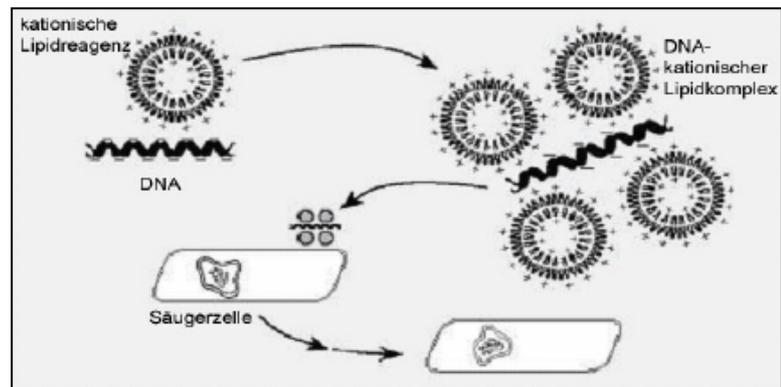


Abbildung 2.17: Prinzip der durch kationische Liposomen vermittelten Transfektion mit kultivierten Zellen. Negativ geladene DNA bindet an positiv geladene Liposomen. Dieser Komplex wird über Endosomen und Lysosomen in die Zellen gebracht. (Verändert nach: Felgner et al, 1987; Felgner et al., 1998)

2.17 gezeigt. Kontrollen wurden ohne Plasmid-DNA transfiziert. Ebenso wurden alle Transfektionsansätze in 4-Well-Platten durchgeführt und etwa 24 Stunden nach der Präparation der Primärzellen gestartet. Um die optimale DNA-Menge für den Transfektionsansatz zu ermitteln, wurden verschiedene DNA-Konzentrationen (0,5-2 µg) ausgetestet und diejenige DNA-Menge verwendet, die die größte Transfektionseffizienz erbrachte. Für den Transfektionsansatz wurde die DNA-enthaltende Lösung zunächst mit dem DNA-Kondensationspuffer (Puffer EC) auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 8 µl „Enhancer“-Lösung hinzupipettiert, für 1 Sekunde gevortext und die Lösung bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden zu der DNA-„Enhancer“-Mischung 25 µl Effectene-Transfektionsreagenz gegeben, für 10 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich der Transfektionskomplex (siehe Abbildung 2.17) bilden konnte. Nach erfolgter Inkubation wurde 1 ml NGF-β-haltiges Kulturmedium [(N 2513, Sigma), 50 ng/ml in DMEM] zur Transfektionslösung pipettiert und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde anschließend in die Wells der 4-Well-Platte gegeben und der Ansatz für 18 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung aus den Wells entfernt und durch 400 µl NGF-β-haltigen Kulturmediums (s.o.) ersetzt. Die Transfektionseffizienz wurde wie in Kapitel 2.11.2 beschrieben, dokumentiert und quantifiziert.

2.11.5 Nukleofektion

Um DRG-Neurone mit YFP1152L zu transfizieren, wurde in dieser Arbeit das „Rat Neuron Nucleofector[®] Kit, for Rat Dorsal Root Ganglion Neurons“ der Firma Amaxa Biosystems (Maryland, USA) verwendet. Wie bei den anderen, oben beschriebenen Methoden, musste



zunächst die optimale DNA-Menge bestimmt werden. Dazu wurden

Abbildung 2.18: Nucleofector-Gerät von Amaxa.

(Aus: <http://www.amaxa.com/nucleofectordevice.html>)

verschiedene DNA-Konzentrationen (1-5 μg) ausgetestet und diejenige DNA-Menge verwendet, die die größte Transfektionseffizienz erbrachte. Kontrollen wurden ohne Plasmid-DNA transfiziert. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Transfektionsmethoden wurden für Nukleofektionen ausschließlich Suspensionen frisch präparierter Neurone verwendet. Nach erfolgter Präparation der Primärzellen (siehe Kapitel 2.3) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte in der Suspension bestimmt und etwa 1×10^6 Zellen für die Nukleofektion aliquotiert. Zu den Zellen wurden die entsprechende DNA-Menge und 100 μl der „Rat Neuron Nucleofector Solution“ gegeben. Diese Mischung wurde anschließend in eine mitgelieferte Amaxa-Kuvette überführt und in das Nucleofector-Gerät gestellt (siehe Abbildung 2.18). Am Gerät wurde das von Amaxa für DRG-Neuronen empfohlene Nucleofector-Programm „G-13“ eingestellt und die Nukleofektion gestartet. Wenige Sekunden später konnte die Kuvette aus dem Gerät wieder entfernt werden. Die Suspension wurde daraufhin mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt und auf beschichtete Deckgläschen (siehe Kapitel 2.3) in fünf 4-Well-Platten ausplattiert (20 Wells, jeweils 200 μl pro Well). Zu jedem Well wurden 200 μl vorgewärmte (37°C) NGF- β -Lösung [(N 2513, Sigma), 100 ng/ml in DMEM] gegeben und für mindestens 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit, aufbewahrt. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch wie in Abschnitt 2.11.2 beschrieben, dokumentiert und quantifiziert.

2.11.6 Herstellung YFPI152L-kodierender Adenoviren

Unter den viralen Gentransfer-Vektoren bieten Adenoviren die meisten Vorteile. Im Gegensatz zu retroviralen Systemen können Adenoviren auch in solchen Zellen ihre DNA zur Expression bringen, die nicht den Zellzyklus durchlaufen (Russell, 2000). Außerdem besitzen Adenoviren, im Vergleich zu Vektoren auf der Basis Adeno-assoziiierter Viren, ein breiteres Infektionsspektrum.

Adenoviren haben eine große Affinität zum Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein, das eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten spielt (Meier & Greber, 2004). Neben diesen Rezeptoren, die von vielen Zelltypen in unterschiedlichem Maß exprimiert werden, spielen Integrine und Heparan-Sulfat-Proteoglykane bei der Virusaufnahme eine Rolle und ermöglichen eine CAR-unabhängige Infektion (Mathis et al., 2006). Da Spinalganglien-Neurone über Integrine verfügen (Tomaselli et al., 1993), entschieden wir uns für ein adenovirales Vektorsystem.

Adenoviren besitzen ein lineares, etwa 36 kb langes DNA Genom, das für etwa 50 Gene kodiert (Russell, 2000). Die Partikel bestehen aus einem unumhüllten, ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 70-90 nm. In den Ecken des Ikosaders sind die antennenartigen Fiberproteine verankert. Diese homotrimeren Fibern bestehen aus einem tripelhelikalen Schaft und einer distalen globulären Domäne, die für die Interaktion mit dem CAR-Rezeptor verantwortlich ist. Die am häufigsten verwendeten Adenoviren zum Gentransfer basieren auf dem humanen Subtyp 5 (hAd5) (Russell, 2000). Aus Gründen der gentechnischen Sicherheit wurden diesen Vektoren die „frühen“ Gene E1 und E3, die für einen produktiven Replikationszyklus unentbehrlich sind, entfernt (Russell, 2000). Durch diese Deletionen sind bis zu 6 kb für die Insertion zu transferierender Gene vorhanden.

Um einen viralen Gentransfer durchführen zu können, mussten zunächst rekombinante YFPI152L-kodierende, Adenoviren hergestellt werden. Dies erfolgte nach dem Hersteller-protokoll „pAdEasyTM-Vektor-System“ der Firma Qbiogen. Dazu wurde das YFPI152L-Insert aus dem Plasmid-Vektor pcDNA3.1 (+), an den Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI herausgeschnitten und in das AdEasyTM Transfer-Plasmid pShuttle (7,4 kb, QBiogene, Carlsbad, USA) hineinkloniert. Dieses Plasmid wurde anschließend an der Restriktionsschnittstelle Eco RI linearisiert und mit dem adenoviralen Vektor pAdEasy-1 (33,4 Kb, QBiogene) in Ecoli (BJ5183, QBiogene) Co-transformiert (Verhältnis 1:10). Bakterien, in denen das linearisierte Transfer-Plasmid und der

adenovirale Vektor homolog rekombinierten, wurden mit Hilfe des Antibiotikums Kanamycin in einer Übernacht-Kultur [10 ml LB / Kan 50; 50 µl Kanamycin / ml LB-Medium (Luria Bertrani (LB)-Medium: 1,0 % Bacto-Trypton 10 g/l, 0,5 % NaCl (w/v) 5 g/l, 0,5 %, Hefeextrakt (w/v) 5 g/l, pH 7,3 mit Natronlauge)], bei 37°C selektiert. Rekombinante pAdEasy-Plasmide wurden am nächsten Tag nach der TENS-Miniprep-Methode extrahiert. Der Erfolg der Rekombination wurde mit einem Pac I-Restriktionsverdau verifiziert und die Größe der *supercoil*-DNA auf einem Agarose-Gel (0,7 %) überprüft. Positive Rekombinanten wurden anschließend in Ecoli (DH5α) transformiert und auf LB / Kan 50-Agar (LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar + Kanmycin) ausplattiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie ausgewählt, mit ihr LB / Kan 50-Medium angeimpft und die Bakterien für 24 Stunden, bei 37°C vermehrt. Um sicherzustellen, dass die ausgewählte Kolonie das gewünschte virale Plasmid enthielt, wurde die rekombinante DNA erneut, wie oben beschrieben, überprüft. Die viralen Plasmide wurden nach der Amplifikation aufgereinigt (Promega-Mini), durch einen Pac I-Restriktionsverdau linearisiert und daraufhin nach der Kalziumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) in 6-Well-Platten (Greiner) in eine immortalisierte, retinale Zelllinie (HER911-Zellen, Indrogene) transfiziert. Etwa 10 Tage nach der Transfektion zeigten alle Zellen in den Wells einen zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE). Die auf diese Weise generierten viralen Partikel wurden anschließend mit Hilfe einer denaturierenden SDS-PAGE auf ihr Proteinprofil hin analysiert. Im Folgenden wurden die generierten Viren amplifiziert. Hierzu wurde der infektiöse Überstand der 6-Well-Platten zur Infektion von T25-Flaschen (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet, die eine etwa dreimal so große Oberfläche wie 6-Well-Platten besitzen. Nach 3 - 4 Tagen zeigten die HER911-Zellen in den T25-Flaschen einen vollständigen CPE. Die Zellen wurden zunächst im Medium belassen, dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden sie abzentrifugiert und das virushaltige infektiöse Medium zur Infektion von HER911-Zellen in einer T75-Flasche (Sarstedt, Nümbrecht) eingesetzt. Nach erfolgreicher Infektion der Zellen wurde eine T175-Flasche (Sarstedt, Nümbrecht), im Anschluss drei T175-Flaschen, und letztlich zehn T175-Flaschen infiziert. Um zu gewährleisten, dass die Viren während dieses finalen Amplifikationsschritts nicht aus den lysierten HER911-Zellen in das Medium entweichen, wurden diese 48 Stunden nach erfolgter Infektion geerntet und abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen aufgeschlossen. Der virushaltige Überstand wurde mit 4,4 g CsCl versetzt, auf 10 ml mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung:

7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl, pH 7,4) aufgefüllt, und mittels Ultrazentrifugation (24 h, 10 °C) im Gradienten von 1,2 g/cm³ - 1,4 g/cm³ aufgetrennt, wobei die viralen Partikel bei 1,34 g/cm³ eine charakteristische Bande bilden. Diese wurde mittels einer Spritze gezapft und das anteilige CsCl durch Dialyse (nach dem Herstellerprotokoll „pAdEasyTM-Vektor-System“ der Firma Qbiogen) entfernt. Abschließend wurde der Titer der Viruspartikel mittels Spektroskopie ermittelt. Hierzu wurde die Viruspräparation 1 : 10 in 0,1 % SDS in PBS verdünnt, 20 min bei 56 °C inkubiert und die Absorption bei 260 nm gegen Dialysepuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerol) bestimmt. Die gemessene Extinktion wurde mit dem Koeffizienten $1,1 \cdot 10^{12}$ multipliziert (nach Maizel et al., 1968) und so die Anzahl der optischen Partikel bestimmt. Die in transfizierten HER911-Zellen synthetisierten, infektiösen Viruspartikel wurden anschließend mit Hilfe einer CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt, in Dialysepuffer suspendiert und ihre optische Partikeldichte bestimmt. Sie standen daraufhin für Infektionen von kultivierten Spinalganglien-Zellen zur Verfügung.

2.11.7 Adenovirale Infektionen mit DRG-Neuronen

Um kultivierte Spinalganglien-Neurone mit YFPI152L auszustatten, wurden sie mit YFPI152L-kodierenden Adenoviren (2.11.6) infiziert. Alle Infektionsansätze wurden in 4-Well-Platten durchgeführt und etwa 24 Stunden nach der Präparation der Primärzellen gestartet. Da die Effizienz einer Infektion von der Anzahl infektiöser Partikel und der Dauer der Virusexposition abhängt, mussten diese Bedingungen zunächst optimiert werden. Dazu wurden kultivierte Spinalganglien-Neurone zwischen 8×10^5 und $1,6 \times 10^8$ Viruspartikeln ausgesetzt. Für die Infektionen wurden in jedes Well einer 4-Well-Platte 1-30 µl Virus-Suspension (in Dialysepuffer: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerol) zum Zellkulturmedium M10 [10 % (v/v) FBS (Sigma F7524); 1 % (v/v) Glutamin-Penicillin-Streptomycin (Sigma G6784); 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma M7145); in MEM (Sigma M2279)] gegeben und der Ansatz für 24-48 Stunden, bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Virus-haltige Lösung aus den Wells entfernt, dreimal für 5 Minuten mit vorgewärmter (37°C) Ringer-Lösung (ES-1: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH 7,4) gewaschen und diese durch 400 µl NGF-β-haltiges Kulturmedium [(N 2513, Sigma), 50 ng/ml in M10]

ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch ES-1 ersetzt und die Infektionseffizienz wie in Abschnitt 2.11.2 beschrieben, dokumentiert und quantifiziert.

2.12 LabView-Software

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (2P-FLIM, Ca^{2+} -Imaging, IB_4 -Färbungen, Verteilungsstudien Clomeleon-exprimierender Mauslinien) sind große Mengen von Aufnahmen entstanden, die jeweils auf individuelle Weise analysiert werden mussten. Da für diese speziellen Anwendungen keine preiswerte oder kostenlose Software verfügbar war, die dazu eine effiziente Verarbeitung großer Datenmengen ermöglichte, habe ich mit der Programmiersprache LabView[®] 7.1 verschiedene Programme entwickelt, die die Auswertung meiner Daten erleichtert und beschleunigt haben.

LabView[®] ist eine seit 1986 von National Instruments (Irland) entwickelte Programmiersprache, die auf der graphischen Programmiersprache "G" basiert. LabView[®] umfasst ein Softwarepaket zur Messdatenerfassung, -visualisierung und -verarbeitung. Die Anwendungen reichen von der Laborautomatisierung, Datenanalyse, über die Mess- und Prüftechnik, Bildverarbeitung und Motorensteuerung, Automatisierungstechnik, Echtzeitsystemen, bis hin zur Automatisierungstechnik. Die Software ist für alle gängigen Plattformen (Windows 98/ME/NT/2000/XP, Linux, HP-UX, Sun Solaris und MacOS) verfügbar. Da LabView[®] mit Symbolen, anstatt mit Texten arbeitet, ist es schnell zu erlernen und macht es gerade für Laien der Informations-Technologie attraktiv.

Mit LabView[®] erstellte Programme sind so genannte „virtuelle Instrumente“, sie tragen daher den Dateizusatz *.vi. LabView[®]-VIs bestehen immer aus einem Quellcode, dem so genannten Blockdiagramm, und einer Benutzeroberfläche. Im Folgenden sind ausschließlich die Benutzeroberflächen der von mir entwickelten Programme gezeigt.

2.12.1 Roi2Tau[®]

Um Aussagen über die Verteilung der intrazellulären Chlorid-Konzentration in Spinalganglien machen zu können, musste die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit verschiedener Neurone in einer großen Anzahl von Messungen einzeln ermittelt werden. Wie in der Falschfarben-kodierten Darstellung in Abbildung 2.19 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Fluoreszenz-Lebenszeiten von Nukleus und Zytosol in den DRG-

Neuronen. Für die sorgfältige Analyse der intrazellulären Chlorid-Konzentrationen durften in den Bildern nur die zytosolischen Bereiche der Neuronen ausgewertet werden. Für diese Anwendung habe ich das Analyseprogramm Roi2Tau[©] entwickelt.

Roi2Tau[©] ermöglicht eine schnelle Analyse einzelner Neurone in 2P-FLIM z-scan-Aufnahmen. Abbildung 2.19 zeigt die Benutzeroberfläche von Roi2Tau[©]. Das Programm ermöglicht ein „Blättern“ durch die optischen Schnittebenen der 2P-FLIM-Aufnahmen von Spinalganglien und die selektive

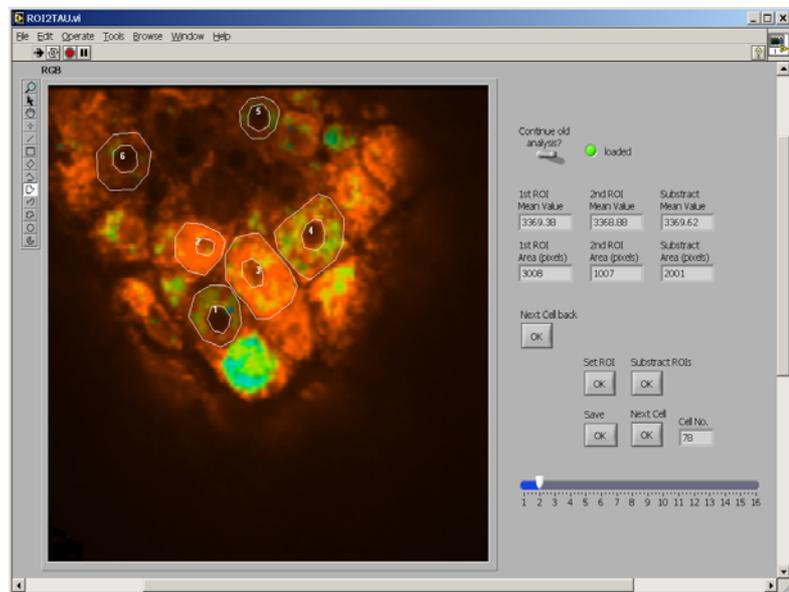


Abbildung 2.19 Benutzeroberfläche der mit der Programmiersprache LabView 7.1 geschriebenen Analysesoftware Roi2Tau[©] bei der Analyse einer 2P-FLIM-Aufnahme.

Benutzeroberfläche ist das Falschfarben-kodierte Bild einer 2P-FLIM-Aufnahme. Bei dieser Art der Darstellung werden kurze Fluoreszenz-Lebenszeiten, d.h. hohe Chlorid-Konzentrationen durch warme- (rot, orange), und lange Fluoreszenz-Lebenszeiten und damit niedrige Chlorid-Konzentrationen durch kalte Farbtöne (grün, blau) repräsentiert. Falschfarben-kodierte Bilder eignen sich besser für die Identifizierung einzelner Zellen im Gewebe, da sie kontrastreicher sind als die originalen Intensitäts-kodierten Graustufenbilder. Für die Analyse der intrazellulären Fluoreszenz-Lebenszeit, bzw. der Chlorid-Konzentration muss der zytosolische Bereich einer Zelle durch einen zweistufigen Selektionsprozess ausgewählt werden. Dabei wird mit einem Zeichenwerkzeug erst die äußere Grenze einer Zelle nachgezeichnet und im Anschluss der Bereich des Zellkerns markiert. Durch drücken des Buttons „Set ROI“ werden die markierten Bereiche im Bild gespeichert und als ROI (*Region Of Interest*) definiert. Gleichzeitig wird jeder Zelle ein Index zugewiesen, mit dem sie, und der ihr zugewiesene Wert, im Nachhinein in Verbindung gebracht werden können. Durch Drücken des Buttons „Subtract ROIs“ werden zwei ROIs einer Zelle zu einer Analyse-Matrix kombiniert, die nur noch den Bereich des Zytosols abdeckt. Mit Hilfe der Analyse-Matrix werden die Fluoreszenz-

Lebenszeiten aller Pixel des ausgewählten Bild-ausschnitts aus der zuvor umkonvertierten τ -Wert-Matrix (siehe Kapitel 2.10.4) extrahiert und gemittelt. Zusätzlich zur mittleren Lebenszeit wird die Gesamtfläche der Zelle (A) registriert und mit Hilfe eines Skalierungsfaktors in μm^2 umgerechnet. Unter Verwendung der Formel:

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$$

wird der Durchmesser (d) der Zelle berechnet und zusammen mit der mittleren Fluoreszenz-Lebenszeit in einer Datei abgespeichert. Der Durchmesser (d) ist ein interessanter Parameter, weil die verschiedenen Modalitäten von DRG-Neuronen in der Literatur mit diesem Wert korreliert werden (z.B. Petruska et al., 2002). Roi2Tau[©] wurde für die Analyse aller der mit 2P-FLIM erhaltenen Daten verwendet.

2.12.2 StatBuddy[©]

StatBuddy[©] ist eine Software, mit der Subpopulationen von kultivierten Spinalganglien-Zellen über ihre Größe und ihre Spezifität für (maximal zwei) Fluoreszenzmarker identifiziert werden können. Abbildung 2.20 zeigt die Benutzeroberfläche von StatBuddy[©]. Die Zellgröße wird durch Nachzeichnen der Zellgrenzen bestimmt. Dafür stehen dem Benutzer eine Reihe von Zeichenwerkzeugen zur Verfügung. Die Spezifität einer Zelle für einen bestimmten Marker (+/+, +/-, -/+, -/-) wird durch Drücken einer von vier Schaltflächen definiert. Sobald einer der vier Knöpfe gedrückt wird, ermittelt StatBuddy[©] die Pixelfläche der umrandeten Zelle und berechnet unter Einbeziehung eines Skalierungsfaktors die



Abbildung 2.20: Die Benutzeroberfläche der mit der Programmiersprache LabView 7.1 geschriebenen Software StatBuddy[©], bei der Analyse kultivierter, doppelt-gefärbter Spinalganglien-Zellen.

Fläche in μm^2 . Der Skalierungsfaktor wird im Feld „Scaling“ eingetragen. Mit Hilfe der Formel:

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$$

wird die Zellfläche (A) automatisch in den Zelldurchmesser (d) umgewandelt und dieser in einem Excel-Datenblatt gespeichert. Sobald der Durchmesser einer Zelle berechnet wurde, speichert das Programm die nachgezeichnete Zellgrenze und markiert sie entsprechend der Marker-Spezifität farblich (+/+ : orange, +/- : rot, -/+ : grün, -/- : weiß).

2.12.3 CellDetect[®]

CellDetect[®] ist ein Strukturerkennungs-Algorithmus, der die Analyse von Einzelzellen in Fluoreszenzbildern ermöglicht. Der von mir entwickelte Algorithmus kombiniert Intensitäts-Thresholding und Größen-abhängige Partikelfilterung in einem iterativen Verfahren. Abbildung 2.21 zeigt die Benutzeroberfläche der Software. Das Softwaremodul muss vom Benutzer für die individuelle Anwendung einmalig parametrisiert werden und erkennt

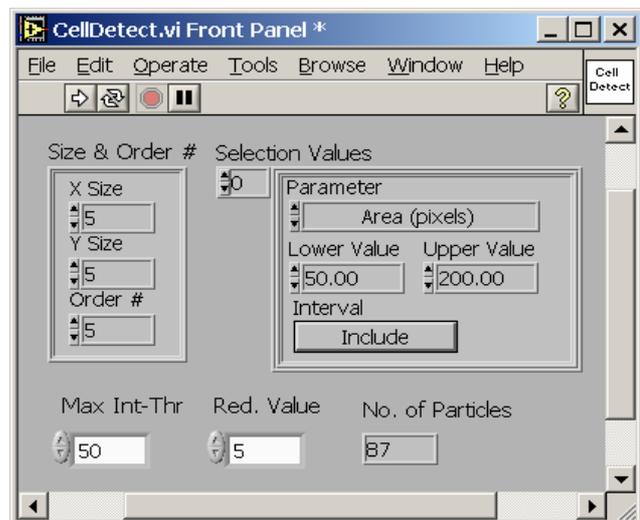


Abbildung 2.21: Benutzeroberfläche der Strukturerkennungs-Software CellDetect[®].

anschließend vollautomatisch Strukturen in Fluoreszenzbildern. Erkannte Strukturen werden in eine Analyse-Matrix konvertiert, die als Vorlage für die zu analysierenden Bildausschnitte verwendet wird. In Abbildung 2.22 ist ein Fluoreszenzbild von YFP152L-exprimierenden HEK293-Zellen mit überlagerter Analyse-Matrix gezeigt. CellDetect[®] kann die Bildformate BMP, JPG, PNG, TIFF und i16 (LabView[®]-internes 16Bit-Bildformat) verarbeiten. Da der Erkennungs-Algorithmus mit 8Bit-Bildern arbeitet, erstellt die Software zunächst eine Kopie des Originalbildes im 8Bit-Format. Dieses Bild wird anschließend von einem nicht-linearen Tiefpass-Filter geglättet und einem Intensitäts-Thresholding unterzogen. Dabei ermittelt die Software in dem 8Bit-Bild alle Bildpunkte, die einen Schwellenwert überschreiten und weist ihnen den Helligkeitswert „weiß“ zu.

Alle anderen Pixel werden schwarz dargestellt. Dieses s/w-Bild (1bit-Matrix) wird daraufhin von einem Partikelfilter nach Strukturen durchsucht, deren Größe innerhalb eines definierten Bereichs liegen. Zu kleine oder zu große Strukturen werden aus der Matrix gelöscht. Die resultierende Matrix wird in einem Zwischenspeicher abgelegt und der Detektionszyklus beginnt erneut, diesmal mit herabgesetztem Intensitäts-Schwellenwert. Dabei werden, im Vergleich zum vorherigen Zyklus, dunklere

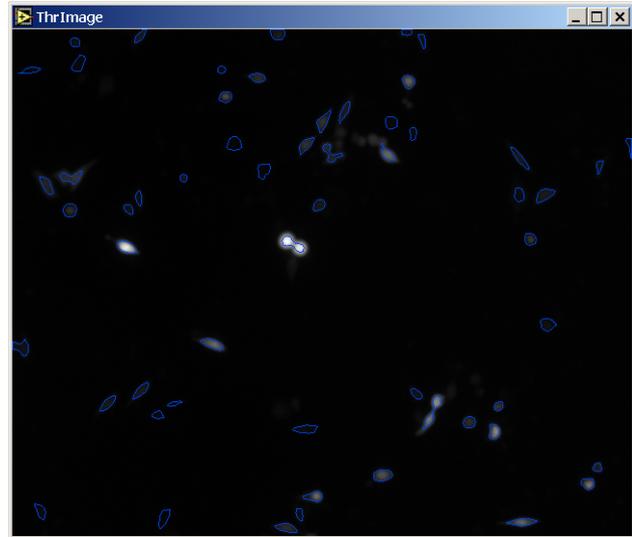


Abbildung 2.22: Fluoreszenzbild YFP152L-exprimierender HEK293-Zellen mit überlagerter Analyse-Matrix. Die blauen Kringel markieren die äußeren Ränder erkannter Strukturen.

Strukturen detektiert. Das Bild wird wieder einer Partikel-Filterung unterzogen, die resultierende Matrix anschließend mit der zuvor generierten Matrix kombiniert und die erweiterte Matrix in den Zwischenspeicher des Computers geladen. Die Anzahl der Iterationen die bei der Strukturerkennung durchgeführt werden sollen, hängt von den benutzerdefinierten Parametern ab. Maximal werden 255 Iterationen durchgeführt. Je größer die Anzahl der Iterationen ist, desto länger dauert der Detektionsprozess. Resultat dieses iterativen Verfahrens ist eine 1bit-Matrix, die die zu analysierenden Bildausschnitte definiert. In Abbildung 2.23 ist die Funktionsweise des Strukturerkennungs-Algorithmus schematisch dargestellt.

Die vom Benutzer festzulegenden Parameter sind: (1) Größe (in Pixeln) und Ordnung des nicht-linearen Tiefpassfilters, (2) Grenzwerte der Partikelgröße (in Pixeln), (3) Maximal-Schwellenwert für das Intensitäts-Thresholding und (4) Wert um den das Intensitäts-Thresholding bei jeder Iteration herabgesetzt wird. Die Anzahl der Iterationen für den gesamten Detektionsprozess ergibt sich automatisch aus den Werten für (3) und (4). Das Indikatorfeld „*No. of Particles*“ gibt die Anzahl der detektierten Partikel an.

Aufgrund der Struktur-, und Anwendungs-unabhängigen Funktionsweise von CellDetect[©] ist der Erkennungs-Algorithmus für viele unterschiedliche Anwendungen geeignet. CellDetect[©] wurde neben anderen, hier nicht genannten Softwareanwendungen, in das Software-Paket PCDetect[©] implementiert.

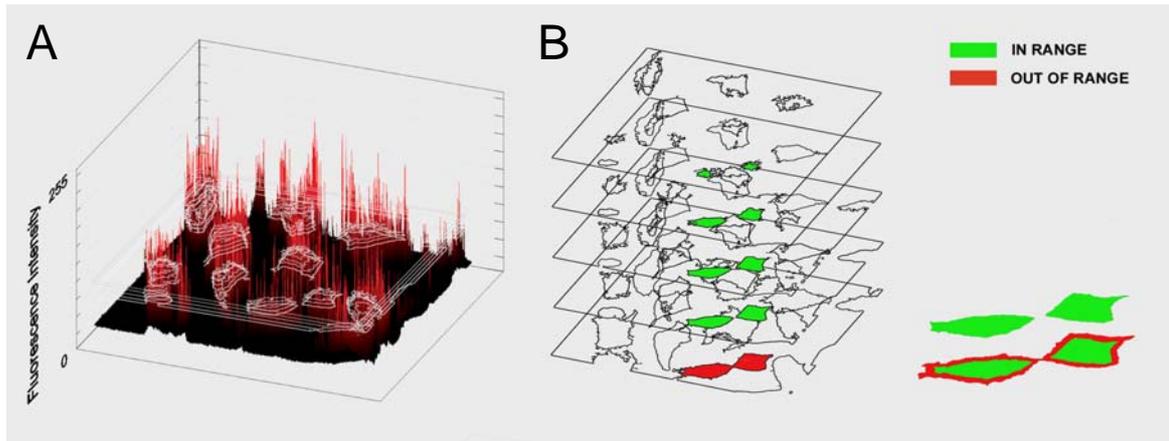
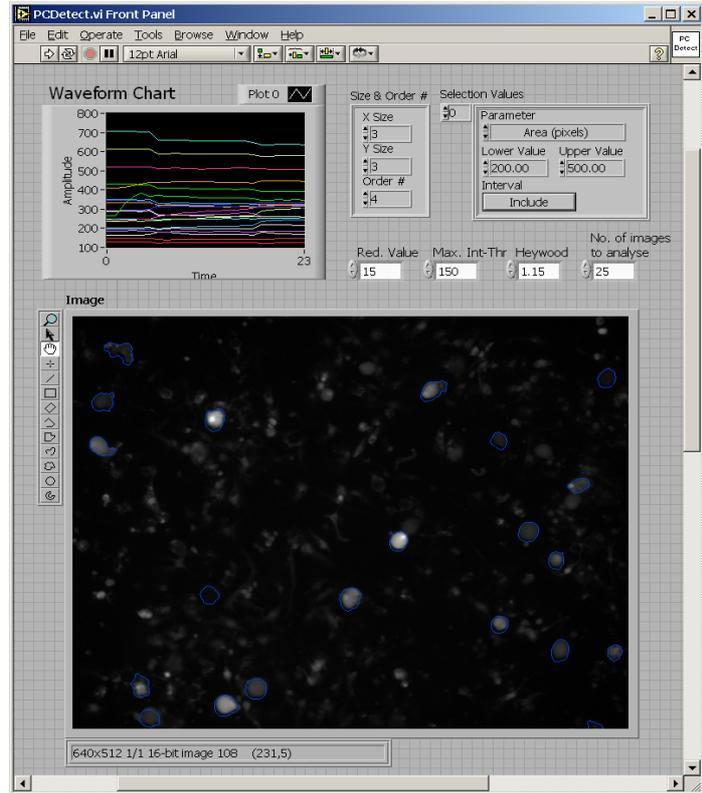


Abbildung 2.23: Funktionsweise des Strukturerkennungs-Algorithmus CellDetect[®]. Für die Strukturerkennung wird das Originalbild zunächst von einem nicht-linearen Tiefpass-Filter geglättet und anschließend einem Intensitäts-Thresholding unterzogen (A). Dabei ermittelt die Software alle Bildpunkte, die einen Schwellenwert überschreiten und weist ihnen den Helligkeitswert „weiß“ zu. Alle anderen Pixel werden schwarz dargestellt. Das Ergebnis ist eine Serie von Bildern, in denen benachbarte, „weiße“ Pixel als „Objekte“ definiert sind (grün). Jedes andere Pixel wird als Hintergrund definiert. Dieses s/w-Bild (1bit-Matrix) wird daraufhin von einem Partikelfilter nach Strukturen durchsucht, deren Größe innerhalb eines definierten Bereichs liegen. Zu kleine oder zu große Strukturen (rot) werden aus der Matrix gelöscht. Resultat dieses iterativen Verfahrens ist eine 1bit-Matrix, die die zu analysierenden Bildausschnitte definiert und die Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensitäten im Originalbild ermöglicht.

2.12.4 PCDetect[®]

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden ausgetestet, um kultivierte Spinalganglien-Zellen mit dem Cl⁻-Indikator YFP1152L auszustatten. Neben der Verwendung in der Elektrophysiologie (Patch-Clamping) sollen zukünftig YFP1152L-exprimierende Neuronen mit dem Screeningsystem Tox-Finder[®] (Liebel, 2000; Gilbert, 2002) untersucht werden. ToxFinder[®] ist ein automatisiertes Liquid-Handling und Fluoreszenz-Imaging-System und wurde ursprünglich für die Suche nach spezifischen Blockern für Ionenkanäle entwickelt. Seine Einsatzmöglichkeiten lassen sich auf viele andere Anwendungen erweitern, unter anderem auf die Untersuchung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle in Schmerzzellen. Das System wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung von Glycin- und GABA-Rezeptor Cl⁻-Kanälen eingesetzt (Kruger et al., 2005).

Damit die beim Screening entstehenden Daten schnell und zuverlässig analysiert werden können, habe ich das Software-Paket PCDetect[©] entwickelt. In Abbildung 2.24 ist die Benutzeroberfläche von PCDetect[©] gezeigt. PCDetect[©] erkennt vollautomatisch Spinalganglien-Zellen in Co-Kulturen und analysiert ihre Fluoreszenzsignale unabhängig von nicht-neuronalen Zellen. Kernmodul dieser Software ist der Strukturerkennungs-Algorithmus CellDetect[©]. Mit ihm werden alle Strukturen im Fluoreszenzbild erkannt.



Zur Unterscheidung zwischen Neuronen und nicht-neuronalen Zellen ist PCDetect[©] um die Filter-Routine Heywood.vi erweitert. Heywood.vi separiert, unter Verwendung des so genannten „Heywood circularity“-Faktors, große, runde von kleinen, verzweigten Strukturen. Der „Heywood circularity“-Faktor ist das Verhältnis eines Partikeldurchmessers zum Durchmesser eines Kreises mit der gleichen Fläche wie der des Partikels. Es errechnet sich aus der Formel:

Abbildung 2.24: Test der Software PCDetect[©] mit Fluo-4 AM beladenen Zellen einer Spinalganglien-Zellen Kultur. Durch Verwendung des „Heywood-circularity“-Faktors werden in der Co-Kultur nur die großen, runden Neuronen detektiert. Kleine, verzweigte nicht-neuronale Zellen werden von PCDetect[©] aussortiert

$$\frac{\text{Partikeldurchmesser}}{\text{Durchmesser eines Kreises mit gleicher Fläche wie der des Partikels}} = \frac{\text{Partikeldurchmesser}}{2 \sqrt{\pi \cdot \text{Partikelfläche}}}$$

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2.25 kreisförmige, ellipsoide und unregelmäßige Partikel, und ihre Position im „Heywood-circularity“-Diagramm gezeigt. Kreisrunde Partikel haben einen „Heywood-circularity“-Faktor von eins und liegen auf der horizontalen Achse im Diagramm. Alle Partikel mit anderen Formen haben größere „Heywood-circularity“-Faktoren. Ihre Positionen im Diagramm hängen von ihrer Größe und Form ab. In der Darstellung der Benutzeroberfläche von PCDetect[©] in Abbildung

2.24, sind die äußeren Grenzen der erkannten und separierten Neurone durch blaue Kringel markiert. Da von CellDetect[®] neben Neuronen auch nicht-neuronale Zellen im Fluoreszenzbild erkannt werden, können bei Bedarf zusätzlich die Fluoreszenzintensitäten nicht-neuronaler Zellen quantifiziert werden. PCDetect[®] habe ich für die Analyse von Bilderserien, die mit ToxFinder[®] aufgenommen werden, entwickelt. Die Analyse-daten erkannter Zellen eines Bildes werden von der Software in einer Textdatei gespeichert und stehen dem Benutzer zur weiteren Auswertung zur Verfügung.

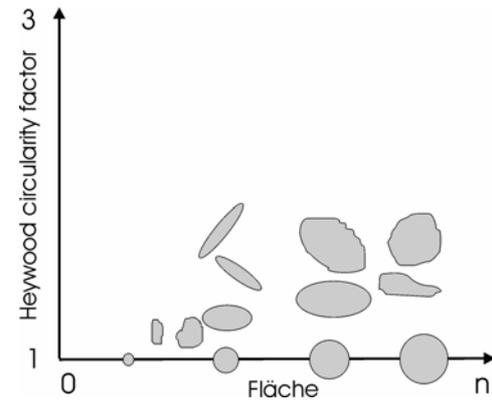


Abbildung 2.25: Graphische Darstellung des „Heywood-circularity“-Faktors für Partikel mit unterschiedlichen Formen. (Reproduziert nach Balzer A., 2001)

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in acht Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die Eigenschaften der verwendeten Gewebe und Kulturen behandelt, sowie die Expression von TRPV1-Kanälen in DRG-Primärkulturen immunzytochemisch untersucht. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Frage nach der Verwendbarkeit von caged Capsaicin für die Untersuchung von TRPV1-Kanälen in kultivierten Schmerzzellen. Im dritten Teil wird das Pflanzenlektin IB₄ auf seinen Nutzen zur Selektion kultivierter, TRPV1-exprimierender DRG-Neurone hin überprüft. Der vierte Teil behandelt die funktionelle Kopplung von TRPV1- mit Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen bei der Generierung Hitzeschmerz-vermittelter, sensorischer Nervensignale. Im fünften Abschnitt wird die [Cl⁻]_i somatosensorischer Neurone sowohl in Primärkultur (*in vitro*), als auch in Geweben (*in situ*) adulter und neugeborener Mäuse mit 2P-FLIM bestimmt. Der sechste Abschnitt behandelt eine Alternative zur MQAE-Lebenszeit-Messung für die Bestimmung der [Cl⁻]_i: Ratiometrische Messung der [Cl⁻]_i mit dem FRET-basierten Cl⁻-Indikator Clomeleon. Im siebten Teil wird durch eine Größenanalyse kultivierter, CLM-exprimierender DRG-Neurone, der vier transgenen Mauslinien CLM-1, -11, -12 und -13, eine für Cl⁻-Imaging mit Schmerzzellen geeignete Mauslinie identifiziert. Im achten und letzten Abschnitt des Ergebnisteils werden verschiedene Methoden ausgetestet, Schmerzzellen für zukünftige Cl⁻-Imaging-Experimente mit dem Anionen-sensitiven Cl⁻-Indikator YFP152L auszustatten.

3.1 Anatomie und Eigenschaften der untersuchten Gewebe und Kulturen

In dieser Arbeit wurde mit Spinalganglien in Wirbelkörperpräparationen neugeborener und adulter Mäuse, sowie mit dissoziierten und kultivierten Spinalganglienzellen von Mäusen und Ratten gearbeitet. Um ein besseres Verständnis von der Anatomie der verwendeten Gewebe, sowie den Eigenschaften kultivierter Spinalganglienzellen zu bekommen, habe ich histologische und zytologische Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Färbungen werden im Folgenden gezeigt.

3.1.1 Wirbelkörper adulter Tiere

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung eines Wirbelkörpers von einer adulten Ratte. Die paarig angeordneten Spinalganglien befinden sich im erwachsenen Tier in 1 – 2 mm Entfernung vom Rückenmark in den Zwischenwirbellöchern.

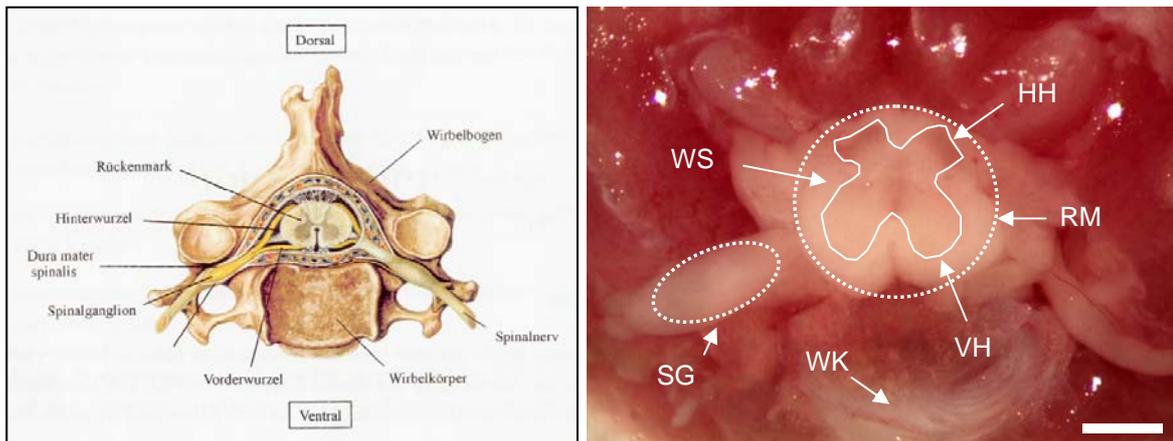


Abbildung 3.1: Links: Schematische Darstellung des Wirbelkörpers eines adulten Wirbeltiers. Die paarig angeordneten Spinalganglien liegen gut geschützt in den Zwischenwirbellöchern. (Aus: Weitz, Atlas der Anatomie, Weltbild Verlag, 1998). Rechts: Wirbelkörper einer adulten Maus mit anhaftendem Spinalganglion. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die verschiedenen Strukturen mit Linien nachgezeichnet. HH: Hinterhorn; RM: Rückenmark; VH: Vorderhorn; WK: Wirbelkörper SG: Spinalganglion; WS: weiße Substanz. Balken: 1 mm.

3.1.2 Wirbelkörper neugeborener Tiere

In dieser Arbeit wurden 2P-FLIM-Aufnahmen von Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen adulter und postnataler Tiere angefertigt. Während der postnatalen Entwicklung verändern sich die Anatomie der Wirbelsäule und damit auch die Lage der Spinalganglien im Wirbelkörper. Damit die in dieser Arbeit fluoreszenzoptisch zu detektierenden Strukturen, postnataler Mäuse anatomisch identifiziert werden konnten, habe ich histologische Gewebefärbungen mit Paraffinschnitten von Wirbelkörper-Präparationen neugeborener Mäuse durchgeführt. Abbildung 3.2 zeigt einen Querschnitt durch die Wirbelsäule (Wirbelkörper L2) eines neugeborenen Tieres, zehn Tage nach der Geburt. Um die verschiedenen Strukturen des Gewebes sichtbar zu machen, wurde der Schnitt mit der Azan-Färbemethode nach Heidenhain gefärbt. Die verschiedenen Strukturen sind in der Abbildung bezeichnet. Betrachtet man die Größe der Spinalganglien in adulten und neugeborenen Tieren relativ zur Größe des Rückenmarks, so erkennt man,

dass die Spinalganglien im neugeborenen Tier (1.) größer sind und (2.) in unmittelbarer Nachbarschaft des Rückenmark liegen. Während der postnatalen Entwicklung des Tieres wandern die Spinalganglien vom Rückenmark in Richtung der äußeren Grenzen der Wirbelsäule. Dies musste bei der Durchführung der 2P-FLIM-Messungen mit Wirbelkörper-Präparationen adulter und neugeborener Tiere berücksichtigt werden.

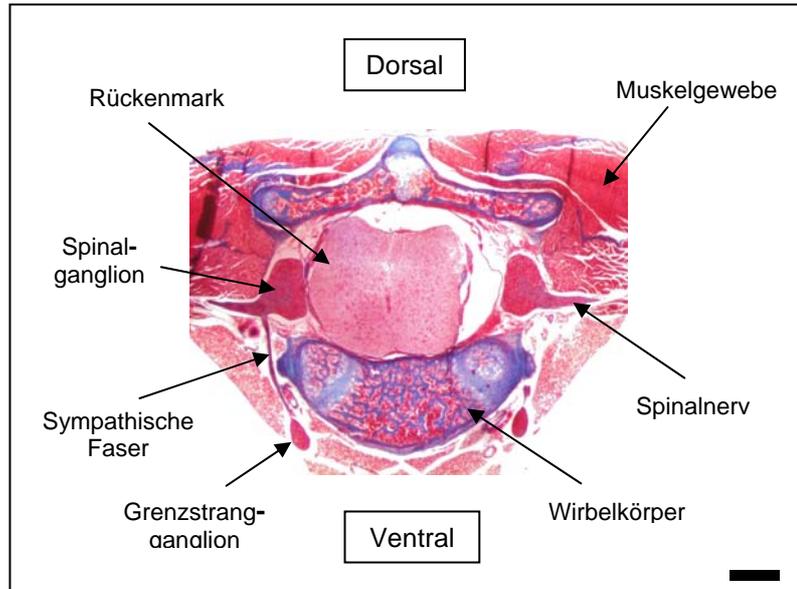


Abbildung 3.2: Querschnitt durch den Wirbelkörper (L2) einer zehn Tage alten Maus (P10). Azanfärbung nach Heidenhain. Bindegewebe ist blau angefärbt, Nerven- und Muskelgewebe erscheint rot. Im Gegensatz zur Anatomie adulter Tiere liegen die Spinalganglien im neugeborenen Tier in unmittelbarer Nachbarschaft zum Rückenmark. Schnittdicke 9 µm. Balken: 400 µm.

Um einen dreidimensionalen Eindruck von der Anatomie der Wirbelsäule und der Lage der Spinalganglien in Wirbelkörpern neugeborener Mäuse zu bekommen, habe ich 25 Azan-gefärbte Paraffin-Serienschnitte dreidimensional rekonstruiert. Der resultierende Kubus hat eine Kantenlänge von 2,1 x 2,1 x 0,9 mm. Bild (A) in Abbildung 3.3 zeigt den Teilausschnitt des Bildes aus Abbildung 3.2, der für die 3D-Rekonstruktion verwendet

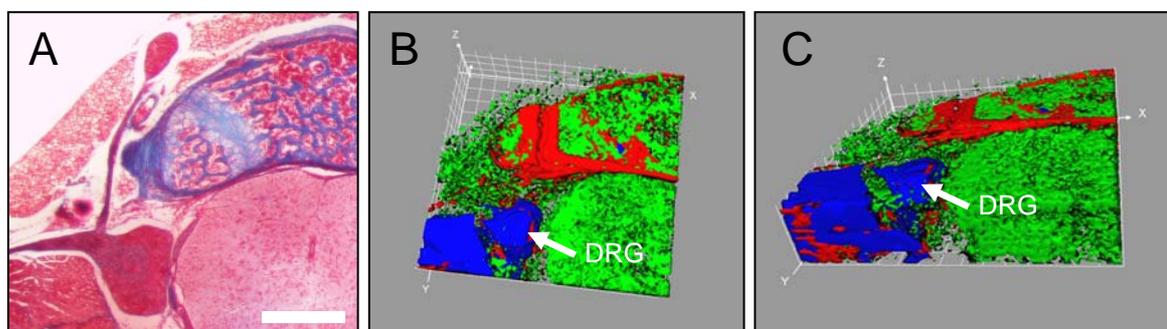


Abbildung 3.3: Orientierung eines Spinalganglions im Wirbelkörper einer zehn Tage alten Maus. Das Bild in (A) zeigt einen Ausschnitt des Paraffinschnittes aus Abbildung 3.2. (B) und (C) sind 3D-Rekonstruktionen aus Serienschnittbildern dieses Wirbelkörpers, betrachtet aus zwei verschiedenen Perspektiven. In der Falschfarbendarstellung sind Rückenmark und Muskelgewebe grün dargestellt, Knochengewebe erscheint rot und das Spinalganglion ist als blaue Struktur zu erkennen. Balken: 400 µm.

wurde. Die Bilder (B) und (C) sind die in Falschfarben dargestellten 3D-Rekonstruktionen, betrachtet aus verschiedenen Perspektiven. Die Bilder lassen die Orientierung der Spinalganglien im Wirbelkörper sehr gut erkennen. Für die Präparation von Wirbelkörpern mit anhaftenden Spinalganglien, sowie für die Durchführung der 2P-FLIM-Experimente waren die dargestellten 3D-Rekonstruktionen postnataler Wirbelkörper eine große Hilfe.

3.1.3 Spinalganglien

Die Größe der Spinalganglien variiert je nach Lage im Körper und Alter des Tieres. Die Länge beträgt zwischen 0,5 und 2 mm. Ihre Größe nimmt von cranial nach caudal ab. Sie enthalten etwa 80000 – 120000 Parikaryen, die von kleineren Gliazellen (Satellitenzellen) umgeben sind. Je älter das Tier ist, desto größer ist der Anteil an Bindegewebe im Spinalganglion. Spinalganglien werden von der Hinterwurzel des Rückenmarks gebildet. Distal zum Spinalganglion bildet die Hinterwurzel mit der Vorderwurzel den Spinalnerv. Abbildung 3.4 zeigt ein Spinalganglion im Detail.

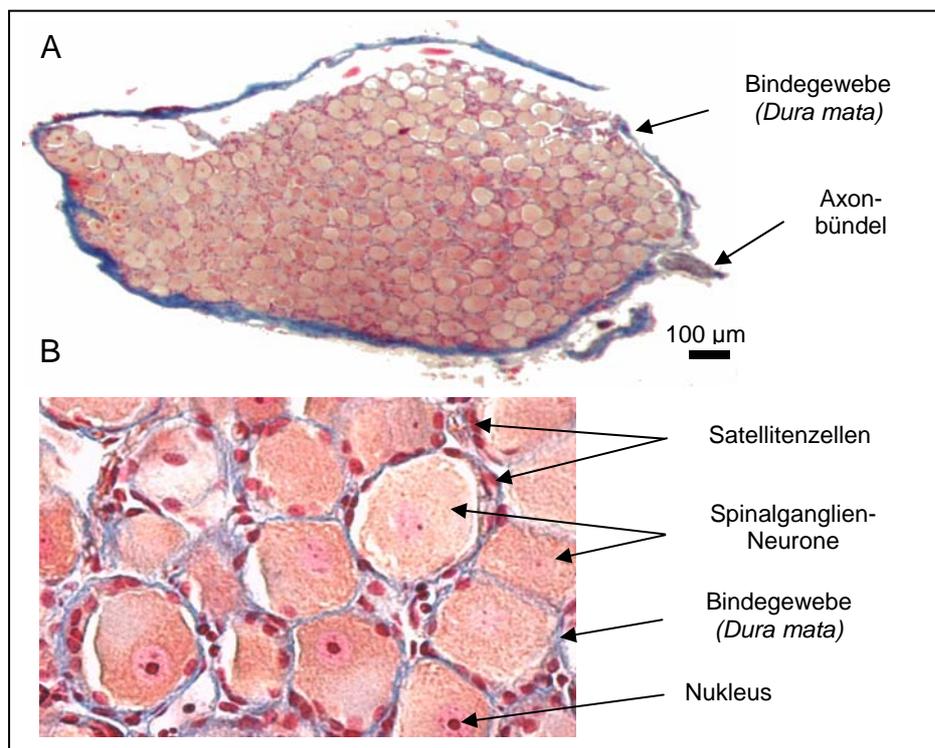


Abbildung 3.4: Spinalganglion im Detail. Die anatomischen Strukturen wurden mit der Azan-Färbemethode sichtbar gemacht. (A) Längsschnitt durch ein Spinalganglion einer adulten Wistar-Ratte. Das Spinalganglion ist vollständig von Bindegewebe (*Dura mata*, blau) umgeben. Auf der rechten Seite des Schnittes ist ein kurzes Stück des Spinalnervs zu sehen. (B) vergrößerter Ausschnitt aus (A). Die Zellkörper der somatosensorischen Neurone (rosa) sind von Gliazellen umgeben (dunkelrote Strukturen) und in eine Bindegewebskapsel (blau) gehüllt. Schnittdicke: 9 µm.

3.1.4 Antikörperfärbung mit kultivierten Spinalganglienzellen

Primärkulturen somatosensorischer Neurone sind das Standardmodell der Schmerzforschung. Die physiologischen Eigenschaften somatosensorischer Nervenzellen werden seit Jahrzehnten an diesem *in vitro*-Standardmodell untersucht. Der Nachteil dieses Modells ist in der Vielzahl der physiologisch unterschiedlichen Populationen afferenter Neurone begründet. Damit funktionell identische Zellen gezielt untersucht werden können, benötigt man Hilfsmittel, die die Identifizierung dieser Subpopulation möglich machen. Eines dieser Hilfsmittel sind immunzytochemische Färbungen.

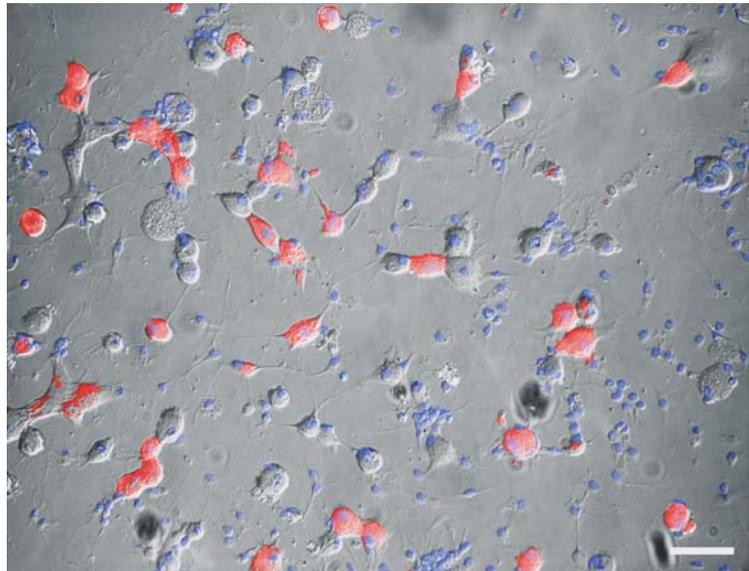
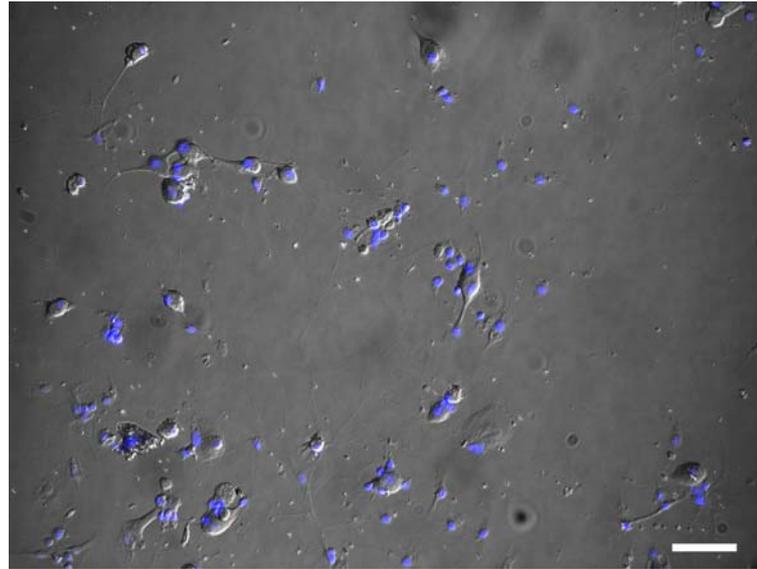


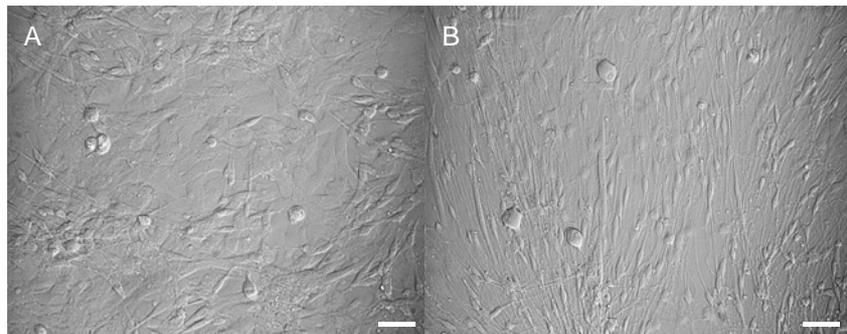
Abbildung 3.5: Die Überlagerung von Nomarski DIC-Bild (*Differential Interference Contrast*) und zwei fluoreszenzoptischen Aufnahmen zeigt eine Primärkultur von DRG-Neuronen 24 Stunden nach der Präparation. Zellkerne erscheinen blau (DAPI-Färbung), die TRPV1-Expression ist durch rote Immunfluoreszenz dargestellt. 41% der mittelgroßen Zellen (20 – 30 μm) exprimierten TRPV1. Diese Zellen wurden für Experimente, bei denen Capsaicin eine Rolle spielte, verwendet. Die großen- und die meisten kleinen Neurone, sowie nicht-neuronale Zellen waren TRPV1-immunonegativ und wurden in den verschiedenen Experimenten nicht verwendet. Balken: 50 μm .

Um bei denjenigen Experimenten, die im Zusammenhang mit Capsaicin durchgeführt wurden, nur den geeigneten-, Capsaicin-sensitiven Zelltyp zu verwenden, habe ich die Expression des TRPV1-Rezeptors immunzytochemisch untersucht. Dazu wurden kultivierte Spinalganglienzellen 24 Stunden nach der Präparation mit einem polyklonalen Erstantikörper behandelt und dieser mit einem rot fluoreszierenden Zweitantikörper nachgewiesen. Das Überlagerungsbild in Abbildung 3.5 zeigt eine Primärkultur von DRG-Neuronen, einen Tag nach der Präparation. 41% der Neurone mit kleinen (<30 μm) und mittelgroßen ($30 \leq 45 \mu\text{m}$) Durchmessern waren immunopositiv für TRPV1. Große Neurone (> 45 μm) wurden nicht untersucht, da sie durch Filtration aus der Kultur entfernt wurden. In sehr kleinen Neuronen (<20 μm), sowie in nicht-neuronalen, fibroblastären Zellen konnte TRPV1 nicht nachgewiesen werden. Für alle Experimente bei denen Capsaicin eine Rolle spielte, wurden ausschließlich kleine und mittelgroße Zellen,

mit Durchmessern zwischen 20 – 45 μm verwendet. Abbildung 3.6 zeigt das Resultat des Kontrollversuchs (Negativ-Kontrolle) mit einer Primärkultur von DRG-Neuronen, 24 Stunden nach der Präparation. Mit diesem Experiment sollte die Spezifität des Zweit-antikörpers nachgewiesen werden. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise behandelt wie in Abbildung 3.5, allerdings ohne eine Vorinkubation mit dem Erstantikörper. Da in dem Bild



keine rot fluoreszierenden Strukturen zu erkennen sind, konnte eine unspezifische Färbung durch den Zweit-antikörper ausgeschlossen werden. Abbildung 3.7 zeigt Primärkulturen von Spinalganglien-Neuronen nach 7 und 14 Tagen. Wie in den Bildern zu erkennen ist, proliferieren die zunächst vereinzelt vorliegenden nicht-neuronalen, fibroblastären Zellen und bilden mit der Zeit eine immer dichteren Zellrasen. Die ausdifferenzierten Spinalganglien-Neurone können sich nicht mehr teilen, ihre Anzahl nimmt mit der Zeit ab.



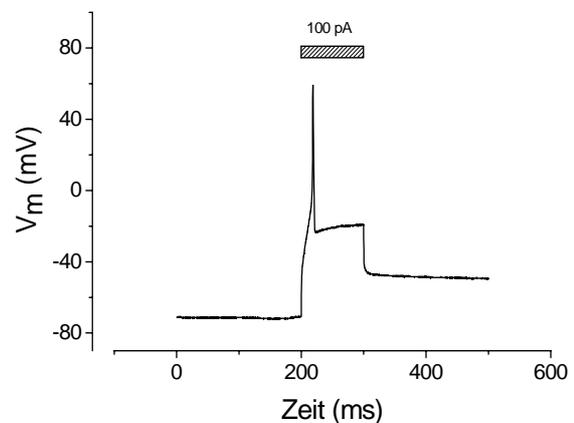
Spinalganglien-Neurone konnten für etwa 14 Tage in Primärkultur gehalten werden.

3.2 Fotolyse-Experimente mit caged Capsaicin

Für kinetische Experimente mit Schmerzzellen hat unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit Dr. Volker Hagen (Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Campus Berlin-Buch) die caged Compounds Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin entwickelt. Um die Verwendbarkeit von Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin für Fotoaktivierungs-Experimente zu testen, wurden Spinalganglienzellen zunächst, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, präpariert und kultiviert. Der Effekt der fotolytischen Freisetzung von Capsaicin auf TRPV1-exprimierende Neuronen wurde in Ganzzell-Experimenten mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Capsaicin-induzierte Ströme und -Spannungsänderungen wurden in insgesamt 70 Neuronen, mit Durchmessern zwischen 20 - 45 μm , gemessen. Die Zellen hatten Ruhepotenziale zwischen -60 und -80 mV, ihre Membrankapazität lag bei $43 \pm 18,5$ pF (70 Zellen).

3.2.1 Identifizierung funktioneller DRG-Neurone

Für alle elektrophysiologischen Untersuchungen mit kultivierten DRG-Neuronen wurden ausschließlich Zellen verwendet, die infolge einer Strominjektion (100 pA, 100 ms) Aktionspotenziale (APs) generierten, d.h. die als vitale Neuronen identifiziert werden konnten. Abbildung 3.8 zeigt die Reaktion eines funktionellen Neurons bei der Strominjektion. Bei dieser Ganzzell-Ableitung wurde die Zelle durch Injektion eines Kommandostroms bei -70 mV geklemmt und das Membranpotenzial, vor und nach der 100 ms andauernden



Strominjektion. Bei dieser Ganzzell-Ableitung wurde die Zelle durch Injektion eines Kommandostroms bei -70 mV geklemmt und das Membranpotenzial, vor und nach der 100 ms andauernden Strominjektion APs generierten.

Strominjektion, für insgesamt 0,5 Sekunden aufgezeichnet. Die Zelle wurde durch die Strominjektion depolarisiert und generierte in der Folge Aktionspotenziale. Nur solche Zellen wurden für weitere Experimente verwendet.

3.2.2 Spannungsklemme-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin

Für die fotolytische Freisetzung von Capsaicin aus caged Capsaicin wurden die Zellen für 1 Sekunde dem ungefilterten Licht einer Quecksilberdampflampe ausgesetzt. Um einen Effekt der UV-Belichtung auf die Neuronen ausschließen zu können, wurden die Zellen bei jeder Messung für eine Sekunde, in caged Capsaicin-freier Lösung belichtet. Die graue Spur in Abbildung 3.9 zeigt diesen Kontrollversuch. Der schwarze Pfeil markiert den Beginn der UV-Belichtung. Bei diesem Experiment wurde das Membranpotenzial des Neurons auf -70 mV geklemmt und die Zelle anschließend für eine Sekunde belichtet. Wie zu erkennen ist, reagierte das Neuron während des UV-Blitzes nicht mit einer Stromänderung. Licht-induzierte Effekte auf die Neuronen konnten daher ausgeschlossen werden. In insgesamt 30 Neuronen wurden Stromänderungen gemessen. Dabei wurden die Neurone auf ein Membranpotenzial von -70 mV geklemmt und die Stromantworten der Zellen für 90 Sekunden aufgezeichnet. 11 Zellen (37%) reagierten in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin auf einen 1000 ms UV-Blitz mit einwärtsgerichteten Strömen im Bereich zwischen -269 pA bis -1978 pA. Im Mittel reagierten die Zellen mit -887 pA, (SD: 573 pA). Die Stromdichten variierten zwischen $4,5$ und $52,5$ pA/pF (Mittelwert: $21,3$ pA/pF; SD: $15,9$ pA/pF) was die Heterogenität der TRPV1-Expression in den verschiedenen Spinalganglienzellen widerspiegelt. 19 Zellen (63%) reagierten nicht auf die fotolytische Freisetzung von Capsaicin. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch die Capsaicin-

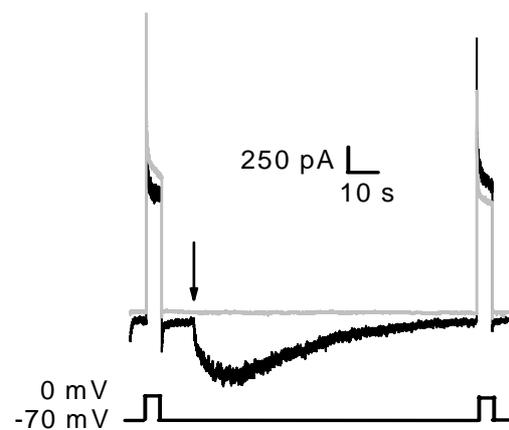


Abbildung 3.9: Aufnahme eines DRG-Neurons von einer adulten Ratte (Spannungsklemme), mit zwei depolarisierenden Pulsen und einem UV-Blitz (1 s, Pfeil) der keine Stromänderung in Na-CDMNB-caged Capsaicin-freier zur Folge hatte (graue Spur). In Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin induzierte ein UV-Blitz mit gleicher Intensität und Dauer in derselben Zelle einen Einwärtsstrom (schwarz).

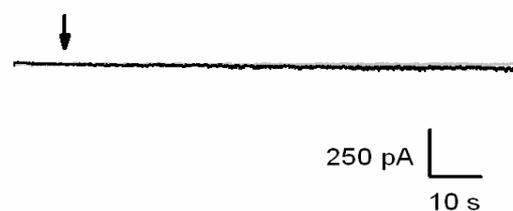


Abbildung 3.10: Ganzzell-Aufnahme eines DRG-Neurons von einer adulten Ratte, in der Spannungsklemme, bei -70 mV. Die Zelle reagierte nicht auf die fotolytische Freisetzung von Capsaicin.

induzierte Stromantwort eines DRG-Neurons. Die Zelle reagierte auf die Fotolyse von Na-CDMNB-caged Capsaicin mit einem raschen Einwärtsstrom, der sein Maximum (-730 pA), nach ~11,3 Sekunden erreichte und danach einen transiente Verlauf zeigte. In Abbildung 3.10 ist eine Strommessung dargestellt, bei der ein DRG-Neuron nicht auf die fotolytische Freisetzung von Capsaicin reagierte.

3.2.3 Stromklemme-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin

Spannungsänderungen durch Foto-Aktivierung mit Na-CDMNB-caged Capsaicin wurden in insgesamt 40 Zellen gemessen. Dabei wurden die Zellen durch Injektion eines Kommandostroms bei -60 mV bis -80 mV geklemmt und das Membranpotenzial, vor und nach dem 1000 ms andauernden UV-Blitz, für insgesamt 4 Sekunden aufgezeichnet. Abbildung 3.11 zeigt das Resultat einer solchen Messung. Die graue Spur gibt die Reaktion der Zelle bei der Kontrollmessung (ohne caged Capsaicin), die schwarze Spur die Spannungsänderung in Anwesenheit von Na-CDMNB-caged Capsaicin, wider. Der Pfeil markiert den Startpunkt des UV-

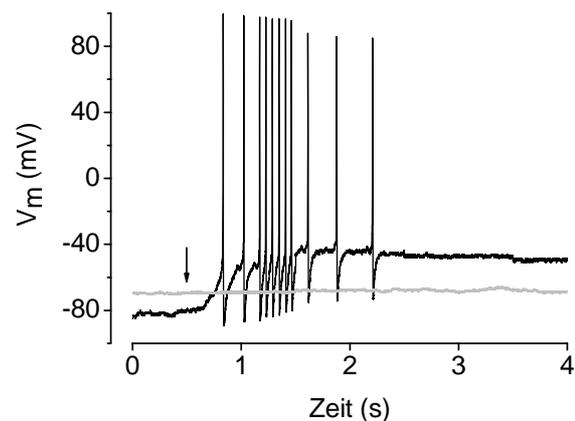


Abbildung 3.11: Stromklemme-Messung eines DRG-Neurons, das ein Ruhepotenzial von -80 mV mit und ohne CDMNB-caged Capsaicin in der Badlösung zeigte. In CDMNB-caged Capsaicin-freier Lösung änderte sich die Membranspannung durch UV-Belichtung (1 s) nicht (Pfeil, graue Spur). In Gegenwart von 1 μ M Na-CDMNB-caged Capsaicin induzierte ein UV-Blitz mit gleicher Intensität und Dauer in derselben Zelle die Generierung von APs (schwarz).

Blitzes. Zu Beginn der Messung zeigte das Neuron ein Ruhepotenzial von etwa -80 mV. In caged-Capsaicin-freier Lösung reagierte die Zelle nicht auf die UV-Belichtung, wogegen der UV-Blitz in Anwesenheit von 1 μ M Na-CDMNB-caged Capsaicin eine Folge von Aktionspotenzialen in derselben Zelle induzierte. Von den insgesamt 40 Zellen reagierten 9 Zellen (22%) mit der Generierung von Aktionspotenzialen nach einem UV-Blitz, in Anwesenheit von 1 μ M Na-CDMNB-caged Capsaicin. Die Dauer zwischen Blitz-Start und erstem Aktionspotenzial variierte zwischen 334 ms bis 2190 ms (Mittelwert: 1002 ms; SD: 759 ms). Die Streuung der Zeitdifferenzen bis zur Zellantwort ist wahrscheinlich auf die Unterschiede bei der TRPV1-Expression, d.h. der TRPV1-Kanaldichten in verschiedenen

DRG-Neuronen zurückzuführen. Die in Abbildung 3.12 gezeigte Messung unterstützt diese Annahme. Das Neuron aus Abbildung 3.11 und die Zelle aus Abbildung 3.12 hatten ähnliche Membrankapazitäten (82 und 76 pF), d.h. sie hatten etwa die gleiche Größe. In beiden Messungen zeigten die Zellen gleiche Ruhepotenziale (ca. -80 mV). Dagegen depolarisierten die Zellen nach der Fotolyse von CDMNB-caged Capsaicin unterschiedlich stark. Die Zelle aus Abbildung 3.11 depolarisierte nur um 40 mV, das Neuron aus Abbildung 3.12 zeigte eine Potenzialänderung von 60 mV. Obwohl die Aktivierungsschwelle in beiden DRG-Neuronen bei etwa -60 mV lag, zeigte die Zelle mit mehr TRPV1-Kanälen (Abbildung 3.12) eine stärkere Depolarisierung, sowie niedrigere Amplituden und eine höhere Frequenz bei der Generierung von Aktionspotenzialen.

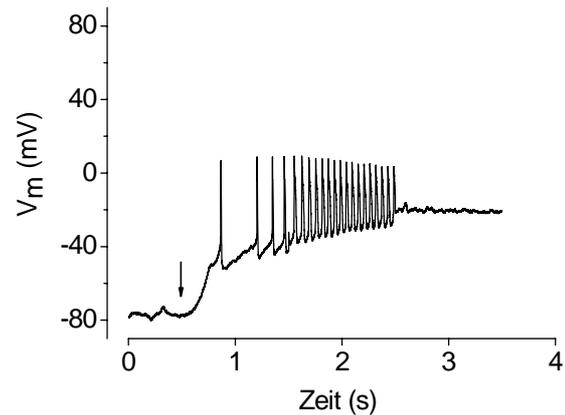


Abbildung 3.12: Stromklemme-Messung eines DRG-Neurons, das wahrscheinlich aufgrund einer größeren TRPV1-Kanaldichte, nach dem UV-Blitz (1 s, Pfeil) in Anwesenheit von 1 μ M Na-CDMNB-caged Capsaicin stärker depolarisiert und mehr Aktionspotenziale mit geringerer Amplitude generiert, als die Zelle in Abbildung 3.11.

3.2.4 Mehrfach-Aktivierungs-Experimente mit Na-CDMNB-caged Capsaicin

Über einige funktionelle Eigenschaften von Ionenkanälen kann man nur dann Aussagen machen, wenn die Kanäle einer Zelle wiederholt aktiviert werden. Zeitabhängige Phänomene, wie Sensitivierung und Desensitivierung, aber auch Ionenkanal-Modulationen durch zytosolische Faktoren, wie Proteinkinasen oder Ca^{2+} -Bindeproteine, benötigen unter Umständen wiederholte Aktivierung.

Um die Verwendbarkeit von Na-CDMNB-caged Capsaicin für derartige Untersuchungen zu testen, habe ich kultivierte Spinalganglienzellen in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin, dreimal in Abständen von fünf Minuten mit UV-Blitzen (1000 ms) belichtet und die Stromantworten für jeweils 60 Sekunden aufgezeichnet. Abbildung 3.13 zeigt, dass die Capsaicin-induzierten Ströme bei jedem Blitz kleiner wurden. Die Abnahme des Stroms kann auf die Desensitivierung des Capsaicin-Rezeptors zurückgeführt werden, die auch in der Literatur bereits ausführlich beschrieben wurde (z.B. Docherty et al., 1996 und Bhave et al., 2002).

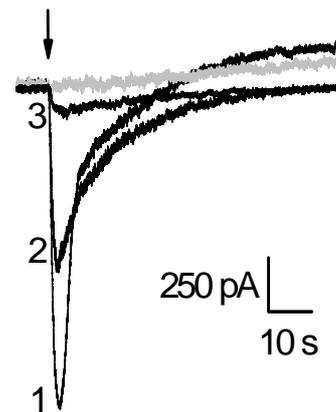


Abbildung 3.13: Wiederholte fotolytische Freisetzung von Capsaicin aus $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin führt zur Desensitivierung von Capsaicin-Rezeptoren. Das Intervall zwischen den Blitzen betrug 5 Minuten. Spannungsklemme-Aufnahmen bei -70 mV .

3.2.5 Verwendung von caged Capsaicin für kinetische Untersuchungen

Der Hauptvorteil der Capsaicin-Applikation durch Fotolyse besteht darin, dass die schnelle Freisetzung kinetische Untersuchungen im Millisekunden-Bereich zulässt. Um die Verwendbarkeit von Na-CDMNB-caged Capsaicin für solche Versuche zu testen, habe ich Capsaicin, durch Wahl unterschiedlicher Belichtungszeiten, in verschiedenen Konzentrationen aus $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin, freigesetzt. Abbildung 3.14 zeigt ein Spannungsklemme-Experiment (bei -70 mV), während der Freisetzung von Capsaicin durch einen 50 ms-Blitz. Die Stromänderung setzt mit einer Verzögerung, Δt , von 105 ms ein, was auf eine Diffusionsbarriere zwischen Ort der Freisetzung und Capsaicin-Bindestelle schließen lässt (siehe Diskussion).

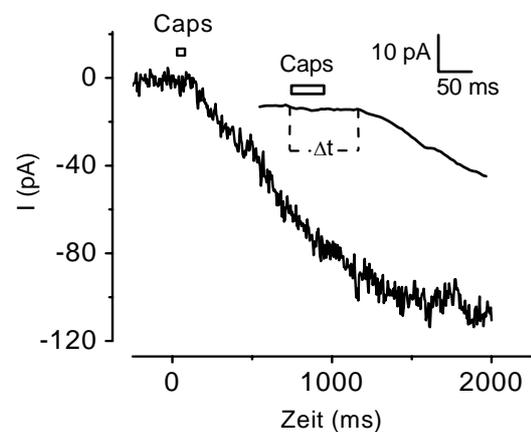
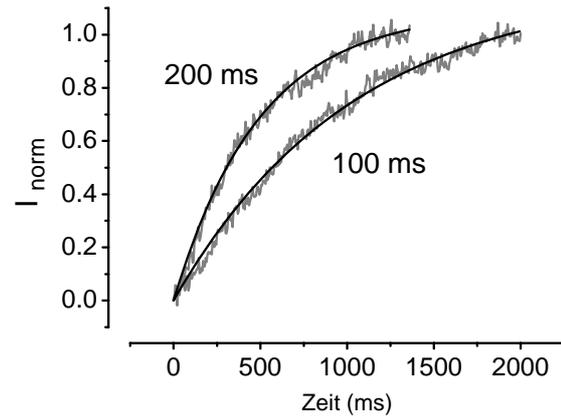


Abbildung 3.14: Strom-Messung bei -70 mV eines DRG-Neurons nach fotolytischer Freisetzung von Capsaicin aus $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin, ausgelöst durch einen 50-ms UV-Blitz. Die vergrößerte Darstellung des Capsaicin-induzierten Stroms veranschaulicht die Verzögerung, Δt , der Stromantwort.

Bei diesen Versuchen haben die Zellen im Mittel nach einer Verzögerung, Δt , von 124 ± 58 ms ($n = 15$) reagiert. Nach der Aktivierung folgte der Einwärtsstrom einem mono-exponentiellen Verlauf. Für die kinetische Analyse des Zeitverlaufs wurden alle Ströme auf einen Sättigungsstrom normalisiert, der durch einen 2-sekündigen UV-Blitz induziert wurde. Abbildung 3.15 zeigt normalisierte Ströme, gemessen in bei -70 mV, ausgelöst durch Blitze von 100 ms und 200 ms Dauer. Beide Messungen wurden mit



unterschiedlichen Zellen durchgeführt. Die in Abbildung 3.16 dargestellten Zeitkonstanten τ , wurden durch exponentielle Kurvenfits, mit der Formel $I(t) = I_{\max}(1 - e^{-t/\tau})$ errechnet und

variierten mit zunehmender Belichtungsdauer zwischen 600 ms und 1100 ms. Je länger die UV-Blitze waren, desto kleiner wurde die Zeitkonstante τ . Die Messwerte in Abbildung 3.49 wurden aus Experimenten (Spannungskl. bei -70 mV) mit insgesamt 8 DRG-Neuronen erhalten.

Die Abhängigkeit zwischen Belichtungsdauer und Zeitkonstante τ ist auf unterschiedliche Capsaicin-Konzentrationen zurückzuführen, die durch verschieden lange UV-Blitze aus $1 \mu\text{M}$ Na-CDMNB-caged Capsaicin freigesetzt wurden. Höhere Capsaicin-Konzentrationen bedingen eine schnellere Zunahme

des makroskopischen Stroms, genauso wie es die Bindungs-Kinetik Liganden-gesteuerter Ionenkanäle erwarten lässt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Na-CDMNB-caged Capsaicin

Abbildung 3.15: Abhängigkeit der TRPV1-Aktivierungskinetik von der Belichtungsdauer. Längere Blitze verursachen eine schnellere Zunahme des normalisierten Stromes, was die Konzentrationsabhängige Antwortkinetik von TRPV1 widerspiegelt.

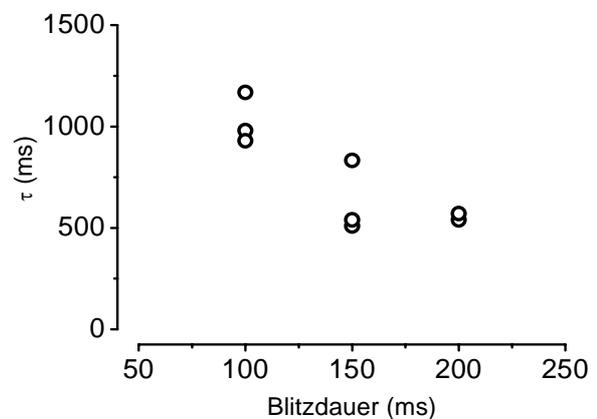


Abbildung 3.16: Der Zeitverlauf der Stromzunahme nach fotolytischer Capsaicin-Freisetzung wird durch die Zerfallsrate τ charakterisiert. Sie wird bei zunehmender Dauer des UV-Blitzes kleiner. Diese Ergebnisse zeigen, dass Na-CDMNB-caged Capsaicin für kinetische Untersuchungen Capsaicin-aktivierter Ionenkanäle geeignet ist.

für Untersuchungen kinetischer Details bei der Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren geeignet ist.

3.2.6 Vergleich zwischen Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Substanz DMNB-caged Capsaicin synthetisiert (Zemelman et al. 2003). Um den Vorteil von Na-CDMNB-caged Capsaicin gegenüber DMNB-caged Capsaicin, für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen zu demonstrieren, habe ich mit beiden Substanzen Ganzzell-Patch-Clamp-Vergleichsexperimente in der Spannungsklemme durchgeführt. Abbildung 3.17 zeigt die Stromantworten von insgesamt vier DRG-Neuronen bei der fotolytischen Aktivierung mit DMNB-caged Capsaicin (grau) und mit Na-CDMNB-caged Capsaicin (schwarz). Der Pfeil markiert den Beginn des 5 Sekunden andauernden UV-Blitzes. Die Dauerbelichtung

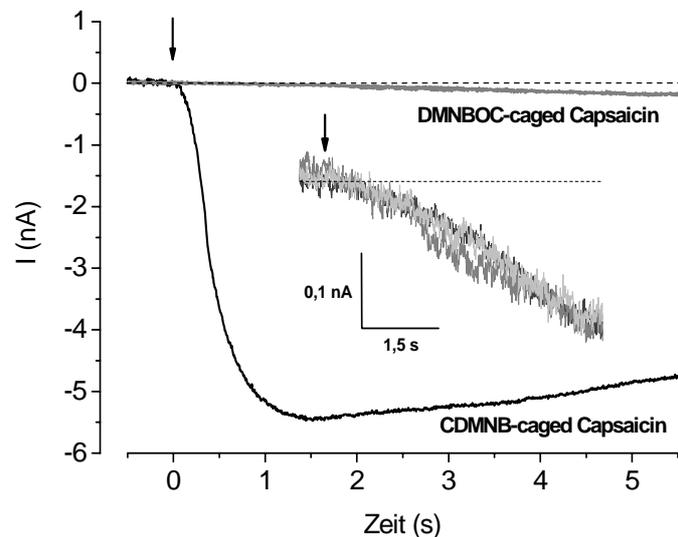


Abbildung 3.17: Vergleich Capsaicin-induzierter Ströme nach fotolytischer Freisetzung von Capsaicin aus Na-CDMNB-caged Capsaicin und DMNB-caged Capsaicin. Die Experimente wurden in der Spannungsklemme, bei -70 mV, in Anwesenheit von 5 μ M Na-CDMNB-caged Capsaicin (schwarze Spur, $n = 1$) und 5 μ M DMNB-caged Capsaicin (grau, $n = 3$), durchgeführt. Die fotolytische Freisetzung von Capsaicin wurde durch 5-sekündige UV-Blitze (Pfeile) ausgelöst und führte in Anwesenheit von Na-CDMNB-caged Capsaicin zu einer raschen (~ 50 ms) und starken ($\sim 5,5$ nA) Aktivierung von TRPV1, in Anwesenheit von 5 μ M DMNB-caged Capsaicin zu einer verzögerten (>1 s) Aktivierung mit geringer Amplitude ($\sim 0,2$ nA). Die vergrößerte Darstellung des Stromes verdeutlicht den Zeitverlauf der Stromzunahme nach Capsaicin-Freisetzung aus DMNB-caged Capsaicin.

mit UV-Licht hat die Stromantworten der Zellen nicht beeinflusst. Die Experimente wurden bei -70 mV durchgeführt. In Anwesenheit von 5 μ M DMNB-caged Capsaicin nahm der Strom nur sehr langsam zu (>1 s) und erreichte nach etwa 4,5 Sekunden ein Maximum von $\sim 0,2$ nA, wogegen TRPV1-Kanäle durch fotolytische Freisetzung von Capsaicin aus CDMNB-caged Capsaicin bereits nach ~ 50 ms aktiviert wurden und einen starken Einwärtsstrom leiteten ($\sim 5,5$ nA). Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass DMNB-

caged Capsaicin für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen nicht geeignet ist, Na-CDMNB-caged Capsaicin dagegen schon.

3.3 Ca²⁺-Imaging mit IB₄-gefärbten DRG-Neuronen und Capsaicin

Bei den im letzten Kapitel gezeigten Experimenten reagierten von insgesamt 70 Zellen nur etwa ein Drittel (20 Zellen, ~28%) mit Capsaicin-induzierten Strom- bzw. Spannungsänderungen. In zwei Dritteln der Fälle wurden demnach die falschen-, TRPV1-negativen DRG-Neurone für das Patch-Clamp-Experiment ausgesucht. Um Patch-Clamp-Experiment mit kultivierten DRG-Neuronen effektiver durchführen zu können, wäre daher ein Marker hilfreich, mit dem gezielt TRPV1-exprimierende Zellen selektiert werden können. Antikörperfärbungen sind dafür nicht geeignet, da sie mit fixierten und abgestorbenen Zellen durchgeführt werden. Für physiologische Untersuchungen müssen die Neurone vital sein. Ein Beispiel für einen Marker, der auch mit funktionellen Neuronen verwendet werden kann, ist das Pflanzenlektin Isolektin B₄ (IB₄). Allerdings ist noch nicht hinreichend geklärt, inwieweit die IB₄-Selektivität zur funktionellen Unterscheidung somatosensorischer Neurone genutzt werden kann. In der Literatur findet man z.B. Hinweise darauf, dass IB₄-bindende DRG-Neurone von Mäusen schwächere Capsaicin-Antworten zeigen, als Neurone, die sich nicht mit dem Pflanzenlektin anfärben lassen (Dirajlal et al., 2003). Dagegen wurden bei Experimenten mit kultivierten DRG-Neuronen der Ratte stärkere Capsaicin-Antworten in der IB₄-bindenden Subpopulation beobachtet (Petruska et al., 2000). Trotz der Unsicherheit über die funktionelle Rolle der IB₄-positiven Subpopulation wird das Pflanzenlektin in der Schmerzforschung häufig zur Charakterisierung kultivierter DRG-Neurone verwendet. Wie mit den Antikörperfärbungen in Abschnitt 3.1.4 gezeigt wurde, exprimieren 41% der kleinen (<30 µm) und mittelgroßen (30 ≤ 45 µm), kultivierten somatosensorischen Neurone der Ratte TRPV1-Kanäle. Um den Anteil IB₄-bindender DRG-Neurone an der TRPV1-exprimierenden Population zu bestimmen, habe ich mit IB₄-gefärbten Spinalganglienzellen Ca²⁺-Imaging durchgeführt. Dazu wurden Primärkulturen somatosensorischer Neurone von Ratten zunächst wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben mit TRITC-markiertem IB₄ gefärbt und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM beladen (siehe Abschnitt 2.7.3). Die IB₄-Färbung wurde fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, wie spezifisch das Pflanzenlektin die TRPV1-exprimierende

Population anfärbt und ob IB₄ als Werkzeug zum Identifizieren kultivierter, Capsaicin-sensitiver DRG-Neurone für Patch-Clamp-Experimente geeignet ist. Um TRPV1-exprimierende Neurone sichtbar zu machen, wurden von den Fluo-4 AM beladenen Zellen zwei Bilder aufgenommen. Ein Bild vor, und ein Bild nach der Zugabe von 10 μM Capsaicin (Endkonzentration). Bei Capsaicin-sensitiven Zellen führt die Aktivierung des Capsaicin-Rezeptors zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und äußert sich in einer Zunahme der Fluo 4-Fluoreszenzintensität. Durch Subtraktion

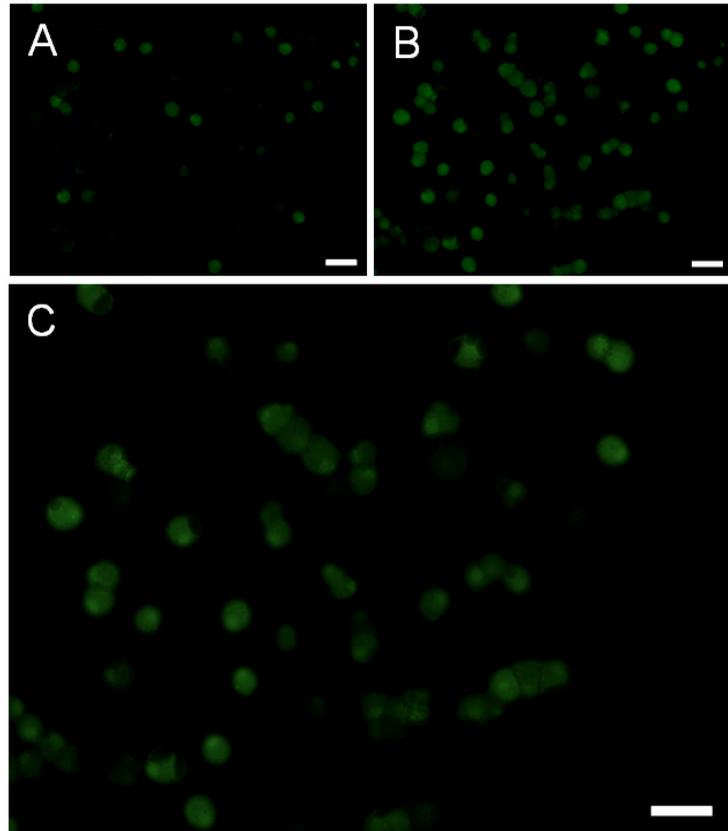


Abbildung 3.18: Ca^{2+} -Imaging mit Fluo 4-AM-beladenen DRG-Neuronen. (A) vor, (B) nach der Zugabe von 10 μM Capsaicin (Endkonzentration). Im Differenzbild (C) sind nur noch Zellen zu erkennen, die auf die Capsaicin Zugabe mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. reagierten. Balken: 50 μm .

der beiden Fluoreszenzbilder erhält man ein Differenzbild, in dem die Änderung der Fluoreszenz-Intensität verdeutlicht dargestellt ist. In Abbildung 3.18 ist ein solches Differenzbild gezeigt. In dem Bild sind TRPV1-positive C- und A δ -Faser DRG-Neurone zu erkennen. Für die Analyse der Verteilung Capsaicin-sensitiver Zellen in den verwendeten Kulturen wurden ausschließlich Differenzbilder verwendet. Fluo 4-Differenzbild und das Fluoreszenzbild der IB₄-Färbung wurden mit einem DIC-Durchlichtbild überlagert und die resultierenden Überlagerungsbilder anschließend mit der eigens für diesen Zweck entwickelten Software StatBuddy[®] analysiert.

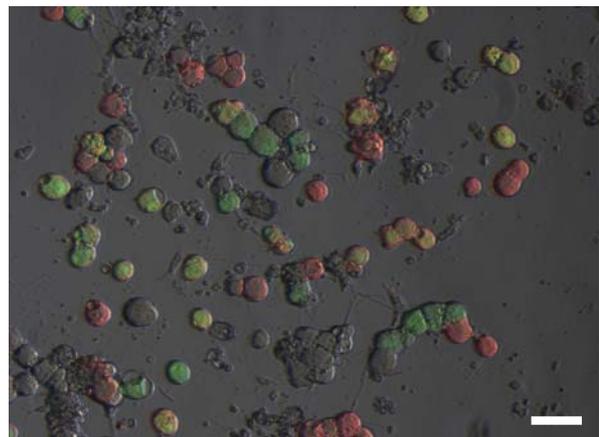


Abbildung 3.19: Überlagerung einer DIC-Durchlichtaufnahme, mit Fluo 4- und IB₄-Fluoreszenzbildern. Diese Bilder wurden mit der Software StatBuddy[®] analysiert. Balken: 50 μm .

siert. In Abbildung 3.19 ist ein Überlagerungsbild dargestellt. Grün eingefärbte Zellen haben auf die Zugabe von Capsaicin mit einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reagiert. Rote Zellen waren IB_4 -positiv, sie wurden mit TRITC-markiertem IB_4 angefärbt. Neurone, die sowohl IB_4 gebunden hatten als auch TRPV1 exprimierten, erscheinen gelb-orange. Transparente Zellen waren für beide Marker negativ. Abbildung 3.20 zeigt die Größenverteilungen (Gauss-Fits) der verschiedenen Subpopulationen. Man sieht bei allen vier Kategorien die gleiche Verteilung mit einer mittleren Größe von etwa $26 \mu\text{m}$. In insgesamt 19 überlagerten Bildern wurden 1010 Zellen ausgewertet. Davon waren 198 Zellen ($\sim 20\%$) sowohl IB_4 -positiv, als auch Capsaicin-sensitiv. Die meisten Zellen ($n = 400$, $\sim 40\%$) waren IB_4 -positiv aber nicht Capsaicin-sensitiv. Als IB_4 -negativ und Capsaicin-sensitiv konnten 163 Neurone ($\sim 16\%$) identifiziert werden, und 249 Zellen ($\sim 24\%$) waren für beide Marker negativ. Abbildung 3.21 stellt die Schnittmengen der verschiedenen Subpopulationen in einem Kuchen-

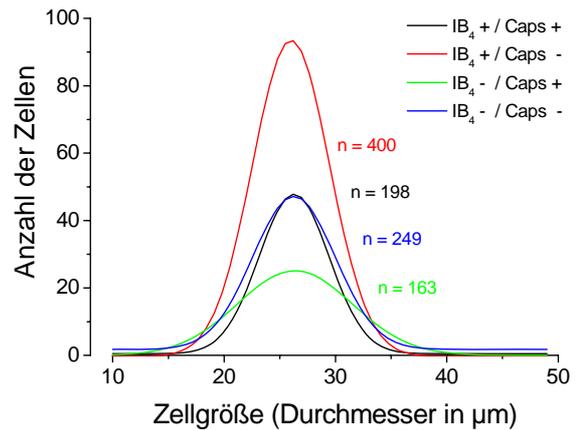


Abbildung 3.20: Gauss-Verteilungen der Zellgrößen (Durchmesser) verschiedener Subpopulationen kultivierter DRG-Neurone. Alle vier Subpopulationen zeigen ähnliche Verteilungen, ihre Zellgrößen lagen im Mittel bei $26 \mu\text{m}$. Schwarz ($\text{IB}_4 + / \text{Caps} +$): $26,28 \pm 0,09 \mu\text{m}$, $n = 198$; rot ($\text{IB}_4 + / \text{Caps} -$): $26,01 \pm 0,18 \mu\text{m}$, $n = 400$; grün ($\text{IB}_4 - / \text{Caps} +$): $26,36 \pm 0,37 \mu\text{m}$, $n = 163$; blau ($\text{IB}_4 - / \text{Caps} -$): $26,27 \pm 0,28 \mu\text{m}$, $n = 249$. Eine Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen durch die Zellgröße ist daher nicht möglich.

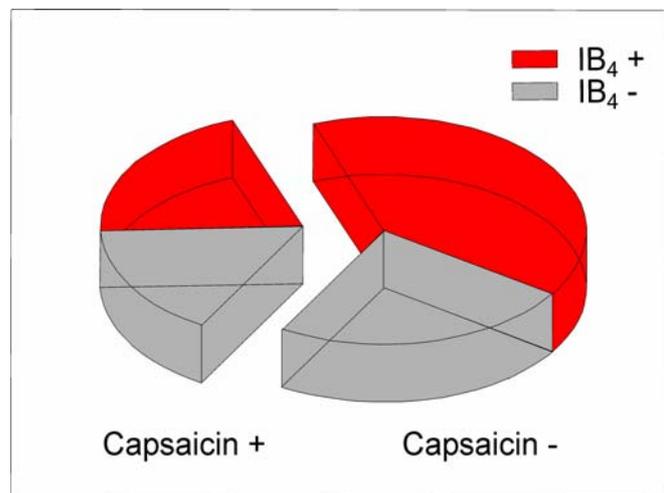


Abbildung 3.21: Das Kuchen- und Kuchendiagramm stellt die Schnittmengen der verschiedenen Subpopulationen kultivierter DRG-Neuronen dar. Etwa die Hälfte der Capsaicin-sensitiven Neurone war auch IB_4 -positiv. Den größten Anteil machten Capsaicin-insensitive Neurone aus, von ihnen ließ sich nur etwa ein Drittel der Zellen mit dem Pflanzenlektin anfärben.

auf die Zugabe von 5 μM Capsaicin, von denen waren die meisten Zellen IB₄-positiv (~62%) und nur etwa ein Drittel (~38%) IB₄-negativ. Insgesamt überwiegt der Anzahl IB₄-positiver Zellen mit einem Anteil von etwa ~60%. IB₄-negative Neurone machen einen Anteil von ungefähr 40% aus. Die statistische Analyse ergab, dass etwa die Hälfte der Capsaicin-sensitiven Neurone eine IB₄-Spezifität aufwies. Dieser Wert entspricht annähernd dem Gesamtanteil Capsaicin-positiver Zellen in den verwendeten Kulturen. Diese Ergebnisse zeigen demnach, dass weder die IB₄-Färbung noch die Zellgröße bei der Suche nach TRPV1-positiven DRG-Neuronen für Patch-Clamp-Experimente hilfreich sind. Neben der Verteilungsanalyse sollte mit den Färbeexperimenten untersucht werden, ob die Funktionalität der Neurone durch eine IB₄-Behandlung beeinflusst wird. Da viele IB₄-gefärbte Zellen eine Capsaicin-induzierte TRPV1-Aktivierung zeigten, konnte eine Beeinflussung der Funktionalität durch die Substanz ausgeschlossen werden und das Pflanzenlektin für verschiedene funktionelle Experimente verwendet werden.

3.4 Capsaicin-induzierte Cl⁻-Ströme in DRG-Neuronen

Die Antikörperfärbungen aus Abschnitt 3.1.4 und Ca²⁺-Imaging-Experimente (Abschnitt 3.3) ergaben, dass 36 - 41% der kleinen (<30 μm) und mittelgroßen (30 \leq 45 μm) somatosensorischen Neurone der Ratte TRPV1-Kanäle exprimieren. 45 - 90% aller DRG-Neurone exprimieren Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle (Bader et al., 1987; Currie et al., 1995; Kenyon, 2000; Scott et al., 1988; Stapleton et al., 1994). Vom statistischen Standpunkt aus betrachtet ist es möglich, dass TRPV1- und Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle in manchen DRG-Neuronen gemeinsam exprimiert werden und der Rezeptorstrom in diesen Zellen durch Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Ströme verstärkt wird. Bei den Patch-Clamp-Experimenten in Abschnitt 3.2 fiel eine große Varianz der Stromdichten auf (4,5 - 52,5 pA/pF), die auf die Heterogenität der TRPV1-Expression zurückgeführt wurde. Allerdings ist ebenso denkbar, dass der Rezeptorstrom in Zellen mit hohen Stromdichten durch Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Ströme verstärkt wurde. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob TRPV1-Kanäle und Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle in DRG-Neuronen gemeinsam exprimiert werden und bei der Entstehung somatosensorischer Signale kooperieren, habe ich Capsaicin-induzierte, auswärtsgerichtete Cl⁻-Ströme in DRG-Neuronen in Cl⁻-Imaging-Experimenten und elektropysiologisch untersucht.

3.4.1 Cl⁻-Imaging mit kultivierten CLM-1-DRG-Neuronen

Neben der von uns angenommenen funktionellen Kopplung von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen mit TRPV1-Kanälen, könnten Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle auch von DRG-Neuronen anderer Modalitäten exprimiert werden. Cl⁻-Imaging ist eine geeignete Methode, viele Zellen in kurzer Zeit auf die Expression Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle zu untersuchen, und eine Verknüpfung dieser Kanäle an eine bestimmte Sinnesmodalität zu identifizieren. Beim Cl⁻-Imaging werden Zellen mit einem Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff ausgestattet, mit verschiedenen Substanzen (wie z.B. Capsaicin) stimuliert, und Änderungen der intrazellulären Cl⁻-Konzentration mit Hilfe der Fluoreszenzintensität untersucht. Der ratiometrische Cl⁻-Indikator Clomeleon (CLM) ist ein geeignetes Werkzeug, um Änderungen der intrazellulären Cl⁻-Konzentration fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Dies wurde an Hippokampus-Neuronen von Mäusen nachgewiesen (Kuner et al., 2000). Für Cl⁻-Imaging-Experimente standen mir vier verschiedene transgene Mauslinien (CLM-1, -11, -12 und -13) zur Verfügung, unter denen zunächst eine für Cl⁻-Imaging mit Schmerzzenellen geeignete Linie identifiziert werden musste. Die Mauslinie CLM-1 hat sich bei diesen Untersuchungen als nützlich erwiesen. Nach welchen Kriterien diese Mauslinie identifiziert wurde, ist in Abschnitt 3.7 gezeigt. Beim Cl⁻-Imaging mit kultivierten CLM-1-DRG-Neuronen wurde von den Neuronen vor und nach der Applikation von 1 µM Capsaicin ein Fluoreszenzbild aufgenommen und die Capsaicin-induzierte Änderung der [Cl⁻]_i mit Hilfe von Fluoreszenz-Differenzbildern (wie in Abschnitt 3.3) dargestellt. Abbildung 3.22 zeigt ein Differenzbild, das mit einem Nomarski DIC-Durchlichtbild überlagert wurde. Bei diesem Experiment reagierte ein kleines DRG-Neuron (Ø ~30 µm) auf die Zugabe von 1 µM Capsaicin. Bezogen auf die Grundfluoreszenz (in Abwesenheit von Capsaicin) nahm die Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von 1 µM Capsaicin um etwa 20% zu. Diese

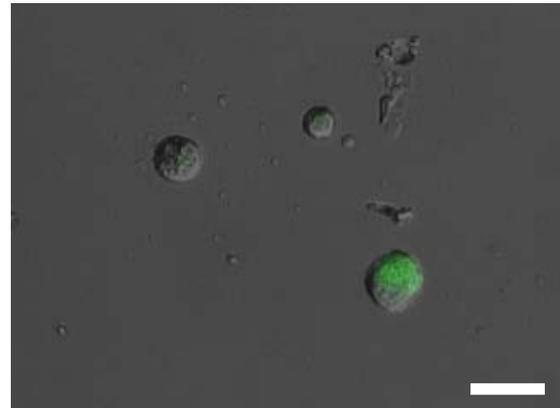


Abbildung 3.22: Überlagerung von Nomarski DIC-Bild (*Differential Interference Contrast*) einer CLM-1-Primärkultur und einem Fluoreszenz-Differenzbild. Eine mittelgroße Zelle reagierte auf die Zugabe von 1 µM Capsaicin mit einem Ausstrom von Cl⁻-Ionen. Dieses Resultat ist ein Hinweis darauf, dass Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle und TRPV1-Kanäle in manchen DRG-Neuronen gemeinsam exprimiert werden und bei der Entstehung somatosensorischer Signale kooperieren. Balken: 50 µm.

Beobachtung weist darauf hin, dass der Capsaicin-induzierte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle führte, die einen auswärtsgerichteten Cl^- -Strom leiteten und die Änderung der intrazellulären Cl^- -Konzentration bewirkten. Dieses vorläufige Ergebnis lässt darauf schließen, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle und TRPV1-Kanäle in manchen DRG-Neuronen gemeinsam exprimiert werden und bei der Entstehung somatosensorischer Signale kooperieren. Das Experiment konnte im Rahmen meiner Arbeit leider nicht wiederholt werden, da mir nach der Durchführung des oben gezeigten Experiments keine CLM-1-Mäuse mehr zur Verfügung standen.

3.4.2 NFA-sensitive, Capsaicin induzierte Cl^- -Ströme in DRG-Neuronen

Das in Abschnitt 3.4.1 gezeigte vorläufige Ergebnis konnte nicht reproduziert werden. Es kann daher nur als Hinweis auf eine Co-Expression von TRPV1-Kanälen und Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen in DRG-Neuronen der Ratte dienen. Um das Ergebnis zu bestätigen, habe ich in Capsaicin-Perfusions-Experimenten mit kultivierten DRG-Neuronen der Ratte den Cl^- -Kanalblocker Nifluminsäure (NFA, Niflumic Acid) verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben, mit TRITC-markiertem IB_4 gefärbt. Für die Messung Capsaicin-induzierter Cl^- -Ströme wurden ausschließlich IB_4 -positive DRG-Neurone verwendet. In 8 (32%) von insgesamt 25 DRG-Neuronen konnten NFA-sensitive Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme gemessen werden. Abbildung 3.23 zeigt die Stromantworten von zwei DRG-Neuronen bei der Aktivierung von TRPV1-Kanälen mit $1 \mu\text{M}$ Capsaicin. In beiden Zellen führte die Aktivierung mit Capsaicin (25 s) zu einem starken ($\sim 5 \text{ nA}$) Einstrom. Wurde die Zelle während der Capsaicin-Applikation zusätzlich mit $500 \mu\text{M}$ NFA perfundiert (5 s), reduzierte sich der Capsaicin-induzierte Strom im hier

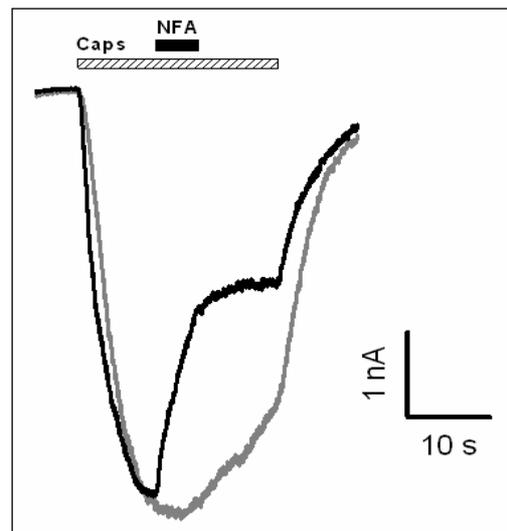


Abbildung 3.23: Strommessungen bei -70 mV mit zwei DRG-Neuronen, während der Applikation von Capsaicin ($1 \mu\text{M}$, 25 s), in Abwesenheit (grau) und in Anwesenheit (schwarz) von Nifluminsäure (NFA, $500 \mu\text{M}$, 5 s). NFA bedingt eine schnelle Reduktion ($\sim 50\%$) des Capsaicin-induzierten Stroms.

gezeigten Experiment um etwa 50%. Bei anderen DRG-Neuronen führte die zusätzliche NFA-Perfusion zu mehr oder weniger starken Block-Effekten (6 - 50 %).

3.4.3 NFA-Sensitivität von TRPV1-Kanälen

Um sicherzustellen, dass die NFA-abhängige Reduktion des Capsaicin-induzierten Stromes auf einen Block Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle zurückzuführen war, und nicht auf einer Interaktion der Nifluminsäure mit TRPV1-Kanälen beruhte, wurde der Versuch mit HEK293-Zellen, die Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle nicht exprimieren, wiederholt. Dazu wurden HEK-293-Zellen zunächst mit TRPV1 transient transfiziert (siehe Abschnitt 2.11.3) und die Capsaicin-induzierten Strom-

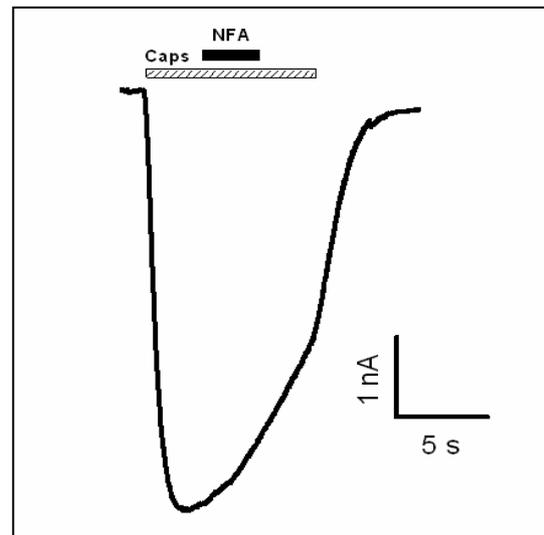


Abbildung. 3.24: Strommessung bei -50 mV mit einer HEK-293-Zelle. Die Zelle wurde zuvor mit TRPV1 transient transfiziert. In Anwesenheit von 1 μM Capsaicin (9 s) reagierte die Zellen mit einem starken Kationen-Einstrom (~ 6 nA), der sich bei zusätzlicher Perfusion mit 500 μM Nifluminsäure (NFA, 3 s) nicht änderte.

daher ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle und Capsaicin-Rezeptoren in manchen DRG-Neuronen gemeinsam exprimiert werden und bei der Entstehung somatosensorischer Signale kooperieren.

3.5 2P-FLIM-Messung der $[\text{Cl}^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen der Maus

Die Ergebnisse des letzten Abschnitts liefern Hinweise auf eine funktionelle Kopplung von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen mit TRPV1-Kanälen bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalentstehung in DRG-Neuronen. In manchen Schmerzzellen wird der Rezeptorstrom also möglicherweise durch Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme verstärkt. Die Frage, wie groß der Anteil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms am Rezeptorstrom ist, d.h. wie groß der Grad der Signalverstärkung ist, konnte mit diesen Experimenten nicht beantwortet werden.

Allerdings ließen sich die Capsaicin-induzierten Cl^- -Ströme in den verschiedenen Neuronen mit variierender Effizienz durch Nifluminsäure blockieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Grad der Signalverstärkung in den einzelnen Neuronen unterschiedlich ist. Die Triebkraft für den auswärtsgerichteten Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom wird durch den elektrochemischen Cl^- -Gradienten- und daher durch die intrazelluläre Cl^- -Konzentration bestimmt. Die unterschiedlichen NFA-Block-Effekte könnten demnach auf variierende intrazelluläre Cl^- -Konzentration in den verschiedenen DRG-Neuronen zurückzuführen sein. Es wurde zwar postuliert, dass alle somatosensorischen Neurone eine gleichmäßig hohe $[\text{Cl}^-]_i$ von etwa 30 mM haben, allerdings ist es möglich, dass die Anzahl der untersuchten Neurone in den genannten Arbeiten nicht repräsentativ war und dadurch ein falsches Bild über den Cl^- -Haushalt somatosensorischer Neurone entstand. Um eine repräsentative Datenlage zu erarbeiten, und um Hypothese der variierenden intrazellulären Cl^- -Konzentrationen zu testen, habe ich die $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Neurone durch 2P-FLIM mit dem Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MQAE bestimmt. Diese Messungen wurden zunächst nur an kultivierten DRG-Neuronen durchgeführt.

3.5.1 Kalibrierung der Fluoreszenz-Lebenszeit an Mäuse-Spinalganglienzellen

Damit gemessene MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten in Cl^- -Konzentrationen umgerechnet werden konnten, mussten sie zunächst auf verschiedene Cl^- -Konzentrationen geeicht werden. Dazu wurde die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in kultivierten, somatosensorischen Neuronen (siehe Abschnitt 2.3) in Lösungen unterschiedlicher $[\text{Cl}^-]$ gemessen.

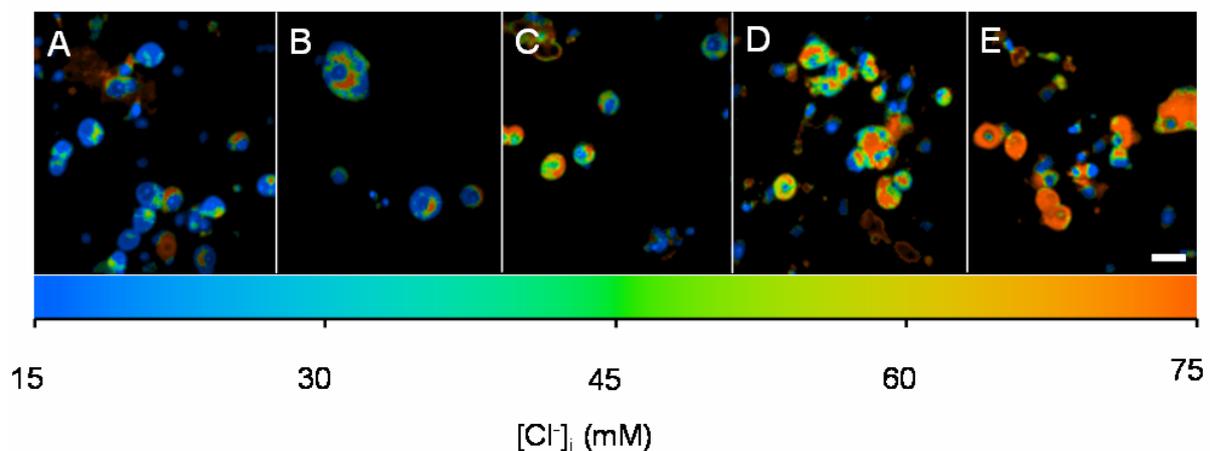


Abbildung 3.25: Messung der Fluoreszenz-Lebenszeiten kultivierter somatosensorischer Neurone, bei der Kalibrierung mit Lösungen verschiedener Cl^- -Konzentrationen. (A) 15 mM, (B) 30 mM, (C) 45 mM, (D) 60 mM und (E) 75 mM. Balken: 20 μm

Da die Zellmembran eine Cl^- -impermeable Barriere zwischen Badlösung und Zytosol darstellt, wurden Fluoreszenz-Lebenszeit und $[\text{Cl}^-]_i$ mit einer Doppel-Ionophor-Strategie geeicht (Chao et al., 1989). Die Zellen wurden nach dem Beladen mit MQAE (siehe Abschnitt 2.10.1) für 20 min in einer von fünf Eichlösungen inkubiert, die 40 mM Tributylzinn und 20 mM Nigericin enthielten (Abschnitt 2.10.1). Für die Bestimmung der Zeitkonstanten τ , für verschiedene Chlorid-Konzentrationen wurden die in Abbildung 3.25 gezeigten Falschfarben-kodierten Bilder mit der Software Roi2Tau[®] analysiert und die Fluoreszenz-Lebenszeiten der Zellen gemittelt. In Abbildung 3.26 sind die errechneten τ -Mittelwerte gegen die verschiedenen Cl^- -Konzentrationen aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert (15 mM: 3.73 ± 0.17 ns, $n = 16$; 30 mM: 3.66 ± 0.09 ns, $n = 4$; 45 mM: 3.45 ± 0.14 ns, $n = 5$; 60 mM: 3.43 ± 0.07 ns, $n = 13$; 75 mM: 3.14 ± 0.13 ns, $n = 10$). Die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit für 0 mM $[\text{Cl}^-]_i$ (τ_0), konnte experimentell nicht ermittelt werden, da die DRG-Neurone in Cl^- -freier Lösung nur einige Minuten überlebt haben. Aus diesem Grund wurde τ_0 durch Extrapolieren auf 0 mM $[\text{Cl}^-]_i$, aus der mono-exponentiellen Funktion in Abbildung 3.26 bestimmt. τ_0 (0 mM $[\text{Cl}^-]_i$) betrug 3,94 ns. Die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten für die verschiedenen $[\text{Cl}^-]_i$ wurden ebenfalls aus dem mono-exponentiellen Kurvenfit ermittelt (15 mM: 3.77 ns; 30 mM: 3.62 ns; 45 mM: 3.48

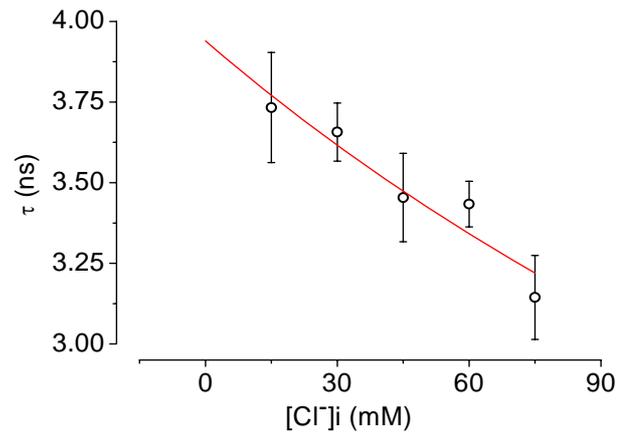


Abbildung 3.26: Eichung der MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten auf verschiedene $[\text{Cl}^-]_i$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert. Die τ -Werte für verschiedene $[\text{Cl}^-]_i$ wurden mit Hilfe eines monoexponentiellen Kurvenfits berechnet, die Fluoreszenz-Lebenszeit für 0 mM $[\text{Cl}^-]_i$ (τ_0), wurde durch Extrapolieren bestimmt.

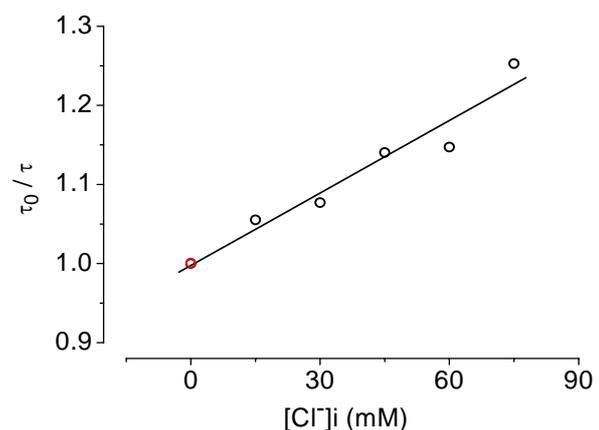


Abbildung 3.27: Die Stern-Volmer Konstante (K_{SV}) wurde im Stern-Volmer-Plot durch lineare Regression (schwarz) über die berechneten Messwerte (τ_0/τ) ermittelt. Da der Wert für τ_0 (0 mM $[\text{Cl}^-]_i$) durch Extrapolieren errechnet wurde ist er rot dargestellt. K_{SV} für MQAE betrug $3,05 \text{ M}^{-1}$.

ns; 60 mM: 3.34 ns; 75 mM: 3.22 ns). In dem in Abbildung 3.27 gezeigten Stern-Volmer-Plot wurde τ_0/τ gegen die Cl^- -Konzentrationen aufgetragen und die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) durch lineare Regression über die erhaltenen Messpunkte berechnet, sie betrug $3,05 \text{ M}^{-1}$.

Der Vergleich der K_{SV} von MQAE in wässriger Lösung und in Zellen [185 M^{-1} (Kaneko et al., 2002) gegenüber $6,8 \text{ M}^{-1}$] zeigt, dass die Sensitivität von MQAE gegenüber Cl^- in Zellen sehr viel geringer ist, als in Lösung. Für andere Zelltypen wurden ähnliche Werte ($K_{SV(\text{MQAE})} = 5\text{-}25 \text{ M}^{-1}$) gemessen (Lau et al., 1994; Bevensee et al., 1997; Maglova et al., 1998; Eberhardson et al., 2000; Kaneko et al., 2001). Vermutlich wurde die MQAE-Fluoreszenz in der Zelle durch andere Anionen, wie z.B. negativ geladene Proteine oder andere lösliche Anionen, bereits stark "gequencht" (Chao et al., 1989). Diese Annahme wird durch 2P-FLIM-Messungen mit somatosensorischen Neuronen (Kaneko et al., 2002) unterstützt, bei denen die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in Cl^- -freier Lösung (τ_0) von 28 ns in wässriger Lösung auf 6,7 ns in somatosensorischen Neuronen absank. Mit Hilfe der ermittelten Lebenszeit-Parameter ($\tau_0 = 3,34 \text{ ns}$; $K_{SV} = 3,05 \text{ M}^{-1}$), ließen sich durch Einsetzen der MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten in die Stern-Volmer-Gleichung ($[\text{Cl}^-]_i = (\tau_0/\tau - 1)/K_{SV}$) die intrazellulären Cl^- -Konzentrationen der DRG-Neurone errechnen.

3.5.2 2P-FLIM mit kultivierten Spinalganglienzellen der Maus

Für die 2P-FLIM-Messung wurden DRG-Neurone wie in Abschnitt 2.3 beschrieben aus einer adulten Maus präpariert, dissoziiert und kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mit MQAE beladen (siehe Abschnitt 2.10.1). Abbildung 3.28 zeigt Bilder einer Spinalganglienzellen-Kultur einen Tag nach der Präparation, in Ringer-Lösung

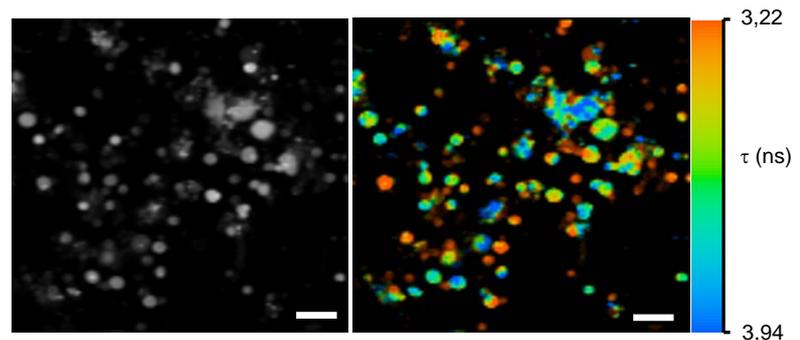


Abbildung 3.28: Bestimmung der $[\text{Cl}^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen mit der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung. Links: Zwei-Photonen-Aufnahme der MQAE-Fluoreszenz-Intensität, dissoziierter und kultivierter somatosensorischer Neurone, 24 Stunden nach der Präparation. Rechts: MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten der DRG-Neurone. Die Fluoreszenz-Lebenszeit τ (ns) ist in diesem Bild in Falschfarben kodiert. Die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in den verschiedenen Neuronen variierte deutlich. Balken: $50 \mu\text{m}$

(ES-1). Das linke Bild gibt die Fluoreszenz-Intensitäten von MQAE in den verschiedenen

Zellen wieder. Das rechte Bild stellt die Fluoreszenz-Lebenszeiten von MQAE in denselben Neuronen in Falschfarben dar. Wie im rechten Bild zu erkennen ist, unterschieden sich die Fluoreszenz-Lebenszeiten und damit die intrazellulären Cl^- -Konzentration der verschiedenen Neurone. Die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten der einzelnen DRG-Neurone wurden in mit Hilfe der von mir entwickelten Software Roi2Tau[®] analysiert. Ihre Werte variierten zwischen 3,08 – 3,76 ns (Mittelwert: $3,42 \pm 0,17$ ns (SD), 38

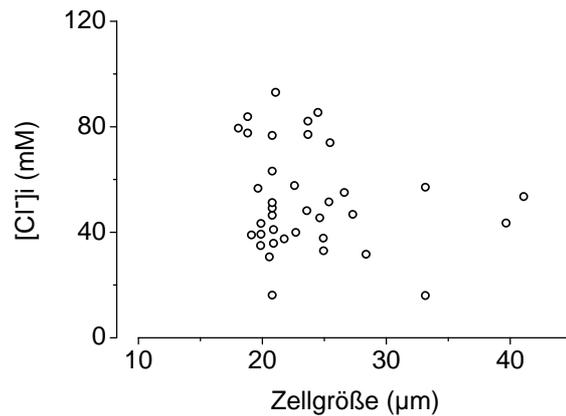


Abbildung 3.29: Korrelationsanalyse von $[\text{Cl}^-]_i$ und der Zellgröße. Mit 2P-FLIM wurde die $[\text{Cl}^-]_i$ in 38 kultivierten somatosensorischen Neuronen bestimmt (24 Stunden nach der Präparation). Die Verteilung der $[\text{Cl}^-]_i$ über den gesamten Größenbereich der Zellen lässt keine Korrelation von $[\text{Cl}^-]_i$ zur Zellgröße erkennen.

Zellen), die berechneten intrazellulären Cl^- -Konzentrationen lagen zwischen 16 mM - 93 mM (Mittelwert: $51,3 \pm 19,9$ mM). Um eine mögliche Korrelation zwischen $[\text{Cl}^-]_i$ und der Zellgröße zu identifizieren habe ich die intrazellulären Cl^- -Konzentrationen gegen die Zellgrößen aufgetragen (siehe Abbildung 3.29). Die Zellgröße variierte zwischen 18 - 47 μm (Mittelwert: $24,38 \pm 6,49$ μm). Wie in dem Graph aus Abbildung 3.29 zu erkennen ist, folgt die Verteilung der $[\text{Cl}^-]_i$ in Bezug auf die Zellgröße keiner erkennbaren Gesetzmäßigkeit. Die $[\text{Cl}^-]_i$ streut über den gesamten Größenbereich, weshalb eine Konzentrations-Größen-Korrelation nicht hergestellt werden konnte.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts bestätigen die Vermutung, dass die $[\text{Cl}^-]_i$ von DRG-Neuronen nicht wie postuliert in allen Zellen gleichmäßig hoch ist, sondern über einen großen Konzentrationsbereich verteilt ist. Die Hypothese dass der Anteil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms am Rezeptorstrom in den einzelnen Neuronen durch verschiedene intrazelluläre Cl^- -Konzentrationen variiert, wird durch diese Beobachtungen bekräftigt. Allerdings verlieren DRG-Neurone, die dem Ensemble des vitalen Gewebes entnommen wurden und in Primärkultur gehalten werden, möglicherweise durch präparativen Stress und artifizielle Kulturbedingungen ihre physiologische Funktion und zeigen pathologische Eigenschaften. Da die Ergebnisse dieses Abschnitts eventuell artifiziellen Effekten zuzuschreiben war, musste ich meine Messergebnisse überprüfen. Dazu habe ich die $[\text{Cl}^-]_i$ mit 2P-FLIM in intakten Spinalganglien, in Wirbelkörper-Präparationen gemessen.

3.5.3 Vitalitätstests mit Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen der Maus

Für 2P-FLIM-Experimente mussten die Wirbelkörper nach erfolgter Präparation für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur in MQAE-haltiger ES-1 inkubiert werden. Es war daher erforderlich, den Zustand des Gewebes zu überprüfen und die Vitalität der Spinalganglien, d.h. der darin beherbergten Neurone, nach Ablauf der Inkubationszeit nachzuweisen.

Die präparierten Wirbelkörper mit anhaftenden Spinalganglien (siehe Abschnitt 2.10.2) wurden dazu bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden in MQAE-freier ES-1 aufbewahrt und anschließend mit Trypan-Blau und MTT wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben, gefärbt. Abbildung 3.30 zeigt exemplarisch einen ungefärbten Wirbelkörper einer erwachsenen Maus, wie sie für 2P-FLIM-Messungen verwendet wurden. Muskelgewebe erscheint rosafarben. Knochengewebe und Rückenmark sind weißlich. Die Spinalganglien haben eine glasige Textur und sind beige-weiß.

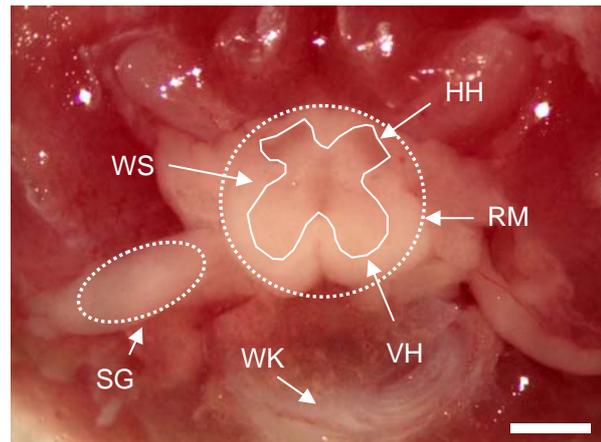


Abbildung 3.30: Wirbelkörper einer adulten Maus mit anhaftendem Spinalganglion. Für 2P-FLIM-Messungen wurden ausschließlich Präparate mit unverletzten Spinalganglien verwendet. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die verschiedenen Strukturen mit Linien nachgezeichnet. HH: Hinterhorn; RM: Rückenmark; VH: Vorderhorn; WK: Wirbelkörper; SG: Spinalganglion; WS: weiße Substanz. Balken: 1 mm.

3.5.4 Trypan-Blau-Färbungen

In Abbildung 3.31 sind Trypan-Blau-gefärbte Wirbelkörper 5 (A), und 24 Stunden (B) nach der Präparation gezeigt. In den hellen Bereichen (Spinalnerv, -ganglion und Rückenmark) in Bild (A) wurde der Farbstoff aus den Zellen exportiert. Dieses Gewebe wies noch Vitalfunktionen auf. Abgestorbene Muskelzellen sind durch ihre deutliche Blaufärbung zu erkennen. Das Gewebe in (B) erscheint insgesamt dunkler, die meisten Zellen in dieser Präparation waren nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit abgestorben. Während der langen Inkubationszeit hatte sich wahrscheinlich unter dem Bindegewebe Blut gesammelt, sodass die rote Farbe der Erythrozyten in Kombination mit der Trypan-Blau-Färbung die rötlich/violette Färbung ergab.

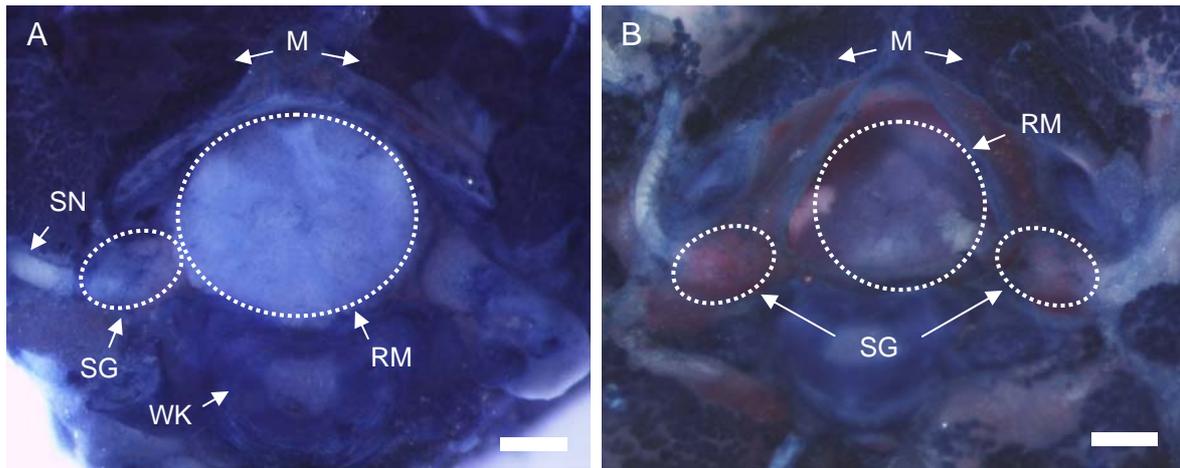


Abbildung 3.31: Vitalitätstest mit Wirbelkörpern adulter Mäuse. Trypan-Blau-Färbung. (A), fünf Stunden nach der Präparation waren die Zellen der Spinalganglien (SG) noch hell, wiesen demnach noch Vitalfunktionen auf. Der gesamte Wirbelkörper im rechten Bild (B) (24 Stunden nach der Präparation) erscheint dunkler, das Gewebe war größtenteils abgestorben. SN: Spinalnerv; M: Muskelgewebe; RM: Rückenmark; WK: Wirbelkörper. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die verschiedenen Strukturen mit gestrichelten Linien nachgezeichnet. Balken: 1 mm.

3.5.5 MTT-Färbungen

In Abbildung 3.32 sind MTT-behandelte Wirbelkörper adulter Mäuse, fünf (A), und 24 Stunden (B) nach der Präparation gezeigt. Das Gewebe in (A) weist im Bereich der *Substantia grisea* (graue Substanz) des Rückenmarks und in den Spinalganglien eine deutliche Violett-Färbung auf. In den Zellen dieser Gewebereiche wurde MTT durch mitochondriale Enzyme zu einem violetten und schwerlöslichen Tetrazoliumsalz reduziert. Diese Zellen waren nach Ablauf der fünfstündigen Inkubationszeit noch lebendig. Das Gewebe in (B) ist kaum gefärbt, die Zellen zeigten nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit keine Vitalfunktionen mehr. Solche Wirbelkörper wurden nicht für weitere Experimente verwendet.

Mit den beiden Methoden wurde ein Zeitfenster von maximal fünf Stunden bestimmt, in dem Spinalganglien-Neurone in Wirbelkörper-Präparationen mit 2P-FLIM untersucht werden konnten, ohne dass zu befürchten war, dass die Zellen in dem Gewebe bereits abgestorben waren.

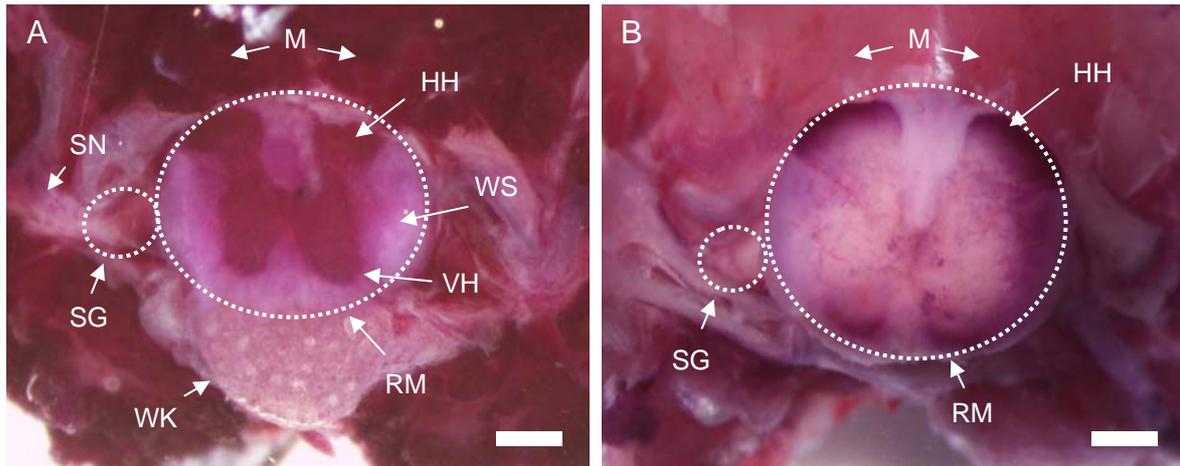


Abbildung 3.32: Vitalitätstest mit MTT. 5 Stunden nach der Präparation (A) wiesen die Zellen in den Spinalganglien (SG) eine deutliche Violett-Färbung auf, waren demnach noch vital. Im rechten Bild (B, 24 Stunden n.P.) waren die Zellen bereits abgestorben und wurden aus diesem Grund nur schwach durch das Tetrazoliumsalz gefärbt. SN: Spinalnerv; M: Muskelgewebe; HH: Hinterhorn; WS: weiße Substanz; VH: Vorderhorn; RM: Rückenmark; WK: Wirbelkörper. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die verschiedenen Strukturen mit gestrichelten Linien nachgezeichnet. Balken: 1 mm.

3.5.6 2P-FLIM mit Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen adulter Mäuse

Für 2P-FLIM-Messungen mit Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen wurden zunächst, wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben, Wirbelkörper aus adulten NMRI-Mäusen (Alter ~3 Monate) präpariert und mit MQAE beladen. Abbildung 3.33 zeigt Bilder einer 2P-FLIM-Messung eines Spinalganglions in einer Wirbelkörper-Präparation, etwa 4 Stunden nach der Präparation. Das linke Bild gibt die Fluoreszenz-Intensitäten von MQAE in den verschiedenen Zellen wieder. Das rechte Bild stellt die Fluoreszenz-Lebenszeiten von MQAE in denselben Neuronen in Falschfarben dar. Die Aufnahme wurde in 25 μm Tiefe, von der äußersten Begrenzung (*Dura mata*) des Spinalganglions aus betrachtet, aufgenommen. Die $[\text{Cl}]_i$ der Einzelzellen wurden mit der Software Roi2Tau[©] ermittelt. Es wurden ausschließlich Zellen analysiert, deren runder Zellkern deutlich zu erkennen war. Damit wurde sichergestellt, dass die Zellfläche auf der Äquatorialebene der Zelle ausgewertet wurde und die Berechnung der Zellgröße eine optimale Annäherung an den maximalen Durchmesser darstellte. Wie in Abbildung 3.33 deutlich zu erkennen ist, unterschieden sich die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten von Zytosol und Nukleus. Daher habe ich mit der Software Roi2Tau[©] ausschließlich die zytosolische $[\text{Cl}]_i$ ausgewertet.

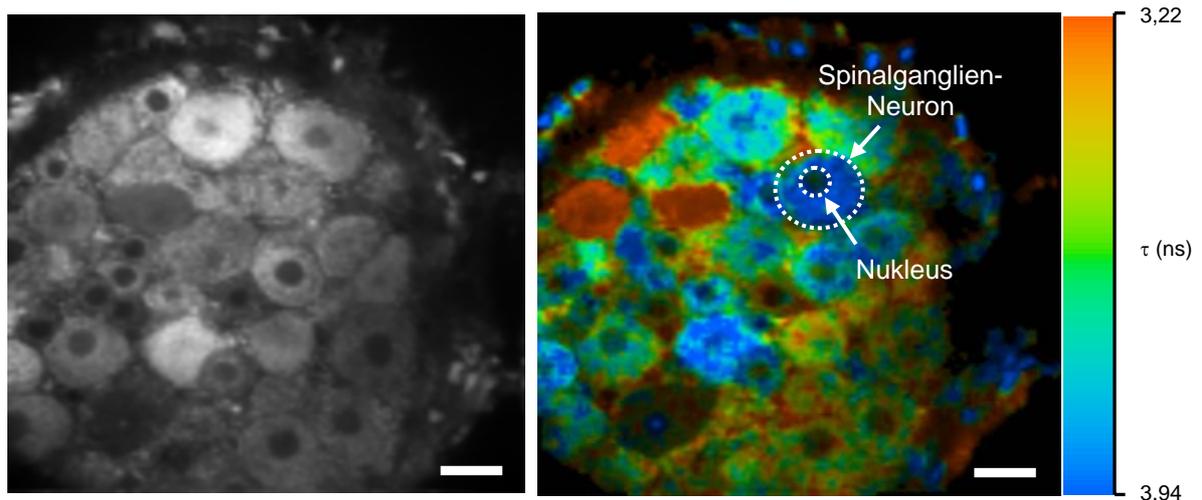


Abbildung 3.33: Bestimmung der $[Cl^-]_i$ mit 2P-FLIM, in somatosensorischen Neuronen eines intakten Spinalganglions in einer Wirbelkörper-Präparation. Links: Zwei-Photonen-Aufnahme der MQAE-Fluoreszenz-Intensität, etwa 4 Stunden nach der Präparation. Rechts: MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten der DRG-Neurone. Die Fluoreszenz-Lebenszeit τ (ns) ist in diesem Bild in Falschfarben kodiert. Auch im intakten Gewebe haben verschiedene DRG-Neurone unterschiedliche Fluoreszenz-Lebenszeiten, bzw. intrazelluläre Cl^- -Konzentrationen. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die zytosolischen Grenzen mit einer gestrichelten Linie nachgezeichnet. Balken: 20 μm

Warum unterschieden sich die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten im Zytosol und Nukleus? Es ist möglich, dass ein Cl^- -Gradient zwischen den Kompartimenten besteht und die Cl^- -Konzentration im Nukleus geringer war als im Zytosol. Bildete dagegen die Kernmembran keine Barriere für Cl^- , wiesen die Kompartimente unterschiedliche „Quenching“-Eigenschaften auf. In Versuchen mit der EDXA-Methode an Sympathikus-Neuronen (Galvan et al., 1984) wurde kein Unterschied der $[Cl^-]_i$ von Zellplasma und Zellkern gemessen. Somit besitzen beide Kompartimente wahrscheinlich unterschiedliche „Quenching“-Eigenschaften für MQAE, die beispielsweise durch unterschiedliche Zusammensetzungen an quenchenden Proteinen zu Stande kommen könnte. Die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten, und damit die $[Cl^-]_i$ der verschiedenen Neurone unterschieden sich. Sie variierte zwischen 26,4 - 53,7 mM (Mittelwert: $39,5 \pm 9,3$ mM). Damit entsprechen die Werte der $[Cl^-]_i$ somatosensorischer Neurone im intakten Gewebe (Spinalganglien) den Werten, die für dissoziierte und kultivierte DRG-Neuronen ermittelt wurden (siehe Abschnitt 3.5.2).

Um auszuschließen, dass die in diesem, und in Abschnitt 3.5.2 gezeigten Ergebnisse artifiziellen Ursprungs waren, musste ich diese Messung wiederholen und dabei die $[Cl^-]_i$ in möglichst vielen DRG-Neuronen analysieren.

Dazu habe ich mit 2P-FLIM optische Schnitte von insgesamt 8 Spinalganglien (aus 6 Mäusen) angefertigt und in diesen Bildern, mit der von mir entwickelten Software Roi2Tau[®], die $[Cl^-]_i$ von 818 Einzelzellen bestimmt. In Bild (A) in Abbildung 3.34 (vorherige Seite) sind exemplarisch 17 optische Schnittebenen eines Spinalganglions dargestellt. Bild (B) dieser Abbildung zeigt einen optischen Schnitt und die bei der Auswertung der Schnittbilder manuell nachgezeichneten äußeren und inneren Grenzen des Zytosols (grüne Kringel).

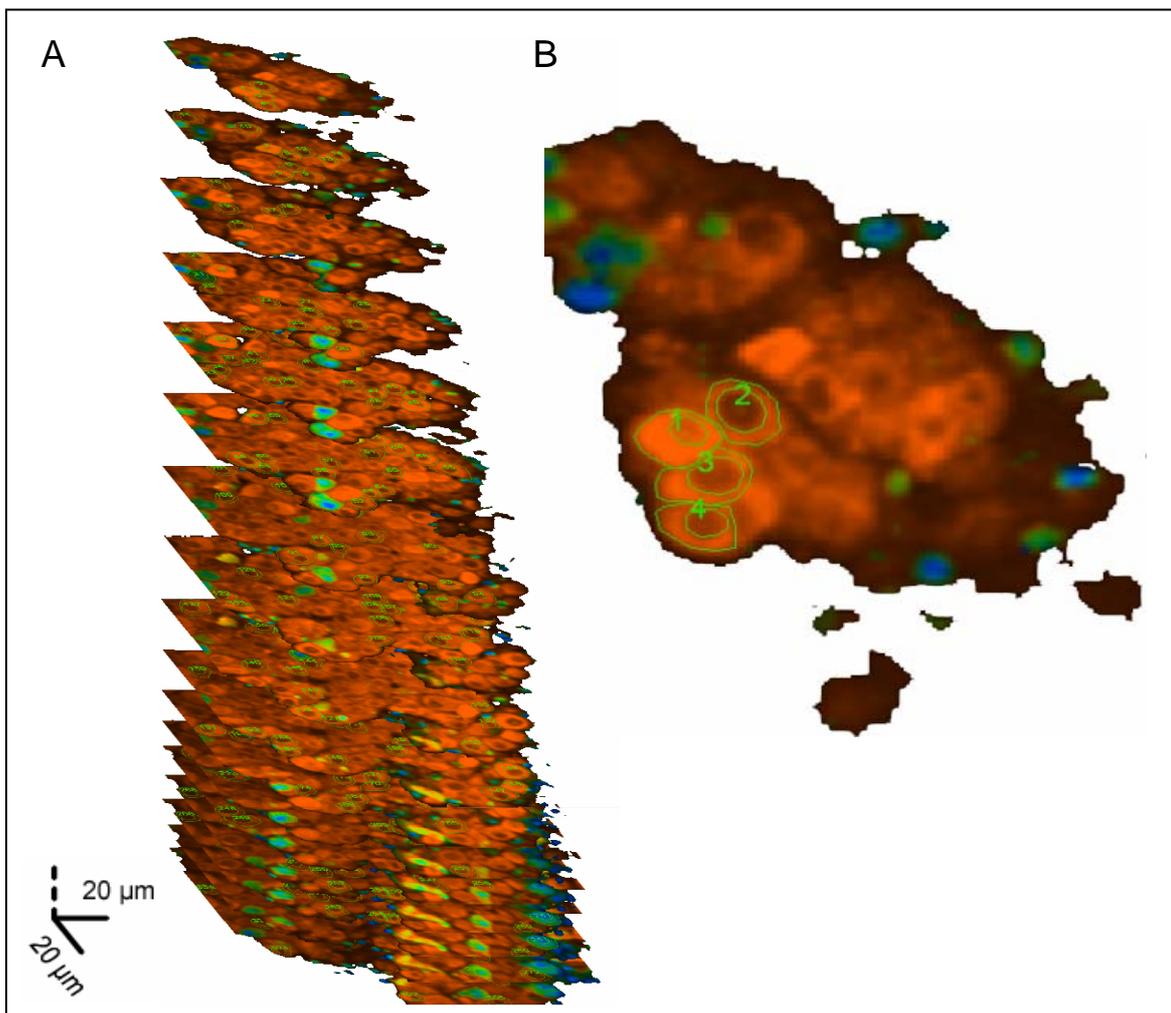


Abbildung 3.34: (A) Optische Schnittebenen eines Spinalganglions, die mit 2P-FLIM aufgenommen wurden. In diesem Beispiel wurde die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in 17 Ebenen, in Abständen von 5 µm gemessen. Bild (B) zeigt die bei der Auswertung mit der Software Roi2Tau[®] nachgezeichneten äußeren- und inneren Grenzen des Zytosols (grüne Kringel), sowie die Indices, die den Zellen für eine nachträgliche Überprüfung der Analysedaten zugewiesen wurden.

Um die ermittelten MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten der ausgewerteten Einzelzellen nachträglich überprüfen zu können, wurden sie mit Indices versehen. In Abbildung 3.35 sind die errechneten $[\text{Cl}^-]_i$ -Konzentrationen gegen die Zellgrößen aufgetragen. Die Zellen hatten Durchmesser zwischen 13 - 43 μm (Mittelwert: $25,8 \pm 6,3 \mu\text{m}$). Ihre $[\text{Cl}^-]_i$ variierte zwischen 8 - 120 mM (Mittelwert: $61,8 \pm 19,7 \text{ mM}$). Die Verteilung der $[\text{Cl}^-]_i$ über den gesamten Größenbereich der Zellen zeigt, dass in dem gemessenen Volumen, $[\text{Cl}^-]_i$ und Zellgröße nicht miteinander korreliert waren.

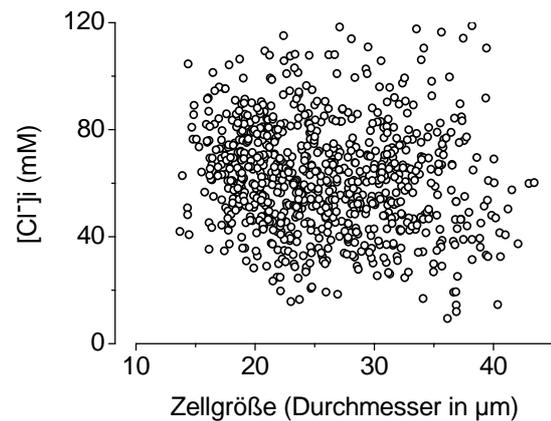


Abbildung 3.35: Korrelationsanalyse von $[\text{Cl}^-]_i$ und der Zellgröße. Mit 2P-FLIM wurde die $[\text{Cl}^-]_i$ in insgesamt 818 Neuronen (aus 8 Spinalganglien von 6 adulten Mäusen) bestimmt. Die Streuung der $[\text{Cl}^-]_i$ über den gesamten Größenbereich der Zellen lässt keine Korrelation von $[\text{Cl}^-]_i$ zur Zellgröße erkennen.

3.5.7 2P-FLIM mit Spinalganglien neugeborener Mäuse

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.2 und 3.5.6 zeigen eine heterogene Verteilung der $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Neurone in Primärkultur, sowie im nativen Gewebe. Die meisten Zellen hatten eine hohe $[\text{Cl}^-]_i$, allerdings gab es auch Neurone mit signifikant geringerer $[\text{Cl}^-]_i$. In der Literatur wurde für DRG-Neuronen postuliert, dass sie den Cl^- -Switch meiden und damit lebenslang eine hohe $[\text{Cl}^-]_i$ haben. Entgegen der Literatur lassen die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.2 und 3.5.6 die Annahme zu, dass zumindest in einigen DRG-Neuronen ein Cl^- -Switch stattfindet. In diesem Fall müsste sich die $[\text{Cl}^-]_i$ von DRG-Neuronen neugeborener Tiere, von der $[\text{Cl}^-]_i$ adulter Tiere deutlich unter-

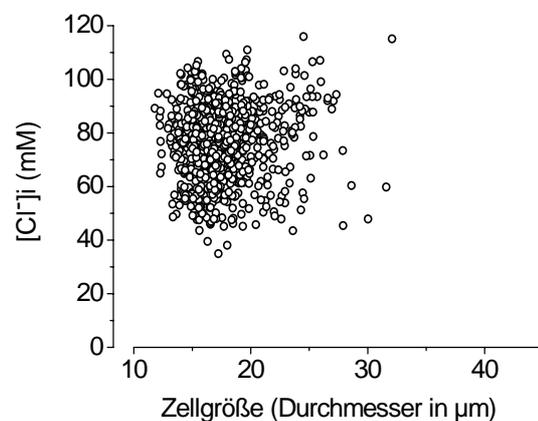


Abbildung 3.36: Verteilung der $[\text{Cl}^-]_i$ in DRG-Neuronen neugeborener Mäuse, d.h. vor dem „ Cl^- -Switch“. Die $[\text{Cl}^-]_i$ ist gegen die Zellgröße aufgetragen. Mit 2P-FLIM wurde die $[\text{Cl}^-]_i$ in insgesamt 975 Neuronen (aus 4 Spinalganglien neugeborener Mäuse, P1-P4) bestimmt. Die $[\text{Cl}^-]_i$ war in allen Zellen homogen verteilt und hoch.

scheiden. Um dies zu überprüfen, habe ich mit 2P-FLIM die $[Cl^-]_i$ von DRG-Neuronen, neugeborener NMRI-Mäuse gemessen. In insgesamt 975 Neuronen (aus vier Spinalganglien unterschiedlich alter Mäuse; P1-P4) habe ich mit 2P-FLIM die $[Cl^-]_i$ bestimmt. In Abbildung 3.36 sind die errechneten Cl^- -Konzentrationen gegen die Zellgrößen aufgetragen. Die $[Cl^-]_i$ der Zellen variierte zwischen 35 - 120 mM (Mittelwert: $77,2 \pm 13,6$ mM), ihre Durchmesser lagen im Bereich zwischen 12 - 32 μm (Mittelwert: $17,5 \pm 2,8$ μm). Die anatomischen Strukturen neugeborener Mäuse sind insgesamt kleiner als die adulter Tiere. Aus diesem Grund wurden in 4 Spinalganglien neugeborener Mäuse mehr Zellen analysiert, als in 8 Spinalganglien adulter Tiere analysiert werden konnten.

3.5.8 Vergleich der $[Cl^-]_i$ von DRG-Neuronen neugeborener und adulter Mäuse

Vergleicht man die 2P-FLIM-Messwerte von DRG-Neuronen adulter und neugeborener Tiere miteinander, so erkennt man einen deutlichen Unterschied, sowohl in der Verteilung der $[Cl^-]_i$, als auch der Zellgröße. Im linken Diagramm in Abbildung 3.37 sind die Messwerte aus den Abbildungen 3.35 und 3.36 gemeinsam dargestellt. Die roten Datenpunkte repräsentieren die Messwerte neugeborener Mäuse, in schwarz sind die Werte adulter Tiere dargestellt. Die Messwerte der jungen Mäuse streuen über einen kleineren Bereich als die Werte adulter Tiere. Die geringere Streuung der Zellgröße hängt zum Einen damit zusammen, dass neugeborene Mäuse insgesamt-, und damit auch die DRG-

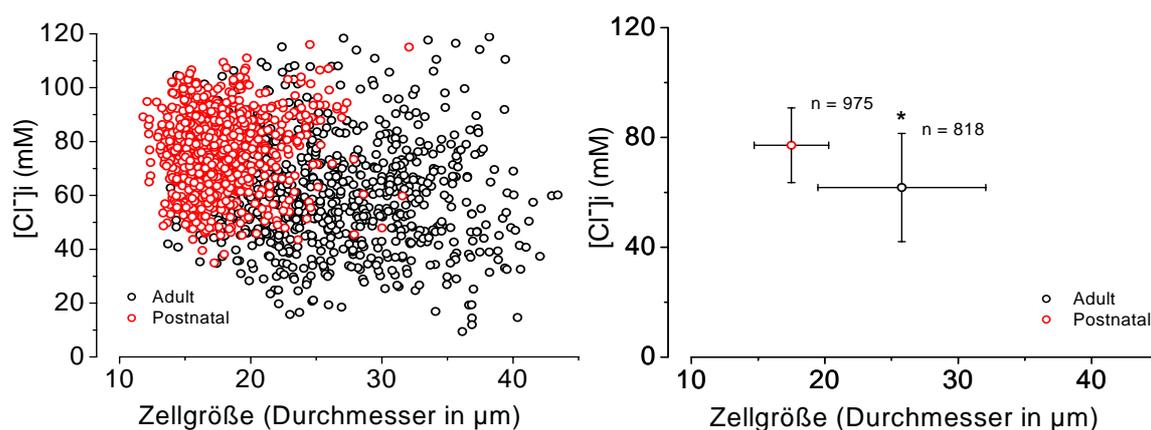


Abbildung 3.37: Vergleich der Verteilung von $[Cl^-]_i$ und Zellgröße in DRG-Neuronen adulter (schwarz) und neugeborener (rot) Mäuse. Die Messwerte neugeborener Mäuse zeigen eine geringere Streuung als die Werte adulter Tiere. Während der postnatalen Entwicklung des somatosensorischen Systems ändert sich offensichtlich die $[Cl^-]_i$ von DRG-Neuronen. Dies ist vermutlich auf die Aktivität von Cl^- -Kotransportern zurückzuführen, die während des Cl^- -Switches exprimiert werden.

Neuronen kleiner sind, als die der adulten Mäuse. Zum anderen ist das somatosensorische System junger Mäuse noch nicht vollständig entwickelt und damit eine Differenzierung in verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Größe möglicherweise noch nicht geschehen. Neben der Zellgröße zeigte auch die Verteilung der $[Cl^-]_i$ von DRG-Neuronen neugeborener Tiere eine geringe Streuung. In allen Neuronen wurde eine homogene und hohe $[Cl^-]_i$ gemessen. Im rechten Diagramm in Abbildung 3.37 sind die Mittelwerte neugeborener (rot) und adulter Tiere

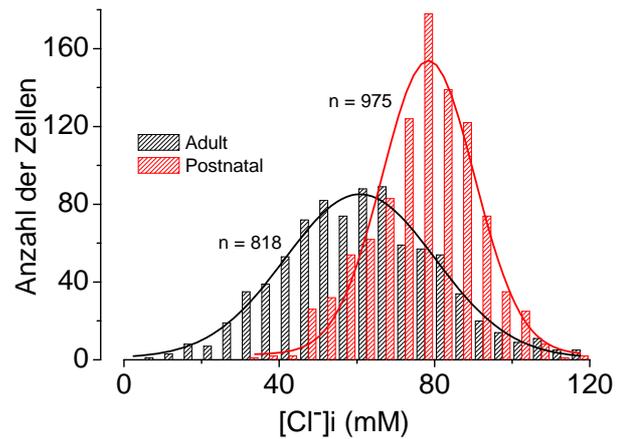


Abbildung 3.38: Histogramm der $[Cl^-]_i$ -Verteilung der DRG-Neuronen neugeborener (rot) und adulter (schwarz) Mäuse. Die Kurven repräsentieren die Verläufe der Gauss-Verteilungen. Die Streuung der $[Cl^-]_i$ ist in neugeborenen Mäusen kleiner als in erwachsenen Tieren. In Spinalganglien findet während der postnatalen Differenzierung des Nervensystems offenbar ein Cl^- -Switch statt.

(schwarz) aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider. Für neugeborene Tiere (P1-P4) wurde eine mittlere $[Cl^-]_i$ von $77,2 \text{ mM} \pm 13,6 \text{ mM}$ (975 Zellen), bei einer durchschnittlichen Größe von $17,5 \text{ } \mu\text{m} \pm 2,8 \text{ } \mu\text{m}$ errechnet. In adulten Tieren lag die mittlere $[Cl^-]_i$ bei $61,8 \text{ mM} \pm 19,7 \text{ mM}$ (818 Zellen), wobei die Zellen eine mittlere Größe von $25,8 \text{ } \mu\text{m} \pm 6,3 \text{ } \mu\text{m}$ hatten. Der „Student’s T-Test“, (Signifikanzniveau $p \leq 0,01$) ergab, dass sich die gemittelten Werte signifikant unterscheiden ($p = 1,09 \cdot 10^{-13}$). In dem Histogramm in Abbildung 3.38 sind die Verteilungen der $[Cl^-]_i$ neugeborener (rote Balken), und adulter Tiere (schwarze Balken) gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Diese Darstellung veranschaulicht die Veränderung der Cl^- -Homöostase (Cl^- -Switch) während der postnatalen Entwicklung der Maus. Kurz nach der Geburt ist die $[Cl^-]_i$ in allen DRG-Neuronen hoch. Bei der postnatalen Differenzierung des Nervensystems zeigen die verschiedenen Neurone immer deutlichere Unterschiede der $[Cl^-]_i$.

3.6 2P-FLIM mit Spinalganglien adulter, Clomeleon-exprimierender Mäuse

Für 2P-FLIM-Messungen stand mir eine transgene Clomeleon-exprimierende Mauslinie, mit der Bezeichnung „Rosa26“, zur Verfügung. In Zellen dieser Mauslinie wurde die Expression von Clomeleon, durch konditionale Mutagenese, unter die Kontrolle von Promotorelementen des Na_v1.8 Gens (Scn10a) gestellt. Dadurch wird Clomeleon in „Rosa26“-Mäusen ausschließlich in nozizeptiven und thermorezeptiven Spinalganglien- und Trigeminalganglien-Neuronen exprimiert (Agarwal et al., 2004). Die selektive Expression des ratiometrischen Cl⁻-Indikators Clomeleon in nozizeptiven

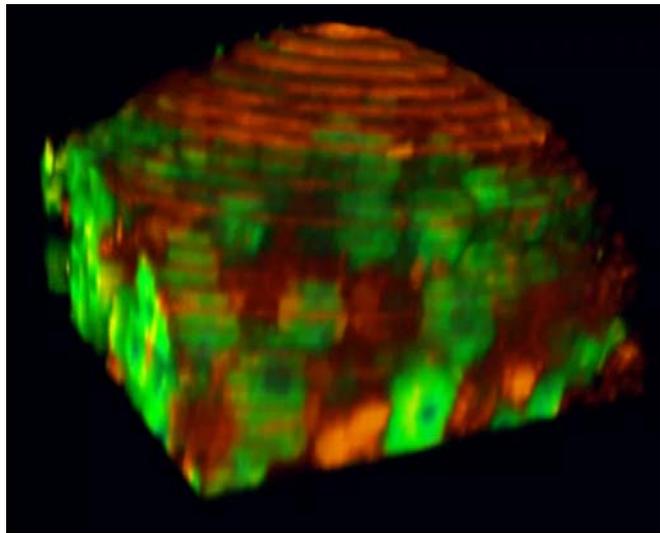


Abbildung 3.39: 3D-Rekonstruktion der Falschfarben-kodierten 2P-FLIM-Aufnahmen eines Spinalganglions von einer adulten „Rosa26“-Maus. Insgesamt wurden 26 optische Schnitte, in Abständen von 5 µm aufgenommen. Der Großteil der Neurone exprimiert Clomeleon, diese Zellen sind grün dargestellt. Clomeleon-negative Zellen erscheinen rot. Das quaderförmige Volumen hat eine Kantenlänge von 235,7 x 235,7 x 52 µm.

Neuronen macht diese Mauslinie für die Untersuchung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle mit Cl⁻-Imaging besonders interessant. Allerdings ist der Expressionslevel von Clomeleon in Neuronen dieser Mäuse gering, wodurch die Intensität des von Clomeleon-positiven Neuronen emittierten Fluoreszenzlichtes sehr schwach ist. Spinalganglienzellen dieser Mäuse sind daher nur bedingt für Imaging-Experimente geeignet und erfordern leistungsfähige Lichtquellen, sowie sehr empfindliche Detektoren. Die in Abschnitt 2.8.4 beschriebene 2P-FLIM-Apparatur erfüllt diese Bedingungen. Mit dieser Apparatur habe ich YFP- und CFP-Emissionen gemessen und die YFP/CFP-Quotienten somatosensorischer „Rosa26“-Neuronen errechnet. Dazu wurde eine Wirbelkörper-Präparation mit anhaftendem Spinalganglion wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben, angefertigt und zunächst die Fluoreszenz-Lebenszeit in mehreren optischen Schnitten gemessen. Abbildung 3.39 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion von 26 Falschfarben-kodierten 2P-FLIM-Bildern, die in einem Abstand von 5 µm aufgenommen wurden. Clomeleon-exprimierende DRG-Neurone sind grün dargestellt. Zellen, die den Cl⁻-Indikator nicht exprimierten, erscheinen rot.

Die Rekonstruktion lässt erkennen, dass die meisten Zellen Clomeleon exprimierten. Das Histogramm in Abbildung 3.40 zeigt die Größenverteilung CLM-positiver und CLM-negativer Zellen. In dem vermessenen Volumen exprimierten ~78% (179 Zellen), von insgesamt 228 analysierten Neuronen Clomeleon. 49 Zellen (~22%) waren CLM-negativ. Der mittlere Durchmesser Clomeleon-exprimierender Zellen liegt bei $24,70 \pm 5,56 \mu\text{m}$. Ihre Häufigkeit ist im Bereich der kleinen- und mittelgroßen, nozizeptiven Sinneszellen am größten. Allerdings wird das Fusionsprotein auch von größeren Zellen ($>45 \mu\text{m}$) exprimiert.

Der durchschnittliche Durchmesser Clomeleon-negativer Zellen liegt bei $29,65 \pm 3,48 \mu\text{m}$. Die Verteilungen beider Populationen überlappen sich im Bereich der mittelgroßen Neurone.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zellgröße zwar zur groben Unterscheidung verschiedener Typen somatosensorischer Sinneszellen verwendet werden kann, eine Diskriminierung von Subpopulationen unterschiedlicher Modalitäten mit Hilfe der Zellgröße alleine aber nicht möglich ist. In dem in Abbildung 3.39 dargestellten Spinalganglion wurden die Intensitäten der YFP- und CFP-Emission von Clomeleon in einer Entfernung von $40 \mu\text{m}$ von der äußeren Begrenzung des Ganglions (*Dura*) gemessen. Mit Hilfe der Software

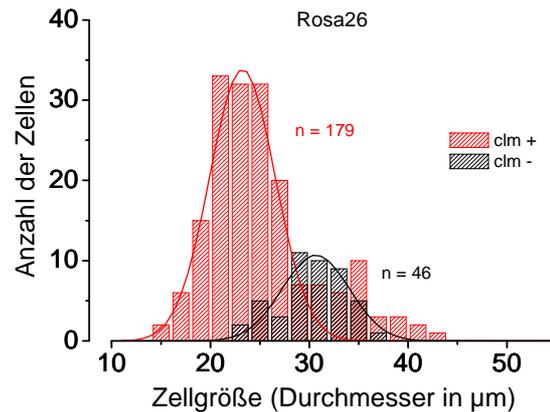


Abbildung 3.40: Größenverteilung Clomeleon-exprimierender (rot) und nicht-exprimierender DRG-Neurone (schwarz). Die meisten Zellen exprimierten Clomeleon. Das Fusionsprotein wurde am häufigsten in mittelgroßen Neuronen ($20 - 30 \mu\text{m}$), aber auch in großen ($>30 \mu\text{m}$) nozizeptiven Sinneszellen hergestellt. Die Mauslinie „Rosa26“ ist daher ein geeignetes Werkzeug, um Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle in Schmerzzellen, mit Hilfe von Cl^- -Imaging zu untersuchen.

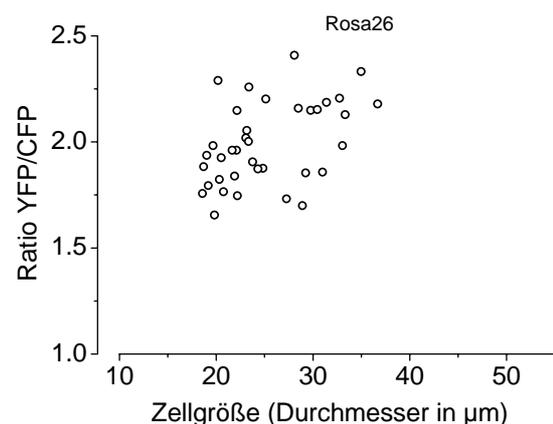


Abbildung 3.41: Quotienten der YFP/CFP-Emissionen, Clomeleon-exprimierender DRG-Neurone, einer adulten „Rosa26“-Maus. Die Werte streuen über einen großen Bereich zwischen 1,65 - 2,29 und lassen keine Korrelation von Quotient und Zellgröße erkennen.

Roi2Tau[®] wurden in diesen Bildern die Fluoreszenzintensitäten von insgesamt 35 Einzelzellen ermittelt und anschließend die Quotienten der YFP- und CFP-Emissionen gebildet. Um die Quotienten in Cl⁻-Konzentrationen umrechnen zu können, bedurfte es analog zu Messungen der Fluoreszenz-Lebenszeit mit MQAE, einer Eichung mit unterschiedlichen Cl⁻-Konzentrationen. Die Eichung nach der Doppel-Ionophor-Strategie (Chao et al., 1989) mit DRG-Neuronen von „Rosa26“-Mäusen hat im Rahmen dieser Arbeit leider nicht funktioniert. Aus diesem Grund wurden die Quotienten mit Hilfe von Literaturwerten, die aus Eichmessungen mit Hippokampus-Neuronen stammen (Kuner et al., 2000) in Cl⁻-Konzentrationen umgerechnet. Im Graph in Abbildung 3.41 sind die ermittelten Quotienten gegen die Zellgrößen aufgetragen. Abbildung 3.42 gibt die errechneten Cl⁻-Konzentrationen der Einzelzellen wider. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, variiert die [Cl⁻]_i in einem Konzentrationsbereich zwischen 2 - 60 mM (Mittelwert: 28.4 ± 14.8 mM). Unter Berücksichtigung der Variabilität der [Cl⁻]_i stimmen die Resultate der ratiometrischen Messungen mit den Werten der MQAE-Lebenszeit-Messungen überein.

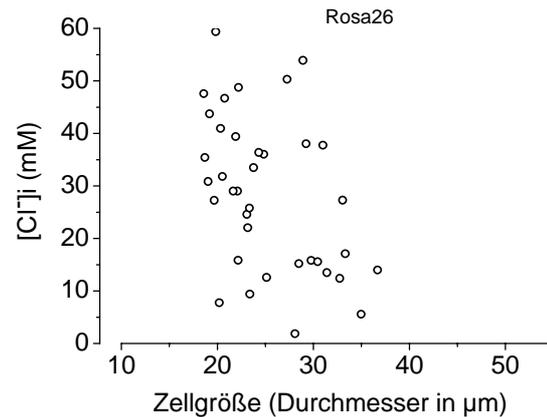


Abbildung 3.42: Errechnete [Cl⁻]_i Clomeleon exprimierender DRG-Neurone einer transgenen „Rosa26“-Maus. Die [Cl⁻]_i streut über einen großen Konzentrationsbereich unabhängig von der Zellgröße. Die ratiometrisch errechnete, und mit MQAE-Lebenszeit-Messungen bestimmte intrazellulären Cl⁻-Konzentrationen von Spinalganglien-Neurone zeigen ähnliche Resultate.

Da die Wirbelkörper-Präparationen der transgenen Tiere nicht für mehrere Stunden mit dem Cl⁻-Indikator MQAE beladen werden mussten, konnten sie im frisch präparierten Zustand, etwa 30 Minuten nach der Tötung der Tiere, für ratiometrische Cl⁻-Messungen verwendet werden. Die ähnlichen Resultate beider Messmethoden können daher auch als Nachweis der Vitalität der in den MQAE-Lebenszeit-Messungen verwendeten Gewebe verwendet werden.

Mit der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (FLIM) habe ich die [Cl⁻]_i somatosensorischer Neurone in Primärkultur-, und erstmals auch in Spinalganglien, adulter und neugeborener Mäuse gemessen. Für DRG-Neurone neugeborener Mäuse (P1-P4) betrug sie im Mittel 77,2 mM (± 13,6 mM). In allen embryonalen-, und frühen postnatalen Neuronen (bis etwa Tag 10 nach der Geburt) des Zentralnervensystems von Wirbeltieren

ist die $[Cl^-]_i$ hoch, daher war in DRG-Neuronen neugeborener Tiere eine hohe $[Cl^-]_i$ zu erwarten.

Die Messungen mit somatosensorischen Neuronen in Spinalganglien (*in situ*) und kultivierten DRG-Neuronen (*in vitro*) adulter Mäuse ergaben eine heterogene Verteilung, und eine große Streuung der $[Cl^-]_i$, sowohl *in situ* (8 - 120 mM, Mittelwert: $61,8 \pm 19,7$ mM), als auch *in vitro* (16 - 93 mM, Mittelwert: $51,3 \pm 19,9$ mM). Diese Resultate lassen sich gut mit den Ergebnissen der Patch-Clamp-Experimente aus Abschnitt 3.4.2 vereinbaren. Dort wurden Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme in kultivierten DRG-Neuronen (bei konstanter NFA-Konzentration) mit variierender Effizienz blockiert. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass (1.) TRPV1-Kanäle mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalentstehung kooperieren und (2.), dass der Anteil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms am Rezeptorstrom durch die $[Cl^-]_i$ beeinflusst wird. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie zur KCC2 und NKCC1-Expression in DRG-Neuronen bekräftigt diese Hypothese (siehe Diskussion).

Um diese Hypothese zu bekräftigen, müsste die funktionelle Kopplung von TRPV1-Kanälen mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen bei der Entstehung von Schmerzsignalen in DRG-Neuronen genauer untersucht werden. Die Patch-Clamp-Technik ist dafür das geeignete Mittel. Sie ermöglicht die kinetische Analyse der Kanal-Wechselwirkungen und damit die Aufklärung der Prozesse, die bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalentstehung in DRG-Neuronen ablaufen. Durch die Entwicklung von Na-CDMNB-caged Capsaicin (siehe Abschnitt 3.2) verfügen wir jetzt auch über ein geeignetes Werkzeug, diese Kooperations-Kinetik im Detail zu studieren

3.7 Größenanalysen verschiedener CLM-DRG-Neurone

Cl^- -Imaging ist eine geeignete Methode, viele Zellen in kurzer Zeit auf die Expression Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle zu untersuchen, und eine Verknüpfung dieser Kanäle an eine bestimmte Sinnesmodalität zu identifizieren. Für Imaging-Experimente mit Clomeleon-exprimierenden DRG-Neuronen standen mir insgesamt vier verschiedene CLM-Mauslinien zur Verfügung: CLM-1, -11, -12 und -13. In diesen Tieren ist die Expression von Clomeleon unter die Kontrolle des Neuronen-spezifischen Promotors *Thy1* gestellt. Clomeleon wird in diesen Mäusen zwar spezifisch in neuronalem Gewebe exprimiert, in welchen Zellen des neuronalen Systems das Protein hergestellt wird, hängt allerdings vom Ort der Integration ins Wirtsgenom ab, und kann daher nicht vorausgesagt werden. Um

herauszufinden, welche der vier transgenen Mauslinien, in den kleinen- ($<30 \mu\text{m}$) und mittelgroßen ($30 \leq 45 \mu\text{m}$) Schmerzstellen Clomeleon exprimiert, habe ich eine Größenbasierte Expressionsanalyse mit kultivierten CLM-DRG-Neuronen durchgeführt. Dazu wurden Spinalganglienzellen der Mauslinien CLM-1, -11, -12 und -13 wie in Abschnitt 2.3 beschrieben präpariert, kultiviert und Fluoreszenzbilder von den Kulturen aufgenommen. Anschließend habe ich mit der Software StatBuddy[®] eine Analyse der Größenverteilung, sowie der Häufigkeit CLM-exprimierender DRG-Neurone durchgeführt. Die Ergebnisse dieser vorbereitenden Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt gezeigt.

3.7.1 CLM-1

Abbildung 3.43 zeigt das Resultat der statistischen Analyse mit kultivierten DRG-Neuronen aus der Mauslinie CLM-1. Insgesamt wurden 675 CLM-1-DRG-Neurone untersucht. Etwa ein Drittel ($\sim 32\%$) dieser Zellen exprimierten Clomeleon. Ihre Zellgröße lag im Mittel bei $25,85 \pm 4,47 \mu\text{m}$. (215 Zellen). Die meisten DRG-Neurone ($\sim 68\%$) exprimierten Clomeleon nicht, die durchschnittliche Zellgröße betrug $21,90 \pm 4,71 \mu\text{m}$ (400 Zellen). Die Kurven geben die Gauss-Verteilungen der dargestellten Histogramme wieder. Die Größenverteilung Clomeleon-exprimierender Zellen liegt im Bereich der kleinen- und mittelgroßen nozizeptiven Sinneszellen. DRG-Neurone aus CLM-1-Mäusen sind daher für Cl-Imaging geeignet.

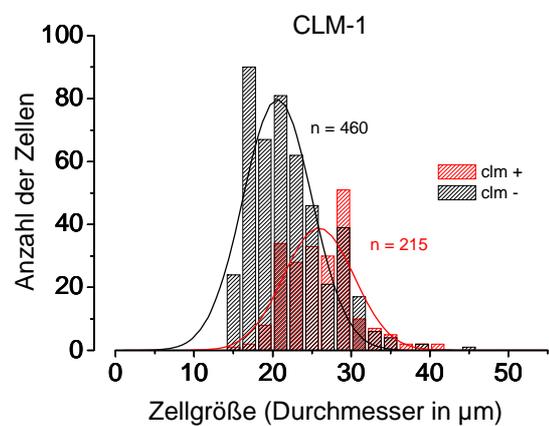


Abbildung 3.43: Größenverteilung Clomeleon-exprimierender (rot) und nicht-exprimierender (schwarz) DRG-Neurone. Clomeleon-positive Zellen sind im Mittel größer als die Clomeleon-negativen Neurone. Da die Größenverteilung Clomeleon-exprimierender Zellen im Bereich der mittelgroßen Zellen (20 - 30 μm) liegt, ist die Mauslinie CLM-1 für Cl⁻-Imaging-Experimente geeignet

3.7.1.1 IB₄-Färbung mit kultivierten DRG-Neuronen der Mauslinie CLM-1

Primärkulturen somatosensorischer Neurone, die aus Spinalganglien von CLM-1-Mäusen gewonnen werden, enthalten eine große Anzahl von Zellen, die den ratiometrischen Cl⁻-Indikator Clomeleon exprimieren und sind aus diesem Grund gut für Cl⁻-Imaging-

Experimente geeignet. Die Experimente aus Abschnitt 3.3 (Ca²⁺-Imaging mit IB₄-gefärbten, kultivierten Spinalganglienzellen der Ratte) haben gezeigt, dass sich etwa 60 % der untersuchten Neurone mit dem Pflanzenlektin Isolektin B₄ (IB₄) anfärben ließen. Um die Verteilung IB₄-positiver Zellen in der Clomeleon-exprimierenden Zellpopulation von CLM-1-Mäusen zu untersuchen, habe ich CLM-1-Primärkulturen mit IB₄ wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben gefärbt, Fluoreszenzbilder angefertigt und diese mit der Software StatBuddy[©] analysiert.

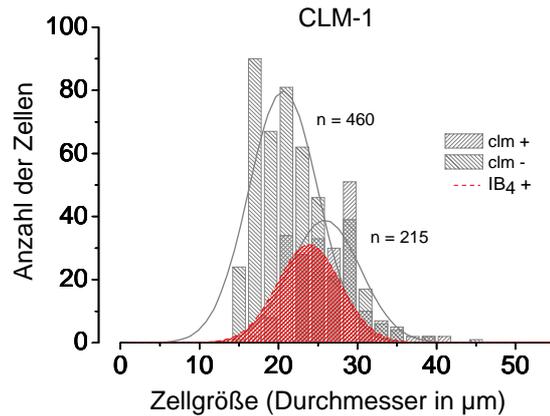


Abbildung 3.44 zeigt das Resultat der Verteilungsanalyse. In dem Histogramm ist die Gaus-Verteilung IB₄-positiver Neurone rot schraffiert dargestellt. Abbildung 3.45 zeigt die Schnittmengen der unterschiedlichen Zellpopulationen in einem Kuchendiagramm. IB₄-positive Zellen machten einen Anteil von 23% (rot, 158 Zellen) aller Zellen aus, ihre mittlere Zellgröße lag bei 24,34 ± 4,19 µm. Diese Zellpopulation war zu ungefähr gleichen Teilen Clomeleon-positiv (49%) als auch Clomeleon-negativ (51%). Von den insgesamt 215 Clomeleon-positiven Zellen, waren 36% IB₄-positiv und 64% IB₄-negativ. Einen geringeren Anteil (18%) machten die IB₄-positiven Neurone in der Clomeleon-negativen Zellpopulation aus.

Abbildung 3.44: Die rot schraffierte Fläche gibt die Gaus-Verteilung IB₄-positiver Spinalganglienzellen der Mauslinie CLM-1 wider. Die mittlere Größe dieser Zellen betrug 24,34 ± 4,19 µm. Die Zellgröße dieser Zellen liegt damit in einem ähnlichen Bereich, wie er auch für IB₄-positive Zellen der Ratte ermittelt wurde (siehe Abschnitt 3.3).

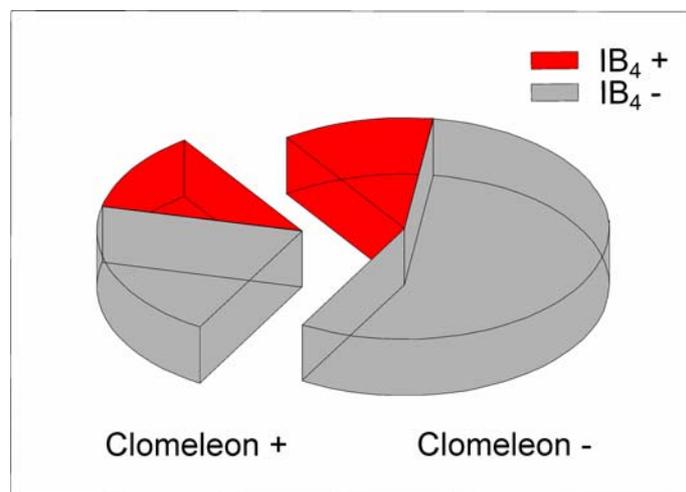


Abbildung 3.45: Das Kuchendiagramm stellt die Schnittmengen der verschiedenen Subpopulationen kultivierter DRG-Neuronen dar. Nur etwa ein Drittel der Clomeleon-exprimierenden Spinalganglienzellen konnte mit dem Pflanzenlektin angefärbt werden. Die IB₄-positiven Neurone machten einen Anteil von etwa einem Viertel an der Clomeleon-negativen Population aus.

3.7.2 CLM-11

Von der Mauslinie CLM-11 wurden insgesamt 1400 Neurone analysiert (siehe Abbildung 3.46). Davon exprimierten 369 Zellen (~26%) Clomeleon (rot). Diese Zellen waren im Mittel $30,57 \mu\text{m}$ groß ($\pm 6,14 \mu\text{m}$). Einen Anteil von 74% (1031 Zellen, schwarz) machten Clomeleon-negative Zellen aus. Der Mittelwert der Zellgröße lag für diese Zellen bei $24,68 \mu\text{m} \pm 5,83 \mu\text{m}$. Nur etwa ein Viertel der untersuchten DRG-Neurone der Mauslinie CLM-11 exprimierten Clomeleon. Etwa die Hälfte dieser Zellen lag im Bereich der mittelgroßen Neurone ($20 - 30 \mu\text{m}$). Das macht einen Anteil von ungefähr einem Achtel, mittelgroßer, Clomeleon-exprimierender Zellen aus. Für CI-Imaging-Experimente ist der Anteil Clomeleon-exprimierender Zellen zu gering. Aus diesem Grund ist die Mauslinie CLM-11 für Imaging-Experimente nicht gut geeignet.

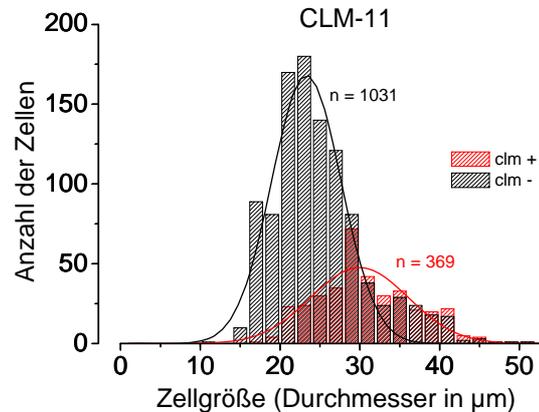


Abbildung 3.46: Die Verteilungen der Zellgrößen Clomeleon exprimierender (rot) und Clomeleon-negativer DRG-Neurone (schwarz) unterscheiden sich deutlich voneinander. Da in CLM-11-Mäusen nur sehr wenige, mittelgroße Zellen ($20 - 30 \mu\text{m}$) den ratiometrischen CI-Indikator Clomeleon exprimieren, ist diese Mauslinie für weitere Experimente nicht geeignet.

3.7.3 CLM-12

Abbildung 3.47 zeigt die Größenverteilung von Spinalganglien-Neuronen der Mauslinie CLM-12. Bei dieser Mauslinie unterschieden sich die Mittelwerte Clomeleon-positiver, und -negativer DRG-Neurone von allen vier Mauslinien am deutlichsten voneinander. Die Population Clomeleon-positiver Zellen machte mit 30 (rot) von insgesamt 80 untersuchten Neuronen einen Anteil von etwa 38% aus. Diese Zellen waren im Mittel sehr groß ($33,83 \pm 6,39 \mu\text{m}$). Ihre

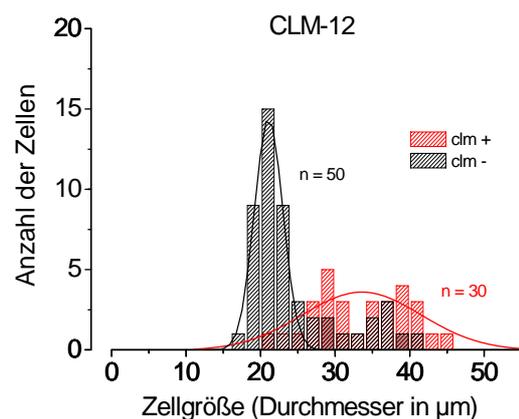


Abbildung 3.47: Größenverteilung Clomeleon-exprimierender (rot) und Clomeleon-negativer (schwarz) DRG-Neurone der Mauslinie CLM-12. Auch bei dieser Mauslinie ist der Anteil Clomeleon-positiver, mittelgroßer Zellen für Imaging-Versuche zu gering

durchschnittliche Größe lag somit nicht im Bereich der mittelgroßen Neurone. Die Größe Clomeleon-negativer Zellen (schwarz, 50 Zellen, ~62%) lag im Bereich von $24,70 \mu\text{m} \pm 6,19 \mu\text{m}$. Die Anzahl mittelgroßer, Clomeleon-positiver Zellen ist auch bei dieser Mauslinie zu gering, als dass DRG-Neurone von CLM-12-Mäusen für Cl⁻-Imaging verwendbar wären.

3.7.4 CLM-13

In Abbildung 3.48 ist das Ergebnis der Verteilungsanalyse mit DRG-Zellen von CLM-13-Mäusen dargestellt. Die Histogramme und Gauss-Verteilungen der beiden Zellpopulationen sind sehr ähnlich. Die mittlere Größe, Clomeleon-positiver Zellen (rot) lag bei $29,65 \pm 3,56 \mu\text{m}$ (27 Zellen), die der Clomeleon-negativen Zellen (schwarz) bei $27,17 \pm 4,49 \mu\text{m}$ (138 Zellen, ~84%). Da nur etwa 16% der insgesamt 165 analysierten Sinneszellen Clomeleon exprimierten, sind DRG-Neurone dieser Mauslinie für Cl⁻-Imaging-Experimente ebenso nicht geeignet.

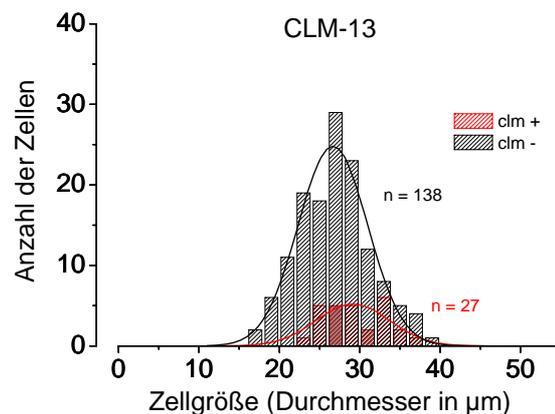


Abbildung 3.48: Die Größenverteilung der beiden Zellpopulationen ist sehr ähnlich. Durch den geringen Anteil Clomeleon-exprimierender Zellen ist die Mauslinie CLM-13 für Cl⁻-Imaging-Experimente nicht geeignet.

Bei der Suche nach der „richtigen“ CLM-Mauslinie für Cl⁻-Imaging-Experimente mit kultivierten Schmerzzenen wurde die Mauslinie CLM-1 als am besten geeignet identifiziert. Kultivierte DRG-Neurone dieser Mauslinie exprimieren zu einem großen Anteil (32%) den ratiometrischen Cl⁻-Indikator in den kleinen- und mittelgroßen, nozizeptiven Neuronen, was kultivierte Neurone dieser Mauslinie für Cl⁻-Imaging-Experimente besonders interessant macht.

Setzt man voraus, dass 36 – 41 % (Abschnitt 3.2 und 3.3) aller untersuchten CLM-1-Neurone TRPV1-Kanäle exprimieren, dann kann der Gesamtanteil doppelt-positiver (Clomeleon-exprimierender, Capsaicin-sensitiver) Neurone grob auf 11,5 – 13% geschätzt werden. Ein höherer Wert ergibt sich, wenn man die Analyseergebnisse aus Abschnitt 3.7.1.1 (IB₄-Färbungen mit kultivierten CLM-1-Spinalganglienzellen) mit den

Ergebnissen aus Abschnitt 3.3 (IB₄-Färbungen mit kultivierten mit DRG-Neuronen der Ratte) verrechnet: Von der CLM-1-exprimierenden Population ließen sich 36% mit dem Pflanzenlektin anfärben; die IB₄-bindende Population aus Abschnitt 3.3 war etwa zu gleichen Teilen (50:50) TRPV1-positiv und –negativ. Dementsprechend wäre in der CLM-1-DRG-Primärkultur ein Anteil von etwa 18% doppelt-positiver Neurone zu erwarten. Die genannten Schätzwerte erscheinen niedrig, ein Anteil von 11,5 – 18% doppelt-positiver Neurone ist für die funktionelle Untersuchung des Zusammenspiels von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen mit TRPV1-Kanälen in Cl⁻-Imaging-Experimenten allerdings hinreichend. Darüber hinaus eignet sich die Mauslinie CLM-1 auch für die Untersuchung einer möglichen funktionellen Kopplung von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen mit Transduktionskanälen anderer sensorischer Modalitäten. Diese Mauslinie ist daher ein nützliches Hilfsmittel für Clomeleon-basierte Untersuchungen mit Schmerzzenen.

Die Analyse der IB₄-Selektivität kultivierter CLM-1-Spinalganglienzellen (Abschnitt 3.7.1.1) ergaben (analog zu den Resultaten aus Abschnitt 3.3), dass sich das Pflanzenlektin als Marker zum Identifizieren der TRPV1-exprimierenden Population in DRG-Primärkulturen nicht eignet.

3.8 Genetische Manipulationen von DRG-Neuronen für Cl⁻-Imaging

Das Anionen-sensitive YFP152L ist ein anderes Beispiel für einen genetisch kodierbaren Cl⁻-Sensor. Eine transgene YFP152L-exprimierende Mauslinie wurde bisher noch nicht etabliert, daher musste ich eine geeignete Methode ausarbeiten, DRG-Neurone mit YFP152L auszustatten. Von den insgesamt vier verschiedenen, getesteten Methoden der genetischen Manipulation haben sich nur die Nukleofektion und Infektionen mit YFP152L-kodierenden Adenoviren bewährt. Transiente Transfektionen nach der Kalziumphosphat-Methode und Effectene[®]-Transfektionen haben für DRG-Neuronen Transfektionsraten <1% ergeben. Nicht-neuronale, fibroblastäre Zellen wurden mit diesen Methoden mit höherer Effizienz transfiziert (~10%). Da die Transfektions-Effizienzen dieser Methoden zu gering waren und nicht weiter angewendet wurden, werden im Folgenden nur die Ergebnisse adenoviraler Infektionen und der Nukleofektionen gezeigt.

3.8.1 Nukleofektion von DRG-Neuronen mit dem Anionen-sensitiven YFP152L

Die Nukleofektion wurde nach dem Amaxa[®]-Herstellerprotokoll, mit Suspensionen frisch dissoziierter Spinalganglienzellen, adulter Wistar-Ratten durchgeführt (siehe Abschnitt 2.11.5). Es wurden DNA-Mengen von 1-, 3- und 5 µg / Well ausgetestet. Die Nukleofektions-Effizienz

betrug bei 1 µg DNA / Well <10%, mit 3 µg DNA / Well wurde eine Rate von etwa 15% erzielt und bei der optimalen DNA-Menge von 5 µg DNA / Well betrug die

Effizienz etwa 27%. Um die Effizienz der Nukleofektion mit 5 µg DNA / Well zu quantifizieren, wurden in insgesamt 5 Bildern 26 Zellen mit der Software StatBuddy[®] analysiert. Das Bild in Abbildung 3.49 zeigt eine Spinalganglien-Zellkultur 24 Stunden nach der Nukleofektion mit 5 µg DNA / Well. Für das Bild wurde eine Nomarski DIC-Durchlichtaufnahme mit einem Fluoreszenzbild überlagert. Wie in dem Bild zu erkennen ist, wurden nicht-neuronale Zellen nicht nukleofiziert. Die auf Elektroporation basierende Technik ist schädlich für die Zellen. Etwa 2/3 der frisch dissoziierten Neurone wurden bei der Nukleofektion zerstört, daher ist die Dichte der ausgesäten Nervenzellen gering. Im kleinen Bild ist ein nukleofiziertes DRG-Neuron dargestellt. Selbst kleinste Strukturen wie dendritische- oder axonale Ausläufer werden durch die gleichmäßige Verteilung des Cl⁻-Sensors sichtbar.

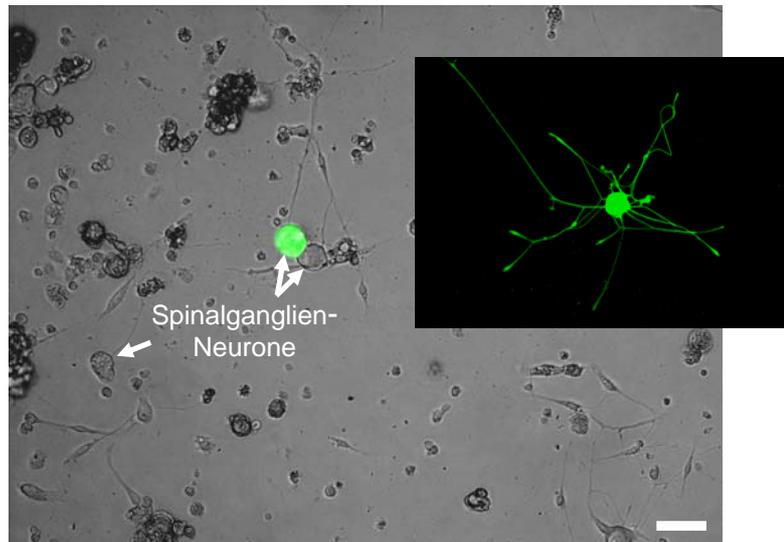


Abbildung 3.49: Spinalganglien-Zellkultur 24 Stunden nach der Nukleofektion. Die Dichte der ausgesäten Neurone ist gering, da viele Zellen bei der Nukleofektion zerstört wurden. Die grün fluoreszierenden Spinalganglienzellen wurden mit dem Anionen-sensitiven YFP152L nukleofiziert. Kleines Bild: Einzelnes nukleofiziertes DRG-Neuron. Das Protein war gleichmäßig in der Zelle verteilt, wodurch selbst kleinste Strukturen wie Neuriten sichtbar wurden. Balken: 50 µm.

3.8.2 Infektionen von DRG-Neuronen mit YFP152L-kodierenden Adenoviren

Für Virusinfektionen wurden Spinalganglienzellen wie in Abschnitt 2.3 beschrieben dissoziiert und kultiviert. 24 Stunden nach der Präparation wurde das Virus zum Kulturmedium der Primärzellen gegeben und die Zellen für 24 Stunden in der infektiösen Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Infektions-Effizienz fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Die größte Infektions-Effizienz wurde mit einer optischen Dichte von $1,6 \times 10^7$ Viruspartikeln, bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden erreicht. Bei größeren

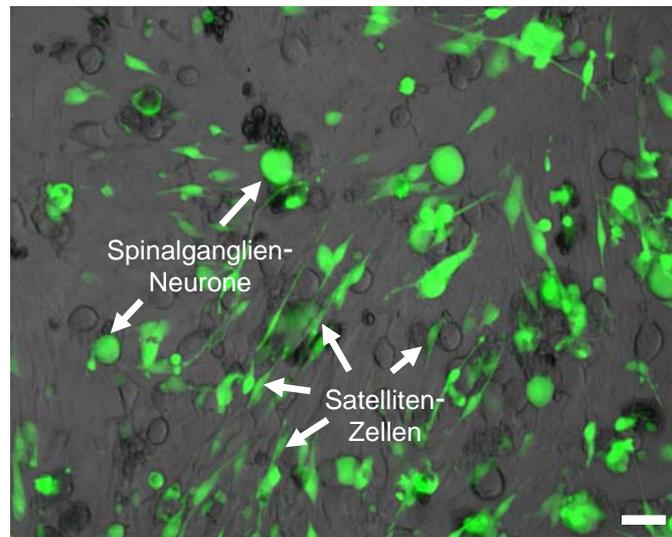


Abbildung 3.50: Überlagerung von Nomarski DIC-Duchlichtaufnahme und Fluoreszenzbild einer infizierten Primärzellkultur. Grün fluoreszierende Zellen exprimieren das Anionen-sensitive YFP152L. Neben DRG-Neuronen wurden auch nicht-neuronale, fibroblastäre Zellen (Satellitenzellen) mit dem Adenovirus infiziert. Balken: 50 µm.

Partikel-Anzahlen starben die Zellen ab, mit weniger Partikeln wurden vorwiegend nicht-neuronale Zellen infiziert. In Abbildung 3.50 ist exemplarisch eine mit YFP152L-kodierenden Adenoviren infizierte Primärzellkultur gezeigt. Wie in dem Bild zu erkennen ist, wurden außer den Neuronen auch nicht-neuronale Zellen mit dem Adenovirus infiziert. Unter den oben beschriebenen, optimalen Bedingungen wurde für Spinalganglienzellen eine Infektions-Effizienz von ~35% ermittelt. Dazu wurden mit der Software StatBuddy[®] in 6 Bildern insgesamt 117 Zellen analysiert. Die Infektionsrate nicht-neuronaler Zellen wurde auf etwa 75% geschätzt.

Infektionen kultivierter DRG-Neurone mit YFP152L-kodierenden Adenoviren stellen eine preiswerte und effektive Alternative zu herkömmlichen Methoden der genetischen Manipulation dar. Leider konnten aus Zeitmangel im Rahmen dieser Arbeit keine CI-Imaging-Experimente mit infizierten DRG-Neuronen durchgeführt werden.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll für die Dissoziation von Spinalganglien-Neuronen ausgearbeitet und Bedingungen geschaffen, unter denen adulte DRG-Primärzellen für mehrere Wochen kultiviert werden können. Mit diesen Primärkulturen wurde die Verwendbarkeit von Na-CDMNB-caged Capsaicin für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen in Schmerzzellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden in Ganzzell-Strommessungen mit der Patch-Clamp-Technik und mit Cl⁻-Imaging Hinweise erarbeitet, dass Capsaicin-induzierte Schmerzsignale in manchen TRPV1-exprimierenden Schmerzzellen durch Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle verstärkt werden. Diese funktionelle Kopplung kann nun mit Na-CDMNB-caged Capsaicin in kinetischen Experimenten untersucht werden. Außerdem wurde die Hypothese entwickelt, dass der Anteil des Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Stroms am Rezeptorstrom in Schmerzzellen durch die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ([Cl⁻]_i) beeinflusst wird. Diese Hypothese wird durch 2P-FLIM-Messungen mit dem Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MQAE, sowie durch Clomeleon-basierte, ratiometrische Messungen der [Cl⁻]_i gestützt. Die Messungen ergaben für Spinalganglienzellen neugeborener Mäuse (P1-P4) eine homogene und hohe [Cl⁻]_i. In Spinalganglienzellen adulter Mäuse wurde dagegen eine heterogene Verteilung der [Cl⁻]_i, sowohl in Kultur (*in vitro*) als auch in vitalen Spinalganglien in Wirbelkörper-Präparationen (*in situ*), ermittelt. Diese Messergebnisse waren insofern überraschend, als für DRG-Neuronen in der Literatur das Fehlen des Cl⁻-Switch, und damit eine lebenslang hohe [Cl⁻]_i postuliert wurde (Gallagher et al., 1978; Alvarez-Leefmans et al., 1988). Allerdings sind diese Ergebnisse gut mit einer neueren Studie zur NKCC1-Expression in Schmerzzellen zu vereinbaren (Morales-Aza et al., 2004). Der Na⁺/K⁺/Cl⁻-Kotransporter NKCC1 vermittelt Cl⁻-Akkumulation und hat damit Einfluss auf die elektrische Erregbarkeit von Schmerzzellen (Sung et al., 2000). Die hier gemessene heterogene Verteilung der [Cl⁻]_i könnte demnach auf alternierende NKCC1-Expressionslevel zurückzuführen sein. Für Cl⁻-Imaging-Experimente mit Schmerzzellen wurde eine Adenovirus-basierte Methode zur genetischen Manipulation von Schmerzzellen etabliert. Mit dieser Methode können nozizeptive Neurone, aber auch nicht-neuronale Zellen mit hoher Effizienz mit dem Anionen-sensitiven YFP152L ausgestattet werden. Die Entwicklung einer Software für Intensitätsanalysen von Schmerzzellen in Co-Kulturen, ermöglicht nun automatisierte Cl⁻-Imaging-Experimente zur Untersuchung von Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle in Schmerzzellen.

4.1 Charakterisierende Untersuchungen mit kultivierten DRG-Neuronen

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich ein Protokoll für die Dissoziation von Spinalganglien-Neuronen ausgearbeitet und Bedingungen geschaffen, unter denen adulte DRG-Primärzellen für mehrere Wochen kultiviert werden können (Abbildung 3.1.4). Da sich die Eigenschaften kultivierter DRG-Primärzellen mit der Zeit ändern (Scott & Edwards, 1980), wurden alle Experimente im selben Zeitfenster, nach 24 bis maximal 48 Stunden Kulturdauer durchgeführt. Die maximal mögliche Kulturdauer wurde also nie ausgenutzt.

Spinalganglien beherbergen, neben nicht-neuronalen Zellen, die Zellkörper der drei verschiedenen Typen (A β -, A δ - und C-Faser-Neurone) somatosensorischer Nervenzellen. Daher besteht eine DRG-Primärkultur immer aus einer Mischung von Zellen mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften. Um in dieser Mischung selektiv die physiologischen Eigenschaften von Schmerzzellen untersuchen zu können, musste ich zunächst eine geeignete Methode ausarbeiten, Schmerzzellen in der Co-Kultur anzureichern. Die Zellkörper der Schmerzzellen zählen zu den kleinen- (C-Fasern, \varnothing : $\leq 30 \mu\text{m}$) und mittelgroßen Neuronen (A δ -Fasern, \varnothing : 30 - 45 μm). Durch mehrstufiges Filtrieren des Dissoziats mit Nylonfiltern unterschiedlicher Maschenweite (150 μm , 50 μm) war es mir möglich, die kleinen- und mittelgroßen Zellen anzureichern. Ein weiterer Filtrationsschritt, bei dem durch ein 10 μm -Filter die meisten nicht-neuronalen Zellen aus der Kultur entfernt wurden, führte zu dem Ergebnis, dass die Neuronen schneller abstarben, als in Kulturen, die noch eine große Anzahl nicht-neuronaler Zellen enthielten. Ein gewisser Anteil nicht-neuronaler Zellen (z.B. Satellitenzellen) in der Kultur scheint also für das Überleben adulter, ausdifferenzierter DRG-Neurone von großer Bedeutung zu sein. Inwieweit nicht-neuronale Zellen einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von DRG-Neuronen *in vitro* eine Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Alle hier beschriebenen und verwendeten Kulturen enthielten eine große Anzahl nicht-neuronaler Zellen. Die Anreicherung kleiner- und mittelgroßer DRG-Neurone, durch mehrstufiges Filtrieren, ist nur ein erster Schritt zur Identifizierung von Schmerzzellen einer bestimmten Modalität. Schmerzzellen sind polymodal (Bessou et al., 1969), d.h. sie haben die Fähigkeit auf unterschiedliche Schmerzreize zu reagieren. Die Schmerzzellkultur ist daher trotz der Anreicherung eine Mischung aus Neuronen, unterschiedlicher Funktionen und Eigenschaften. Die Identifizierung von Schmerzzellen einer definierten Modalität ist durch den Vergleich der Perikaryen-Durchmesser leider nicht möglich. Mein Interesse galt der Hitze-, bzw. Capsaicin-sensitiven Modalität, die durch den

Transduktionskanal TRPV1 vermittelt wird. Um Zellen dieser Modalität zu identifizieren habe ich immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen TRPV1, sowie funktionelle Charakterisierungen mit Ca^{2+} -Imaging und Färbungen mit dem Pflanzenlektin IB₄ durchgeführt. Die Antikörperfärbungen ergaben, dass 41% der kultivierten-, mittelgroßen DRG-Neurone TRPV1 exprimierten (Abbildung 3.5). Die funktionellen Experimente und IB₄-Färbungen bestätigten, dass die kleine- und mittelgroße Zellpopulation aus Zellen unterschiedlicher Modalitäten besteht (Abbildung 3.19 - 3.21). Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob mit dem Pflanzenlektin die TRPV1-exprimierende Zellpopulation identifiziert werden kann. Aus dem Kuchendiagramm in Abbildung 3.21 geht hervor, dass mehr als die Hälfte (55%) der TRPV1-exprimierenden Zellen das Pflanzenlektin gebunden hatten. Dieser Wert entspricht annähernd dem Gesamtanteil Capsaicin-positiver Zellen in den verwendeten Kulturen. Diese Ergebnisse zeigen, dass weder die IB₄-Färbung noch die Zellgröße (Durchmesser) bei der Suche nach TRPV1-positiven DRG-Neuronen in Primärkulturen für Patch-Clamp-Experimente hilfreich sind.

Neben der Verteilungsanalyse sollte mit den Färbeexperimenten untersucht werden, ob die Funktionalität der Neurone durch eine IB₄-Behandlung beeinflusst wird. Da viele IB₄-gefärbte Zellen eine Capsaicin-induzierte TRPV1-Aktivierung zeigten, konnte eine Beeinträchtigung der Funktionalität durch das Pflanzenlektin ausgeschlossen werden.

4.2 Capsaicin-induzierte Ströme nach Fotolyse von caged Capsaicin

In dieser Arbeit habe ich die caged Capsaicine Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin für physiologische Experimente mit Schmerzstellen ausgetestet.

4.2.1 Na-CDMNB-caged Capsaicin

Der Effekt der fotolytischen Freisetzung von Capsaicin aus Na-CDMNB-caged Capsaicin auf TRPV1-exprimierende Neuronen wurde in Ganzzell-Experimenten mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Capsaicin-induzierte Ströme und -Spannungsänderungen wurden in insgesamt 70 Neuronen, mit Durchmessern zwischen 20 - 45 μm , gemessen (Abbildungen 3.9, 3.11 und 3.12). Na-CDMNB-caged Capsaicin erfüllt sowohl die chemischen-, als auch funktionellen Anforderungen für Konzentrationssprung-Experimente mit Vanilloid-Rezeptoren. Die gute Löslichkeit, das Absorptionsmaximum

bei 350 nm und eine hohe Quantenausbeute macht diese Substanz sehr nützlich für physiologische Experimente. Durch die Maskierung der biologisch aktiven Hydroxylgruppe ist das Molekül auch bei einer Konzentration von 1 μM inaktiv - eine Konzentration, bei welcher freies Capsaicin TRPV1-Kanäle bereits sättigt. Diese fotochemischen Eigenschaften machen CDMNB-caged Capsaicin zu einem hilfreichen Werkzeug für kinetische Experimente mit Vanilloid Rezeptoren.

Vor der fotolytischen Capsaicin-Freisetzung, durch einen UV-Blitz, ist die TRPV1-exprimierende Zelle von einer Lösung mit konstanter caged Capsaicin-Konzentration umgeben. Durch die gleichmäßige Verteilung der Substanz in der Badlösung, kann fotolytisch freigesetztes Capsaicin innerhalb von Mikrosekunden die gesamte zugängliche Zelloberfläche erreichen. Die Kanalantwort ist daher kinetisch nicht durch Diffusionsprozesse limitiert. Das garantiert eine nahezu synchrone Aktivierung aller zugänglichen Ionenkanäle der Zelle, wodurch die mikroskopischen, kinetischen Parameter von makroskopischen Strommessungen abgeleitet werden können. Demgegenüber erzeugen herkömmliche Perfusionssysteme komplexe zeitliche Aktivierungsmuster, die durch hydrodynamische Störungen des Lösungsflusses hervorgerufen werden, und die Analyse schneller Kanalprozesse unmöglich machen.

Die fotolytische Freisetzung von Kanal-Liganden bewirkt ein plötzliches Einsetzen des Kanalstroms (z.B. Hagen et al., 1996; Grewer et al., 2000; Lagostena et al., 2001; Li and Niu et al., 2004). Bei meinen Untersuchungen zur Verwendbarkeit von caged Capsaicin für kinetische Experimente (Abschnitt 3.2.5, Abbildungen 3.14 und 3.15) habe ich Verzögerungen zwischen UV-Blitz und Einsetzen der Stromantwort von 124 ± 58 ms ($n = 15$) gemessen. Die verzögert einsetzende Kanalantwort ist möglicherweise auf eine Diffusionsbarriere am Kanal zurückzuführen, die das freigesetzte Capsaicin zunächst überwinden musste. Vorhergehende Arbeiten haben gezeigt, dass Capsaicin an die intrazelluläre Domäne von TRPV1-Kanälen binden muss (Jung et al., 1999; Jordt and Julius, 2002; Jung et al., 2002; Gavva et al., 2004). Die Verzögerung zwischen UV-Blitz und Einsetzen der Stromantwort lässt vermuten, dass fotolytisch freigesetztes Capsaicin zunächst die Zellmembran überwinden muss, bevor es an den Kanal binden kann. Für schnelle Kanal-Aktivierungen, ohne Verzögerung müsste caged Capsaicin daher von beiden Seiten der Zellmembran angeboten werden.

Die caged Compound-Technologie hat in den letzten Jahren interessante Entwicklungen hervorgebracht, die auch für kinetische Untersuchungen von Vanilloid Rezeptoren nützlich sind. Beispielsweise ermöglichen Seitengruppen, die bei einer

fotolytischen Spaltung der maskierten Substanz Fluoreszenzlicht emittieren, eine fluoreszenzoptische Untersuchung der Freisetzungskinetik der biologisch aktiven Substanz, sowie seine Ausbreitung und Verteilung in das umgebende Medium. (Hagen et al., 2002). Außerdem sind diese Substanzen für Experimente nützlich, bei denen eine Zweiphotonen-Anregung verwendet wird, um Konzentrations sprünge innerhalb des fokalen Volumens eines Anregungslasers zu erreichen (Furuta et al., 1999). Zweiphotonen-Fotolyse ist ein sehr hilfreiches Werkzeug, wenn sehr kleine Strukturen, mit einer räumlichen Ausdehnung, die der des fokalen Volumens der Mikroskoplinse entspricht, untersucht werden müssen. Durch die Anregung mit der doppelten Wellenlänge (rotes Licht, Infrarotlicht, ≥ 700 nm) sind Streueffekte und Fotoschäden im Vergleich zur Verwendung von UV-Licht stark reduziert. Experimente, bei denen die Fotolyse biologisch aktiver Substanzen auf sehr kleine Zellkompartimente beschränkt sein muss, wie z.B. Dendriten, Synapsen oder intrazelluläre Organellen (Niggli & Egger, 2004), aber auch in Gewebeschnitten und in organotypischen- oder Primärzellkulturen, dem Standardmodell des Schmerzsystems, sind durch eine Zweiphotonen-Belichtung möglich.

4.2.2 Vergleich zwischen Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin

DMNB-caged Capsaicin ist aufgrund seiner langsamen Freisetzungskinetik nicht für physiologische Experimente mit Schmerzzellen geeignet. Abbildung 3.17 zeigt das Resultat eines Vergleichsexperiments mit den beiden Substanzen Na-CDMNB- und DMNB-caged Capsaicin. In Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$ DMNB-caged Capsaicin nahm der Strom nur sehr langsam zu (>1 s) und erreichte nach etwa 4,5 Sekunden ein Maximum von $\sim 0,2$ nA, wogegen TRPV1-Kanäle durch fotolytische Freisetzung von Capsaicin aus Na-CDMNB-caged Capsaicin bereits nach ~ 50 ms aktiviert wurden und einen starken Einwärtsstrom leiteten ($\sim 5,5$ nA). Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung von Na-CDMNB-caged Capsaicin, als Werkzeug für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen.

4.2.3 Mögliche Anwendungen für caged Capsaicin in der Schmerzforschung

Na-CDMNB-caged Capsaicin ermöglicht neuartige Experimente mit Präparationen, bei denen die nozizeptive Plasmamembran zugänglich ist. Beispielsweise kann mit lebenden Gewebeschnitten von Rückenmark oder Spinalganglien, die Weiterleitung der

Schmerzsignale von den Nozizeptoren zu den Projektionsneuronen im Hinterhorn untersucht werden (z.B. Ruscheweyh et al., 2003; Kato et al., 2004). Caged Capsaicin kann als Werkzeug dienen, um sehr spezifisch und wiederholt (Abbildung 3.13) TRPV1-Kanäle in den Zielorganen zu aktivieren und so die Beobachtung der Antwort von Rückenmarksneuronen mit hoher zeitlicher Auflösung zu ermöglichen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Stimulation von Hinterwurzelfasern mit elektrischen Impulsen liegt in der Spezifität des Reizes. Schmerzfasern einer definierten Modalität (schmerzhafte Hitze) können selektiv, durch die Aktivierung ihrer Transduktionskanäle stimuliert werden.

Wenn die Fotolyse durch eine Punktbeleuchtung ausgelöst wird, können Einzelzellen aktiviert- und die Antworten benachbarter, mit der aktivierten Zelle über synaptische Kontakte verbundene Zellen, abgeleitet werden. Die selektive Aktivierung TRPV1-exprimierender Neurone in neuronalen Netzwerken ermöglicht die Untersuchung der Prozesse bei der Signalverarbeitung und -Weiterleitung mit hoher zeitlicher Auflösung und gewährt einen Einblick in die Konnektivität und Plastizität der Signalverarbeitung zwischen Schmerzzellen und Neuronen des ZNS.

4.3 Capsaicin-induzierte Cl⁻-Ströme in kultivierten DRG-Neuronen

4.3.1 Cl⁻-Imaging mit kultivierten CLM-1-DRG-Neuronen

Cl⁻-Imaging ist ein experimenteller Ansatz, eine funktionelle Kopplung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle mit Transduktionskanälen, wie beispielsweise dem Capsaicin-sensitiven Kanal TRPV1, bei der Generierung von Schmerzsignalen, nachzuweisen. Bei einer solchen Interaktion, werden infolge des Transduktionskanal-vermittelten Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, Ca²⁺-gesteuerte Cl⁻-Kanäle aktiviert, die ihrerseits einen auswärtsgerichteten Cl⁻-Strom leiten. Der Cl⁻-Auswärtsstrom äußert sich in einer Änderung der Fluoreszenzintensität des Cl⁻-Sensors (hier: Clomeleon), und identifiziert eine funktionelle Kopplung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle mit dem entsprechenden Transduktionskanal.

Mit dem Cl⁻-Imaging-Experiment aus Abschnitt 3.4.1 konnte ein erster Hinweis auf eine funktionelle Kopplung von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen mit TRPV1-Kanälen erarbeitet werden. Ein mittelgroßes (~ Ø 30 µm) CLM-1-DRG-Neuron reagierte auf eine

Stimulation mit 1 μM Capsaicin, mit einer 20%-igen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Alle Zellen, die in Abbildung 3.22 gezeigten Kultur, haben unterschiedliche Durchmesser. Die kleinste Zelle ($\sim \varnothing 15 \mu\text{m}$) liegt außerhalb des für CLM-1-DRG-Neurone ermittelten Größenbereiches CLM-positiver Neurone (siehe Abbildung 3.43) und exprimiert das Fusionsprotein daher nicht. Die andere, nicht-reagierende Zelle, exprimiert möglicherweise keinen, oder nur einen der beiden oben genannten Ionenkanäle, bzw. war CLM-negativ. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis auf eine funktionelle Kopplung von Cl^- - und TRPV1-Kanälen. Für einen echten Nachweis dieser funktionellen Kopplung müsste dieses Experiment reproduziert und statistisch nachgewiesen werden. Da nach der Größenanalyse CLM-exprimierender DRG-Neurone keine adulten CLM-1-Mäuse mehr verfügbar waren, konnte ich dieses Experiment nicht wiederholen.

4.3.2 NFA-sensitive, Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme in DRG-Neuronen

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4 sind Hinweise darauf, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle den Rezeptorstrom in manchen DRG-Neuronen verstärken. Die von unserer Arbeitsgruppe vermutete-, und von Granados-Soto et al. (2005) postulierte Funktion Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle in Schmerzzellen, konnte durch meine Experimente also bekräftigt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise auf eine funktionelle Kopplung von TRPV1- mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen, bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalentstehung erarbeitet. Für die Messung Nifluminsäure (NFA)-sensitiver, Capsaicin-induzierter Cl^- -Ströme wurden ausschließlich IB_4 -positive DRG-Neurone verwendet. In 8 (32%) von insgesamt 25 DRG-Neuronen konnten NFA-sensitive, Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme gemessen werden. Dieses Resultat ist gut mit den Ergebnissen von Currie et al. (1992) zu vereinbaren. In dieser Studie wurden in 50% der untersuchten DRG-Neurone Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme gemessen. Bei meinen Capsaicin-Perfusions-Experimenten ließen sich Capsaicin-induzierte Cl^- -Ströme mit 500 μM Nifluminsäure um 6 - 50% blockieren, was auf unterschiedlich starke Einflüsse Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle bei der Generierung von Hitzeschmerzsignalen schließen lässt. Auf der Basis dieser Resultate habe ich die Hypothese erstellt, dass der Anteil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms am Rezeptorstrom möglicherweise durch die intrazelluläre Cl^- -Konzentration bestimmt wird. Diese Hypothese wird durch eine Studie zur Expression von Cl^- -Kotransportern in DRG-Neuronen der Ratte gestützt (siehe folgender Abschnitt 4.4).

4.4 2P-FLIM-Messung der $[Cl^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen der Maus

Die Vitalität der in 2P-FLIM-Experimenten untersuchten Gewebe wurde mit den Farbstoffen Trypan-Blau und MTT überprüft. Wie in den Abbildungen 3.31 und 3.32 zu erkennen ist, zeigten die DRG-Neurone in Wirbelkörper-Präparationen, nach Ablauf der 5-stündigen, „simulierten“ MQAE-Inkubationszeit eine starke Vitalität. Entsprechend konnten die Gewebe innerhalb dieses Zeitfensters für 2P-FLIM-Messungen genutzt werden. Da sich die Vitalität des Gewebes für spätere Zeitpunkte nicht eindeutig nachweisen ließ, wurden keine älteren Präparationen für FLIM-Experimente verwendet.

An die Qualität der Wirbelkörperpräparationen wurden große Ansprüche gestellt (gut zugängliche Spinalganglien mit unverletzter *Dura mata* und intakten Wurzeln). Daher mussten viele Mäuse präpariert werden um eine hinreichende Anzahl verwendbarer Präparationen zu erhalten. Der Versuch, 2P-FLIM-Messungen an isolierten Spinalganglien, die in größerer Anzahl und mit geringerem Arbeitsaufwand präpariert werden können, durchzuführen, scheiterte an der Vitalität der Gewebe, da die vom Wirbelkörper entfernten Ganglien, bzw. die darin beherbergten Neuron sehr schnell (<1 Stunde) abstarben.

Mit den 2P-FLIM-Messungen habe ich einerseits die hohe $[Cl^-]_i$, die bereits von Kaneko et al. (2002) mit einer ähnlichen Technik an frisch dissoziierten DRG-Neuronen adulter Ratten ermittelt wurde, bekräftigt ($61,8 \text{ mM} \pm 19,7 \text{ mM}$, 818 Zellen). Andererseits ergaben diese Messungen, dass die $[Cl^-]_i$ nicht in allen DRG-Neuronen adulter Tiere hoch ist. Für somatosensorische Neurone postnataler Mäuse, treffen die Voraussagen zu, die von Gallagher et al., Alvarez-Leefmans et al. und Kaneko et al. getroffen wurden. Im Spinalganglien-Gewebe der jungen Mäuse (P1-P4) hatten alle Neuronen eine hohe $[Cl^-]_i$ ($>35 \text{ mM}$), im Mittel betrug sie $77,2 \text{ mM} \pm 13,6 \text{ mM}$ (975 Zellen). Eine klare Unterteilung verschiedener Populationen somatosensorischer Neurone, mit ähnlicher $[Cl^-]_i$, ist bisher nicht möglich. Auch konnte keine Korrelation von Zellgröße und $[Cl^-]_i$ nachgewiesen werden.

Wie kommen die Unterschiede der $[Cl^-]_i$ postnataler- und adulter Tiere zustande? In den meisten Neuronen des Zentralnervensystems wird die $[Cl^-]_i$ nach der Geburt, durch die Expression des K^+/Cl^- -Kotransporters KCC2, zunehmend reduziert (Cl⁻-Switch). Von Kanaka et al. (2001) konnte in somatosensorischen Neuronen keine KCC2-Expression nachgewiesen werden, daher wurde für diese Zellen eine lebenslang hohe $[Cl^-]_i$ postuliert. Allerdings findet man in der Literatur zur KCC2-Expression in Spinalganglien-Neuronen

gegenteilige Aussagen. Im Rahmen einer Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe wurde eine schwache Expression der K^+/Cl^- -Kotransporter-Gene in DRG-cDNA nachgewiesen (Putzier 2003). In einer neueren Studie von Morales-Aza et al. (2004), beobachtete man in DRG-Neuronen eine zunehmende Expression von K^+/Cl^- -Kotransporter-Proteinen mit einhergehenden Entzündungsprozessen. In der gleichen Arbeit wurde auch eine, durch Entzündungsprozesse eingeleitete Zunahme der NKCC1-Expression nachgewiesen. Der $Na^+/K^+/Cl^-$ -Kotransporter NKCC1 vermittelt Chlorid-Akkumulation in DRG-Neuronen (Sung et al., 2000) und ermöglicht diesen Zellen, eine hohe $[Cl^-]_i$ aufrechtzuerhalten. Die von mir mit der 2P-FLIM-Technik gemessenen, großen Unterschiede der intrazellulären Cl^- -Konzentration von Spinalganglien-Neuronen sind also möglicherweise auf alternierende KCC2-, und NKCC1-Expressions-Level zurückzuführen. Diese beiden Proteine können über die $[Cl^-]_i$ Einfluss auf die elektrische Erregbarkeit dieser Zellen nehmen, und vermitteln möglicherweise damit die große Dynamik von Schmerzzellen bei der Generierung von Schmerzsignalen. Meine Messungen ergaben, dass die $[Cl^-]_i$ nicht in allen DRG-Neuronen hoch ist. Ebenso werden nicht von allen Spinalganglien-Neuronen Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle exprimiert. Es könnte sein, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle nur in DRG-Neuronen mit hoher $[Cl^-]_i$ exprimiert werden und der Einfluss dieser Kanäle auf die Verstärkung des Rezeptorpotenzials durch NKCC1- und KCC2-vermittelte Änderungen der $[Cl^-]_i$ verändert wird.

Gegenüber den Methoden, die andere Arbeitsgruppen für $[Cl^-]_i$ -Messungen verwenden, hat die Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit eines Fluorophors, einige Vorteile:

- (1.) 2P- FLIM ist nicht-invasiv, da der nicht-toxische Cl^- -Indikator MQAE verwendet wird. Zudem kann die 2P-FLIM-Technik auch mit Gewebeschnitten durchgeführt werden.
- (2.) Messungen können direkt verfolgt und auch während des Versuchs, beispielsweise über die Badlösung, beeinflusst werden.
- (3.) Ist die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) einmal für einen Zelltyp bestimmt, können Zellen unterschiedlicher Präparationen direkt miteinander verglichen werden.

Die FLIM-Methode hat allerdings nicht nur Vorteile. Vor allem die Eichung, also die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) eines Zelltyps, ist für die Zellen toxisch. Die K_{SV} wird mit Hilfe der giftigen Ionophore Nigericin und Tributylzinn durchgeführt, die die Zellmembran für Cl^- -Ionen und Protonen permeabilisieren. Die Ionophore werden

dazu verwendet, um die $[Cl^-]_i$ über die Badlösung einzustellen. Tributylzinn wird für diese Zwecke standardmäßig verwendet. Es kann innerhalb weniger Minuten diverse physiologische Funktionen der Zelle zerstören und den programmierten Zelltod zur Folge haben (Viviani et al., 1995; Nishikimi et al., 2001). Zurzeit sind Triorganozinn-Verbindungen jedoch die einzigen erhältlichen Cl^- -Ionophore. Es wurden allerdings bereits andere Verbindungen diskutiert, die als Cl^-/H^+ -Symporter oder Cl^-/OH^- -Austauscher dienen können und somit vielleicht in Zukunft eine bessere Möglichkeit zur Cl^- -Permeabilisierung der Zelle bieten könnten (Sato et al., 1998). Die Verwendung der 2P-FLIM-Methode hat außerdem den Nachteil, dass unterschiedliche Zelltypen nicht direkt, während der Messung, miteinander verglichen werden können. Dazu müssen die τ -Messdaten zunächst über die jeweilige K_{SV} und τ_0 in die $[Cl^-]_i$ umgerechnet werden. Die von mir in DRG-Neuronen ermittelten MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit-Parameter betragen: τ_0 (0 mM $[Cl^-]_i$) = 3,94 ns, $K_{SV} = 3,05 M^{-1}$.

4.5 Ratiometrische Bestimmung der $[Cl^-]_i$

In Zellen der transgenen Mauslinie „Rosa26“ ist die Expression des ratiometrischen Cl^- -Sensors Clomeleon unter die Kontrolle von Promotorelementen des Na_v 1.8-Gens gestellt. Dieses Gen kodiert das Protein des TTX (Tetrodotoxin)-insensitiven, spannungsgesteuerten Natriumkanals in Schmerzzellen. Er ist für die Generierung von Aktionspotenzialen in Schmerzzellen verantwortlich. TTX-insensitive Natriumkanäle werden nur in nozizeptiven Neuronen exprimiert. Die Nozizeptor-spezifische Clomeleon-Expression würde diese Mauslinie besonders geeignet für Cl^- -Imaging-Experimente mit Schmerzzellen machen, allerdings ist der Expressionslevel des Proteins in den Neuronen sehr gering (mündliche Mitteilung von Dr. Thomas Kuner). Entsprechend ist die Farbstoffkonzentration in den Zellen-, und damit die Fluoreszenzintensität gering. Spinalganglienzellen dieser Mäuse sind daher nur bedingt für Imaging-Experimente geeignet und erfordern leistungsfähige Lichtquellen, sowie sehr empfindliche Detektoren. Die in Abschnitt 2.8.4 beschriebene 2P-FLIM-Apparatur erfüllt diese Bedingungen. Mit dieser Apparatur habe ich YFP- und CFP-Emissionen gemessen und die YFP/CFP-Quotienten somatosensorischer „Rosa26“-Neuronen errechnet. Die ratiometrische Messung ergab eine große Streuung der $[Cl^-]_i$, mit Konzentrationen zwischen 2 – 60 mM (Mittelwert: 28.4 ± 14.8 mM). Die Streuung der Messwerte ähnelt der Verteilung, die mit MQAE-Lebenszeit-Messungen ermittelt wurde. Insgesamt wurden 228 Neurone untersucht

(Abb. 3.40). Etwa 78% (179 Zellen) exprimierten Clomeleon. Sie hatten, wie erwartet, eine mittlere Größe von $24,70 \pm 5,56 \mu\text{m}$, und fielen damit in den Bereich der kleinen ($\leq 30 \mu\text{m}$), nozizeptiven Nervenzellen. Ein geringer Anteil der Zellen war CLM-negativ (22%, 49 Zellen). Ihr mittlerer Durchmesser betrug $29,65 \pm 3,48 \mu\text{m}$, diese Zellen waren also wie erwartet größer die Clomeleon-exprimierenden, nozizeptiven Zellen.

Die Verwendung der Mauslinie „Rosa26“ eröffnet neue Möglichkeiten für die Untersuchung der Prozesse bei der Entstehung von Schmerzsignalen. Da der Cl⁻-Sensor wahrscheinlich in alle Kompartimente des Schmerzsystems transportiert wird, bzw. dorthin diffundiert, sollte eine Untersuchung der Cl⁻-Konzentration auch in den kleinen sensorischen Kompartimenten und an den Synapsen im Hinterhorn möglich sein. Außerdem entfallen bei Messungen mit Clomeleon-exprimierenden DRG-Neuronen lange Inkubationszeiten, wie im Fall der MQAE-Lebenszeit-Messungen.

4.6 Größenanalysen von CLM-DRG-Neuronen

Um die Expression Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle in Schmerzzellen funktionell zu untersuchen und eine mögliche funktionelle Kopplung dieser Kanäle mit TRPV1-Kanälen zu identifizieren, sollte mit Clomeleon-exprimierenden Neuronen Cl⁻-Imaging durchgeführt werden. Der FRET-basierte Cl⁻-Sensor Clomeleon ist dafür ein geeignetes Werkzeug. Gegenüber anderen Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. MQAE, hat Clomeleon zwei entscheidende Vorteile: (1.) Über die ratiometrische Analyse der CFP-/YFP-Fluoreszenzemissionen ermöglicht Clomeleon die direkte Messung absoluter Cl⁻-Konzentrationen. Der zu untersuchende Zelltyp muss nicht (wie bei MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen) mit verschiedenen Cl⁻-Konzentrationen kalibriert werden (Kuner et al., 2004; Kaneko et al., 2004). Auf die Verwendung giftiger Ionophore wie Nigericin und Tributylzinn kann daher verzichtet werden. (2.) Da Clomeleon ein genetisch kodierbares Protein ist, kann es gezielt in einem bestimmten Zelltyp, bzw. Gewebe zur Expression gebracht werden.

Bei der Herstellung der transgenen Mauslinien CLM-1, -11, -12 und -13 wurde die kodierende Sequenz durch einen ungezielten, bzw. ortsunspezifischen Gentransfer in das Genom der Tiere integriert. In diesen Tieren ist die Expression von Clomeleon unter die Kontrolle des Neuronen-spezifischen Promotors *Thy1* gestellt. Clomeleon wird in diesen Mäusen zwar spezifisch in neuronalem Gewebe exprimiert, in welchen Zellen des neuronalen Systems das Protein hergestellt wird, hängt allerdings vom Ort der Integration

ins Wirtsgenom ab, und kann daher nicht vorausgesagt werden. Um herauszufinden, welche der vier transgenen Mauslinien, in den kleinen ($\leq 30 \mu\text{m}$, C-Fasern) und mittelgroßen ($30 - 45 \mu\text{m}$, A δ -Fasern) Schmerzcellen Clomeleon exprimiert, habe ich eine Größen-basierte Expressionsanalyse mit kultivierten CLM-DRG-Neuronen durchgeführt.

4.6.1 CLM-1

Die Analyse der Größenverteilung, kultivierter CLM-1-DRG-Neurone ergab, dass der Anteil Clomeleon-exprimierender Zellen dieser Mauslinie bei etwa einem Drittel (32%) liegt. Ihr Durchmesser betrug im Mittel $25,85 \pm 4,47 \mu\text{m}$. Wie das Histogramm in Abbildung 3.43 erkennen lässt, deckt die CLM-positive Population den Bereich der kleinen, nozizeptiven Zellen ab, was kultivierte Neurone dieser Mauslinie für CI-Imaging Experimente besonders interessant macht. Die Analyse der IB₄-Selektivität, kultivierter CLM-1-Spinalganglienzellen (Abschnitt 3.7.1.1) ergaben (analog zu den Resultaten aus Abschnitt 3.3), dass sich das Pflanzenlektin als Marker zum Identifizieren der TRPV1-exprimierenden Population in DRG-Primärkulturen nicht eignet.

4.6.2 CLM-11, -12 und -13

Tabelle 4.1 zeigt die mittleren Durchmesser, sowie die Häufigkeiten (in %) CLM-positiver Neurone, die in DRG-Primärkulturen von transgenen Mäusen der Linien CLM-11, -12 und -13 ermittelt wurden. Keine der drei Mauslinien erfüllen die Anforderungen, die an die Größe und den prozentualen Anteil CLM-exprimierender Neurone gestellt werden. Diese Mauslinien sind daher für CI-Imaging-Experimente nicht geeignet.

CLM-11	$30,57 \pm 6,14 \mu\text{m}$	26%
CLM-12	$33,83 \pm 6,39 \mu\text{m}$	38%
CLM-13	$29,65 \pm 3,56 \mu\text{m}$	16%

Tabelle 4.1: Mittlere Größen (\pm SD) und prozentualer Anteil, CLM-exprimierender DRG-Neurone der Mauslinien CLM-11, -12 und -13.

4.7 Genetische Manipulationen von DRG-Neuronen für Cl⁻-Imaging

Es ist möglich, dass Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle, außer an die hier postulierte TRPV1-vermittelte Hitze-, bzw. Capsaicin-sensitive Modalität, auch an andere sensorische Modalitäten gekoppelt sind. Cl⁻-Imaging mit kultivierten Schmerzzellen ist eine geeignete Methode, dies zu untersuchen.

Um Cl⁻-Imaging-Experimente mit kultivierten DRG-Neuronen durchführen zu können, müssen die Zellen zunächst mit einem Cl⁻-Sensor ausgestattet werden. In dieser Arbeit habe ich vier verschiedene Methoden (Kalziumphosphat, Effectene[®], Nukleofektion und Virusinfektion) ausgetestet, DRG-Neurone mit dem Anionen-sensitiven Cl⁻-Sensor YFP152L zu transfizieren. Leider hat nur eine der vier Techniken zu befriedigenden Ergebnissen geführt.

Kalziumphosphat-, und Effectene[®]-Transfektionen erwiesen sich als absolut ungeeignet, da mit ihnen Transfektionsraten für DRG-Neurone von ~1% erzielt wurden.

Mit der Nukleofektions-Methode wurde eine maximale Transfektionsrate von ~27% erreicht. Allerdings scheint diese, auf Elektroporation basierende Technik sehr schädigend auf frisch dissoziierte DRG-Neurone zu wirken, da nach erfolgter Nukleofektion nur noch etwa ein Drittel der Neurone intakt waren. Im Bild in Abbildung 3.49 exprimiert eine Zelle den Cl⁻-Sensor YFP152L, die meisten anderen Zellen fielen dem Elektroschock zum Opfer.

Mit Virusinfektionen wurden die höchsten Raten erzielt. Das in Abb. 3.50 gezeigte Bild lässt eine hohe Transfektionseffizienz sowohl für DRG-Neurone (~35%), als auch für nicht-neuronale Zellen (~75%, geschätzt) erkennen.

Zwar ist die Herstellung der Viren ein zeitaufwendiges Verfahren, allerdings hat der Virus-vermittelte Gentransfer gegenüber konventionellen Transfektions-Methoden mehrere Vorteile: (1.) Infektions-Ansätze sind in wenigen Minuten, mit geringem Arbeitsaufwand hergestellt, am nächsten Tag stehen die Zellen für Imaging-Experimente zur Verfügung. (2.) Die Inkubationszeit des Transfektions-, bzw. Infektionsansatzes ist für Experimente mit DRG-Neuronen ein kritischer Parameter, da sich die physiologischen Eigenschaften dieser Zellen mit zunehmender Kulturdauer verändern (Scott & Edwards, 1980). (3.) Lange Inkubationszeiten, wie bei Kalziumphosphat-, oder Effectene[®]-Transfektionen werden durch Virusinfektionen umgangen. (4.) Bei Bedarf können die Viruspartikel in HER911-Zellen mit geringem Arbeits- und Zeitaufwand vermehrt werden

und erfordern keine kosten- und zeitintensiven Präparationen von Transfektions-Plasmiden, wie im Fall konventioneller Transfektions-Methoden.

Nicht-neuronale Zellen ließen sich in dem in Abb. 3.50 gezeigten Experiment mit höherer Effizienz manipulieren (~75%), als DRG-Neurone. Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme wurden, außer in den Perikaryen der somatosensorischen Neurone, auch in fibroblastären Satellitenzellen gemessen (England et al., 2001). Satellitenzellen umgeben DRG-Neurone im nativen Gewebe wie ein Mantel, weshalb sie auch als Mantelzellen bezeichnet werden. Über ihre Funktion, sowie über die Rolle der Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanäle in diesen Zellen, ist bisher wenig bekannt. Farbstoff-Diffusionsexperimente haben eine Kopplung der Intrazellularräume von DRG-Neuronen und Satellitenzellen nachgewiesen (Huang et al., 2004). Möglicherweise tragen die Satellitenzellen zur Cl^- -Homöostase von DRG-Neuronen bei, und haben über die zytosolische Kopplung Einfluss auf die elektrische Erregbarkeit der Neurone. Mit YFP152L-ausgestatteten Satellitenzellen könnte dieser Fragestellung in Zukunft nachgegangen werden.

Infektionen mit HEK293-Zellen (Daten nicht gezeigt) haben eine Infektionseffizienz von 100% ergeben. Virusinfektionen mit YFP152L-kodierenden Adenoviren sind also nicht nur für genetische Manipulationen von Spinalganglien-Neuronen und -Satellitenzellen, sondern auch für HEK293-Zellen interessant.

Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitmangel keine Cl^- -Imaging-Experimente mit infizierten DRG-Neuronen durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz ist diese erfolgreich etablierte Methode ein neuartiges, effektives und preiswertes Werkzeug der genetischen Manipulation neuronaler, sowie nicht-neuronaler Zellen, und stellt eine wertvolle Alternative zu herkömmlichen Methoden des Gentransfers dar.

4.8 LabView-Software

Die Anzahl aller in dieser Arbeit untersuchten Einzelzellen (insgesamt 5540 Zellen) lässt auf mühsame Auszählarbeiten schließen. Nur durch die speziellen, von mir entwickelten LabView-Programme war es möglich die großen Datenmengen mit geringem Zeitaufwand zu sammeln und anschließend zu analysieren.

Für automatisierte Cl^- -Imaging-Experimente mit dem Screeningsystem ToxFinder[©] habe ich die Zellerkennungs-Software CellDetect[©] entwickelt. Die Verwendung dieser Struktur-erkennungs-Routine, in der von mir entwickelten Software PCDetect[©] (PC, *pain cell*), ermöglicht selektive und quantitative Intensitätsanalysen von Schmerzzellen in Co-

Kulturen bei automatisierten Cl⁻-Imaging-Experimenten. Mit dem Screeningsystem kann nun nach spezifischen Agonisten oder Antagonisten gesucht werden, die die Funktion der Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanäle verändern. Ein spezifischer Blocker für Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle wäre sowohl bei weiteren elektrophysiologischen als auch bei biochemischen Untersuchungen von großem Nutzen. Die Suche nach diesem Blocker kann mit Hilfe einer weit angelegten Untersuchung von biologisch gewonnenen Toxinen durchgeführt werden. Gerade im Bereich der Schmerzforschung erhofft man sich aus der Untersuchung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle Erkenntnisse als Basis zur Entwicklung neuer Analgetika, die die an der Schmerzweiterleitung beteiligten Ionenkanäle modulieren können. Sie bilden daher ein mögliches Ziel zur Erprobung neuer Therapieansätze (Eglen et al., 1999).

4.9 Das Funktionelle Modell der Signaltransduktion in Schmerzzellen / Ausblick

Neben Riechzellen sind DRG-Neurone die einzigen bekannten Nervenzellen, die intrazellulär Cl⁻ akkumulieren. Viele DRG-Neurone exprimieren Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle. Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erzeugt deshalb bei diesen Zellen eine Depolarisation durch Cl⁻-Efflux und damit eine Verstärkung der elektrischen Aktivität. Bisher war nicht bekannt, welche Modalität somatosensorischer Neurone Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle exprimieren und wie groß der Anteil des Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Stroms am Rezeptorstrom ist. In der Literatur findet man viele Hinweise darauf, dass Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle von den kleinen- und mittelgroßen Hitze-sensitiven, TRPV1-positiven DRG-Neuronen exprimiert werden. Daher habe ich in dieser Arbeit die Rolle der Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanäle bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalgenerierung untersucht. Mit Cl⁻-Imaging und Patch-Clamp-Experimenten konnte ich zeigen, dass der TRPV1-vermittelte Rezeptorstrom in manchen DRG-Neuronen durch Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Ströme verstärkt wird. Die Triebkraft für den exzitatorischen Cl⁻-Efflux wird durch die [Cl⁻]_i bestimmt. Da die Amplitude des Cl⁻-Stroms in den untersuchten Neuronen unterschiedlich stark war, habe ich die Hypothese erstellt, dass die [Cl⁻]_i in den untersuchten DRG-Neuronen variierte. 2P-FLIM (*in vitro* & *in situ*) mit dem Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MQAE sowie ratiometrische Messungen mit dem FRET-basierten Cl⁻-Indikator Clomeleon (*in situ*) haben diese Hypothese bestätigt. Außerdem konnte ich mit 2P-FLIM nachweisen, dass während der postnatalen Reifung des Nervensystems in

manchen DRG-Neuronen ein Cl^- -Switch stattfindet, der in diesen Zellen die Abnahme der $[\text{Cl}^-]_i$ zur Folge hat. Die Ergebnisse neuerer Studien legen die Vermutung nahe, dass der Umbau der Cl^- -Homöostase durch den Cl^- -Kotransporter NKCC1 verwirklicht wird. Die in dieser Arbeit erarbeitete Datenlage ermöglicht nun, ein Modell für die Signaltransduktion in Hitze-sensitiven Schmerzzellen zu postulieren. Dieses Modell ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

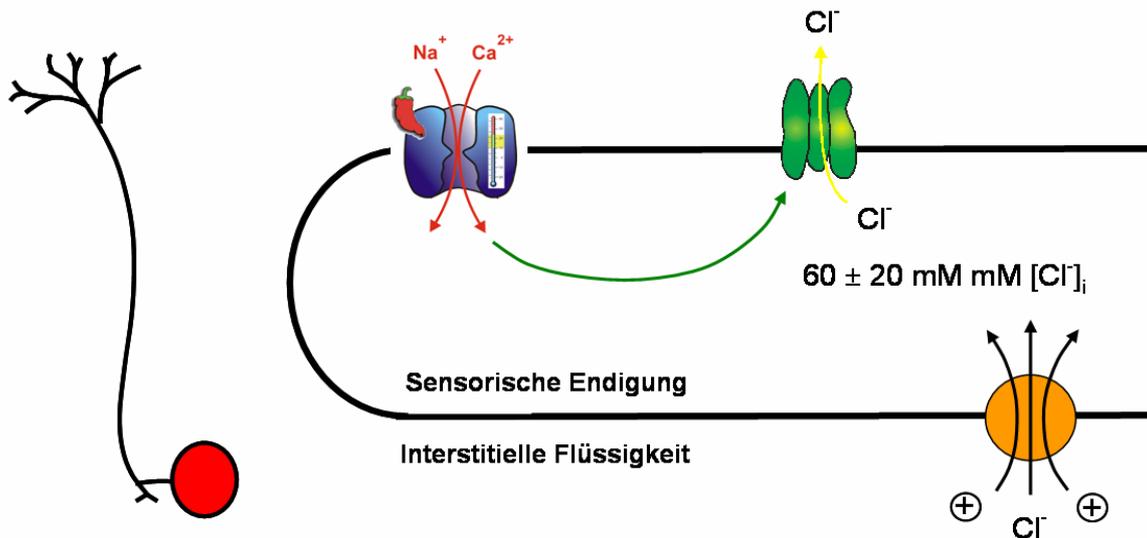


Abbildung 4.1: Modell der Cl^- -basierten Signalverstärkung in Capsaicin- und Hitze-sensitiven Schmerzzellen. TRPV1-Kanäle (blau) leiten bei ihrer Aktivierung Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Depolarisation des Membranpotenzials und bedingt die Öffnung Ca^{2+} -gesteuerter Cl^- -Kanäle (grün). Eine hohe $[\text{Cl}^-]_i$, die vom Cl^- -akkumulierenden Transporter NKCC1 (orange) aufrecht gehalten wird, liefert die treibende Kraft für den exzitatorischen Cl^- -Ausstrom, der die Verstärkung des Sensorpotenzials bedingt.

In Riechzellen wurde der Cl^- -basierte Signalverstärkungsmechanismus bereits vor einigen Jahren nachgewiesen. Neue Studien sprechen dafür, dass auch Zellen der glatten Muskulatur diesen Verstärkungsmechanismus nutzen (Leblanc et al., 2005). Die hier vorliegende Arbeit gibt Hinweise, dass DRG-Neurone diesen Mechanismus bei der Signalentstehung verwenden. Der Cl^- -basierte Signalverstärkungsmechanismus könnte demnach ein allgemeines Konzept für Zellen sein, die kleine Ca^{2+} -Signale in Depolarisationen umwandeln müssen: Die Cl^- -Akkumulation liefert dabei die nötige Triebkraft für depolarisierende Cl^- -Ströme, die durch ein Ca^{2+} -Signal ausgelöst werden.

Um einen Einblick in die Funktionsweise des Zusammenspiels von TRPV1- mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen zu bekommen, müssen die biophysikalischen Eigenschaften der beiden Kanäle zukünftig in kinetischen Experimenten untersucht werden. Für die

Untersuchung von TRPV1-Kanälen in Schmerzzellen hat unsere Arbeitsgruppe die Substanz Na-CDMNB-caged Capsaicin entwickelt. Seine Eignung für kinetische Untersuchungen habe ich in dieser Arbeit nachgewiesen. Das Zusammenspiel der beiden Kanäle bei der Hitzeschmerz-vermittelten Signalgenerierung kann daher nun unter Verwendung von Na-CDMNB-caged Capsaicin untersucht werden.

Neben der hier postulierten funktionellen Kopplung von TRPV1- mit Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen, könnten Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle auch an der Signaltransduktion in somatosensorischen Neuronen anderer Modalitäten beteiligt sein. Mit Cl^- -Imaging kann diese Frage beantwortet werden. Um Cl^- -Imaging mit somatosensorischen Neuronen durchführen zu können, müssen diese zuvor mit einem Cl^- -Sensor ausgestattet werden. In meiner Arbeit habe ich erfolgreich eine Methode etabliert DRG-Neurone sowie nicht-neuronale Zellen, durch adenoviralen Gentransfer mit dem Anionen-sensitiven YFP-I152L auszustatten. Außerdem habe ich eine für Cl^- -Imaging mit Schmerzzellen geeignete transgene Mauslinie identifiziert: die Clomeleon-exprimierende Mauslinie CLM-1. Diese Arbeit bietet daher die Grundlage für zukünftige Cl^- -Imaging-Experimente zur Untersuchung von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen mit infizierten, bzw. transgenen kultivierten DRG-Neuronen.

5. Zusammenfassung

Polymodale Schmerzzenen exprimieren Transduktionskanäle, die durch gewebschädigende Reize aktiviert werden und einen depolarisierenden Ca^{2+} -Fluß in die Zelle leiten. Einige Schmerzzenen exprimieren Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle, die durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geöffnet werden und einen auswärtsgerichteten Cl^- -Fluß leiten. Dieser Cl^- -Efflux depolarisiert die Zellen zusätzlich und bewirkt eine Verstärkung der sensorischen Signale. Der „Gain“ dieses Cl^- -basierten Verstärkungsmechanismus wird durch die intrazelluläre Cl^- -Konzentration ($[\text{Cl}^-]_i$) bestimmt. Es ist bekannt, dass Cl^- -Akkumulation in Schmerzzenen durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter NKCC1 vermittelt wird. Zur $[\text{Cl}^-]_i$ von Schmerzzenen gibt es dagegen keine zuverlässigen Informationen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob und welche Schmerzzenen den Cl^- -basierten Verstärkungsmechanismus nutzen.

In dieser Arbeit wurde durch Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit-Imaging-Mikroskopie (2P-FLIM) mit Schmerzzenen in Gewebepräparationen von Mäusen gezeigt, dass die $[\text{Cl}^-]_i$ während der postnatalen Entwicklung verändert wird. In Schmerzzenen neugeborener Tiere ist die $[\text{Cl}^-]_i$ homogen und hoch, wogegen sie in adulten Tieren über einen großen Konzentrationsbereich streut. Diese Ergebnisse konnten *in vitro*, an kultivierten Schmerzzenen einer adulten Ratte, mit 2P-FLIM bestätigt werden.

Durch funktionelles *in vitro*- Cl^- -Imaging mit Schmerzzenen adulter Mäuse, und in Patch-Clamp-Experimenten mit kultivierten Schmerzzenen adulter Ratten wurden Hinweise erarbeitet, dass TRPV1-exprimierende, Capsaicin-sensitive Schmerzzenen den Cl^- -basierten Mechanismus zur Verstärkung sensorischer Signale verwenden. In Ganzzell-Ableitungen wurden Capsaicin-induzierte, exzitatorische Cl^- -Ströme mit stark variierenden Amplituden gemessen, die die variierenden $[\text{Cl}^-]_i$ von Schmerzzenen adulter Tiere widerspiegeln.

Für kinetische Untersuchungen von TRPV1-Kanälen haben wir Na-CDMNB-caged Capsaicin entwickelt. Seine Verwendbarkeit wurde in dieser Arbeit nachgewiesen.

Es wurde eine Adenovirus-basierte Methode etabliert, um kultivierte Schmerzzenen mit dem Anionen-sensitiven YFP1152L auszustatten. Zudem wurde eine Zellerkennungs-Software entwickelt, die automatisiertes *in vitro*- Cl^- -Imaging ermöglicht. Es kann nun nach spezifischen Agonisten oder Antagonisten für Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle gesucht werden und es ist möglich, weitere sensorische Modalitäten zu identifizieren, die den Verstärkungsmechanismus nutzen.

5. Summary

Polymodal pain cells express transduction channels, which conduct cations into the cell upon activation and cause an increase of the intracellular calcium concentration. This leads to a depolarisation of the plasma membrane and the activation of Ca^{2+} -activated Cl^- channels. These channels conduct an outward-directed and excitatory Cl^- -current which causes an additional depolarisation of the cell and the amplification of the receptor current. The gain of this chloride based amplification mechanism depends on the intracellular chloride concentration. It has been shown, that Cl^- -accumulation in pain cells is performed by the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -cotransporter NKCC1, but there is no reliable information available about the intracellular Cl^- -concentration in pain cells. Furthermore it is not known, which and whether pain cells employ the Cl^- -based amplification mechanism.

Two-photon fluorescence-lifetime-imaging-microscopy (2P-FLIM) with pain cells in tissue preparations (dorsal root ganglia) of mouse revealed that the intracellular Cl^- -concentration ($[\text{Cl}^-]_i$) of pain cells changes during postnatal development. The $[\text{Cl}^-]_i$ of pain cells from newborn mice is homogenous and high and is distributed heterogeneously in adult animals. These results were confirmed *in vitro*, with primary cultured pain cells of adult rats.

Functional Cl^- -imaging and patch-clamp experiments with cultured pain cells of adult rats provided evidence, that capsaicin sensitive pain cells, which express TRPV1 channels, employ the Cl^- -based mechanism. In accordance to the heterogeneous distribution of $[\text{Cl}^-]_i$ of pain cells in adults animals, the application of capsaicin induced outward-directed Cl^- -currents of varying amplitude in whole cell recordings with cultured pain cells of rat.

For kinetic experiments with TRPV1 channels in pain cells we developed Na-CDMNB-caged capsaicin. Its suitability for kinetic investigations was confirmed in this thesis.

The infrastructure for future Cl^- -imaging experiments with cultures pain cells was created: An adenovirus based method of genetic manipulation, to equip cultured pain cells with the anion-sensitive YFP1152L, as well as a software for structure recognition in fluorescence images, which can be used for selective intensity analysis of pain cells in co-cultures. Both are tools which permit automated high throughput screenings to search for specific agonists or antagonists which affect the function of Ca^{2+} -activated Cl^- channels and simplify the investigation of their physiological properties.

6. Literaturangaben

- Agarwal,N., Offermanns,S., & Kuner,R. (2004) Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. *Genesis.*, 38, 122-129.
- Alvarez-Leefmans,F.J., Gamino,S.M., Giraldez,F., & 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. & Nogueron,I. (1989) Intracellular chloride homeostasis in vertebrate nerve cells. *Acta Physiol Scand.Suppl*, 582, 17.
- Alvarez-Leefmans,F.J., Leon-Olea,M., Mendoza-Sotelo,J., Alvarez,F.J., Anton,B., & Garduno,R. (2001) Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, 104, 569-582.
- Andres,K.H. (1961) Research on the fine-structure of spinal ganglia. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.*, 55, 1-48.
- Ault,B. & Hildebrand,L.M. (1994) GABAA receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the rat isolated spinal cord-tail preparation. *Neuropharmacology*, 33, 109-114.
- Bader,C.R., Bertrand,D., & Schlichter,R. (1987) Calcium-activated chloride current in cultured sensory and parasympathetic quail neurones. *J.Physiol*, 394, 125-148.
- Belmonte,C. & Giraldez,F. (1981) Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J.Physiol* , 321, 355-368.
- Benham,C.D., Davis,J.B., & Randall,A.D. (2002) Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology*, 42, 873-888.
- Bessou,P. & Perl,E.R. (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J.Neurophysiol.*, 32, 1025-1043.

- Bevensee, M.O., Apkon, M., & Boron, W.F. (1997) Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. II. Electrogenic Na/HCO₃ cotransport. *J.Gen.Physiol*, 110, 467-483.
- Bevensee, M.O., Weed, R.A., & Boron, W.F. (1997) Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. I. Role Of HCO₃⁻. *J.Gen.Physiol*, 110, 453-465.
- Bhandawat, V., Reisert, J., & Yau, K.W. (2005) Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science*, 308, 1931-1934.
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., & Gereau, R.W. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35, 721-731.
- Campbell, J.N., Raja, S.N., Cohen, R.H., Manning, D.C., Kahn, A.A., & Meyer, R.A. (1990) Peripheral neural mechanisms of nociception. Textbook of Pain (ed. by P. D. Wall & R. Melzack), pp. 22-45. Churchill Livingstone, New York.
- Carlton, S.M. & Hargett, G.L. (2002) Stereological analysis of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II alpha -containing dorsal root ganglion neurons in the rat: colocalization with isolectin Griffonia simplicifolia, calcitonin gene-related peptide, or vanilloid receptor 1. *J.Comp Neurol.*, 448, 102-110.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., & Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Caterina, M.J. & Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu.Rev.Neurosci.*, 24, 487-517.
- Cervero, F. (1994) Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev.*, 74, 95-138.
- Chao, A.C., Dix, J.A., Sellers, M.C., & Verkman, A.S. (1989) Fluorescence measurement of chloride transport in monolayer cultured cells. Mechanisms of chloride transport in fibroblasts. *Biophys.J.*, 56, 1071-1081.

- Chen,C. & Okayama,H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.*, 7, 2745-2752.
- Cherkas,P.S., Huang,T.Y., Pannicke,T., Tal,M., Reichenbach,A., & Hanani,M. (2004) The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain*, 110, 290-298.
- Cherubini,E., Gaiarsa,J.L., & Ben Ari,Y. (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.*, 14, 515-519.
- Clapham,D.E., Runnels,L.W., & Strubing,C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat.Rev.Neurosci.*, 2, 387-396.
- Clapham,D.E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524.
- Cooper,B.Y. & Sessle,B.J. (1993) Physiology of nociception in the trigeminal system. The Headaches (ed. by J. Olesen, P. Tfelt-Hansen, & K. M. A. Welch), pp. 87-92. Raven, New York.
- Currie,K.P. & Scott,R.H. (1992) Calcium-activated currents in cultured neurones from rat dorsal root ganglia. *Br.J.Pharmacol.*, 106, 593-602.
- Currie,K.P., Wootton,J.F., & Scott,R.H. (1995) Activation of Ca(2+)-dependent Cl-currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen. *J.Physiol*, 482 (Pt 2), 291-307.
- Darian-Smith I. (1984a) The sense of touch: performance and peripheral neural processes. Handbook of Physiology. (ed. by S. F. Geiger, I. Darian-Smith, J. M. Brookhart, & V. B. Mountcastle), pp. 739-788. Am. Physiol. Soc., Washington, DC.
- Darian-Smith I (1984b) Thermal sensibility. Handbook of Physiology. (ed. by S. F. Geiger, I. Darian-Smith, J. M. Brookhart, & V. B. Mountcastle), pp. 879-913. Am. Physiol. Soc., Washington, DC.
- Deschenes,M., Feltz,P., & Lamour,Y. (1976) A model for an estimate in vivo of the ionic basis of presynaptic inhibition: an intracellular analysis of the GABA-induced depolarization in rat dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 118, 486-493.

- Di,M., V, Bisogno,T., & De Petrocellis,L. (2001) Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol.Sci.*, 22, 346-349.
- Dirajlal,S., Pauers,L.E., & Stucky,C.L. (2003) Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J.Neurophysiol.*, 89, 513-524.
- Duchen,M.R. (1990) Effects of metabolic inhibition on the membrane properties of isolated mouse primary sensory neurones. *J.Physiol*, 424, 387-409.
- Dzeja,C., Hagen,V., Kaupp,U.B., & Frings,S. (1999) Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.*, 18, 131-144.
- Eberhardson,M., Patterson,S., & Grapengiesser,E. (2000) Microfluorometric analysis of Cl⁻ permeability and its relation to oscillatory Ca²⁺ signalling in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Cell Signal.*, 12, 781-786.
- Eckardt,T., Hagen,V., Schade,B., Schmidt,R., Schweitzer,C., & Bendig,J. (2002) Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 2. Photocleavage of selected (coumarin-4-yl)methyl-caged adenosine cyclic 3',5'-monophosphates with fluorescence enhancement. *J.Org.Chem.*, 67, 703-710.
- Eglen,R.M. (1999) High Throughput Screening: Myths and Future Realities. *J.Biomol.Screen.*, 4, 179-182.
- Eglen,R.M., Hunter,J.C., & Dray,A. (1999) Ions in the fire: recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *Trends Pharmacol.Sci.*, 20, 337-342.
- England,S., Heblich,F., James,I.F., Robbins,J., & Docherty,R.J. (2001) Bradykinin evokes a Ca²⁺-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. *J.Physiol*, 530, 395-403.
- Firestein,S., Darrow,B., & Shepherd,G.M. (1991) Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron*, 6, 825-835.

- Frings,S., Lynch,J.W., & Lindemann,B. (1992) Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J.Gen.Physiol*, 100, 45-67.
- Frings,S., Seifert,R., Godde,M., & Kaupp,U.B. (1995) Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 15, 169-179.
- Frings,S., Reuter,D., & Kleene,S.J. (2000) Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels--homing in on an elusive channel species. *Prog.Neurobiol.*, 60, 247-289.
- Furuta,T., Wang,S.S., Dantzker,J.L., Dore,T.M., Bybee,W.J., Callaway,E.M., Denk,W., & Tsien,R.Y. (1999) Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 1193-1200.
- Galiotta,L.J., Haggie,P.M., & Verkman,A.S. (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett.*, 499, 220-224.
- Gallagher,J.P., Higashi,H., & Nishi,S. (1978) Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. *J.Physiol*, 275, 263-282.
- Galvan,M. & Sedlmeir,C. (1984) Outward currents in voltage-clamped rat sympathetic neurones. *J.Physiol*, 356, 115-133.
- Galvan,M., Dorge,A., Beck,F., & Rick,R. (1984) Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. *Pflugers Arch.*, 400, 274-279.
- Gavva,N.R., Klionsky,L., Qu,Y., Shi,L., Tamir,R., Edenson,S., Zhang,T.J., Viswanadhan,V.N., Toth,A., Pearce,L.V., Vanderah,T.W., Porreca,F., Blumberg,P.M., Lile,J., Sun,Y., Wild,K., Louis,J.C., & Treanor,J.J. (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J.Biol.Chem.*, 279, 20283-20295.

- Gavva,N.R., Tamir,R., Qu,Y., Klionsky,L., Zhang,T.J., Immke,D., Wang,J., Zhu,D., Vanderah,T.W., Porreca,F., Doherty,E.M., Norman,M.H., Wild,K.D., Bannon,A.W., Louis,J.C., & Treanor,J.J. (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 313, 474-484.
- Gilbert,D. (2002) Entwicklung eines automatisierten Ca²⁺-Imaging-Verfahrens zur Suche nach Toxinen für cGMP-gesteuerte Kanäle., Diplomarbeit an der Universität zu Köln.
- Granados-Soto,V., Arguelles,C.F., & Alvarez-Leefmans,F.J. (2005) Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain*, 114, 231-238.
- Grewer,C., Jager,J., Carpenter,B.K., & Hess,G.P. (2000) A new photolabile precursor of glycine with improved properties: A tool for chemical kinetic investigations of the glycine receptor. *Biochemistry*, 39, 2063-2070.
- Guo,A., Vulchanova,L., Wang,J., Li,X., & Elde,R. (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur.J.Neurosci.*, 11, 946-958.
- Hagen,V., Dzeja,C., Frings,S., Bendig,J., Krause,E., & Kaupp,U.B. (1996) Caged compounds of hydrolysis-resistant analogues of cAMP and cGMP: synthesis and application to cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry*, 35, 7762-7771.
- Hallani,M., Lynch,J.W., & Barry,P.H. (1998) Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J.Membr.Biol.*, 161, 163-171.
- Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., & Sigworth,F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391, 85-100.
- Huang,T.Y., Cherkas,P.S., Rosenthal,D.W., & Hanani,M. (2005) Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 1036, 42-49.

- Hubner,C.A., Stein,V., Hermans-Borgmeyer,I., Meyer,T., Ballanyi,K., & Jentsch,T.J. (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30, 515-524.
- Iggo,A. (1985) Sensory receptors in the skin of mammals and their sensory functions. *Rev.Neurol.(Paris)*, 141, 599-613.
- Jordt,S.E. & Julius,D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*, 108, 421-430.
- Julius,D. & Basbaum,A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-210.
- Jung,J., Hwang,S.W., Kwak,J., Lee,S.Y., Kang,C.J., Kim,W.B., Kim,D., & Oh,U. (1999) Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J.Neurosci.*, 19, 529-538.
- Jung,J., Lee,S.Y., Hwang,S.W., Cho,H., Shin,J., Kang,Y.S., Kim,S., & Oh,U. (2002) Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J.Biol.Chem.*, 277, 44448-44454.
- Kaila,K. (1994) Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog.Neurobiol.*, 42, 489-537.
- Kanaka,C., Ohno,K., Okabe,A., Kuriyama,K., Itoh,T., Fukuda,A., & 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., Nakamura,T., & Lindemann,B. (2001) Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 280, C1387-C1393.
- Kaneko,H., Putzier,I., Frings,S., Kaupp,U.B., & Gensch,T. (2004) Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J.Neurosci.*, 24, 7931-7938.

- Kashiba,H., Uchida,Y., & Senba,E. (2001) Difference in binding by isolectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 95, 18-26.
- Kato,G., Furue,H., Katafuchi,T., Yasaka,T., Iwamoto,Y., & Yoshimura,M. (2004) Electrophysiological mapping of the nociceptive inputs to the substantia gelatinosa in rat horizontal spinal cord slices. *J.Physiol*, 560, 303-315.
- 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.
- Khirug,S., Huttu,K., Ludwig,A., Smirnov,S., Voipio,J., Rivera,C., Kaila,K., & Khiroug,L. (2005) Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur.J.Neurosci.*, 21, 899-904.
- Kleene,S.J. & Gesteland,R.C. (1991) Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J.Neurosci.*, 11, 3624-3629.
- Kleene,S.J. (1995) Block by external calcium and magnesium of the cyclic-nucleotide-activated current in olfactory cilia. *Neuroscience*, 66, 1001-1008.
- Kruger,W., Gilbert,D., Hawthorne,R., Hryciw,D.H., Frings,S., Poronnik,P., & Lynch,J.W. (2005) A yellow fluorescent protein-based assay for high-throughput screening of glycine and GABAA receptor chloride channels. *Neurosci.Lett.*, 380, 340-345.
- Kuner,T. & Augustine,G.J. (2000) A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 27, 447-459.
- Kurahashi,T. & Yau,K.W. (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*, 363, 71-74.
- Lagostena,L., Ashmore,J.F., Kachar,B., & Mammano,F. (2001) Purinergic control of intercellular communication between Hensen's cells of the guinea-pig cochlea. *J.Physiol*, 531, 693-706.

- Lakowicz,J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Ed 2. New York, London. 1999.
Kluwer Academic/Plenum.
Ref Type: Generic
- Lau,K.R., Evans,R.L., & Case,R.M. (1994) Intracellular Cl⁻ concentration in striated intralobular ducts from rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch.*, 427, 24-32.
- Leblanc,N., Ledoux,J., Saleh,S., Sanguinetti,A., Angermann,J., O'driscoll,K., Britton,F., Perrino,B.A., & Greenwood,I.A. (2005) Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: a complex picture is emerging. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 83, 541-556.
- Lee,K.H., Chung,K., Chung,J.M., & Coggeshall,R.E. (1986) Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J.Comp Neurol.*, 243, 335-346.
- Leinders-Zufall,T., Rand,M.N., Shepherd,G.M., Greer,C.A., & Zufall,F. (1997) Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J.Neurosci.*, 17, 4136-4148.
- Li,G. & Niu,L. (2004) How fast does the GluR1Qflip channel open? *J.Biol.Chem.*, 279, 3990-3997.
- Li,Y.X., Schaffner,A.E., Walton,M.K., & Barker,J.L. (1998) Astrocytes regulate developmental changes in the chloride ion gradient of embryonic rat ventral spinal cord neurons in culture. *J.Physiol*, 509 (Pt 3), 847-858.
- Lidow,M.S. & Menco,B.P. (1984) Observations on axonemes and membranes of olfactory and respiratory cilia in frogs and rats using tannic acid-supplemented fixation and photographic rotation. *J.Ultrastruct.Res.*, 86, 18-30.
- Liebel,U. (2000) Konstruktion eines Screeningsystems mit Einzelzellauflösung für die fluoreszenzoptische Untersuchung von Zellkulturen., Diplomarbeit der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen.
- Lowe,G. & Gold,G.H. (1993) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, 366, 283-286.

- Ma,C. & LaMotte,R.H. (2005) Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat. *Pain*, 113, 106-112.
- Ma,Q.P. (2001) Vanilloid receptor homologue, VRL1, is expressed by both A- and C-fiber sensory neurons. *Neuroreport*, 12, 3693-3695.
- Maglova,L.M., Crowe,W.E., Smith,P.R., Altamirano,A.A., & Russell,J.M. (1998) Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport in human fibroblasts is inhibited by cytomegalovirus infection. *Am.J.Physiol*, 275, C1330-C1341.
- Maizel,J.V., Jr., White,D.O., & Scharff,M.D. (1968) The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, 36, 115-125.
- Mayer,M.L. (1985) A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture. *J.Physiol*, 364, 217-239.
- McCleskey,E.W. & Gold,M.S. (1999) Ion channels of nociception. *Annu.Rev.Physiol*, 61, 835-856.
- Meier,O. & Greber,U.F. (2004) Adenovirus endocytosis. *J.Gene Med.*, 6 Suppl 1, S152-S163.
- Mense,S. (1993) Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain*, 54, 241-289.
- Mezey,E., Toth,Z.E., Cortright,D.N., Arzubi,M.K., Krause,J.E., Elde,R., Guo,A., Blumberg,P.M., & Szallasi,A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* , 97, 3655-3660.
- Minke,B. & Cook,B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev.*, 82, 429-472.
- Miyawaki,A., Llopis,J., Heim,R., McCaffery,J.M., Adams,J.A., Ikura,M., & Tsien,R.Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388, 882-887.

- Montell,C., Birnbaumer,L., Flockerzi,V., Bindels,R.J., Bruford,E.A., Caterina,M.J., Clapham,D.E., Harteneck,C., Heller,S., Julius,D., Kojima,I., Mori,Y., Penner,R., Prawitt,D., Scharenberg,A.M., Schultz,G., Shimizu,N., & Zhu,M.X. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol.Cell*, 9, 229-231.
- Montell,C., Birnbaumer,L., & Flockerzi,V. (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108, 595-598.
- Montell,C., Birnbaumer,L., & Flockerzi,V. (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108, 595-598.
- Montell,C., Birnbaumer,L., Flockerzi,V., Bindels,R.J., Bruford,E.A., Caterina,M.J., Clapham,D.E., Harteneck,C., Heller,S., Julius,D., Kojima,I., Mori,Y., Penner,R., Prawitt,D., Scharenberg,A.M., Schultz,G., Shimizu,N., & Zhu,M.X. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol.Cell*, 9, 229-231.
- Morales-Aza,B.M., Chillingworth,N.L., Payne,J.A., & Donaldson,L.F. (2004) Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol.Dis.*, 17, 62-69.
- Nakamura,T., Kaneko,H., & Nishida,N. (1997) Direct measurement of the chloride concentration in newt olfactory receptors with the fluorescent probe. *Neurosci.Lett.*, 237, 5-8.
- Neher,E. & Sakmann,B. (1992) The patch clamp technique. *Sci.Am.*, 266, 44-51.
- Neher,E. & Augustine,G.J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J.Physiol*, 450, 273-301.
- Niggli,E. & Egger,M. (2004) Applications of multi-photon microscopy in cell physiology. *Front Biosci.*, 9, 1598-1610.
- Nishikimi,A., Kira,Y., Kasahara,E., Sato,E.F., Kanno,T., Utsumi,K., & Inoue,M. (2001) Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release. *Biochem.J.*, 356, 621-626.

- Pace,U., Hanski,E., Salomon,Y., & Lancet,D. (1985) Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature*, 316, 255-258.
- Petruska,J.C., Napaporn,J., Johnson,R.D., Gu,J.G., & Cooper,B.Y. (2000) Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J.Neurophysiol.*, 84, 2365-2379.
- Petruska,J.C., Napaporn,J., Johnson,R.D., & Cooper,B.Y. (2002) Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience*, 115, 15-30.
- Piston,D. (1996) Two-photon excitation microscopy. *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*. (ed. by X. Wang & B. Herman), pp. 253-272. J. Wiley and Sons, New York.
- Priestley,J.V., Michael,G.J., Averill,S., Liu,M., & Willmott,N. (2002) Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 80, 495-505.
- Putzier,I. (2000) Methoden zur Untersuchung Kalzium-aktivierter Chloridkanäle in somatosensorischen Neuronen der Ratte. Diplomarbeit der Universität zu Köln.
- Putzier,I. (2003) Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle und Cl⁻-Akkumulation in Sinneszellen der Ratte. Diplomarbeit an der Universität zu Köln.
- Reisert,J. & Matthews,H.R. (2001) Responses to prolonged odour stimulation in frog olfactory receptor cells. *J.Physiol*, 534, 179-191.
- Reisert,J., Bauer,P.J., Yau,K.W., & Frings,S. (2003) The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J.Gen.Physiol*, 122, 349-363.
- Reisert,J., Lai,J., Yau,K.W., & Bradley,J. (2005) Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron*, 45, 553-561.
- Reuter,D., Zierold,K., Schroder,W.H., & 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., & Kaila,K. (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397, 251-255.
- Rivera,C., Voipio,J., & Kaila,K. (2005) Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J.Physiol*, 562, 27-36.
- Rola,R., Witkowski,G., & Szulczyk,P.J. (2003) Voltage-dependent K⁺ currents in rat cardiac dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 119, 181-191.
- Romeis,B. (1968) *Mikroskopische Technik.*, 16. neubearbeitete und verbesserte Auflage. edn, Oldenburg Verlag, München.
- Rosenbaum,T., Gordon-Shaag,A., Munari,M., & Gordon,S.E. (2004) Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J.Gen.Physiol*, 123, 53-62.
- Ruscheweyh,R., Ikeda,H., Heinke,B., & Sandkuhler,J. (2004) Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J.Physiol*, 555, 527-543.
- Russell,W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J.Gen.Virol.*, 81, 2573-2604.
- Sasamura,T. & Kuraishi,Y. (1999) Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn.J.Pharmacol.*, 80, 275-280.
- Sato,T., Konno,H., Tanaka,Y., Kataoka,T., Nagai,K., Wasserman,H.H., & Ohkuma,S. (1998) Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. *J.Biol.Chem.*, 273, 21455-21462.
- Schaible,H.G. & Grubb,B.D. (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55, 5-54.
- Scott,B.S. & Edwards,B.A. (1980) Electric membrane properties of adult mouse DRG neurons and the effect of culture duration. *J.Neurobiol.*, 11, 291-301.
- Scott,R.H., McGuirk,S.M., & Dolphin,A.C. (1988) Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br.J.Pharmacol.*, 94, 653-662.

- Scott,R.H., Sutton,K.G., Griffin,A., Stapleton,S.R., & Currie,K.P. (1995) Aspects of calcium-activated chloride currents: a neuronal perspective. *Pharmacol.Ther.*, 66, 535-565.
- Scroggs,R.S. & Fox,A.P. (1992) Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J.Physiol*, 445, 639-658.
- Seifert,R., Eismann,E., Ludwig,J., Baumann,A., & Kaupp,U.B. (1999) Molecular determinants of a Ca²⁺-binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO J.*, 18, 119-130.
- Smart,D., Gunthorpe,M.J., Jerman,J.C., Nasir,S., Gray,J., Muir,A.I., Chambers,J.K., Randall,A.D., & Davis,J.B. (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br.J.Pharmacol.*, 129, 227-230.
- Snider,W.D. & McMahon,S.B. (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20, 629-632.
- Stapleton,S.R., Scott,R.H., & Bell,B.A. (1994) Effects of metabolic blockers on Ca(2+)-dependent currents in cultured sensory neurones from neonatal rats. *Br.J.Pharmacol.*, 111, 57-64.
- Stein,V., Hermans-Borgmeyer,I., Jentsch,T.J., & 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.
- Stucky,C.L. & Lewin,G.R. (1999) Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J.Neurosci.*, 19, 6497-6505.
- Sung,K.W., Kirby,M., McDonald,M.P., Lovinger,D.M., & 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.
- Surh,Y.J. & Lee,S.S. (1995) Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci.*, 56, 1845-1855.
- Szallasi,A., Nilsson,S., Farkas-Szallasi,T., Blumberg,P.M., Hokfelt,T., & Lundberg,J.M. (1995) Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional

- differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.*, 703, 175-183.
- Szallasi,A. & Blumberg,P.M. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol.Rev.*, 51, 159-212.
- Szolcsanyi,J. (2000) Are cannabinoids endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor? *Trends Pharmacol.Sci.*, 21, 41-42.
- Takeuchi,H. & Kurahashi,T. (2005) Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J.Neurosci.*, 25, 11084-11091.
- Tanelian,D.L. & Beuerman,R.W. (1984) Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Exp.Neurol.*, 84, 165-178.
- Tomaselli,K.J., Doherty,P., Emmett,C.J., Damsky,C.H., Walsh,F.S., & Reichardt,L.F. (1993) Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *J.Neurosci.*, 13, 4880-4888.
- Tominaga,M., Caterina,M.J., Malmberg,A.B., Rosen,T.A., Gilbert,H., Skinner,K., Raumann,B.E., Basbaum,A.I., & Julius,D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
- Viviani,B., Rossi,A.D., Chow,S.C., & Nicotera,P. (1995) Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology*, 16, 19-25.
- Wachter,R.M. & Remington,S.J. (1999) Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr.Biol.*, 9, R628-R629.
- Wallquist,W., Zelano,J., Plantman,S., Kaufman,S.J., Cullheim,S., & Hammarberg,H. (2004) Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy. *J.Comp Neurol.*, 480, 162-169.
- Walpole,C.S., Wrigglesworth,R., Bevan,S., Campbell,E.A., Dray,A., James,I.F., Masdin,K.J., Perkins,M.N., & Winter,J. (1993) Analogues of capsaicin with agonist

- activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *J.Med.Chem.*, 36, 2381-2389.
- Welch,J.M., Simon,S.A., & Reinhart,P.H. (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 13889-13894.
- Whitear,M. (1960) An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *J.Anat.*, 94, 387-409.
- Willis,E.F., Clough,G.F., & Church,M.K. (2004) Investigation into the mechanisms by which nedocromil sodium, frusemide and bumetanide inhibit the histamine-induced itch and flare response in human skin in vivo. *Clin.Exp.Allergy*, 34, 450-455.
- Zemelman,B.V., Nesnas,N., Lee,G.A., & Miesenbock,G. (2003) Photochemical gating of heterologous ion channels: remote control over genetically designated populations of neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 1352-1357.
- Zhang,J.M., Song,X.J., & LaMotte,R.H. (1999) Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion. *J.Neurophysiol.*, 82, 3359-3366.
- Zhang,L.L., Pathak,H.R., Coulter,D.A., Freed,M.A., & Vardi,N. (2006) Shift of intracellular chloride concentration in ganglion and amacrine cells of developing mouse retina. *J.Neurophysiol.*, 95, 2404-2416.
- Zhao,H., Otaki,J.M., & Firestein,S. (1996) Adenovirus-mediated gene transfer in olfactory neurons in vivo. *J.Neurobiol.*, 30, 521-530.
- Zufall,F. & Firestein,S. (1993) Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J.Neurophysiol.*, 69, 1758-1768.
- Zygmunt,P.M., Petersson,J., Andersson,D.A., Chuang,H., Sorgard,M., Di,M., V, Julius,D., & Hogestatt,E.D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-457.