

**Capsaicinrezeptoren und die Wirkung von Crobenetin auf  
Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle in einer  
Dünnschnittpräparation primär sensorischer Neurone junger Ratten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ulrich J. Krause

aus Frankfurt/Main

Gießen 2002

Aus dem Physiologischen Institut  
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. A. Scholz

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 13.12.2002

---

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	3
1.1	Grundlagen .....	3
1.1.1	Ionenkanäle in erregbaren Membranen.....	3
1.1.2	Das Ruhemembranpotential.....	6
1.1.3	Aktionspotentiale .....	8
1.1.4	Primär sensorische Neurone des Spinalganglions .....	10
1.2	Der Capsaicinrezeptor .....	15
1.2.1	Scharfe Pfeffer: Capsaicin und andere Vanilloide .....	15
1.2.2	Wirkung von Capsaicin auf primär sensorische Neurone.....	17
1.2.3	Molekularbiologie des klonierten Capsaicinrezeptors VR1 .....	19
1.2.4	Anatomische Lokalisation von VR1 .....	21
1.2.5	Elektrophysiologische Charakteristika von VR1 .....	21
1.2.6	Pharmakologische Eigenschaften von VR1 .....	22
1.2.7	Modulation und Regulation von VR1 .....	24
1.2.8	Auswirkungen der Deletion des VR1–Gens in Mäusen .....	26
1.3	Spannungsabhängige Natriumkanäle.....	26
1.3.1	Biophysikalische Eigenschaften spannungsabhängiger Natriumkanäle .....	27
1.3.2	Molekularbiologie spannungsabhängiger Natriumkanäle.....	28
1.3.3	Molekulare Pharmakologie spannungsabhängiger Natriumkanäle.....	32
1.3.4	Modulation spannungsabhängiger Natriumkanäle.....	34
1.3.5	TTX-resistente Natriumkanäle in sensorischen Neuronen .....	35
1.3.6	Natriumkanäle in sensorischen Neuronen nach Nervenschädigungen .....	38
1.3.7	Der Natriumkanalblocker Crobenetin (BIII 890 CL).....	39
1.4	Physikalische Grundlagen .....	41
1.4.1	Fragestellung.....	43
2	Material und Methoden .....	45
2.1.1	Präparation der Ganglienschnitte .....	45
2.1.2	Lösungen.....	48
2.1.3	Toxine .....	49
2.1.4	Die <i>patch-clamp</i> Technik.....	51
2.1.5	Hintergrundrauschen.....	56
2.1.6	Der Versuchsstand .....	58
2.1.7	Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren .....	64
3	Ergebnisse .....	66
3.1	Capsaicinrezeptoren in primär sensorischen Neuronen junger Ratten .....	66
3.1.1	Capsaicin-induzierte Einwärtsströme in der <i>whole-cell</i> Konfiguration .....	66

---

3.1.2	Capsaicin depolarisiert die Zellmembran .....	68
3.1.3	Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors .....	70
3.1.4	Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors .....	73
3.1.5	Einzelkanalamplitude und Leitfähigkeit des Capsaicinrezeptors .....	76
3.1.6	Capsazepin blockiert die Capsaicinrezeptor-Einzelkanalaktivität .....	81
3.1.7	Eigenschaften Capsaicin induzierter Ganzzellströme bei unterschiedlichen Haltepotentialen.....	83
3.1.8	Wirkung von Capsaicin auf Aktionspotentiale in sensorischen Neuronen.....	85
3.2	Die Wirkung des Natriumkanalblockers Crobenetin (BIII 890 CL) auf Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle primär sensorischer Neurone .....	87
3.2.1	Benutzungsabhängig Blockade TTX-resistenter Natriumströme.....	87
3.2.2	Crobenetin bindet hochaffin an inaktivierte TTX-resistente Natriumkanäle.....	91
3.2.3	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Crobenetin .....	93
3.2.4	Erholung vom benutzungsabhängigen Block .....	94
3.2.5	Der Effekt von Crobenetin auf einzelne TTX-resistente Aktionspotentiale .....	97
3.2.6	Crobenetin hemmt Serien TTX-resistenter Aktionspotentiale.....	100
4	Diskussion .....	104
4.1	Die <i>thin slice</i> Präparation.....	104
4.2	Capsaicinrezeptoren in primär sensorischen Neuronen.....	106
4.2.1	Capsaicininaktivierte Ganzzellströme.....	106
4.2.2	Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors in der Schnittpräparation .....	108
4.2.3	Spannungsabhängigkeit capsaicinaktivierter Ganzzellströme .....	112
4.2.4	Depolarisation der Zellmembran durch Capsaicin.....	113
4.2.5	Beeinflussung von Aktionspotentialamplitude und -dauer durch Capsaicin.....	115
4.3	Die Wirkung von Crobenetin auf TTX-resistente Natriumströme und Aktionspotentiale primär sensorischer Neurone .....	116
4.3.1	Potente, benutzungsabhängige Blockade TTX-resistenter Natriumströme durch Crobenetin .....	117
4.3.2	Beeinflussung einzelner Aktionspotentiale durch Crobenetin.....	118
4.3.3	Komplexe Wirkung von Crobenetin auf Aktionspotentialserien.....	119
5	Zusammenfassung.....	122
6	Anhang .....	125
6.1	Literatur .....	125
6.2	Verzeichnis der Abbildungen .....	141
6.3	Verzeichnis der Tabellen .....	142
6.4	Lebenslauf .....	143
6.5	Danksagung .....	144

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen

### 1.1.1 Ionenkanäle in erregbaren Membranen

Vor ungefähr drei Milliarden Jahren entwickelten sich Organismen, die sich gegen das äußere Milieu durch eine Zellmembran abgrenzten. Die aus einer Doppellipidschicht bestehende Membran setzt sich aus einem inneren, hydrophoben Bereich und einer polaren, hydrophilen Oberfläche zusammen. Sie dient dem Schutz der Zelle vor schädigenden Einflüssen von außen und dem unkontrollierten Verlust intrazellulärer Bestandteile. Durch die apolaren, hydrophoben Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Zellmembran erklärt sich ihre Impermeabilität für geladene Moleküle. Da aber die Passage von Ladungsträgern über die Membran essentiell für die elektrische Erregbarkeit und die Homöostase aller Zellen ist, wurde mit der Entwicklung von Zellmembranen die Einführung von Transportmolekülen notwendig.

Prinzipiell können geladene Moleküle die Zellmembran auf zwei Arten passieren. Sogenannte *Carrier* sind relativ komplex strukturierte Transmembranproteine, die aktiv unter Energieverbrauch Ionen entgegen ihres Konzentrationsgradienten oder höhermolekulare Substrate über die Zellmembran transportieren. Ein Beispiel ist die ubiquitär vorkommende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe, die Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in sie hinein pumpt und damit zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beiträgt (s. Abschnitt 1.1.2). Bei diesen aktiven Transportprozessen handelt es sich um relativ langsame Vorgänge, die maximale Umsatzrate für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe beträgt 50 – 200 Zyklen/s. Interessanterweise ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt nicht die ATP-Hydrolyse sondern die extrazelluläre Freisetzung der transportierten Natriumionen (Läuger, 1991).

Ionenkanäle sind ebenfalls transmembranäre Proteine, deren Eigenschaften sich aber grundlegend von denen der *Carrier* unterscheiden. Vereinfacht kann man sich einen Ionenkanal als eine wassergefüllte Pore, die eine Verbindung zwischen Intra- und Extrazellulärraum bildet, vorstellen. Der Transport von Ionen findet passiv, ohne Energieverbrauch, durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten in einem elektrischen Feld statt. Ein weiterer, wichtiger Unterschied zwischen Ionenkanälen und *Carriern* ist die hohe Flussrate der Kanäle. Viele ihrer Funktionen, wie zum Beispiel die Weiterleitung von Aktionspotentialen, können Ionenkanäle nur wahrnehmen, indem sie einen Fluß von mehr als  $10^6$  Ionen/s ermöglichen.

Ionenkanäle kommen auf allen Zellen vor und erfüllen so unterschiedliche Aufgaben wie die Erhaltung des Ruhemembranpotentials (s. Abschnitt 1.1.2), Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen (s. Abschnitt 1.1.3), Kontrolle der Calciumhomöostase, Regulation des Zellvolumens und Gewährleistung der Ausscheidung und Retention von Ionen über sezernierende Epithelien, zum Beispiel im Tubulussystem der Niere.

Aufgrund der Vielfalt ihrer Funktionen gibt es eine große Anzahl unterschiedlicher Ionenkanäle, die sich z.B. nach ihrer Ionenselektivität unterscheiden lassen. Es gibt Ionenkanäle, die recht spezifisch für nur eine Ionenart sind, zum Beispiel für Natrium, Kalium oder Calcium. Andere Kanäle sind weniger selektiv und lassen unterschiedliche Ionen passieren, wie z.B. der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Capsaicinrezeptor.

Ein geregeltes Öffnungs- und Schließungsverhalten von Ionenkanälen ist für eine ungestörte Zellfunktion von außerordentlicher Wichtigkeit. Wären alle Kanäle permanent offen, würde es zu erheblichen Verschiebungen der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen kommen, schließlich würden die Konzentrationsunterschiede aufgehoben. Außerdem wäre die differenzierte Regulation des Membranpotentials nicht möglich. Man unterteilt Kanäle auch nach den unterschiedlichen Stimuli, die zum Öffnen oder Schließen der Kanalpore führen. Da ein adäquater Reiz nicht immer nur zur Öffnung eines Ionenkanals führt, sondern diesen auch schließen kann, wird die Antwort eines Ionenkanals auf einen Stimulus allgemein als *gating* bezeichnet. Es lassen sich folgende Gruppen von Ionenkanälen unterscheiden:

1) Spannungsabhängige Ionenkanäle

ändern ihre Leitfähigkeit mit dem Membranpotential. Als Auswärtsgleichrichtung bezeichnet man eine Zunahme der Leitfähigkeit bei Depolarisation. Nimmt die Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation zu, spricht man von Einwärtsgleichrichtung.

2) Ionenaktivierte Ionenkanäle

werden in ihrer Aktivität durch die Konzentration intrazellulärer Ionen bestimmt. Beispiele sind calciumaktivierte Kaliumkanäle (Pallotta *et al.*, 1981) oder der natriumaktivierte Kaliumkanal (Kameyama *et al.*, 1984).

3) Ligandengesteuerte Ionenkanäle

werden durch Bindung eines höhermolekularen Liganden geöffnet oder geschlossen. Extrazelluläres ATP kann beispielsweise P2X Rezeptoren öffnen (Benham & Tsien, 1987) oder aber, intrazellulär, zum Verschluß ATP-abhängiger Kaliumkanäle führen (Noma, 1983).

#### 4) Protonenaktivierte Ionenkanäle

reagieren auf einen Anstieg der extrazellulären  $H^+$ -Konzentration mit einer Öffnung der Kanalpore. Die Mitglieder der ASIC-Familie (von *acid-sensing ion channel*) gehören zu den Amilorid-sensitiven Natriumkanälen (Waldmann *et al.*, 1997b).

#### 5) Temperaturempfindliche Ionenkanäle

werden durch Hitzereize aktiviert und spielen eine wichtige Rolle bei der Empfindung von Hitzeschmerz (Caterina *et al.*, 2000). Außerdem gibt es Ionenkanäle, deren *gating* durch Kälte gesteuert wird und deren Funktion entscheidend für die Entstehung von Kälteschmerz ist (Reid & Flonta, 2001; Viana *et al.*, 2002).

#### 6) Mechanosensitive Ionenkanäle

verändern ihre Leitfähigkeit während einer Deformierung der Zellmembran (Viana *et al.*, 2001).

Andere Einteilungen richten sich nach der anatomischen Region, beispielsweise verschiedene Abschnitte des Nervensystems, in der die Ionenkanäle hauptsächlich vorkommen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanäle werden z.B. mit SNS (*sensory neuron specific*) bezeichnet. Mit der zunehmenden Verbreitung biochemischer und molekularbiologischer Arbeitsmethoden ist heute die Einteilung von Kanalproteinen nach Unterschieden bzw. Ähnlichkeiten in Proteinstruktur, DNA-Sequenz und Genlokalisierung üblich.

In den Membranen erregbarer Zellen, z. B. Nerven- oder Muskelzellen, ist das Vorhandensein von Ionenkanälen entscheidend für die Fähigkeit zur Generierung von Aktionspotentialen. Die gerichteten Leitfähigkeiten müssen einer sehr genauen Regulation unterliegen und sich abgestimmt aufeinander im Verlauf einer Erregungsbildung und –rückbildung verändern. Wie in nicht erregbaren Zellen, sind auch in erregbaren Strukturen Ionenkanäle an der Aufrechterhaltung und der Modulation des Ruhemembranpotentials beteiligt.

Grundlegende Arbeit über Ionenbewegungen und Permeabilitätsänderungen von biologischen Membranen wurde in den USA von Cole und Curtis bzw. in Großbritannien von Hodgkin, Huxley und Katz in den Jahren von 1930 bis 1955 geleistet. Sie beschrieben Änderungen der Leitfähigkeiten neuronaler Membranen an Riesenaxonen von Tintenfischen, ohne daß das Konzept von Ionenkanälen bekannt war. Mittels zweier, an einen Verstärker angeschlossenen Elektroden konnten Veränderungen des Membranpotentials gemessen werden. An erregbaren Zellen ließen sich durch die Injektion von Stromimpulsen Aktionspotentiale nach dem Alles–oder–Nichts-Prinzip generieren. Daß ein Aktionspotential durch Veränderungen in der

Membranleitfähigkeit entsteht, schlossen Cole & Curtis (1939) aus der Abnahme der Membranimpedanz während eines Aktionspotentials. Mit der Beobachtung von Aktionspotentialen wurden alte Vorstellungen entkräftet, nach denen Information in Form chemischer Veränderungen innerhalb des Axons transportiert würde (zur Übersicht s. Hille, 2001). Die Beobachtung, daß es im Verlauf eines Aktionspotentials zu einer Depolarisation der Zellmembran über 0 mV hinaus in den positiven Bereich kommt, widerlegte die Hypothese, daß Erregung durch einen „Zusammenbruch“ des Membranpotentials nach 0 mV weitergeleitet wird (Bernstein, 1902; Bernstein, 1912). Mit Ionensubstitutionsexperimenten konnten Hodgkin & Katz (1949) allein durch Messung von Membranpotentialänderungen zeigen, daß die Aufstrichphase eines Aktionspotentials durch einen Anstieg der Leitfähigkeit für Natriumionen getragen wird. Für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials erkannten sie eine Kaliumleitfähigkeit als dominierend.

Mit der Entwicklung des *voltage-clamp* Verfahrens, durch Hodgkin *et al.* (1949) war es seither möglich, das Membranpotential einer Zelle zu kontrollieren. Im Prinzip handelt es sich um eine einfache Methode, bei der durch eine Elektrode das Membranpotential gemessen, über eine andere Elektrode der zum Halten des gewünschten Potentials notwendige Strom in die Zelle injiziert wird. Mit dem *voltage-clamp* Verfahren war es erstmals möglich, Spannungssprünge zu applizieren und die Stromantworten einer Zelle aufzuzeichnen. Hodgkin & Huxley (1952b) beschreiben in ihrer Arbeit zwei Stromkomponenten, die einem depolarisierenden Impuls folgen. Eine transiente, einwärts gerichtete Leitfähigkeit identifizierten sie als Natriumstrom, die persistierende, auswärts gerichtete Leitfähigkeit als Kaliumstrom. Da beide Leitfähigkeiten durch depolarisierende Spannungssprünge zu aktivieren waren, wurden sie als spannungsabhängig bezeichnet.

Mit der Entwicklung der *patch-clamp* Technik durch Neher & Sakmann (1976; Hamill *et al.*, 1981) gelang es schließlich erstmalig, den Ionenfluß durch einen einzelnen Ionenkanal zu messen. Viele verschiedene Ionenkanäle sind seither durch Anwendung des *patch-clamp* Verfahrens identifiziert und beschrieben worden.

### 1.1.2 Das Ruhemembranpotential

Als Ruhemembranpotential wird die zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum bestehende elektrische Potentialdifferenz einer ruhenden, nicht erregten Zelle bezeichnet. Dabei ist der Intrazellulärraum gegenüber der Außenseite negativ geladen. Das Ruhemembranpotential beträgt, je nach Zelltyp, -55 mV (glatte Muskelzelle) bis -90 mV (Purkinjefasern des Herzmuskels). Verantwortlich für diese Potentialdifferenz ist die unterschiedliche ionale



Zusammensetzung von Intra- und Extrazellulärflüssigkeit, sowie unterschiedliche Leitfähigkeiten der ruhenden Zellmembran für die einzelnen Ionen, vor allem Natrium- und Kaliumionen.

Die Aktivität der auf allen Zellen vorkommenden  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe hält die Konzentrationsgradienten für Natrium und Kalium dadurch aufrecht, daß sie unter Verbrauch eines ATP Moleküls in einem Zyklus 2 Kaliumionen in die Zelle und 3 Natriumionen aus ihr hinaus transportiert. Durch den Transport eines positiven Ladungsträgers mehr aus der Zelle heraus, als in sie hinein, wirkt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe außerdem direkt elektrogen. Je nach Zelle trägt diese direkte Elektrogenität 2 mV bis 15 mV zum Ruhemembranpotential bei (Sperelakis, 1998).

Die im Extrazellulärraum sehr viel niedrigere Kaliumkonzentration führt bei dominierender Kaliumleitfähigkeit unter Ruhebedingungen dazu, daß entlang des Konzentrationsgradienten Kaliumionen aus der Zelle strömen. Da mit jedem Kaliumion, welches die Zelle verlässt, auch ein positiver Ladungsträger die Membran passiert, entsteht eine Potentialdifferenz; das Innere der Zelle wird gegenüber dem Extrazellulärraum elektrisch negativ (s. Abschnitt 1.4). Die Anzahl von Ionen, die eine Membran passieren muß, um auf diese Weise eine relativ große Potentialdifferenz zu erzeugen, ist sehr klein (Hille, 2001).

Das so entstehende Diffusionspotential, das dem Konzentrationsgradienten entgegengerichtet ist, verhindert ein Angleichen der intra- und extrazellulären Kaliumkonzentrationen aneinander. Wenn die beiden entgegengesetzt wirkenden Kräfte, nämlich die elektrische Kraft, die durch das entstehende Potential ausgeübt wird und die durch den Konzentrationsunterschied auf das Ion einwirkende Kraft genau gleich groß sind, kommt der Ionenstrom zum Erliegen und ein Gleichgewichtspotential stellt sich ein. Seine Größe lässt sich für ein gegebenes Ion mit Hilfe der Nernst-Gleichung (s. Abschnitt 1.4) berechnen.

Nimmt man für eine Warmblütermuskelzelle Kaliumkonzentrationen von  $[\text{K}^+]_{\text{außen}} = 4$  mmol/l;  $[\text{K}^+]_{\text{innen}} = 155$  mmol/l und Natriumkonzentrationen von  $[\text{Na}^+]_{\text{außen}} = 145$  mmol/l;  $[\text{Na}^+]_{\text{innen}} = 12$  mmol/l an (Schmidt & Thews, 1995), berechnet sich das Gleichgewichtspotential für Kaliumionen zu ungefähr  $-96$  mV und für Natriumionen zu etwa  $66$  mV.

Daß das Ruhemembranpotential einer Zelle vom berechneten Gleichgewichtspotential für Kaliumionen abweicht, liegt daran, daß trotz dominierender Kaliumleitfähigkeit die Zellmembran auch in Ruhe für einwärtsströmende Kationen, namentlich Natrium, zu einem gewissen Grade permeabel ist. Der Strom von Calciumionen kann aufgrund der niedrigen Calciumkonzentration und der geringen Ruheleitfähigkeit für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials zumindest bei den hier verwendeten sensorischen Neuronen

vernachlässigt werden. Da auch Chloridkanäle im Bereich des Ruhemembranpotentials eine gewisse Offenwahrscheinlichkeit haben, trägt der Fluß von Chloridionen ebenfalls zum Ruhepotential einer Zelle bei.

Sind unter obiger Annahme, daß das Membranpotential einer Zelle wesentlich von den Leitfähigkeiten für Kalium-, Natrium- und Chloridionen bestimmt wird, diese, sowie die Konzentrationen der Ionen bekannt, kann durch die Gleichung

$$E = RT/F \ln (g_K[K]_o + g_{Na}[Na]_o + g_{Cl}[Cl]_i) / (g_K[K]_i + g_{Na}[Na]_i + g_{Cl}[Cl]_o) \quad (1)$$

das bestehende Membranpotential  $E$  berechnet werden.  $g_K$ ,  $g_{Na}$  und  $g_{Cl}$  sind die jeweiligen Leitfähigkeiten, in eckigen Klammern angegeben die extrazellulären (o) bzw. intrazellulären (i) Konzentrationen für Kalium<sup>+</sup>, Natrium- und Chloridionen,  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $F$  die Faraday-Konstante.

Kennt man das Membranpotential einer Zelle und das Gleichgewichtspotential eines beliebigen Ions, so lässt sich die das Ion treibende Kraft (*Elektromotorische Kraft EMK*) nach der Gleichung

$$EMK = E - E_{ion} \quad (2)$$

berechnen, wobei  $E$  das Membranpotential und  $E_{ion}$  das Gleichgewichtspotential des Ions sind.

### 1.1.3 Aktionspotentiale

Zellen werden als elektrisch erregbar bezeichnet, wenn sie in der Lage sind, Information in Form von Aktionspotentialen weiterzuleiten (Hille, 2001). Beispiele für erregbare Zelltypen sind Nerven- und Muskelzellen. Bei einem Aktionspotential handelt es sich um eine schnelle und nur kurz andauernde, überschießende Depolarisation der Zellmembran als Antwort auf einen adäquaten Reiz. „Überschießend“ bezeichnet in diesem Zusammenhang eine Depolarisation der Membran über 0 mV hinaus in den positiven Bereich. Aktionspotentiale laufen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ab. Kommt es durch den Stimulus zum Überschreiten einer Schwelle, läuft das Aktionspotential stereotyp und uniform ab. Die Parameter des ablaufenden Aktionspotentials, wie Amplitude, Dauer oder Schwellenpotential sind charakteristisch für einen Zelltyp und abhängig von der Art der in der Zellmembran vorhandenen Ionenkanäle. So dauert das Aktionspotential eines Riesenaxons des

Tintenfisches *Loligo* etwa 1 ms, während Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen mehrere hundert ms dauern.

Wie entsteht nun ein Aktionspotential? Sowohl Cole & Curtis (1939), als auch Hodgkin & Huxley (1939) konnten am Beispiel des Tintenfischriesenaxons zeigen, daß im Verlauf eines Aktionspotentials der Membranwiderstand dramatisch abnimmt, während die Membrankapazität nahezu unverändert bleibt. Die Abnahme des Membranwiderstandes erkannten sie richtig als Folge einer Zunahme der Membranleitfähigkeit (s. Abschnitt 1.1). Heute wissen wir, daß in den meisten erregbaren Zellen die Aufstrichphase des Aktionspotentials durch einen in die Zelle gerichteten, schnell aktivierenden, spannungsabhängigen Natriumstrom getragen wird. Eine Ausnahme bilden spezialisierte Herzmuskelzellen des Erregungsbildungs- und -weiterleitungssystems, deren Aufstrichphase des Aktionspotentials durch einen Calciumeinwärtsstrom bestimmt wird.

Die Repolarisation der Membran wird dadurch eingeleitet, daß durch die zunehmende Depolarisation der Natriumstrom noch während der Aufstrichphase inaktiviert, ein Phänomen, das noch näher beschrieben wird (s. Abschnitt 1.3.1). Die Inaktivierung des Natriumstroms noch während der Depolarisation ist dafür verantwortlich, daß das Membranpotential nicht das Natriumgleichgewichtspotential erreicht. Gleichzeitig werden spannungsabhängige Kaliumkanäle aktiviert. Die nun dominierende Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran führt zum Auswärtsstrom von Kaliumionen und damit zu einer Repolarisation bis hin zum Ruhemembranpotential oder sogar darüber hinaus (Nachhyperpolarisation). Dieser einfache Mechanismus gilt allerdings nur für Amphibien, nicht für Säuger.

Nach Ablauf eines Aktionspotentials ist die Zellmembran für eine, je nach Zelltyp unterschiedlich lange andauernde Zeit, nicht erregbar. Dieses Zeitintervall bezeichnet man als Refraktärzeit, die sich in eine absolute und eine relative Refraktärzeit unterteilen läßt. Als „absolut refraktär“ bezeichnet man Membranen, die sich durch keinen Stimulus, sei er auch noch so stark, erregen lassen. Eine „relativ refraktäre“ Membran läßt die Generierung von Aktionspotentialen nur durch supranormale Reize zu, außerdem hat das in der relativen Refraktärzeit ausgelöste Aktionspotential oft eine niedrigere Amplitude als das vorausgehende (bei Summenaktionspotentialen). Die funktionelle oder effektive Refraktärzeit bestimmt die maximal erreichbare Aktionspotentialfrequenz einer Zelle und ist daher von physiologischer Bedeutung. Kann z. B. ein Axon Aktionspotentiale mit einer maximalen Frequenz von 0,5 kHz weiterleiten, beträgt die effektive Refraktärzeit 2 ms. Verantwortlich für die Refraktärzeit erregbarer Membranen ist zum einen die Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle. Erst mit zunehmender Repolarisation gehen die

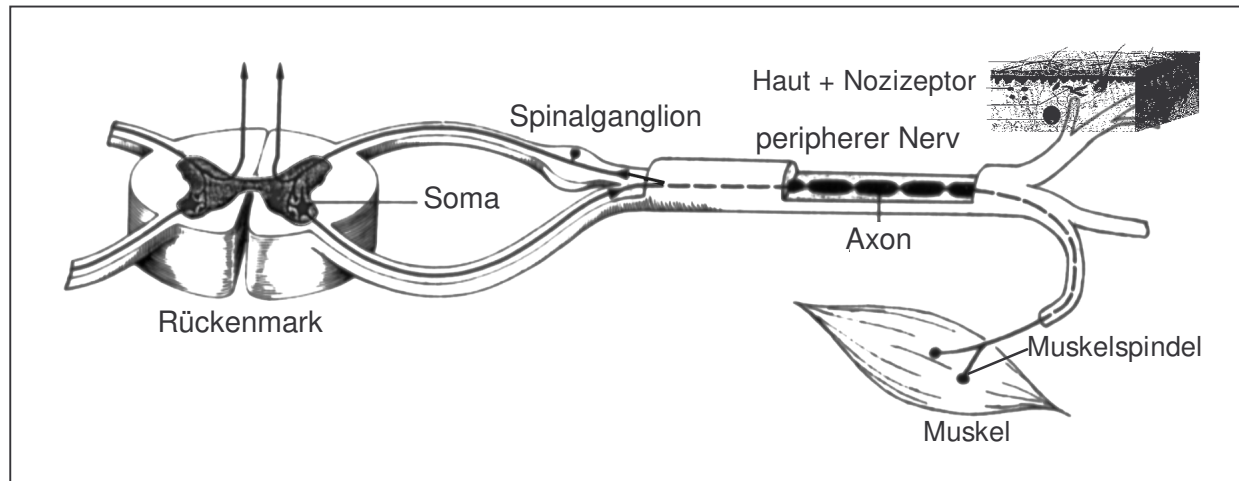
Natriumkanäle aus dem inaktivierten Zustand in den Ruhezustand über, der eine erneute Aktivierung erlaubt. Zum anderen trägt aber auch eine erhöhte Kaliumleitfähigkeit nach Ablauf eines Aktionspotentials durch Erzeugung hyperpolarisierender Nachpotentiale zur Refraktärität der Membran bei.

Als Nachpotentiale bezeichnet man transiente, dem Aktionspotential folgende Abweichungen vom Ruhemembranpotential. Nachpotentiale können entweder hyper- oder depolarisierender Natur sein und haben dementsprechend unterschiedlichen Einfluß auf die Erregbarkeit einer Zelle. Depolarisierende Nachpotentiale verstärken die Erregbarkeit, indem sie das Membranpotential dem Schwellenpotential für ein Aktionspotential annähern. Hyperpolarisierende Nachpotentiale hingegen vergrößern den Abstand zum Schwellenpotential und bewirken damit eine verminderte Erregbarkeit. Für die Entstehung langsamer hyperpolarisierender Nachpotentiale sind unter anderem calciumaktivierte Kaliumleitfähigkeiten verantwortlich (Hille, 2001).

#### **1.1.4 Primär sensorische Neurone des Spinalganglions**

Die Somata der primär sensorischen Neurone befinden sich in den Spinalganglien (DRG, von engl.: *dorsal root ganglion*), welche im Bereich der Foramina intervertebralia der Wirbelsäule liegen. Es handelt sich um pseudounipolare Nervenzellen, deren Soma einen Stammfortsatz besitzt. Dieser zweigt sich in einiger Entfernung vom Nervenzellkörper in ein peripherwärts und ein zentralwärts laufendes Axon auf (Zenker, 1994).

Man nimmt an, daß ein in der Peripherie generierter Reiz über die Teilungsstelle hinweg direkt vom peripheren Teil des Neuriten auf seinen zentralen Anteil übergeht. Das Soma des Neurons wird nur im Nebenschluß erregt und ist für die Reizentstehung und -weiterleitung wohl von untergeordneter Bedeutung. Seine Aufgabe besteht unter anderem darin, die im Axon sowie am peripheren und zentralen Ende benötigten Proteine, z.B. Ionenkanäle bereitzustellen. Am zentralen Ende des Axons ist das primär sensorische Neuron über eine Synapse mit Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks verbunden, auf welche die Erregung durch Freisetzung von Transmittern und Modulatoren weitergeleitet wird. Modulatoren sind Substanzen, deren Freisetzung allein nicht zur Reizweiterleitung an einer Synapse führt. In Gegenwart eines Transmitters beeinflussen Modulatoren die Informationsübertragung. Über die Nervenzellen des Spinalganglions werden dem Zentralnervensystem (ZNS) Reize verschiedener sensorischer Modalitäten vermittelt. Unter Exterozeption versteht man die Wahrnehmung an der Oberfläche des Körpers entstehender Reize.



### Abb. 1 Anatomische Lage des Spinalganglions

Die Spinalganglien enthalten primär sensorische Neurone und befinden sich im afferenten Schenkel des Reflexbogens. Die zentralen Fortsätze der Axone treten über das Hinterhorn in das Rückenmark ein (aus: Gruß, 1998).

Je nach Stimulus unterscheidet man hier Mechanozeption, Thermozeption und Nozizeption. Propriozeptive Rezeptoren finden sich in tieferen Geweben wie Muskelsehnen und Gelenken und leiten Informationen über die Position des Körpers, Bewegungen, über Vibration und Tiefschmerz weiter. Die Weiterleitung mechanischer, chemischer und thermischer Reize aus den inneren Organen, die bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. Hunger, unterhalb der Bewußtseinschwelle erfolgt, bezeichnet man als Intero- oder Viszerozeption.

Da in der vorliegenden Arbeit Ionenkanäle untersucht wurden, die wesentlich an der Entstehung und Weiterleitung von Schmerzen beteiligt sind, sollen die Eigenschaften nozizeptiver Neurone des Spinalganglions im folgenden näher beschrieben werden.

Morphologisch lassen sich im Spinalganglion zwei Haupttypen von sensorischen Nervenzellen unterscheiden, eine Gruppe großer, hell erscheinender Zellen und eine Gruppe kleiner, dunkler Neurone (Scharf & Oster, 1957). Daß beide Typen sich in ihren Eigenschaften fundamental unterscheiden, belegen Arbeiten über die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zellen mit Antikörpern gegen Neurofilamente (Lawson *et al.*, 1984) oder ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber der neurotoxischen Wirkung von Capsaicin (Lawson, 1981).

Die Arbeit von Harper & Lawson (1985) zeigte, daß sich primär sensorischer Neurone mit verschiedener Somagröße unterschiedlich schnell leitenden Nervenfasern in der Peripherie zuordnen lassen. Danach sind die schnelleitenden Axone der A $\alpha$ - und A $\beta$ -Fasern am ehesten

die Fortsätze großer heller Neurone, die kleinen dunklen Somata lassen sich gut den langsamen leitenden C-Fasern zuordnen. Gerade für diese langsam leitenden Fasern lässt sich eine gute Korrelation zwischen Leitungsgeschwindigkeit und dem Somadurchmesser als Maß für die Zellgröße zeigen. Keine genaue Korrelation ergibt sich für die Somata der A $\delta$ -Fasern, deren Verteilung ihrer Größe eine hohe Variabilität zeigte, weshalb eine Zwischenstellung zwischen den beiden beschriebenen Gruppen angenommen wurde (Harper & Lawson, 1985). Die Transduktion eines noxischen Reizes in elektrische Erregung geschieht am peripheren Ende des Axons eines nozizeptiven Neurons. Für kutane Nozizeptoren konnte gezeigt werden, daß die rezeptive Struktur einfach das Ende eines Axons ist. Speziell ausgebildete anatomische Strukturen, wie sie für andere Sinnesmodalitäten bekannt sind, werden nicht ausgebildet. Nachdem das Axon die epidermale Basalmembran passiert hat, verliert es die Myelinscheide und den Kontakt zu Schwann-Zellen. Das Nervenende liegt so frei zwischen Keratinozyten der Epidermis (Kruger *et al.*, 1981).

Im Gegensatz zu Rezeptoren anderer Modalitäten haben nozizeptive Nervenendigungen eine hohe Erregungsschwelle, welche die Generierung von Aktionspotentialen nur durch noxische Reize zulässt (Meyer *et al.*, 1994). Vor allem den C-Fasern zugeordnete Schmerzrezeptoren lassen sich häufig durch verschiedenartige Stimuli erregen. Deshalb wird für solche Rezeptoren auch oft die Bezeichnung „polymodaler Nozizeptor“ verwendet. Schmerzrezeptoren, deren Nervenfasern der Gruppe der A $\delta$ -Fasern zugeordnet werden, sind für die Transduktion von noxischen mechanischen Reizen sowie Hitzereizen verantwortlich (Meyer *et al.*, 1994). Eine Sonderform der Nozizeptoren stellen die *silent nociceptors* dar. Es handelt sich um Nozizeptoren, die unter physiologischen Bedingungen selbst durch einen adäquaten, noxischen Stimulus nicht erregbar, also „still“ sind, sondern erst „sensitisiert“ werden müssen, beispielsweise durch Capsaicin (Schaible & Schmidt, 1988).

Für die Weiterleitung nozizeptiver Reize aus der Peripherie sind die dünn myelinisierten und die sogenannten marklosen Nervenfasern von Bedeutung. Erstere gehören zur Gruppe der A $\delta$ -Fasern, die für die Übertragung der ersten, gut lokalisierbaren Komponente des Oberflächenschmerzes verantwortlich sein sollen. Die marklosen Axone bilden die C-Fasern, die den zweiten, schlecht lokalisierbaren, brennenden Anteil des Oberflächenschmerzes leiten.

Die Generierung eines Schmerzreizes und dessen Weiterleitung über die Axone primär sensorischer Neurone zum ZNS ist aber kein stereotypes Geschehen. Vielmehr ist der Prozeß der Schmerzentstehung und -weiterleitung in hohem Maße plastisch. Unter bestimmten pathologischen Umständen, z.B. im Rahmen von Nervenverletzungen oder Entzündungen

sind Phänomene wie Hyperalgesie (gesteigertes Schmerzempfinden bei noxischen Reizen) oder Allodynie (Schmerzempfinden bei nichtnoxischer Reizung) zu beobachten. Die verstärkte Antwort auf repetitive adäquate Stimuli kennzeichnet die „Sensitisierung“, die durch eine erniedrigte Schwelle, spontane Aktivität und verstärkte Antworten im überschwelligem Bereich charakterisiert ist (Treede & Magerl, 1995). Von „peripherer Sensitisierung“ spricht man, wenn es über Veränderungen im primären Nozizeptor zu einer Verstärkung der Schmerzwahrnehmung kommt. Aber auch im ZNS ist Plastizität schmerzleitender Neurone bekannt. So kommt es beispielsweise bei permanent und hochfrequent eingehenden Schmerzinformationen polymodaler Nozizeptoren über die Hinterwurzel zu einer verstärkten Erregbarkeit von Hinterhornneuronen, ein Vorgang, der mit dem Begriff „zentrale Sensitisierung“ bezeichnet wird. Dieses Phänomen der verstärkten Erregbarkeit als Antwort auf wiederholte oder dauerhafte Stimulation findet sich im sensorischen Nervensystem nur unter Nozizeptoren. Unter „Adaptation“ versteht man die verminderte Erregbarkeit von Zellen als Antwort auf repetitive Reizung. Adaptation findet sich sowohl in Nozizeptoren als auch in Neuronen der anderen sensorischen Systeme (Treede & Magerl, 1995).

Welche Ionenkanäle sind nun an der Entstehung und Weiterleitung, sowie an der Modulation der Empfindlichkeit nozizeptiver Neurone beteiligt? Gibt es spezifische, nur auf Schmerz vermittelnden Nervenzellen vorkommende Ionenkanäle?

In den letzten Jahren sind neben denen in dieser Arbeit untersuchten Tetrodotoxin-resistenten, spannungsabhängigen Natriumkanälen und dem Capsaicin- oder Vanilloidrezeptor (s. Abschnitte 1.2 u. 1.3) zahlreiche andere Ionenkanäle beschrieben worden, denen eine zentrale Rolle bei der Transduktion und Weiterleitung von Schmerzreizen im peripheren Nervensystem zugeschrieben wird. Es handelt sich im Wesentlichen um

- 1) spannungsabhängige Kanäle, von denen wohl die Natriumkanäle hinsichtlich ihrer Beteiligung bei Schmerzentstehung und –weiterleitung am besten untersucht sein dürften.
- 2) protonenaktivierte Ionenkanäle
- 3) ATP-aktivierte Ionenkanäle

Unter den ATP-Rezeptoren (purinerge Rezeptoren) sind für die Nozizeption vor allem die Gruppe der sog. P2X-Rezeptoren bedeutend. Bei den außerdem vorkommenden P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nur indirekt über

verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden an der Nozizeption beteiligte Ionenkanäle, z.B. Vanilloidrezeptoren, beeinflussen (Tominaga *et al.*, 2001). Heute kennt man 7 verschiedene P2X–Rezeptoren (P2X<sub>1–7</sub>), die mit Ausnahme von P2X<sub>7</sub>, der von immunkompetenten Zellen exprimiert wird, in neuronalen Zellmembranen vorkommen. Unter diesen ist P2X<sub>3</sub> besonders hervorzuheben, da dieser Kanal bei der Ratte ausschließlich in primär sensorischen Neuronen exprimiert wird (Chen *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995; Garcia-Guzman *et al.*, 1997).

P2X-Rezeptoren kommen in Neuronen des Spinalganglion sowohl am peripheren als auch am zentralen Ende des Axons vor. Peripher tragen sie durch Vermittlung eines Kationeneinstromes zur Generierung von Aktionspotentialen bei. Aktiviert werden sie durch ATP, welches aus verletztem Gewebe freigesetzt wird.

Am zentralen Fortsatz des Axons primär sensorischer Neurone führt die Aktivierung von P2X–Rezeptoren zur Freisetzung des exzitatorischen Transmitters Glutamat und damit zu verstärkter Reizübertragung auf Hinterhornneurone im Rückenmark.

Bedenkt man die Schmerzhaftigkeit von Ereignissen wie Ischämie, Infektion oder Entzündung, die alle mit einer lokalen Azidose einhergehen, so ist es nicht überraschend, daß ein Beitrag protonenaktivierter Ionenkanäle zur Schmerzentstehung und –weiterleitung gezeigt werden konnte (Benson *et al.*, 1999). Es handelt sich um zur Familie der Amilorid-sensitiven Natriumkanäle gehörige Ionenkanäle, deren Vertreter viele unterschiedlich Funktionen haben, wie z.B. die Rückresorption von Natriumionen aus dem Tubulussystem der Niere.

Drei der dieser Gruppe zugehörigen Ionenkanäle sind im Nervensystem von Bedeutung: ASIC1-3 (von *acid-sensing ion channel*). ASIC1 und ASIC2 kommen im gesamten ZNS vor, ASIC1 auch im Spinalganglion. Von ASIC2 wird nur die *splice*–Variante ASIC2b von primär sensorischen Neuronen exprimiert. Ihre weite Verbreitung im ZNS und die Tatsache, daß synaptische Vesikel einen sauren Inhalt haben, lässt vermuten, daß ASIC1 und ASIC2 eine Rolle bei der synaptischen Übertragung spielen (Eglen *et al.*, 1999). Vorwiegend auf primär sensorischen Neuronen kommt ASIC3 (DRASIC, von *dorsal root ganglion acid sensing ion channel*) vor (Waldmann *et al.*, 1997a,b). Unklar ist aber, ob ein saures Milieu mit einem pH um 7.0 durch eine Aktivierung von ASIC–Kanälen einen persistierenden Schmerz, wie er für Entzündungen typisch ist, allein auslösen kann. In vitro Experimente zeigen bei einer Ansäuerung der extrazellulären Lösung auf pH 7.0 keinen persistierenden Strom durch ASIC–Kanäle. Erst eine Protonenkonzentration von pH 6.0 führt zu einer entsprechenden Kanalaktivierung. Eine Generierung von Aktionspotentialen durch eine Ansäuerung auf pH 7.0 ist zwar möglich, allerdings kommt es nur zu einem transienten Feuern der Neurone, so



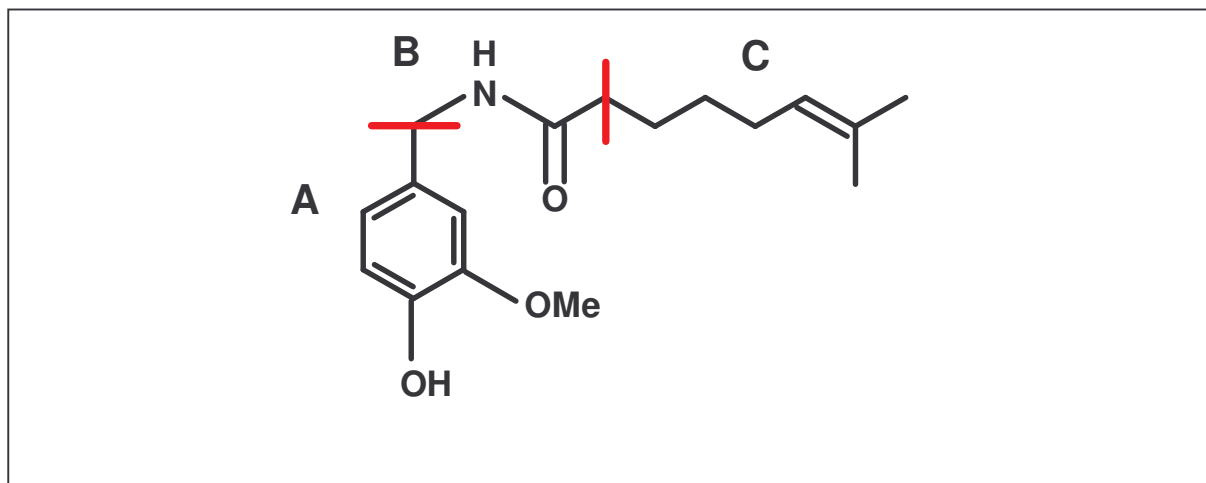
daß hierin zumindest nicht die alleinige Erklärung für einen persistierenden Entzündungsschmerz liegen kann (McCleskey & Gold, 1999).

Auf primär sensorischen Neuronen kommt also eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle vor, von denen der Capsaicinrezeptor als ein Vertreter der ligandengekoppelten Ionenkanäle und der TTX-resistente Natriumkanal als spannungsabhängiger Ionenkanal in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden

## 1.2 Der Capsaicinrezeptor

### 1.2.1 Scharfe Pfeffer: Capsaicin und andere Vanilloide

Etwa 25 % der Weltbevölkerung konsumiert täglich scharfen Pfeffer. In Europa sind die sogenannten Chili-Pfeffer erst seit der Entdeckung Amerikas bekannt; kultiviert werden sie bei uns seit dem 16. Jahrhundert. Verantwortlich für den scharfen Geschmack der Chili-Pfeffer, es handelt sich um eine ganze Gruppe von Pflanzen, ist das Vanilloid Capsaicin (CAP), das 1846 zum ersten Mal isoliert und benannt wurde. Die Herkunft des Namens „Capsaicin“ ist nicht abschließend geklärt, eine Theorie besagt, daß der Name vom griechischen Wort für „beißen“ (*kapto*) abstammt. Die chemische Struktur wurde 1919



**Abb. 2 Capsaicin**

Das Capsaicinmolekül (links) lässt sich in 3 funktionelle Gruppen unterteilen: **A** aromatische Homovanillylgruppe, **B** Amidbindung, **C** aliphatische Octanyleinheit (Walpole *et al.*, 1993 a,b,c).

aufgeklärt (Abb.2) und im Jahr 1930 gelang erstmals die Synthese von CAP (Spath & Darling, 1930). Die Schärfe von Pfeffern wird auch heute noch durch den sog. organoleptischen Test quantitativ bestimmt, der 1912 von Wilbur Scoville eingeführt wurde. Ein Pfefferextrakt wird solange verdünnt, bis der Proband keinen scharfen Geschmack mehr empfindet. Die jeweils notwendige Verdünnung entspricht dann der Schärfe in Scoville Einheiten. So hat z.B. der mexikanische Habanero eine Schärfe von 350000 Scoville Einheiten, also ist erst bei einer Verdünnung von 1:350000 kein scharfer Geschmack mehr wahrzunehmen.

Neben der kulinarischen Verwendung sind scharfe Pfeffer aber auch als Verteidigungsmittel bekannt geworden; schon die Inkas blendeten die gegnerischen Spanier mit Pulvern aus getrockneten Pfeffern, die sie ihnen in die Augen warfen. Gegenwärtig wird in den USA ein CAP-haltiges Spray als Selbstverteidigungswaffe verkauft („*Sergeant Pepper*“). Ebenfalls bis zu den Inkas lässt sich der analgetische Effekt von CAP-haltigen Pfeffern zurückverfolgen; diese benutzten Pfefferschoten gegen Zahnschmerzen. Am Hof des chinesischen Kaisers wurden Männer zu Eunuchen kastriert, nachdem man ihnen das Skrotum mit Pfefferextrakten eingerieben hatte. Heute finden CAP-haltige Salben in der Behandlung von verschiedenen Schmerzsyndromen Anwendung. Auch Juckreiz, wie er z.B. bei der Psoriasis auftritt, lässt sich durch die topische Anwendung von CAP behandeln. In die Harnblase appliziertes CAP verwendet man bei spinaler Detrusorhyperreflexie (Szallasi & Blumberg, 1999).

Andere natürlich vorkommende Vanilloide sind die Capsaicinoide Piperin, Zingeron, Eugenol und Guaiacol. Eugenol und Guaiacol kommen in Gewürznelken vor und haben, wie CAP, einen scharfen Geschmack. Klinisch werden beide Substanzen zur Behandlung von Zahnschmerzen eingesetzt.

Olvanil und Nuvanil sind synthetische Vanilloide, die entwickelt wurden, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von CAP zu untersuchen. Olvanil hat die interessante Eigenschaft, den Capsaicinrezeptor zu aktivieren, ohne selbst einen scharfen Geschmack zu entfalten. Erklären lässt sich dieses Phänomen, damit, daß die Affinität zum CAP-Rezeptor allein nicht ausreichend ist, um Aktionspotentiale zu generieren. Vielmehr scheint die Kinetik des nach der Rezeptorbindung aktivierten Ionenstromes eine entscheidende Rolle zu spielen, denn tatsächlich löst die Applikation verschiedener Vanilloide Stromantworten unterschiedlicher Kinetik aus (Szallasi & Blumberg, 1999).

Eine weitere Untergruppe der Vanilloide stellen die Resiniferanoide dar, deren ultrapotenter Vertreter Resiniferatoxin (RTX, Faktor 20 potenter als CAP, Caterina *et al.*, 1997) in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Analog zu den Capsaicinoiden (vergl. Abb.2) lässt die

Molekülstruktur der Resiniferanoide 3 Gruppen erkennen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Gruppe entsprechen der A- und B-Gruppe der Capsaicinoide. Die  $\chi$ -Gruppe besteht aus einem Diterpengerüst, das für die Wirksamkeit der Resiniferanoide von größerer Bedeutung zu sein scheint, als die aliphatische C-Region der Capsaicinoide (Walpole *et al.*, 1996).

Daß auch Moleküle ohne Homovanillyleinheit durch die Aktivierung des Capsaicinrezeptors scharf schmecken können, zeigt sich am Beispiel einiger Terpene, zum Beispiel Isovelleral (Szallasi *et al.*, 1996). Scutigeral, ein Triprenyl-Phenol, das in Pilzen vorkommt aktiviert ebenfalls den Capsaicinrezeptor, ohne eine Homovanillylgruppe zu besitzen. Außerdem ist es, wie das synthetische Olvanil, ohne scharfen Geschmack (Szallasi *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Wirkung von Capsaicin auf primär sensorische Neurone

Auf die Haut bzw. Schleimhäute appliziert, verursacht CAP das Gefühl brennenden Schmerzes. Außerdem entwickelt sich im Bereich der Applikationsstelle eine Region der Hyperalgesie gegenüber mechanischen und thermischen Stimuli („primäre Hyperalgesie“). In den die Applikationsstelle umgebenden Hautarealen beobachtet man eine sich entwickelnde Überempfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen („sekundäre Hyperalgesie“; Treede & Magerl, 1995).

Die algogene Wirkung von CAP erklärt sich durch die Stimulation der peripheren Nervenendigungen einer Subpopulation primär sensorischer Neurone, deren Somata im Spinal- oder Trigemininalganglion oder im Ganglion nodosum des N. vagus liegen (Helliwell *et al.*, 1998). Die betreffenden Neurone sind durch ihren geringen Somadurchmesser sowie die Fähigkeit zur Bildung von Neuropeptiden gekennzeichnet, wobei das Vorkommen des Neuropeptids Substanz P am besten mit der Vanilloidsensitivität korreliert (Holzer, 1991). Es handelt sich aufgrund der genannten Charakteristika also am ehesten um C-Faser Neurone (Harper & Lawson, 1985). Aber nicht alle Neurone kleinen Durchmessers sind CAP-empfindlich und andererseits findet sich auch unter den Neuronen mit mittelgroßen Somata eine CAP-Sensitivität. Es muß also davon ausgegangen werden, daß erstens nicht alle C-Fasern zugeordneten Somata CAP-empfindlich sind und zweitens auch einige A $\delta$ -Faser Neurone diese Eigenschaft besitzen (Ikeda *et al.*, 1997). Zudem scheint CAP-Empfindlichkeit auch eine plastische Eigenschaft von Neuronen des Spinalganglions zu sein. So führt das als Algogen bekannte Bradykinin dazu, daß sich bislang CAP-unempfindliche primär sensorische Neurone durch das Vanilloid stimulieren lassen (Stucky *et al.*, 1998).

Welcher Mechanismus unterliegt nun der stimulierenden Wirkung von CAP?

Daß die extrazelluläre Applikation von CAP zur Depolarisation der Zellmembran einer Gruppe sensorischer Neurone durch einen vornehmlich durch Natrium- und Calciumionen getragenen Strom führt und daß die Depolarisation, wird sie überschwellig, zur Generierung von Aktionspotentialen führt, zeigen die Arbeiten von Baccaglini & Hogan (1983) und Marsh *et al.* (1987). Für Neurone des Spinalganglions zeigten Wood *et al.* (1988) die konzentrationsabhängige Vergrößerung eines Membranstromes als Antwort auf die Applikation von CAP. Das Umkehrpotential des beobachteten Stromes von etwa 0 mV und seine Blockierbarkeit durch den kompetitiven Antagonisten Capsazepin (s. Abschnitt 2.1.3) sprechen dafür, daß der beobachteten Zunahme der Membranleitfähigkeit die Aktivierung eines unspezifisch kationenselektiven, CAP-aktivierten Ionenkanals zugrunde liegt (Liu & Simon, 1994; Bevan *et al.*, 1992). Auch das Vorkommen von spezifischen [<sup>3</sup>H]RTX-Bindungsstellen auf den Membranen von Neuronen des Spinalganglions spricht für die Existenz eines Rezeptorproteins für CAP und andere Vanilloide (Szallasi & Blumberg, 1990). Den elektrophysiologischen Beweis für die Existenz eines CAP-aktivierten Ionenkanals in der Membran sensorischer Neurone liefert die Arbeit von Oh *et al.* (1996). Die Einzelkanalregistrierungen zeigen einen Ionenkanal, der in Gegenwart von CAP mit einer halbmaximalen Wirkungskonzentration von 1.1 µM konzentrationsabhängig aktiviert wird. Der Antagonist Capsazepin (CPZ) blockiert den Einzelkanalstrom wirkungsvoll. Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt ungefähr 45 pS bei einem Haltepotential von -60 mV und etwa 80 pS bei 60 mV und zeigt damit auswärtsgerichtete Eigenschaften. Divalente Kationen scheinen die Kanalpore besser passieren zu können, als monovalente Kationen. Mittlerweile ist es gelungen, die cDNA eines Protein zu klonieren, welches, in der Zellmembran exprimiert, einen CAP-empfindlichen Ionenkanal bildet (s. Abschnitt 1.2.3; Caterina *et al.*, 1997).

Der initial algogenen Wirkung von CAP folgt typischerweise eine Phase, in welcher die betroffenen Neurone gegenüber erneuter CAP-Applikation oder schmerzhaften Stimuli refraktär sind. Diese „desensitisierende“ Wirkung wurde zuerst von Jansco & Jancso (1949) beschrieben. Der Begriff „Desensitisierung“ beschreibt das Phänomen allerdings nur ungenau, da unterschiedliche Mechanismen für die der CAP-Applikation folgende Unempfindlichkeit der Neurone verantwortlich sind. Folgende Prozesse lassen sich unterscheiden:

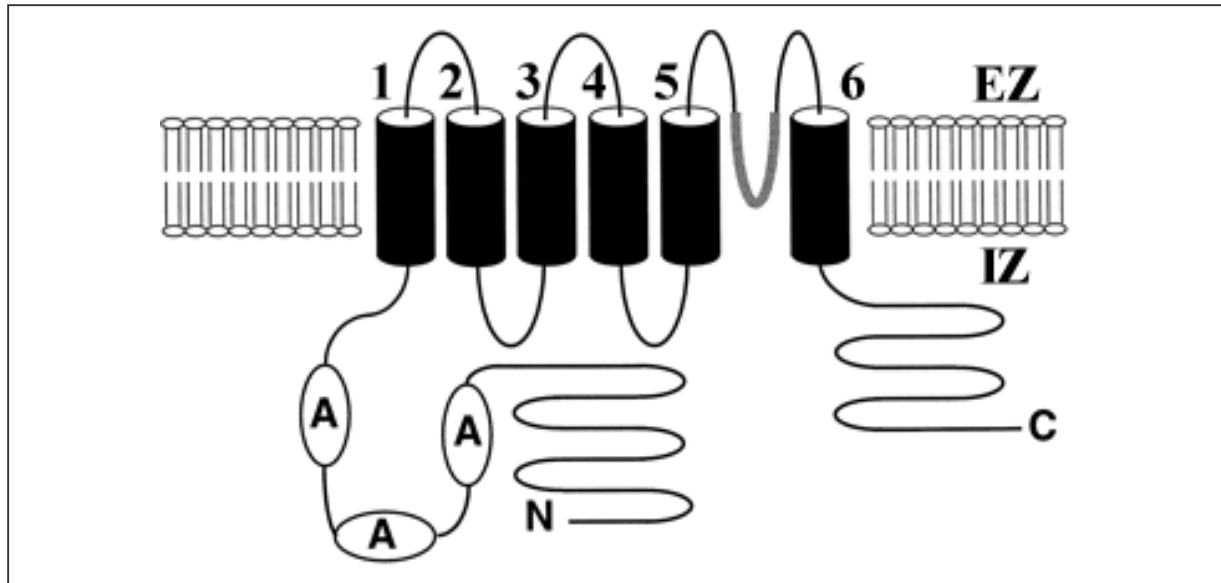
- 1) Desensitisierung des Rezeptors i.e.S.: hiermit wird eine Verringerung der Rezeptoraktivität in Gegenwart des Agonisten bezeichnet.

- 2) Tachyphylaxie: die Verkleinerung der Antwort bei mehrfach kurz aufeinander folgenden Agonistenapplikationen.
- 3) Neurotoxizität: hohe Konzentrationen von CAP führen in Gegenwart von extrazellulärem Calcium zum Untergang nozizeptiver Neurone.

Während es sich bei der Desensibilisierung und der Tachyphylaxie um Vorgänge handelt, die sich am Rezeptor selbst abspielen und reversibel sind, ist die neurotoxische Wirkung irreversibel. Neurotoxizität von CAP manifestiert sich morphologisch als strukturelle Degeneration sensorischer Neurone mit kleinem Somadurchmesser. Da auch ein Untergang unmyelinisierter zentraler Axonterminale zu beobachten ist, handelt es sich bei den betroffenen Zellen aller Wahrscheinlichkeit nach um nozizeptive Neurone (Jancso *et al.*, 1977). In neugeborenen Ratten wird als Ursache des Untergangs sensorischer Neurone die inhibierende Wirkung von CAP auf den Transport des Nervenwachstumsfaktors NGF im Axon angenommen (Taylor *et al.*, 1985; Wood, 1993). Aber auch CAP-induzierte Apoptosemechanismen scheinen eine Rolle zu spielen (Sugimoto *et al.*, 1998). Eine Schlüsselfunktion übernimmt anscheinend der durch CAP induzierte Einstrom extrazellulärer Calciumionen. In calciumfreier extrazellulärer Lösung sind die beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen sensorischer Neurone in CAP-haltigem Medium deutlich reduziert oder treten gar nicht auf (Marsh *et al.*, 1987). Chard *et al.* (1995) zeigten, daß der durch CAP ausgelöste Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Aktivierung von calciumabhängigen Proteasen führt, die für den Zelltod verantwortlich sind.

### 1.2.3 Molekularbiologie des klonierten Capsaicinrezeptors VR1

Mit der Isolierung einer funktionellen cDNA aus einer cDNA Bibliothek von Nagetierspinalganglien, die injiziert in *Xenopus*-Oozyten und HEK 293 Zellen diesen CAP-Sensitivität verleiht, wurde in der Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen von CAP und anderen Vanilloiden ein großer Fortschritt erzielt. Die cDNA kodiert ein Protein aus 838 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 95 kD. Da CAP und andere Vanilloide bekannte Agonisten sind, wurde dem Protein die Bezeichnung Vanilloidrezeptor Subtyp 1 (VR1) gegeben und mit dieser Nomenklatur der Vermutung Rechnung getragen, daß neben VR1 andere, bisher unbekannte Subtypen existieren. Untersuchungen der Membrantopologie zeigten, daß es sich bei VR1 um ein integrales Membranprotein handelt, das sich aus 6 Transmembrandomänen zusammensetzt, die durch intra- bzw. extrazelluläre „Aminosäureschleifen“ miteinander verbunden sind (Abb.3).



### Abb. 3 Membrantopologie von VR1

Bei VR1 handelt es sich um ein Kanalprotein mit sechs Transmembranhelices (1-6). Man beachte die Ähnlichkeit der Membrantopologie von VR1 mit der eines spannungsabhängigen Natriumkanals (Abb.5). A steht für mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A. EZ = Extrazellulärraum, IZ = Intrazellulärraum (Abb. modifiziert n. Szallasi & Blumberg, 1999)

Zwischen der Domäne 5 und 6 befindet sich eine hydrophobe Schleife, die wahrscheinlich der Porenregion des Kanalproteins entspricht (Caterina *et al.*, 1997). Innerhalb der Zellmembran lagern sich mehrere VR1 Rezeptorkomplexe zu Oligomeren, bevorzugt Homotetrameren, zusammen (Kedei *et al.*, 2001). Am N-terminalen Ende des Proteins befinden sich drei Ankyrin-Bindungsstellen. Ankyrine sind Cytoskelettproteine, die über dynamische, nicht-kovalente Bindungen mit integralen Membranproteinen interagieren und deren räumliche Verteilung innerhalb der Zellmembran mitbestimmen (Hille, 2001). Der Carboxyterminus hingegen zeigt keine derartigen Strukturauffälligkeiten. Sucht man nach mit VR1 verwandten Molekülen, so findet man Ähnlichkeiten mit *store-operated* Calciumkanälen der TRP-Familie (*transient receptor potential*; Clapham *et al.*, 2001), die bei einer Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum vermitteln. Die Ähnlichkeiten finden sich vor allem in der Membrantopologie, dem Vorhandensein der drei Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus und in der Aminosäuresequenz der hydrophoben Region zwischen Domäne 5 und 6. Eine Funktion, wie sie diesen Calciumkanälen zugeordnet wird, kann für VR1 aber ausgeschlossen werden (Caterina *et al.*, 1997).

#### 1.2.4 Anatomische Lokalisation von VR1

Während Caterina *et al.* (1997) die Expression von VR1-mRNA auf Neurone mit kleinem Durchmesser im Spinalganglion und Trigeminalganglion beschränkt beschreiben, konnten spätere Arbeiten zeigen, daß VR1 bzw. VR1-ähnliche Proteine auch in anderen Bereichen des Nervensystems exprimiert werden. So zeigten Helliwell *et al.* (1998) in ihrer Arbeit, daß Vanilloidrezeptor mRNA auch im Ganglion nodosum vorkommt. Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse von Caterina und Helliwell ist wahrscheinlich die Anwendung unterschiedlicher Methoden. Caterina *et al.* (1997) verwendeten für die Northern blots die gesamte VR1-Sequenz, Helliwell *et al.* (1998) hingegen benutzten für die Polymerase-Ketten-Reaktion nur einen kleineren Abschnitt der VR1-Sequenz. Es ist wahrscheinlich, daß im Ganglion nodosum eine Isoform von in Neuronen des Spinalganglions vorkommenden Vanilloidrezeptoren exprimiert wird. Zum Beispiel könnte es sich um eine oder mehrere *splice*-Varianten handeln (Xue *et al.*, 2001). Ein weiterer Hinweis für die Existenz anderer Isoformen ist die unterschiedliche Regulierung der CAP-Sensitivität im Spinalganglion und im Ganglion nodosum. Im Spinalganglion wirkt vor allem NGF (*nerve growth factor*), möglicherweise auch GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), im Ganglion nodosum hingegen unterliegt die CAP-Sensitivität der Regulation durch BDNF (*brain derived neurotrophic factor*; Winter, 1998, s. auch Abschnitt 1.2.7). Auch im ZNS ist das Vorkommen von Vanilloidrezeptoren beschrieben, z.B. im Hypothalamus und in der *Formatio reticularis*. Hier könnten sie an der Regulation vegetativer Funktionen beteiligt sein (Mezey *et al.*, 2000; Sasamura *et al.*, 1998).

#### 1.2.5 Elektrophysiologische Charakteristika von VR1

Biophysikalisch ist der VR1-vermittelte Ganzzellstrom durch eine Auswärtsgleichrichtung charakterisiert, sein nahe bei 0 mV liegendes Umkehrpotential (Zusammensetzung der Bad- und Pipettenlösung s. Caterina *et al.*, 1997) zeigt, daß der durch VR1 vermittelte Strom kationenselektiv ist. Durch Ionensubstitutionsexperimente konnte gezeigt werden, daß VR1 für verschieden monovalente Kationen gleichmäßig permeabel ist, aber eine deutliche Präferenz für divalente Kationen, insbesondere Calcium, besitzt.

Die Beobachtung von Einzelkanalströmen durch VR1 in isolierten Membranflecken bestätigte die schon in der Ganzzelleableitung gesehenen Eigenschaften der Auswärtsgleichrichtung und des Umkehrpotentials nahe 0 mV. Mit Natriumionen als dominierendem Ladungsträger beträgt die Einzelkanalleitfähigkeit von VR1 77 pS bei positiven und 35 pS bei negativen

Haltepotentialen. Eine Abhängigkeit der Kanaloffenwahrscheinlichkeit vom Membranpotential wird nicht beschrieben (Caterina *et al.*, 1997).

### 1.2.6 Pharmakologische Eigenschaften von VR1

Wie der Name schon sagt, lässt sich VR1 durch CAP und andere Vanilloide, beispielsweise Resiniferatoxin (RTX), aktivieren. Wird VR1 in Oozyten exprimiert, führte CAP konzentrationsabhängig mit einer halbmaximalen Wirkungskonzentration ( $EC_{50}$ ) von  $0.7 \mu\text{M}$  bei negativem Haltepotential zur Aktivierung eines Einwärtsstromes, der mit Ende der CAP-Applikation innerhalb einiger Sekunden deaktiviert (Caterina *et al.*, 1997). Damit liegt der  $EC_{50}$  Wert in der Größenordnung der Konzentration, die für native Capsaicinrezeptoren beschrieben ist (Oh *et al.*, 1996). RTX, das ultrapotente CAP-Analogon, aktiviert den klonierten Kanal mit einer  $EC_{50}$  von nur  $0.04 \mu\text{M}$  und ist damit etwa achtzehnmal potenter als CAP (Caterina *et al.*, 1997). Ein Hill-Koeffizient von 2.0 zeigte, daß mehr als ein Molekül des Agonisten zur vollständigen Rezeptoraktivierung binden muß. Gleiches gilt für den von Oh *et al.* (1996) beschriebenen nativen Rezeptor. Der durch VR1 vermittelte Strom wurde reversibel durch den kompetitiven Antagonisten CPZ und das nicht-kompetitiv wirksame Ruthenium-Rot blockiert (Caterina *et al.*, 1997).

Die Bindungsstelle für CAP befindet sich auf der intrazellulär gelegenen Seite des Kanalproteins, wahrscheinlich im Bereich der Pore zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 (Jung *et al.*, 1999; Welch *et al.*, 2000). Physiologisch bzw. pathophysiologisch wahrscheinlich von erheblich größerer Bedeutung ist die Aktivierung von VR1 durch Hitze, Protonen und lipidähnliche Substanzen. VR1 kann daher als „polymodaler Detektor“ noxischer physikalischer und chemischer Reize bezeichnet werden (Caterina & Julius, 2001). Hitzereize führen ab einer Schwellentemperatur von  $43^\circ\text{C}$  zur Aktivierung von heterolog exprimierten VR1. Die Eigenschaften des durch Hitze aktivierten Ionenstromes durch VR1 stimmen in wesentlichen Punkten mit denen des CAP-aktivierten Stromes überein. CPZ inhibiert den durch Hitze induzierten Strom reversibel, die Strom-Spannungs-Beziehung zeigt die auswärtsgerichtete Eigenschaft des Kanals. Auch bezüglich der Einzelkanalleitfähigkeit herrscht Übereinstimmung (Tominaga *et al.*, 1998). Die in den heterologen Expressionssystemen beobachteten hitzeinduzierten Ströme ähneln in ihren biophysikalischen wie auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften den in sensorischen Neuronen nativ vorkommenden Hitzeströmen (Cesare & McNaughton, 1996; Kirschstein *et al.*, 1999). Auch korreliert die CAP-Sensitivität sensorischer Neurone mit der Hitzesensitivität (Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy & Rang, 1999a,b). Andererseits gibt es aber



auch Arbeiten, die zeigen, daß in nativen sensorischen Neuronen gerade auf Einzelkanalebene erhebliche Unterschiede zwischen dem CAP-aktivierten und dem hitzeempfindlichen Ionenkanal bestehen. Betroffen sind Parameter wie Ionenselektivität und Sensitivität gegenüber CPZ (Reichling & Levine, 1997) und die Sensitivität gegenüber Hitzereizen sowie CAP (Nagy & Rang, 1999b). Diese Diskrepanzen könnten zumindest teilweise durch das Vorkommen mehrerer temperaturempfindlicher Ionenkanäle in sensorischen Neuronen erklärt werden (Davis *et al.*, 2000; Caterina *et al.*, 2000).

Die Schmerzen und die Hyperalgesie, die mit Gewebeschäden, ausgelöst durch Infektionen, Entzündungen oder Ischämie, einhergehen, werden unter anderem der in den betroffenen Gebieten herrschenden, lokalen Azidose zugeschrieben (Steen *et al.*, 1995). Extrazelluläre Protonen führen zur Aktivierung CAP-sensitiver sensorischer Neurone (Bevan & Geppetti, 1994). Für diese stimulierende Wirkung ist vermutlich die Interaktion von Protonen mit einer Vielzahl von auf sensorischen Neuronen exprimierten Rezeptoren und Ionenkanälen verantwortlich. So wurde auch beschrieben, daß eine Erniedrigung des extrazellulären pH Wertes eine Potenzierung CAP-induzierter Ströme in kultivierten sensorischen Neuronen zur Folge hat (Petersen & LaMotte, 1993; Kress *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen drängt sich die Frage auf, ob und wie Protonen in der Lage sind, als VR1-Agonisten zu wirken. In der Tat wird auch der CAP-aktivierte Strom durch heterolog exprimierte VR1-Kanäle durch mäßige Ansäuerung des extrazellulären Milieus potenziert (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Tominaga *et al.* (1998) zeigten in ihrer Arbeit außerdem, daß es durch Veränderungen des extrazellulären pH Wertes auch zur Beeinflussung hitzeinduzierter Ströme durch VR1 kommt. Neben einer Potenzierung der durch noxische Hitzereize ausgelösten Stromantwort verschiebt sich die Schwellentemperatur für die Hitzeaktivierung zu niedrigeren Temperaturen. So führte eine Absenkung des pH Wertes auf 6.4 (was den Verhältnissen eine lokalen Azidose durchaus entspricht) zu einer Aktivierung von VR1 durch Temperaturen im Bereich von 37°C. Weiteres Absenken des pH Wertes auf 5.4 führte schließlich zur Aktivierung von VR1 bei Raumtemperatur. An heterolog exprimierten VR1 durchgeführte Einzelkanalexperimente zeigten, daß die Eigenschaften des bei Raumtemperatur durch Protonen aktivierten Stromes mit denen der CAP und hitzeinduzierten Ströme übereinstimmen. Der Potenzierung CAP und hitzeaktivierter Ströme liegt eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von VR1 und nicht eine Veränderung der Einzelkanalleitfähigkeit in saurem Milieu zugrunde. Die Aktivierung von Einzelkanälen in zellfreien Membranflecken gelingt allerdings nur bei der extrazellulären Applikation von Protonen, so daß die „Bindungsstelle“ für Protonen in extrazellulär gelegenen Regionen des Rezeptors vermutet

wird (Tominaga *et al.*, 1998; Baumann & Martenson, 2000). Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Julius zeigen, daß ein Glutamatrest in der extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 wesentlich an der Modulation von VR1 durch Protonen beteiligt sein muß. Ein Austausch der betreffenden Aminosäure führte aber nicht zum kompletten Verlust der Säureempfindlichkeit, was auf weitere Interaktionsstellen für Protonen mit VR1 hinweist (Jordt *et al.*, 2000). Auch die Arbeit von Welch *et al.* (2000) zeigte, daß für die Interaktion der verschiedenen Agonisten mit VR1 unterschiedliche Regionen des Proteins verantwortlich sind.

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von CAP und diversen im Organismus vorkommenden Lipidderivaten (z.B. Arachidonsäurederivate) hat man vermutet, daß diese ebenfalls Agonisten oder Modulatoren für VR1 sein könnten. Tatsächlich aktiviert der endogene Cannabinoidrezeptoragonist Anandamid konzentrationsabhängig in Zellsystemen, die VR1 heterolog exprimieren, einen auswärtsgerichteten Kationenstrom, der durch CPZ zu inhibieren ist (Zygmunt *et al.*, 1999). In sensorischen Neuronen führt Anandamid sowohl am peripheren als auch am zentralen Ende des Axons zur CAP-vermittelten Freisetzung von Neuropeptiden (Zygmunt *et al.*, 1999; Tognetto *et al.*, 2001), außerdem verursacht Anandamid in CAP-empfindlichen sensorischen Neuronen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, am ehesten durch Aktivierung von Capsaicinrezeptoren (Szoke *et al.*, 2000). Fraglich ist, ob die endogen vorkommenden Anandamidkonzentrationen hoch genug sind, um über Capsaicinrezeptoren eine proalgetische Wirkung auszuüben oder ob nicht doch die analgetische Wirkung durch Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren in sehr viel geringeren Konzentrationen *in vivo* dominiert (Szolcsanyi, 2000). Andere endogen vorkommende Lipide, die VR1 aktivieren, sind Lipoxygenaseprodukte, z.B. Leukotrien B<sub>4</sub> (Hwang *et al.*, 2000). Allen Lipidderivaten gemeinsam ist, daß sie hinsichtlich der VR1-Aktivierung im Vergleich zu CAP wesentlich weniger potent sind (Caterina & Julius, 2001). Die Komplexität der Pharmakologie von VR1 verdeutlichen die Arbeiten von Vyklicky *et al.* (1998) und Olah *et al.* (2001), in denen gezeigt wird, daß inflammatorische Mediatoren, die als Monosubstanzen keine VR1-Agonisten sind, zusammen in einem „Cocktail“ und der gleichzeitigen Ansäuerung des extrazellulären Mediums einen Membranstrom induzieren, der dem durch CAP aktivierten Strom stark ähnelt.

### 1.2.7 Modulation und Regulation von VR1

Wie andere Ionenkanäle unterliegt auch VR1 dem Einfluß intrazellulärer Modulatoren. Die drei möglichen Phosphorylierungsstellen des Rezeptorproteins weisen darauf hin, daß

calciumabhängige Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen durch Proteinkinasen respektive Phosphatasen bei der Regulation des Rezeptors eine wichtige Rolle spielen (Szallasi & Blumberg, 1999). Inhibition der Phosphatase Calcineurin beispielsweise führte zum Verlust der bei repetitiver CAP–Applikation beobachteten Tachyphylaxie, was für eine erhöhte Ansprechbarkeit von VR1 gegenüber Agonisten in phosphoryliertem Zustand spricht (Docherty *et al.*, 1996). Dieser Befund wird durch die Beobachtungen von Koplak *et al.* (1997) ergänzt: entfernte man die Substrate für Phosphorylierungsreaktionen ATP und GTP aus dem Zellinneren, zeigte sich eine sehr viel stärker ausgeprägte Tachyphylaxie, als man sie in Gegenwart der genannten Nukleotide beobachtete. Wie kommt es nun zur Aktivierung von Proteinkinasen und der folgenden Phosphorylierungsreaktion? Eine Möglichkeit ist die cAMP–abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch proinflammatorische Prostaglandine. In der *cell-attached* Konfiguration wurde eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit CAP–aktivierter Ionenkanäle nach Applikation von Prostaglandinen beobachtet (Lopshire & Nicol, 1998). Auch durch die Proteinkinase C (PKC) wird die Aktivität von VR1 reguliert. Cesare & McNaughton (1996) berichten über die PKC–abhängige Sensibilisierung eines hitzeinduzierten Stromes in Neuronen des Spinalganglions, dem vermutlich der native Capsaicinrezeptor zugrunde liegen dürfte. Für die Sensibilisierung des Rezeptors verantwortlich ist wahrscheinlich ein Verschieben der Aktivierungsschwelle für Hitze zu niedrigeren Temperaturen. Zumindest führte die Aktivierung von PKC (z.B. durch das proinflammatorische Peptid Bradykinin) bei Raumtemperatur ohne die Applikation eines Agonisten zur Aktivierung von VR1 (Premkumar & Ahern, 2000; Vellani *et al.*, 2001). Über die Modulation von VR1 durch die genannten Proteinkinasen und Phosphatasen, die ihrerseits wiederum den Einflüssen multipler intrazellulärer Signalsysteme unterliegen, ist es also möglich, daß auch extrazelluläre Botenstoffe, die per se keine Agonisten für VR1 darstellen, Einfluß auf die Aktivität des Ionenkanals zu nehmen.

Unabhängig von Phosphorylierungsreaktionen führte intrazelluläres ATP zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von VR1. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Interaktion von ATP mit zwei Nukleotidbindungsstellen auf der intrazellulären Seite des Kanals (Kwak *et al.*, 2000).

Die Expression des VR1–Gens unterliegt je nach Zelltyp unterschiedlichen Regulationsmechanismen. In Neuronen des Spinalganglions ist die Expression von VR1 vom Nervenwachstumsfaktor NGF abhängig (Winston *et al.*, 2001). NGF wird in der Peripherie gebildet und retrograd über die Axone sensorischer Nervenzellen in deren Somata im Spinalganglion transportiert, wo die Expression von Proteinen stimuliert wird. Unterbricht

man den axonalen Transport durch eine Axotomie, kommt es zu einer reduzierten Transkription des VR1-Gens (Michael & Priestley, 1999). Im Ganglion nodosum des N. vagus hingegen reguliert BDNF die Expression von VR1 (Winter, 1998).

### 1.2.8 Auswirkungen der Deletion des VR1-Gens in Mäusen

Gleich zwei Arbeitsgruppen veröffentlichten kürzlich ihre Ergebnisse über Experimente mit Mäusen, die VR1 nicht exprimierten (Davis *et al.*, 2000; Caterina *et al.*, 2000). In beiden Fällen waren die sog. VR1-Null-Mäuse lebensfähig, fertil und vom äußeren Aspekt und Verhalten her nicht von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. Elektrophysiologische *in vitro* Studien an kultivierten Neuronen des Spinalganglions und Haut-Nerven Präparaten zeigten, daß die in den entsprechenden Präparaten von Wildtyp-Mäusen vorhandene Sensitivität gegenüber den VR1-Agonisten CAP, Protonen und Hitze, in VR1-Null-Mäusen nicht nachzuweisen war. Auch die Entwicklung einer Hyperalgesie gegenüber thermischen Reizen war in den mutierten Tieren deutlich abgeschwächt. Unterschiedliche Ergebnisse zeigten die Arbeiten hinsichtlich der Reaktion auf akute noxische Hitzereize in *in vivo* Experimenten. Während Caterina *et al.* (2000) eine verminderte Schmerzreaktion der VR1-Null-Mäuse auch gegenüber akuten thermischen Reizen beobachteten, zeigten sich in den von Davis *et al.* (2000) durchgeführten Experimenten keine signifikanten Unterschiede im Verhalten gegenüber akuten Hitzereizen zwischen Null-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen ist bislang noch nicht bekannt, könnte aber in den unterschiedlichen Versuchsprotokollen liegen (Caterina & Julius, 2001). Eine andere Ursache für die persistierende Empfindlichkeit der Null-Mäuse gegenüber akuten Hitzereizen könnte die Transduktion des Stimulus durch einen anderen Rezeptor als VR1 sein (Roza *et al.*, 2001)

### 1.3 Spannungsabhängige Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle in Neuronen sind für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials verantwortlich. In anderen Zelltypen übernehmen sie außerdem Schrittmacherfunktionen und sind an der Regulation des Ruhemembranpotentials und damit an der Erregbarkeit der Zelle beteiligt (Hille, 2001). Obwohl bis heute mehrere Natriumkanaltypen beschrieben und kloniert sind, weisen die verschiedenen Natriumkanäle viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten auf (Hille, 2001; Goldin, 2001). Diese

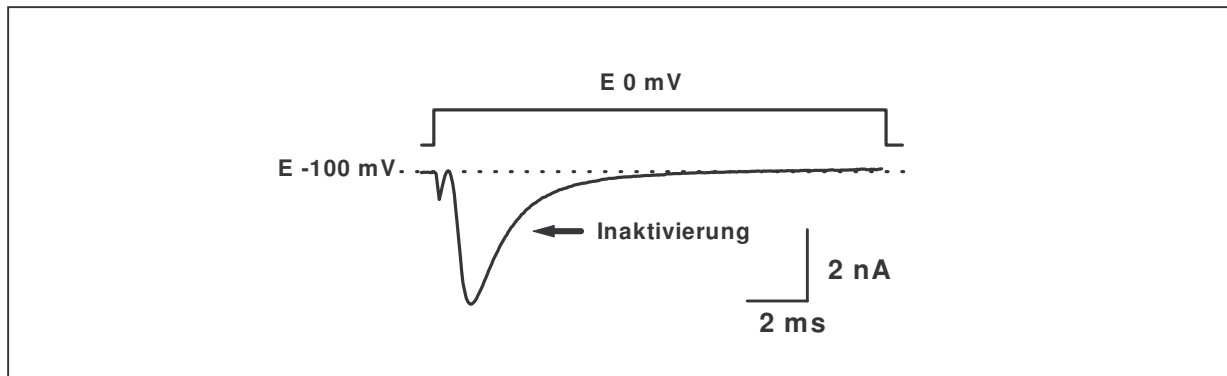
Ähnlichkeiten sind unter anderem dafür verantwortlich, daß eine differenzierte Unterteilung der Natriumkanäle in Untergruppen, wie es z.B. für Kaliumkanäle der Fall ist, bis heute nicht geschehen ist (Goldin, 2001). Ihre wichtigsten gemeinsamen biophysikalischen Eigenschaften, nämlich spannungsabhängige Aktivierung, Inaktivierung und Natriumselektivität wurden erstmals durch Hodgkin & Huxley (1952a) beschrieben. Auch Bindungsstellen für verschiedene Neurotoxine und die Lokalanästhetika lassen sich an allen spannungsabhängigen Natriumkanälen nachweisen (Catterall, 2000).

Unterschiede zwischen den einzelnen Typen zeigen sich in den Kinetiken und der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung und den pharmakologischen Eigenschaften, insbesondere in der Sensitivität gegenüber dem Gift des Kugelfisches, dem klassischen Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX; Hille, 2001; Narahashi *et al.*, 1964). Sowohl in der Membran sensorischer Neurone, als auch auf Herzmuskelzellen kommen spannungsabhängige Natriumkanäle vor, die sich durch die herkömmlichen Konzentrationen von TTX im einstellig nanomolaren Bereich nicht blockieren lassen (Catterall, 2000; Baker & Wood, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung „TTX-resistente Natriumkanäle“ nur für die in sensorischen Neuronen vorkommenden Typen von Natriumkanälen verwendet.

### **1.3.1 Biophysikalische Eigenschaften spannungsabhängiger Natriumkanäle**

Die ersten Beobachtungen eines spannungsabhängigen Natriumstromes wurden von Hodgkin und Huxley während *voltage-clamp* Experimenten an den Riesenaxonen des Tintenfisches gemacht. Der durch einen depolarisierenden Spannungssprung ausgelöste Natriumstrom ist durch eine schnelle „Aktivierung“ gekennzeichnet. Die Zeitkonstante für Aktivierung und die maximale Amplitude sind abhängig vom jeweils applizierten Potential. Mit zunehmender Depolarisation wird die Aktivierung beschleunigt und die Amplitude größer, bis ein „Sättigungseffekt“ zu beobachten ist (Hodgkin & Huxley, 1952b). Dieser Sättigung liegt die Aktivierung aller in der Membran der untersuchten Zelle vorkommenden Natriumkanäle zugrunde (Hille, 2001). Der Aktivierung folgt bei anhaltender Depolarisation innerhalb von Millisekunden eine relativ langsamere „Inaktivierung“, die Amplitude des Stromes wird kleiner und erreicht schließlich wieder das Ausgangsniveau (Abb.4). Um erneut einen Natriumstrom aktivieren zu können, bedarf es einer „Erholungsphase“, während der die Zellmembran re- bzw. hyperpolarisiert sein muß.

Wenn es zu einer Verringerung der Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum kommt, trägt ein höherer Anteil spannungsabhängiger Natriumkanäle im inaktivierten Zustand zu einer verminderten Erregbarkeit von Zellen bei (Hille, 2001).



#### Abb. 4 Inaktivierung des spannungsabhängigen Natriumstromes

Originalregistrierung eines TTX-resistenten Natriumstromes nach Subtraktion des Leckstromes. Darüber abgebildet ist der 15 ms lange, depolarisierende Impuls, der zur Aktivierung des Stromes führt. Bei anhaltendem Reiz kommt es zur kompletten Inaktivierung des Stromes. Die gestrichelte Linie entspricht dem geschlossenen Zustand der Kanäle.

Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, 300 nM TTX, Pipette: CsF, Filterfrequenz: 5 kHz, Temperatur: 23°C.

In einem einfachen kinetischen Modell kann man also dem spannungsabhängigen Natriumkanal drei unterschiedliche Zustände zuordnen:

- 1) Geschlossener Zustand: kein Strom fließ, der Kanal ist aktivierbar.
- 2) Offener Zustand: Ionen passieren die Pore.
- 3) Inaktivierter Zustand: weder Ionenfluß noch eine erneute Aktivierung sind möglich, die offene Pore ist durch das IFM-Partikel blockiert (s. Abschnitt 1.3.2.).

Andere, komplexere kinetische Modelle unterscheiden noch mehrere geschlossene, offene und inaktivierte Zustände, in denen sich der Kanal befinden kann (Hille, 1978).

### 1.3.2 Molekularbiologie spannungsabhängiger Natriumkanäle

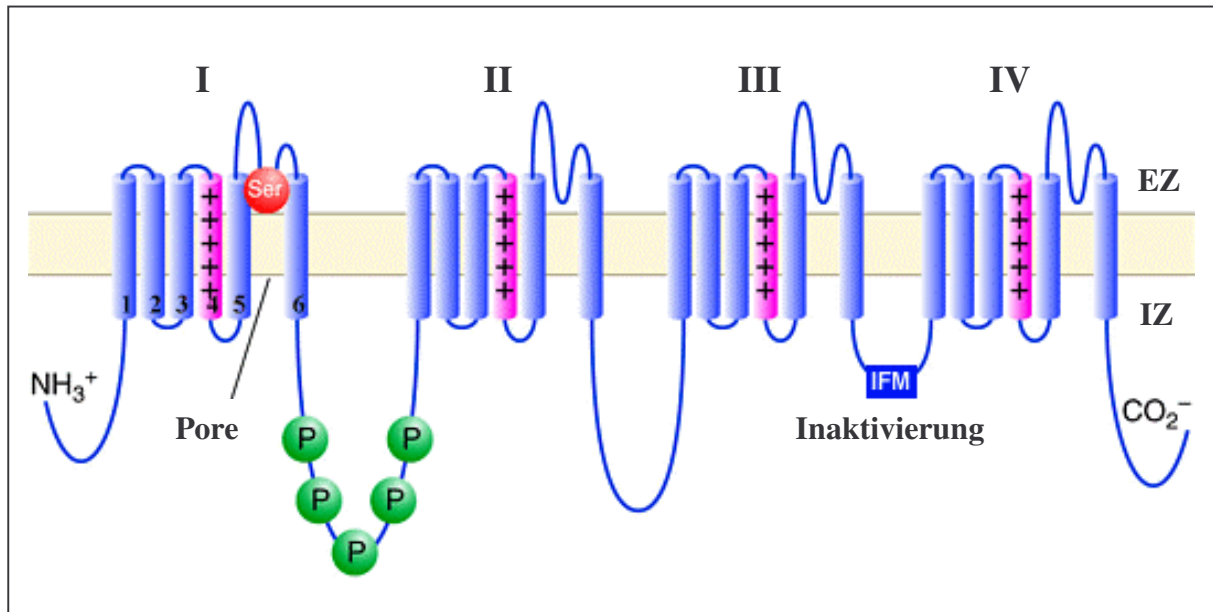
Einblick in die molekulare Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle hat man, seit es Beneski & Catterall (1980) gelang, das Protein eines Natriumkanals des Gehirns

nachzuweisen. Nachfolgende Studien zeigten, daß es sich beim Protein des Natriumkanals von Säugetieren um einen Komplex aus einer  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten handelt (Hartshorne & Catterall, 1981; Hartshorne *et al.*, 1982), der funktionelle, spannungsabhängige Natriumkanäle bildet (Talvenheimo *et al.*, 1982; Hartshorne *et al.*, 1985).

Mit der Klonierung der Natriumkanal-cDNA des elektrischen Aals *Electrophorus electricus* durch Noda *et al.* (1984) und dem sich daraus ergebenden Wissen über die Aminosäuresequenz konnten Aussagen über die Membrantopologie des Natriumkanals gemacht werden. Es handelte es sich um ein Protein mit vier homologen Domänen, welche sich aus jeweils mehreren  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten zusammensetzen. Die Expression eines funktionellen Natriumkanals in *Xenopus* Oozyten wurde zum ersten Mal von Goldin *et al.* (1986) beschrieben. Es zeigte sich, daß die  $\alpha$ -Untereinheit ausreichend ist, Natriumströme funktionell zu exprimieren. Um allerdings einen spannungsabhängigen Natriumkanal mit physiologischen Kinetiken zu erhalten, bedarf es der Coexpression der  $\alpha$ - sowie der  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Untereinheiten (Isom *et al.*, 1992; Isom *et al.*, 1995).

Bisher konnten die Gene für 10 verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten und 3  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert werden. Allerdings lassen sich nur 9  $\alpha$ -Untereinheiten funktionell exprimieren, so daß über die physiologische Bedeutung einer 10.  $\alpha$ -Untereinheit spekuliert werden darf (Goldin, 2001; Baker & Wood, 2001; Morgan *et al.*, 2000). Die porenbildende  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen I - IV, bestehend aus jeweils sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten S1 – S6 (Abb.5). Die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus einer großen extrazellulären, glycosylierten Domäne, einem membrandurchspannenden Segment und einem kurzen intrazellulären Abschnitt (Catterall, 2000). Die  $\beta$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle haben mehrere Funktionen. Zum einen regulieren sie die räumliche Verteilung der Natriumkanäle in der Zellmembran. Ihre strukturelle Nähe zu Zelladhäsionsmolekülen (Immunglobulin-ähnliche Tertiärstruktur) macht eine Funktion im Bereich der Zell-Zellinteraktion von Neuronen und umgebenden Zellen wahrscheinlich (Srinivasan *et al.*, 1998). Auch die biophysikalischen Eigenschaften, insbesondere die spannungsabhängige Aktivierung und die Inaktivierungskinetik, sowie das Expressionsverhalten der Kanäle werden von den  $\beta$ -Untereinheiten beeinflusst (Smith *et al.*, 1998; Isom, 2000).

Welche molekularen Mechanismen sind nun für die spannungsabhängige Aktivierung des Natriumkanals verantwortlich?



**Abb. 5**  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals

Alle spannungsabhängigen Natriumkanäle besitzen eine ähnlich aussehende  $\alpha$ -Untereinheit, bestehend aus 4 Domänen zu je 6 Transmembranhelices. Den Spannungssensor vermutet man in der 4. Transmembranhelix (S4), hier rosa wiedergegeben. Zwischen der 3. und 4. Domäne befindet sich das Inaktivierungspartikel (IFM). Als Kugeln dargestellt sind Phosphorylierungsstellen zur Regulation der Kanalaktivität. Der Serinrest in der Domäne I anstelle einer aromatischen Aminosäure hebt die TTX-Empfindlichkeit auf. EZ und IZ bezeichnen den Extra- bzw. Intrazellulärraum (Abb. modifiziert n. Baker & Wood, 2001).

Daß wesentlicher Bestandteil des Aktivierungsmechanismus eine Auswärtsbewegung von Ladungen (*gating charges*) als Reaktion auf Veränderungen im elektrischen Feld der Zellmembran ist, beschrieben schon Hodgkin & Huxley (1952a). Der eigentliche Spannungssensor, über den es zur Öffnung der Kanalpore kommt, befindet sich im Transmembransegment S4 aller 4 Domänen. Dort kommt eine Sequenz von Aminosäuren vor, in der auf einen positiv geladenen Rest immer zwei Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette folgen. Diese Primärstruktur führt zur Bildung einer nach außen hin positiv geladenen Helix, die durch die Interaktion mit negativ geladenen Teilchen des hydrophoben Teiles der Plasmamembran in deren elektrischem Feld fixiert wird. Die Theorie besagt weiter, daß eine Depolarisation der Zellmembran zu einer spiralförmigen Auswärtsbewegung von S4 und damit zu der beobachteten Ladungsverschiebungen führt. Diese führt dann über eine Konformationsänderung des Kanalproteins zur Öffnung der Pore (Catterall, 1986). In der Tat führen Neutralisation der genannten positiven Ladungen oder Mutation der entsprechenden Aminosäuren zu erheblichen Verlusten in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung



(Stühmer *et al.*, 1989; Kontis *et al.*, 1997). Auch die Auswärtsbewegung des S4 Segmentes konnte durch elegante Experimente inzwischen bestätigt werden. Eine natürlich vorkommende Kanalmutante, bei der ein Arginin im extrazellulären Bereich von S4 durch ein Cystein ersetzt ist (R1448C) reagiert in Gegenwart von Methanthiosulfatderivaten in der Extrazellulärlösung mit einer Beschleunigung der spannungsabhängigen Inaktivierung (Yang & Horn, 1995; Yang *et al.*, 1996).

Auch die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Inaktivierung hat seit den ersten Experimenten von Hodgkin und Huxley große Fortschritte gemacht. In der Tat war das sog. Inaktivierungsgate die erste funktionelle Komponente eines Ionenkanals, die experimentell identifiziert wurde (Vassilev *et al.*, 1988). Da der spannungsabhängige Natriumstrom die Eigenschaft der schnellen Inaktivierung durch die intrazelluläre Applikation von Proteasen verliert, wurde das folgende Modell für ein Inaktivierungsgate postuliert: eine Art Pfropfen, der über eine Aminosäurekette mit der intrazellulären Seite des Kanalproteins verbunden ist, führt zur Inaktivierung, indem er sich vor die innere Öffnung der Kanalpore legt (Armstrong, 1981). Weitere Arbeiten zeigten, daß sich das Inaktivierungsgate im Bereich des intrazellulären Abschnittes zwischen Domäne III und IV der  $\alpha$ -Untereinheit befinden muß (Vassilev *et al.*, 1988; Vassilev *et al.*, 1989; Stühmer *et al.*, 1989).

Für die Inaktivierung wichtigster Abschnitt innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen Domäne III und IV ist ein hydrophobes Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (sog. IFM-Partikel, Abb.5). Tauscht man die drei genannten Aminosäuren gegen drei Glutaminreste aus, so erhält man eine Natriumkanalmutante, der die Eigenschaft der schnellen Inaktivierung fehlt, ohne daß andere Eigenschaften des Kanals betroffen sind (West *et al.*, 1992). Die Struktur des „Rezeptors“ für das IFM-Partikel ist wesentlich komplexer, als das Partikel selber. Drei verschiedene Stellen, die alle im Bereich der inneren Porenöffnung liegen, scheinen an der Bildung des „Rezeptors“ beteiligt zu sein. Es handelt sich um Segment S6 der Domäne IV (McPhee *et al.*, 1995), den intrazellulären Bereich zwischen den Segmenten S5 und S6 der Domäne III (Smith & Goldin, 1997) und den intrazellulären Bereich zwischen den Segmenten S5 und S6 der Domäne IV (Lerche *et al.*, 1997). Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wird vor allem durch eine Kopplung an die spannungsabhängig Aktivierung des Natriumkanals über das Segment S4 der Domäne IV bestimmt (Sheets *et al.*, 1999).

Wie man sich die dreidimensionale Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle vorzustellen hat, zeigt die kürzlich erschienene Arbeit von Sato *et al.* (2001). Es handelt sich um ein glockenförmiges Protein, dessen schmaleres Ende die extrazelluläre Seite bildet. Im

Inneren werden eine große, zentrale Öffnung und vier periphere, kleinere Öffnungen beschrieben. Der zentralen Öffnung wird die eigentliche Porenfunktion zugeschrieben, während die peripheren Aushöhlungen möglicherweise wichtigen Raum für Anteile des Kanalproteins im Rahmen der porenöffnenden Konformationsänderung bieten.

### 1.3.3 Molekulare Pharmakologie spannungsabhängiger Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle unterliegen der Beeinflussung durch eine ganze Reihe von Pharmaka bzw. Toxinen. Nach Art des Wirkungsmechanismus unterscheidet man Kanalblocker, welche die Pore wie ein Korken verstopfen, von Toxinen, die das *gating* (also Aktivierung und Inaktivierung) verändern (Hille, 2001).

Eine wichtige Eigenschaft der meisten spannungsabhängigen Natriumkanäle ist ihre Sensitivität gegenüber dem Gift des Kugelfisches, dem Tetrodotoxin (TTX). TTX hemmt die Kanäle in nanomolaren Konzentrationen im einstelligen Bereich {Schwarz *et al.*, 1973; Tanaka *et al.*, 1998), ohne dabei andere Rezeptoren und Kanäle zu beeinflussen (Hille, 2001). TTX wirkt nur von der extrazellulären Seite der Membran und scheint die Kanalpore im Bereich des Selektivitätsfilters wie ein Deckel zu verschließen (Hille, 1975). Die *gating*-Eigenschaften werden durch TTX nicht verändert und die Bindung des Toxins an den Kanal ist unabhängig von dessen funktionellem Zustand (Hille, 2001). Für die Bindung von TTX entscheidend ist das Vorhandensein eines Glutamatrestes mit seiner Carboxylgruppe im Bereich zwischen Segment S5 und S6 in Domäne I des Kanalproteins (Noda *et al.*, 1989). Auch die restlichen 3 Domänen zeigen negativ geladene Aminosäureseitenketten in ähnlichen Positionen, die zusammen den Rezeptor für TTX bilden (Terlau *et al.*, 1991). Bei einer Gruppe von spannungsabhängigen Natriumkanälen des peripheren Nervensystems ist eine aromatische Aminosäure (Tyrosin oder Phenylalanin), die sich 2 Positionen vor dem Glutamatrest in Domäne I befindet, durch die Aminosäure Serin ersetzt, was zu einem Verlust der hohen Empfindlichkeit gegenüber TTX führt (Sivilotti *et al.*, 1997). Es handelt sich um die in der vorliegenden Arbeit untersuchten TTX-resistenten Natriumkanäle.

Im Gegensatz zu TTX, das neben seiner Bedeutung in der Untersuchung von Ionenkanälen und dem gelegentlichen Auftreten von Intoxikationen nach dem Genuß des Kugelfisches (einer Delikatesse in Japan) keinerlei Verwendung am Menschen findet, hat eine andere Gruppe von Natriumkanalblockern wesentliche Bedeutung im klinischen Alltag erlangt: die Lokalanästhetika.

Schon lange ist bekannt, daß Lokalanästhetika die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen durch Blockade des spannungsabhängigen Natriumstromes hemmen

(Taylor, 1959; Hille, 1966). Experimente mit geladenen Lokalanästhetikaderivaten zeigten, daß diese ihre Bindungsstelle im Kanalprotein von der intrazellulären Seite aus erreichen und daß es zur Bindung der Kanalaktivierung bedarf (Frazier *et al.*, 1970; Strichartz, 1973). Courtney (1975) nannte diese Art der Blockade *use-dependent block*, also benutzungsabhängige (oder phasische) Blockade. Für die hydrophoberen Lokalanästhetika scheint neben dem Weg durch die intrazelluläre Porenöffnung auch eine direkte Permeation durch die Zellmembran zur Rezeptorbindung zu führen (Hille, 2001). Lokalanästhetika blockieren aber nicht nur den Fluß von Ionen durch die Pore, sondern verändern (im Gegensatz zu TTX) auch die *gating*-Eigenschaften des Kanals. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wird zu negativeren Potentialen verschoben und die Erholung von der Inaktivierung, also die Rückkehr in den Ruhezustand, ist verzögert. Lokalanästhetika bleiben also bevorzugt an den Natriumkanal im inaktivierten Zustand gebunden (Hille, 2001; Butterworth & Strichartz, 1990).

Die exakte Lokalisation der Lokalanästhetikabindungsstelle in Segment S6 der Domäne IV des Natriumkanals gelang 1994 durch Untersuchungen an in diesem Bereich mutierten Natriumkanälen. Es stellte sich heraus, daß das Vorhandensein von 2 Aminosäuren, eines Phenylalanin- und eines Tyrosinrestes in der Nähe der inneren Porenöffnung entscheidend für die hochaffine Bindung der Lokalanästhetika an den Kanal ist (Ragsdale *et al.*, 1994).

Neben den beschriebenen Inhibitoren spannungsabhängiger Natriumkanäle gibt es aber auch Substanzen, welche die Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung erhöhen, bzw. die Inaktivierung verlangsamen oder aufheben. Es handelt sich vor allem um die Peptidtoxine verschiedener Skorpione und Coelenteraten und um die Alkaloide einiger Frösche und Pflanzen. Für den Menschen können solche „Agonisten“ spannungsabhängiger Natriumkanäle unter Umständen tödlich sein, wenn diese beispielsweise Herzrhythmusstörungen verursachen (Hille, 2001).

Die Peptidtoxine lassen sich nach Art ihrer Wirkung in Substanzen unterteilen, welche die Inaktivierung verzögern ( $\alpha$ -Toxine) und solche, die eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen bewirken ( $\beta$ -Toxine). Beide Gruppen führen zu einer Zunahme der Membranerregbarkeit.

Für die  $\alpha$ -Toxine konnte die Bindungsstelle im extrazellulären Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit zwischen den Segmenten S3 und S4 der Domäne IV lokalisiert werden (Rogers *et al.*, 1996).

$\beta$ -Toxine führen zur Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen schon im Bereich des Ruhemembranpotentials, ohne wesentlichen Einfluß auf die Inaktivierungseigenschaften auszuüben. Auch die  $\beta$ -Toxine beeinflussen das *gating* durch Bindung von der extrazellulären Seite. Die Bindungsstelle befindet sich zwischen den

Segmenten S3 und S4 der Domäne II (Cestele *et al.*, 1998). Die räumliche Nähe der Bindungsstellen für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxine zu den spannungsempfindlichen Segmenten S4 macht eine Modifikation von Aktivierung bzw. Inaktivierung über Interaktionen mit den extrazellulären Bereichen des Spannungssensors sehr wahrscheinlich (Hille, 2001).

Auch eine ganze Reihe von Alkaloiden pflanzlicher und tierischer Herkunft wirken als „Agonisten“ an spannungsabhängigen Natriumkanälen. Zu dieser Gruppe von Toxinen gehören Aconitin (das Hauptalkaloid des Blauen Eisenhutes *Aconitum napellus*), Veratridin (aus dem Samen des mexikanischen Läusekrautes *Schoenocaulon officinale*) und Batrachotoxin, das Gift des kolumbianischen Pfeilgiftfrosches *Phyllobates aurotaenia*. Die Bindungsstelle für diese lipidlöslichen Toxine unterscheidet sich von der für die bisher genannten Substanzen und liegt im Bereich der Bindungsstelle für Lokalanästhetika. Die Wirkung der Alkaloide ist benutzungsabhängig und wird durch alle Faktoren, die zu häufigerer oder verlängerter Öffnung der Natriumkanäle führen, erleichtert. Demzufolge scheint ihre Bindung an das Kanalprotein dessen Offenzustand vorauszusetzen. Lokalanästhetika wirken als kompetitive Antagonisten für die Bindung der Alkaloide (Hille, 2001). Die Wirkung auf die biophysikalischen Eigenschaften der Natriumkanäle lässt sich als Kombination der Effekte von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxinen beschreiben. Die Schwelle zur spannungsabhängigen Aktivierung ist zu negativeren Potentialen verschoben und die Inaktivierung verzögert oder gänzlich aufgehoben (Catterall, 1980). Die Einzelkanalleitfähigkeit wird durch Batrachotoxin und seine Verwandten reduziert. Einzigartig für diese Gruppe von Toxinen ist, daß sie die Selektivität des Natriumkanals verringern (Mozhayeva *et al.*, 1977).

### 1.3.4 Modulation spannungsabhängiger Natriumkanäle

Wie viele andere Ionenkanäle unterliegen auch die spannungsabhängigen Natriumkanäle dem Einfluß intrazellulärer Regulationsmechanismen (z.B. sog. *second messenger* Systeme). Über Phosphorylierungsstellen im Bereich der intrazellulären Schleife zwischen den Domänen I und II interagiert die cAMP-abhängige Proteinkinase A mit dem Natriumkanalprotein (Murphy *et al.*, 1993). Phosphorylierung des Natriumkanals führt zu einer Reduktion der maximalen Ganzzell-Stromamplitude ohne die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sowie die Spannungsabhängigkeit zu beeinflussen (Smith & Goldin, 1996). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß durch CAP-induzierte Aktivierung des Vanilloidrezeptors der intrazelluläre cAMP Gehalt ansteigt, was zum Beispiel über eine

Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung spannungsabhängiger Natriumkanäle zur Inhibition des Natriumstromes in diesen Neuronen führt (Liu *et al.*, 2001).

Für Proteinkinase C weist das Natriumkanalprotein zwei Bindungsstellen auf. Eine liegt ebenfalls im Bereich zwischen Domäne I und II. Phosphorylierung in dieser Region führt, wie für Proteinkinase A beschrieben, zu einer Reduktion der Ganzzell-Stromamplitude (Catterall, 2000). Eine zweite Interaktionsstelle für Proteinkinase C befindet sich im Bereich des Inaktivierungspartikels zwischen den Domänen III und IV. Ein hier phosphorylierter Kanal zeigt eine deutlich verlangsamte Inaktivierung (Cantrell *et al.*, 1996; West *et al.*, 1991).

Schließlich beeinflusst auch die Aktivierung von Tyrosinkinasen die Eigenschaften spannungsabhängiger Natriumkanäle; es kommt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Inaktivierung in Richtung negativerer Membranpotentiale (Hilborn *et al.*, 1998). Dieser Effekt wird durch Aktivierung einer Tyrosinphosphatase rückgängig gemacht (Ratcliffe *et al.*, 2000).

### 1.3.5 TTX-resistente Natriumkanäle in sensorischen Neuronen

Von den bislang identifizierten 10 Genen für  $\alpha$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle werden sieben von primär sensorischen Neuronen exprimiert. Für die  $\beta$ -Untereinheiten wurde das Vorkommen aller drei Typen im Spinalganglion nachgewiesen (Baker & Wood, 2001).

Die auf primär sensorischen Neuronen vorkommenden Natriumkanäle unterteilt man nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber Tetrodotoxin in TTX-sensitive (TTXs) und TTX-resistente (TTXr) Natriumkanäle (Kostyuk *et al.*, 1981; McCleskey & Gold, 1999). TTXs Natriumkanäle findet man auf allen Neuronen des Spinalganglions, während sich das Vorkommen von TTXr Natriumkanälen auf Nervenzellen beschränkt, die typische Eigenschaften von Nozizeptoren aufweisen (Elliott & Elliott, 1993; Ogata & Tatebayashi, 1993; Gold *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 1998a). Elektrophysiologisch lassen sich mindestens drei unterschiedliche TTXr Natriumströme in Neuronen des Spinalganglions unterscheiden (Rush *et al.*, 1998). Der erste Typ der TTXr Natriumströme (TTX-R1) ist dadurch charakterisiert, daß er gegenüber TTXs Strömen (1) eine, auf das Membranpotential bezogen positivere Aktivierungsschwelle hat, (2) eine positivere Inaktivierungsschwelle aufweist, (3) der Inaktivierungsprozeß langsamer verläuft und (4) die Erholung von der Inaktivierung schneller stattfindet (Rush *et al.*, 1998). Der als TTX-R2 bezeichnete zweite, in sensorischen Neuronen beschriebene TTXr Natriumstrom unterscheidet sich vor allem in seiner Spannungsabhängigkeit und der, zur Erholung von der Inaktivierung benötigten Zeit von

TTX-R1. Aktivierung und Inaktivierung finden im Vergleich zu TTX-R1 bei hyperpolarisierteren Potentialen statt und die Erholung von der Inaktivierung dauert erheblich länger. Diese Eigenschaft stimmt mit dem von Ogata & Tatebayashi (1993) beschriebenen TTXr Natriumstrom überein und ist der Grund, warum dieser Strom eine relativ ausgeprägte intrinsische Benutzungsabhängigkeit zeigt. Der dritte Typ der TTXr Natriumströme des Spinalganglions, TTX-R3, konnte von Rush *et al.* (1998) nur nach hyperpolarisierenden Vorimpulsen gemessen werden. Wurde eine Zelle vom Ruhemembranpotential aus stimuliert, wurde TTX-R3 nicht beobachtet. Die biophysikalischen Eigenschaften von TTX-R1 könnten diesen Natriumstrom zu einem wichtigen Regulator der Erregbarkeit primär sensorischer Neurone machen (Gold, 1999). Durch die, im Vergleich zu TTXs Natriumströmen schnellere Erholung von der Inaktivierung, stehen einer Zelle mit einer hohen Anzahl von TTX-R1 leitenden Natriumkanälen (also wahrscheinlich vorwiegend nozizeptiven Neuronen) nach einem Aktionspotential schneller wieder ausreichend Natriumkanäle zur Generierung eines neuen Aktionspotentials zur Verfügung. Diese Nervenzellen können also durch ihre spezifische Ausstattung mit TTXr Natriumkanälen Aktionspotentiale in hoher Frequenz generieren und weiterleiten (Elliott & Elliott, 1993; McCleskey & Gold, 1999; Scholz & Vogel, 2000). Weitere funktionelle Bedeutung könnte TTX-R1 in partiell depolarisierten Geweben, also zum Beispiel an Verletzungsstellen mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration spielen. Durch seine relativ hohe Schwelle für Aktivierung und Inaktivierung würde TTX-R1 ausreichend Natriumstrom zur Aktionspotentialgenerierung liefern, wenn sich ein Großteil anderer Natriumkanäle aufgrund der Depolarisation schon im inaktivierten Zustand befinden würde (Rush *et al.*, 1998). Der Beitrag von TTX-R2 zum gesamten Natriumstrom einer Zelle würde aufgrund seiner langsamen Erholung von der Inaktivierung sehr viel schneller abnehmen, als dieses für TTX-R1 der Fall wäre. Damit scheidet TTX-R2 als Kandidat für einen, Serien von Aktionspotentialen unterliegenden Strom praktisch aus. TTX-R3 spielt bei physiologischen Ruhemembranpotentialen aufgrund der sehr negativen, zur Aktivierung und Inaktivierung notwendigen Potentiale wahrscheinlich keine Rolle (Rush *et al.*, 1998). Scholz *et al.* (1998a) beschreiben zwei verschiedene TTXr Natriumströme in Neuronen des Spinalganglions, die aufgrund ihrer Inaktivierungskinetiken als *slow* TTXr und *fast* TTXr bezeichnet werden. Auch in ihrer Spannungsabhängigkeit unterscheiden sich die beiden Ströme, *fast* TTXr aktiviert und inaktiviert bei deutlich negativeren Potentialen als *slow* TTXr. Was weiß man über die molekulare Identität von TTXr Natriumkanälen? Bisher ist es gelungen, cDNA für zwei TTXr Natriumkanäle, die in Neuronen des Spinalganglions vorkommen, zu klonieren und die Kanalproteine heterolog zu

exprimieren. Da TTXr Natriumkanäle im Nervensystem bisher nur in primär sensorischen Neuronen gefunden wurden, werden sie abgekürzt auch als SNS (von *sensory neuron specific*) bezeichnet. Mit SNS (Akopian *et al.*, 1996) bzw. PN3 (Sangameswaran *et al.*, 1996) und SNS2 (Tate *et al.*, 1998) oder NaN (Dib-Hajj *et al.*, 1998) bezeichnet man die beiden identifizierten und klonierten TTXr  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten, die von nozizeptiven Neuronen exprimiert werden (neuere Literatur verwendet die Bezeichnung  $\text{Na}_v1.8$  für SNS/PN3 und  $\text{Na}_v1.9$  für SNS2/NaN). Die Proteinstruktur und Membrantopologie der TTXr Natriumkanäle unterscheidet sich nicht von der beschriebenen Struktur der TTXs Natriumkanäle (s.o.). Heterolog exprimierte SNS/PN3  $\alpha$ -Untereinheiten sind biophysikalisch durch eine hohe Aktivierungsschwelle und eine langsame Inaktivierung gekennzeichnet (Akopian *et al.*, 1996; Sangameswaran *et al.*, 1996). Die heterologe Expression von SNS2 (für NaN sind entsprechende Experimente nicht beschrieben) zeigte, daß die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken dieses Natriumkanals schneller sind, als die entsprechenden Parameter von SNS. Weitere Unterschiede sind eine niedrigere Aktivierungsschwelle und eine deutliche niedrigere  $\text{IC}_{50}$  für die Blockade durch TTX (Tate *et al.*, 1998).

Einen weiteren Typ eines TTXr Natriumstromes beschrieben Cummins *et al.* (1999) nach Experimenten an Neuronen des Spinalganglions von SNS Null-Mäusen. Dieser TTXr Natriumstrom aktivierte bei sehr negativen Membranpotentialen und zeigte eine ultralangsame Inaktivierung, er „persistierte“. Die Zeitkonstante für die Erholung aus dem inaktivierten Zustand war sehr groß, sie wurde mit etwa 16 s angegeben. Diese Charakteristika dürften auch der Grund sein, warum Akopian *et al.* (1999) in ihren Experimenten mit SNS Null-Mäusen unter Verwendung eines anderen Versuchsprotokolls den ultralangsam inaktivierenden TTXr Natriumstrom nicht messen konnten. Die Funktion eines solchen TTXr Natriumstromes könnte in der Modulation von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit des Neurons liegen (Herzog *et al.*, 2001).

Die Zuordnung der in nativen Neuronen gemessenen TTXr Ströme zu einem der klonierten TTXr Natriumkanäle ist nicht einfach, da die in heterologen Expressionssystemen beobachteten Ströme durch die  $\alpha$ -Untereinheiten nicht dem Einfluß von  $\beta$ -Untereinheiten und der posttranslationalen Modifikation im Neuron unterliegen. Den Versuch einer Zuordnung unternahmen Baker & Wood (2001) und schreiben TTX-R1 und TTX-R2 dem SNS/PN3 bzw. *slow* TTXr Natriumkanal zu. Dem von Cummins *et al.* (1999) beschriebenen persistierenden TTXr Strom unterliegt trotz der Unterschied in den biophysikalischen Eigenschaften am ehesten SNS2/NaN (Baker & Wood, 2001) bzw. *fast* TTXr (Scholz *et al.*, 1998a).

Die Funktion von TTXr Natriumkanälen der nozizeptiven Neurone scheint vor allem in einer Beteiligung an der Reiztransduktion am peripheren Ende der Nervenfasern zu liegen (Strassman & Raymond, 1999; Brock *et al.*, 1998). Die Transmission der Information in Form von Aktionspotentialen entlang eines Axons wurde bislang vornehmlich den TTXs Kanälen zugeschrieben. Da es jedoch möglich ist, TTXr Aktionspotentiale von unmyelinisierten Nervenfasern abzuleiten, muß man annehmen, daß TTXr Natriumströme einen wichtigen Beitrag auch zur Aktionspotentialweiterleitung liefern (Quasthoff *et al.*, 1995; Waxman *et al.*, 1999; Grosskreutz *et al.*, 1996). Auch von den Somata primär sensorischer Neurone lassen sich sowohl *in vivo* (Ritter & Mendell, 1992) als auch *in vitro* (Villiere & McLachlan, 1996; Scholz & Vogel, 2000) Aktionspotentiale in Gegenwart hoher TTX-Konzentrationen ableiten.

### 1.3.6 Natriumkanäle in sensorischen Neuronen nach Nervenschädigungen

Die Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle in sensorischen Neuronen ist keinesfalls statisch, sondern sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen ein äußerst dynamischer Prozeß (Tate *et al.*, 1998; Waxman *et al.*, 2000). Untersucht man die Natriumströme sensorischer Neurone von Tieren mit verschiedenen chronischen Nervenschädigungen, so zeigen sich unterschiedliche, z.T. gegensätzliche Effekte.

Nach kompletter Durchtrennung des Axons (Axotomie) beobachtet man zum einen eine Akkumulation von Natriumkanalproteinen im Bereich der Axotomiestelle, die mit einer Übererregbarkeit sensorischer Nervenendigungen in der entsprechenden Region einhergeht (Devor *et al.*, 1993; McCleskey & Gold, 1999). Zum anderen kommt es zu einer qualitativen Veränderung des TTXs Natriumstromes. In der Literatur wird die Reexpression der  $\alpha$ -Untereinheit eines Natriumkanals (Hirntyp III bzw.  $\text{Na}_v1.3$ ) in sensorischen Neuronen nach Axotomie beschrieben, von dem man bislang annahm, daß er nur in der Embryonalphase in Neuronen des Spinalganglions zu finden ist (Cummins & Waxman, 1997; Waxman *et al.*, 1994). Dieser Natriumkanal zeichnet sich durch eine schnelle Erholung aus dem inaktivierten Zustand aus. Dadurch könnte der Kanal zur ektopen Generierung hochfrequenter Aktionspotentiale und zur Entstehung neuropathischer Schmerzen beitragen (Cummins & Waxman, 1997; Waxman *et al.*, 1999; Baker & Wood, 2001). Sowohl für das SNS/PN3 Gen (Dib-Hajj *et al.*, 1996) als auch für das SNS2/NaN Gen (Dib-Hajj *et al.*, 1998) konnte eine verminderte Expression nach Axotomie nachgewiesen werden. Ursache der verminderten Expression könnte eine Abhängigkeit der Genexpression der beiden TTXr Natriumkanäle von den Wachstumsfaktoren NGF (*nerve growth factor*; SNS; (Fjell *et al.*, 1999a; Tanaka *et al.*, 1998) und GDNF (*glial derived neurotrophic factor*; NaN; Fjell *et al.*, 1999b) sein. Geht man

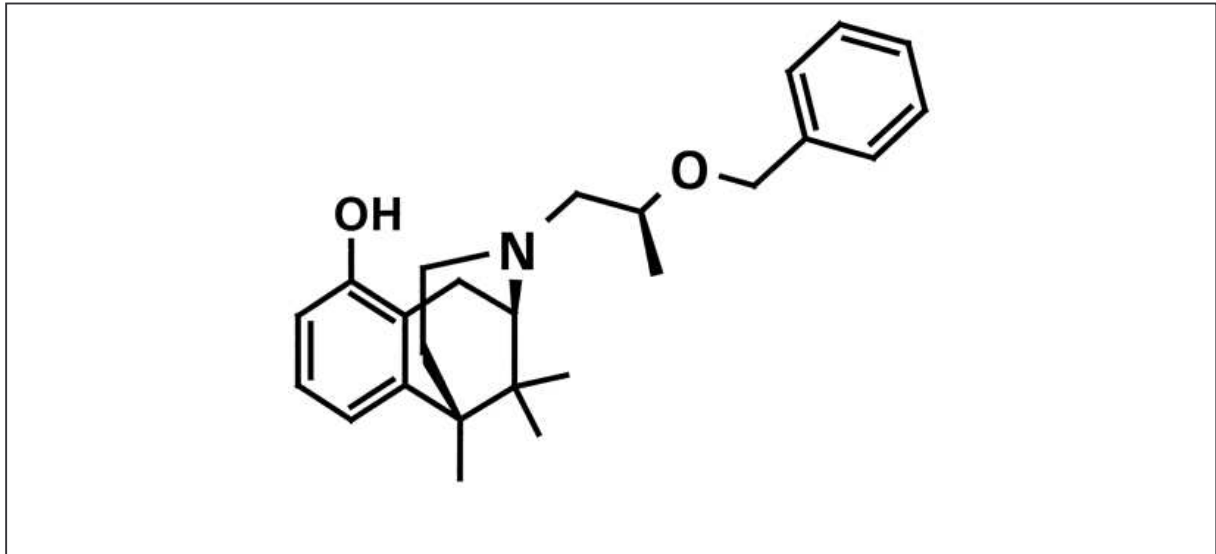


davon aus, daß die Synthese TTXr Natriumkanäle durch in der Peripherie gebildete und im Axon retrograd zum Soma transportierte Wachstumsfaktoren gesteuert wird, erklärt sich die verminderte Bildung dieser Kanäle nach Durchtrennung des Axons (Fjell *et al.*, 1999b; Sleeper *et al.*, 2000; Cummins *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit einer verminderten Genexpression TTXr Natriumkanäle nimmt auch die Dichte des TTXr Natriumstromes in Neuronen des Spinalganglions nach Axotomie ab (Cummins & Waxman, 1997). Eine verminderte Expression von TTXr Natriumkanälen könnte über eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials in Richtung Hyperpolarisation zu einer schnellen Rückkehr inaktivierter TTXs Natriumkanäle in den Ruhezustand beitragen (Waxman *et al.*, 1999).

In Modellen hingegen, die eine chronische Entzündung simulieren, beobachtet man eine verstärkte Expression der mRNA von TTXr Natriumkanälen und einen Anstieg der TTXr Natriumstromdichte (Tanaka *et al.*, 1998; Tate *et al.*, 1998; Waxman *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus dieser Hochregulierung ist nicht bekannt; als Ursache vorstellbar ist eine verstärkte Produktion von Wachstumsfaktoren (z.B. NGF) in entzündetem Gewebe. Der retrograde axonale Transport der Wachstumsfaktoren in das Soma der Neurone des Spinalganglions würde dort die Natriumkanalsynthese stimulieren. (Waxman *et al.*, 1999; Gould *et al.*, 2000). Neben der Regulation spannungsabhängiger Natriumkanäle in chronisch geschädigtem Gewebe werden TTXr Natriumströme auch während akuter Entzündungen moduliert. Die in entzündeten Geweben freigesetzten Mediatoren Prostaglandin E<sub>2</sub>, Serotonin und Adenosin führen über eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Kanalproteins zu einer Zunahme der Amplitude TTXr Natriumströme in sensorischen Neuronen (Gold *et al.*, 1996; England *et al.*, 1996).

### **1.3.7 Der Natriumkanalblocker Crobenetin (BIII 890 CL)**

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanz Crobenetin (früher: BIII 890 CL) handelt es sich um ein von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG synthetisiertes Benzomorphanderivat, das spannungsabhängige TTXs Natriumkanäle blockiert. Die Substanz wurde mit dem Ziel entwickelt, durch eine Blockade von spannungsabhängigen TTXs Natriumkanälen in der Umgebung ischämisch geschädigter Hirnareale neuroprotektiv zu wirken. In der Umgebung cerebraler Insulte kommt es nicht nur durch die mangelnde Versorgung mit oxygeniertem Blut und damit hypoxischer Schädigung von Zellen zum Untergang von Neuronen, sondern eine wichtige Rolle spielt auch die Ischämie-bedingte Depolarisation von Nervenzellen.



**Abb. 6 Strukturformel von Crobenetin**

Durch eine Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle verspricht man sich daher eine protektive Wirkung auf Zellen in der Umgebung cerebraler Ischämieherde (Taylor & Meldrum, 1995). Um vorwiegend in Bereichen erhöhter Natriumkanalaktivität und Hirnarealen mit einer hohen Anzahl depolarisierter Neurone zu wirken, ist eine benutzungsabhängige Blockade von Natriumkanälen und eine bevorzugte Bindung an den offenen und inaktivierten Kanalzustand, wie es von einigen Lokalanästhetika bekannt ist, wünschenswert. In der Tat besitzt Crobenetin einige typische Eigenschaften von Lokalanästhetika. So konnte gezeigt werden, daß durch Crobenetin das Batrachotoxin aus seiner Bindungsstelle an der Neurotoxin–Rezeptorstelle 2 des Typ IIA Natriumkanals verdrängt wird. Hingegen hat Crobenetin keinen Einfluß auf die Bindung von Tetrodotoxin. Verdrängungsexperimente mit radioaktiv markierten Liganden anderer Bindungsstellen im peripheren und Zentralnervensystem, sowie Studien an mutierten Natriumkanälen lassen darauf schließen, daß die Substanz spezifisch an die Lokalanästhetikabindungsstelle spannungsabhängiger Natriumkanäle bindet. Elektrophysiologische Untersuchungen an heterolog exprimierten Typ IIA Natriumkanälen zeigten, daß Crobenetin bevorzugt an Kanäle im inaktivierten Zustand bindet. Die halbmaximale inhibitorische Wirkungskonzentration ( $IC_{50}$ ) konnte für inaktivierte Natriumkanäle mit 77 nM bestimmt werden, wohingegen die  $IC_{50}$  für ruhende Natriumkanäle bei 18  $\mu$ M lag (Carter *et al.*, 2000).

In vivo Experimente an Mäusen und Ratten verifizierten den neuroprotektiven Effekt von Crobenetin. Nach Verschluß der A. cerebri media konnte durch nachfolgende Gabe der

Substanz die Größe des Infarktareals signifikant gesenkt werden, ohne daß nennenswerte Nebenwirkungen beobachtet wurden (Carter *et al.*, 2000).

#### 1.4 Physikalische Grundlagen

Das Ohm'sche Gesetz, daß einen fließenden Strom in Beziehung zu Potentialdifferenz (Spannung) und Widerstand bzw. Leitfähigkeit setzt, ist für die Untersuchung von Ionenkanälen von zentraler Bedeutung.

Als Strom ist der Nettofluß geladener Teilchen definiert, der nach der Gleichung

$$I = g E \quad (3)$$

durch die Leitfähigkeit  $g$  und die Potentialdifferenz  $E$  bestimmt wird. Ersetzt man die Leitfähigkeit durch ihren Kehrwert, so erhält man nach der Gleichung

$$I = E / R \quad (4)$$

die Beziehung von fließendem Strom  $I$ , Potentialdifferenz  $E$  und Widerstand  $R$ .

Auf eine Zelle übertragen bedeutet das Ohm'sche Gesetz, daß Ionenkanäle elementare Leiter mit einer bestimmten Leitfähigkeit sind, die eine isolierende Doppellipidmembran durchspannen, zwischen deren Innen- und Außenseite eine Potentialdifferenz besteht. Für Ionenkanäle in biologischen Membranen läßt sich das Ohm'sche Gesetz in der oben gezeigten Form aber nicht ohne weiteres anwenden, da nach Gleichung (4) eigentlich bei einer Potentialdifferenz von 0 kein Strom fließen dürfte. Betrachtet man aber eine Zelle, so ist dieses doch der Fall, da sich die Konzentrationen der verschiedenen Ionen intra- und extrazellulär unterscheiden und die Leitfähigkeit der Membran in Ruhe für Kaliumionen am größten ist.

Modifiziert man die Gleichung des Ohm'schen Gesetzes, indem man die sog. elektromotorische Kraft (EMK), die Differenz zwischen herrschendem Membranpotential und das Gleichgewichtspotential eines Ions, miteinbezieht, so läßt sich nach der Gleichung

$$I_{ion} = g_{ion} (E - E_{ion}) \quad (5)$$

der Strom einzelner Ionen über eine biologische Membran berechnen. Als EMK wird die Differenz aus Membranpotential und Gleichgewichtspotential des Ions bezeichnet.

Betrachtet man nun die Strom–Spannungs–Beziehung von Ionenkanälen, so können sich mehrere Kurvenformen ergeben. Verläuft diese linear, so wird der betreffende Ionenkanal nicht durch unterschiedliche Potentialdifferenzen in seinen *gating*-Charakteristika beeinflusst, er ist demzufolge nicht spannungsabhängig. Verläuft die Strom–Spannungs–Kurve hingegen nicht linear, sondern ändert sich die Leitfähigkeit mit dem Potential, so spricht man von einer Rektifizierung (Gleichrichtung), eine Eigenschaft, die typisch für spannungsabhängige Ionenkanäle ist. Es werden einwärts rektifizierende (einwärtsgleichrichtende) von auswärts rektifizierenden (auswärtsgleichrichtende) Strömen unterschieden. Einwärtsrektifizierung bezeichnet die Zunahme der Kanalleitfähigkeit bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen und ist typisch für einige Kaliumkanäle. Auswärtsrektifizierung hingegen beschreibt eine Leitfähigkeitszunahme bei Depolarisation.

Die Zellmembran ist nicht nur eine Isolationsschicht, sondern sie stellt auch einen Kondensator dar.

$$C = Q / E \quad (6)$$

Gleichung (6) beschreibt die Beziehung von Kapazität der Membran  $C$ , der Potentialdifferenz  $E$  und der Ladung  $Q$ . Außerdem ist die Kapazität von der Dielektrizitätskonstante des Materials und der geometrischen Form des Kondensators, also der Zellmembran, abhängig, was die Gleichung

$$C = \varepsilon \varepsilon_0 A / d \quad (7)$$

zeigt.  $A$  ist die Fläche des Kondensators,  $d$  dessen Dicke,  $\varepsilon$  ist die Dielektrizitätskonstante der Doppellipidschicht,  $\varepsilon_0$  ist eine Naturkonstante. Setzt man nun in Gleichung (7) die entsprechenden Werte für eine Zellmembran ein, so ergibt sich vor allem aufgrund der geringen Dicke eine hohe Kapazität. Appliziert man einen Stromimpuls, so vergeht bis zur Spannungsantwort der Zelle Zeit, in welcher die Zellmembran umgeladen wird. Dieses geschieht mit einer charakteristischen Membranzeitkonstanten, die abhängig von Leitfähigkeit und Kapazität der Membran ist. Nimmt man für die Kapazität biologischer Membranen einen Wert von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  an, erlaubt die Membranzeitkonstante Rückschlüsse auf die momentane Leitfähigkeit einer Zellmembran.

Die physikalische Grundlage der Potentialdifferenz über eine Zellmembran ist die Bewegung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld über eine semipermeable Membran.

Die Boltzmann-Gleichung

$$p_2/p_1 = e^{(-u_2 - u_1/kT)} \quad (8)$$

beschreibt die Gleichgewichtsverteilung von Partikeln in Kraftfeldern;  $p_1$  und  $p_2$  sind die unterschiedlichen Zustände des Partikels,  $u_2 - u_1$  stellt die Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen dar,  $k$  ist die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur.

Durch Umformen und Logarithmieren erhält man aus der Boltzmann-Gleichung die Nernst-Gleichung,

$$E_{Kation} = RT/zF \ln (Kation_{au\ss en})/(Kation_{innen}) \quad (9)$$

$$E_{Anion} = RT/zF \ln (Anion_{innen})/(Anion_{au\ss en}) \quad (10)$$

mit welcher die Gleichgewichtspotentiale von Ionen berechnet werden kann.  $E$  ist das Gleichgewichtspotential,  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $z$  die Wertigkeit des Ions,  $F$  die Faraday-Konstante. Au\ss erdem gehen die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten einer semipermeablen Membran, also die Konzentrationen auf der intra- und extrazellul\ss ren Seite der Zellmembran, in die Gleichung ein.

### 1.4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten mit dem Capsaicinrezeptor und dem TTX-resistenten Natriumkanal zwei typische Ionenkan\ss le nozizeptiver Neurone des Spinalganglions untersucht werden. Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, Capsaicinrezeptoren von Neuronen des Spinalganglions in einer D\ss nnschnittpr\ss aration zu untersuchen und zu charakterisieren. Bislang liegen ausschlie\ss lich Arbeiten vor, die die Eigenschaften von Capsaicinrezeptoren in dissoziierten bzw. kultivierten sensorischen Neuronen oder aber heterolog exprimierte Vanilloidrezeptoren beschreiben. Da der Capsaicin- bzw. Vanilloidrezeptor wesentlich an der Transduktion von Hitze- und Entz\ss ndungsschmerz beteiligt sein soll, war es von besonderem Interesse, diesen Ionenkanal auf zellul\ss rer Ebene mit Hilfe der *patch-clamp* Technik in der physiologischeren D\ss nnschnittpr\ss aration ohne den Einflu\ss von Proteasen und Kulturmedien zu studieren. Zun\ss chst sollten in Ganzzelleableitungen von sensorischen Neuronen CAP-aktivierte Str\ss me identifiziert und ihre Eigenschaften untersucht werden. Ebenfalls von Interesse war der Einflu\ss des Capsaicinrezeptors auf das Ruhemembranpotential und Aktionspotentiale der untersuchten Zellen. Um die biophysikalischen Charakteristika des Capsaicinrezeptors in der D\ss nnschnittpr\ss aration zu untersuchen, sollten Einzelkanalexperimente Aufschlu\ss \ss ber Offenwahrscheinlichkeit, Leitf\ss higkeit und Beeinflussung dieser Parameter durch das Membranpotential geben. Der Identifikation des Capsaicinrezeptors auf Einzelkanalebene sollte die Verwendung des Antagonisten Capsazepin

dienen. Da bekannt war, daß ein Teil der Neurone des Spinalganglions mit kleinem Durchmesser den großen calciumabhängigen Kaliumkanal BK<sub>Ca</sub> exprimiert (Scholz *et al.*, 1998b) und die Aktivierung des Capsaicinrezeptors zum Einstrom von Calciumionen in Neurone führt, war außerdem von Interesse, ob der Capsaicinrezeptor auf den BK<sub>Ca</sub> exprimierenden Neuronen des Spinalganglions vorkommt. Durch den Capsaicinrezeptor vermittelten Calciumeinstrom und anschließende Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> könnte es zur funktionellen Interaktion beider Ionenkanäle kommen, welche die Erregbarkeit der Neurone beeinflusst.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet Untersuchungen TTX-resistenter Natriumkanäle, die ebenfalls an sensorischen Neuronen in der Dünnschnittpräparation von Spinalganglien junger Ratten durchgeführt wurde. Dabei ging es um die Frage, inwiefern die als Blocker von TTX-sensitiven Natriumkanälen bekannte Substanz Crobenetin (früher BIII 890 CL) der Firma Boehringer Ingelheim in der Lage ist, auch TTX-resistente Natriumkanäle sensorischer Neurone zu inhibieren. Die ursprünglich als Neuroprotektivum zur Vermeidung cerebraler Schäden nach apoplektischen Insulten synthetisierte Substanz könnte durch eine potente Blockade TTXr Natriumkanäle auch als Analgetikum zur Therapie chronischer Schmerzen, bei deren Entstehung diese Sonderform spannungsabhängiger Natriumkanäle wesentlich beteiligt sein soll, eingesetzt werden. Besonderes Interesse bei der Untersuchung des Einflusses von Crobenetin auf TTXr Natriumströme galt der möglichen benutzungsabhängigen Blockade dieser Ströme. Ein hoher Grad an Benutzungsabhängigkeit würde ruhende spannungsabhängige Natriumkanäle nur minimal beeinflussen und so die möglichen Nebenwirkungen reduzieren.

Um die funktionelle Auswirkung der Natriumkanalblockade zu demonstrieren, sollte außerdem der Einfluß von Crobenetin auf TTXr Aktionspotentiale untersucht werden. Es sollte evaluiert werden, ob eine potente Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle durch Crobenetin tatsächlich mit einer verminderten Erregbarkeit sensorischer Neurone einhergeht.

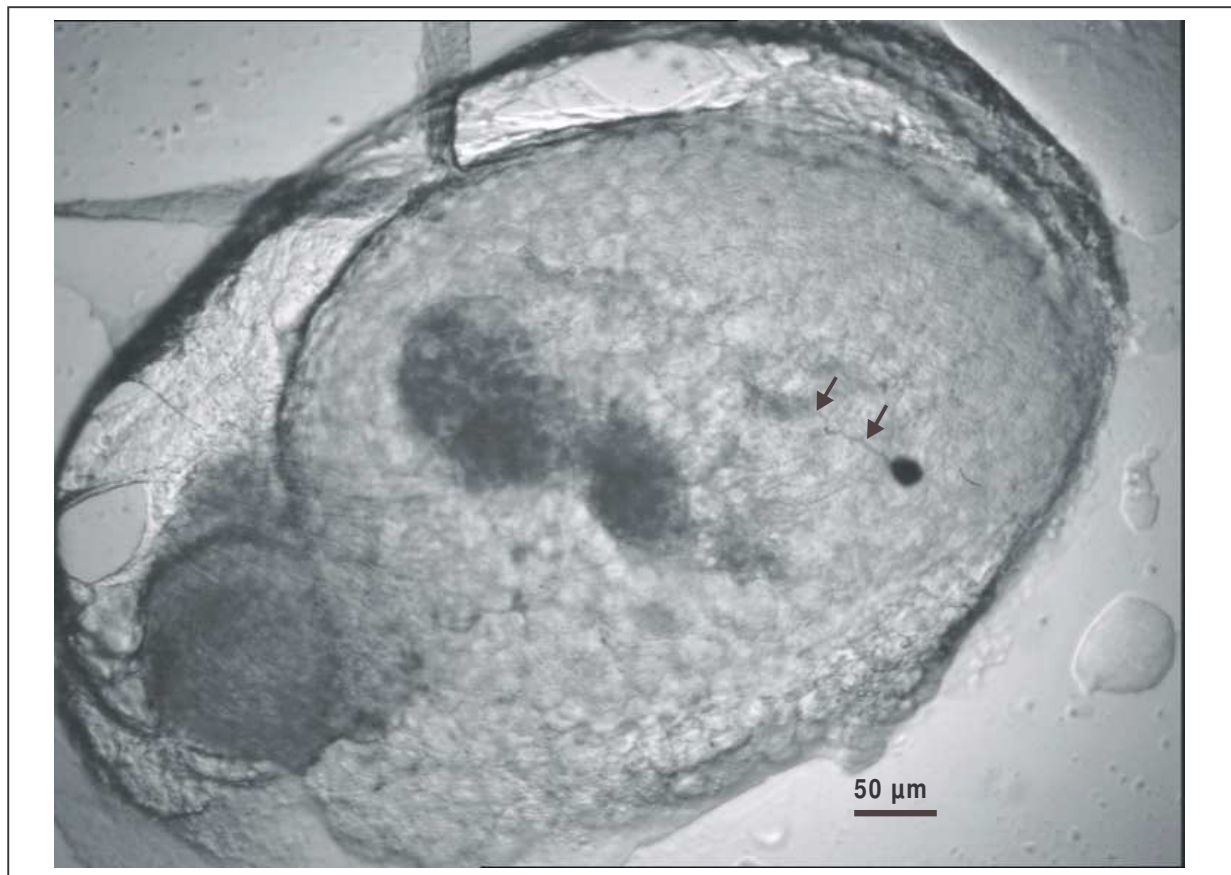
## 2 Material und Methoden

### 2.1.1 Präparation der Ganglienschnitte

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Präparat wurde modifiziert wie von Safronov *et al.* (1996) beschrieben, angefertigt. Die 3–10 Tage alte Ratte (Wistar, hauseigene Zucht) wurde dekapitiert und die Präparation anschließend in eisgekühlter Standard-Bicarbonat-Ringerlösung unter ständiger Begasung mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) fortgesetzt. Durch die Kälte soll der Stoffwechsel der Neurone auf ein Minimum reduziert werden, um metabolische Schädigungen während der Präparation vorzubeugen. Die permanente Zufuhr von Carbogengas dient der Aufrechterhaltung des pH Wertes in der Standard-Bicarbonat-Ringerlösung. Nach Entfernung der Haut und des subkutanen Bindegewebes von dorsal wurden die Rippen im Bereich des größten Thoraxdurchmessers in der Frontalebene durchtrennt, weiter kaudal geschah Gleiches mit der muskulären Bauchwand. Nach transversaler Durchtrennung der Wirbelsäule im unteren Sakralbereich konnte der thorakale und lumbale Abschnitt der Wirbelsäule mit dem dorsalen Teil des knöchernen Thorax vom Rest des Tieres getrennt werden. Im nächsten Schritt wurde das Präparat mit vier Präpariernadeln auf einem Styroporblöckchen befestigt und der Wirbelkanal durch Entfernung der Wirbelkörper von ventral her mit einer Iridektomieschere (Storz, Heidelberg, Deutschland) eröffnet. Man blickte nun auf das Rückenmark, die Vorder- und Hinterwurzeln der Spinalnerven sowie die Hinterwurzelganglien mit abgehenden Spinalnerven. Die geringe Größe der anatomischen Strukturen machte für das weitere Vorgehen die Verwendung einer Präparierlupe (Wild M3, Heerbrugg, Deutschland, 6,4 - 40 fache Vergrößerung) erforderlich. Die Ganglien liegen im Bereich der Foramina intervertebralia und wurden hier unter Vermeiden eines direkten Kontaktes mittels zweier Pinzetten, mit denen am Spinalnerv und an der Hinterwurzel gefaßt wurde, vorsichtig herausgelöst. Um Schnittpräparate in ausreichender Anzahl herstellen zu können, wurden 2 – 4 Ganglien verwendet; pro Ganglion waren unter optimalen Bedingungen und abhängig von der Schnittdicke etwa 5 Schnitte zu erhalten. Die herausgelösten Ganglien mit anhängender Hinterwurzel und Spinalnerv wurden nun behutsam von umgebendem Bindegewebe, das den Schneidevorgang stören würde, befreit. Für das folgende Schneiden der Ganglien, das sogenannte *slicing*, mußte das Gewebe in Agar (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) eingebettet werden. Es wurde eine 2%ige (w/v) Mischung aus Agar und Standard-Bicarbonat-Ringerlösung hergestellt, diese wurde unter ständigem Rühren erhitzt und zweimal zum Sieden gebracht. Anschließend wurde die Lösung unter weiterem Rühren und Carbogenbegasung abgekühlt,

bis eine Temperatur von 39°C erreicht war. Mittels einer Heizplatte, die mit einem Temperaturkontrollsystem (Variomag, Daytona Beach, FL, USA) gekoppelt war, konnte die gewünschte Temperatur während des Präparationsvorganges konstant gehalten werden. Die Ganglien wurden nach dem Entfernen des Bindegewebes mit einer Pinzette am Spinalnerven oder der Hinterwurzel gefaßt und rasch in die beschriebene Agarlösung gebracht. Bei einer Temperatur von 39°C hatte das Agar eine geleeartige Konsistenz und die Ganglien sanken nicht bis auf den Boden des Becherglases. Um nun das Erkalten und Härten des Agars zu beschleunigen, wurde das Becherglas mit den eingebetteten Ganglien in ein Gefäß mit zum Teil gefrorener Natriumchloridlösung (23%) gebracht. Nach dem Abkühlen war das Agar fest und es konnten mit einer Skalpellklinge kleine, quadratische Blöcke, welche die Ganglien enthielten, herausgeschnitten werden. Diese Blöcke wurden wieder in eisgekühlter Standard-Bicarbonat-Ringerlösung unter ständiger Begasung mit Carbogengas aufbewahrt und weiterbearbeitet. Aus den würfelförmigen Blöcken wurden kleine Pyramiden geschnitten; zum einen ergab sich während des Schneidevorganges eine höhere Stabilität, zum anderen gelang es so, die Fläche des Schnittes zu reduzieren. Eine kleine Schnittfläche erwies sich beim Transport der Schnitte mittels einer Pipette als vorteilhaft. Die Agarpyramiden wurden nun zum Herstellen der Schnitte aus der Ringerlösung genommen und mit Cyanacrylat-Kleber (Sekunden-Alleskleber, UHU GmbH, Bühl, Deutschland) auf die saubere Oberfläche eines Glas- oder Stahlblöckchens geklebt. Dazu war es wichtig, vor Auftragen des Klebers die Unterseite der Agarpyramiden kurz mit einem Papiertuch zu trocknen, damit ein stabiler Kontakt zwischen Glas und Agar entstand. Der Block mit den aufgeklebten Pyramiden wurde in einer dafür vorgesehenen Schale befestigt, diese wurde dann mit der erwähnten eiskalten Ringerlösung gefüllt, die während des folgenden Schneidevorganges permanent mit Carbogengas begast wurde. Das eigentliche Schneiden der Ganglien wurde mit einem Vibratom (FTB 1.4, Fa. Meier, Bensheim, Deutschland) vorgenommen. Das Gefäß mit den Ganglien wurde mittels eines Elektromagneten auf dem Vibratom fixiert und Amplitude und Vorschubgeschwindigkeit (ca. 3 mm/min) wurden eingestellt. Die Höhe der Vibratomklinge (Martox-Inox Nr.189, Fa. Meier, Bensheim, Deutschland) konnte manuell gewählt werden, vor jedem Schneidegang wurde das Messer um die gewünschte Schnittdicke abgesenkt. In der vorliegenden Arbeit wurden anfangs 150 µm, später 100 µm Dicke gewählt. Dünnere Schnitte haben den Vorteil, daß aus einem Ganglion mehr Schnitte zu erhalten sind, außerdem sind die 100 µm dünnen Schnitte für immunhistochemische Verfahren besser geeignet.





**Abb.7 Schnitt eines Spinalganglions mit einem Biocytin-gefärbten Neuron**

Die Zelle des 150 μm dünnen Schnittes wurde über die *patch-clamp* Pipette mit Biocytin gefüllt, zu erkennen ist auch das ebenfalls gefärbte Axon (Pfeile).

Die fertigen Schnitte wurden mit der weitleumigen Seite einer Pasteur-Pipette aus der Ringerlösung der o.g. Schale entnommen und in ein Becherglas, welches ebenfalls mit carbogenbegaster Ringerlösung gefüllt war, gegeben. Hierbei war es wichtig, darauf zu achten, daß die Oberfläche der Schnitte nicht mit Luft in Berührung kam, dieses würde die Plasmamembranen oberflächlicher Zellen stark schädigen. Vor der Verwendung für *patch-clamp* Experimente mussten die Schnitte etwa 30 min bei einer Temperatur von 32°C ruhen. Hierfür wurde das Becherglas mit den Präparaten in einem Wasserbad (Colora Kryo-Thermostat WK5, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch, Deutschland) bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Um die Ganglienschnitte elektrophysiologisch untersuchen zu können, wurden sie mit der schon erwähnten Pasteur-Pipette in die mit Ringerlösung perfundierte Experimentierkammer des Versuchstandes transportiert.

### 2.1.2 Lösungen

Alle folgenden Konzentrationen sind in mM angegeben.

#### Außenlösungen

##### (1) Standard-Bicarbonat-Ringerlösung:

NaCl 115, KCl 5.6, CaCl<sub>2</sub> 2.2, MgCl<sub>2</sub> 1, Glucose 11, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 25.

Die verwendete Badlösung hatte eine Natriumendkonzentration von 141 mM.

Der pH der Lösung wurde durch Begasung mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) auf Werte zwischen 7.2 und 7.3 eingestellt, die Begasung wurde sowohl während der Präparation der Spinalganglien als auch während der *patch-clamp* Experimente kontinuierlich weitergeführt und so der pH konstant gehalten.

##### (2) Calciumfreie Standard-Bicarbonat-Ringerlösung:

NaCl 115, KCl 5.6, MgCl<sub>2</sub> 5, Glucose 11, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 25.

Calciumpuffer wurden nicht hinzugefügt, d.h. die verwendete Lösung war nur nominell calciumfrei, Spuren von Calciumionen können enthalten sein.

##### (3) Pufferlösungen:

NaCl 136.4, KCl 5.6, MgCl<sub>2</sub> 5, Glucose 11.

Als Puffer wurden, je nach gewünschtem pH, HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure], pKs 7.5) und / oder MES (Morpholin-Ethansulfonsäure, pKs 6.1) verwendet.

pH 7.4: HEPES 10

pH 6.0: HEPES 5, MES 5

pH 5.5: MES 10

Der jeweilige pH wurde durch hinzufügen von NaOH eingestellt, die Natriumendkonzentration betrug 141 mM.

## Innenlösungen

### (1) High-Ki EGTA:

NaCl 5, KCl 144.4, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA (Ethylenglycol-bis[β-Aminoethyl Ether]N,N,N',N',-Tetraessigsäure) 3, HEPES 10.

Zur Adjustierung des pH auf 7.3 wurde KOH verwendet, die verwendete Lösung enthielt 155 mM Kalium.

### (2) CsCl EGTA:

NaCl 5.8, CsCl 145, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 3, HEPES 10.

Der pH wurde mit NaOH auf 7.3 eingestellt, die Natriumendkonzentration betrug 15 mM.

### (3) CsF:

NaCl 10, CsCl 40, CsF 67.5, HEPES 10, Na<sub>2</sub> ATP 2,

Der pH wurde mit CsOH auf 7.2 eingestellt, die Cäsiumendkonzentration betrug 135 mM

### (4) CsCl EGTA mit ATP:

NaCl 5.8, CsCl 145, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 3, HEPES 10, ATP 2

Der pH wurde mit NaOH auf 7.3 eingestellt, die Natriumendkonzentration betrug 15 mM.

Die angegebenen Außenlösungen wurden in der *whole-cell* und der *outside-out* Konfiguration als Badlösungen, die Innenlösungen als Pipettenlösungen verwendet. Für Experimente in der *inside-out* Konfiguration diente die pH 7.4-Pufferlösung als Pipettenlösung, als Badlösung wurde die CsCl EGTA-Lösung verwendet. Die unten angegebenen Toxine wurden der verwendeten Badlösung in der gewünschten Verdünnung direkt aus der Stammlösung zupipettiert.

### **2.1.3 Toxine**

Die verwendeten Toxine wurden in den angegebenen Lösungsmitteln aufgelöst und als Stammlösungen den jeweiligen Badlösungen zugesetzt.

### **Capsaicin**

Capsaicin, 8-Methyl-*N*-vanillyl-6-noneamid, (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) ist Inhaltsstoff von Pfeffern des Genus *Capsicum* und aktiviert mit einer halbmaximalen Wirkungskonzentration von 0.7  $\mu\text{M}$  den klonierten Vanilloidrezeptor Subtyp1 (VR1; Caterina *et al.*, 1997). Die  $\text{EC}_{50}$  für die Aktivierung nativer Capsaicinrezeptoren beträgt 1.1  $\mu\text{M}$  (Oh *et al.*, 1996). Capsaicin ist außerdem als Blocker einiger spannungsabhängiger Kaliumkanäle aus der Gruppe der *Delayed rectifier* bekannt (Akins & McCleskey, 1993). Für die vorliegende Arbeit wurde die Substanz mit einem Molekulargewicht von 305.4 in Ethanol (p.a.) gelöst und als Stammlösung in einer Konzentration von  $10^{-2}$  M verwendet.

### **Resiniferatoxin**

Resiniferatoxin (RTX, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland), Inhaltsstoff von *Euphorbia poissonii* ist ein ultrapotenter Agonist des Capsaicinrezeptors, den es mit einer  $\text{EC}_{50}$  von 40 nM aktiviert und somit um den Faktor 20 potenter ist als Capsaicin (Caterina *et al.*, 1997). RTX hat ein Molekulargewicht von 628.7, wurde in Ethanol (p.a.) gelöst und als Stammlösung in einer Konzentration von  $10^{-2}$  M verwendet.

### **Capsazepin**

Capsazepin (CPZ, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) ist der bisher einzige, kommerziell erhältliche kompetitive Antagonist des Capsaicinrezeptors. Im Gegensatz zu den Agonisten Capsaicin und RTX ist es keine natürlich vorkommende Substanz, sondern wurde im Rahmen eines Forschungsprogramms des Novartis Institute for Medical Research in London entwickelt (Bevan *et al.*, 1992). Allerdings hemmt CPZ nicht ausschließlich den Capsaicinrezeptor, sondern blockiert in den notwendigen mikromolaren Konzentrationen auch spannungsabhängige Calciumkanäle (Docherty *et al.*, 1997) und nikotinische Acetylcholinrezeptoren (Liu & Simon, 1997). Die Existenz CPZ–unempfindlicher Vanilloidrezeptoren beschrieben Liu *et al.* (1998) für sensorische Neurone des Trigeminalganglions. Aufgelöst wurde CPZ, das ein Molekulargewicht von 376.9 hat, in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von  $10^{-2}$  M.

### **Tetrodotoxin**

Tetrodotoxin (TTX) ist das Gift des Kugelfisches (*Tetraodontidae*) und kommt in dessen Eingeweiden vor, wo es allerdings nicht von Zellen des Fisches selber sondern von

aufgenommenen Mikroorganismen gebildet wurde. Es blockiert selektiv und reversibel spannungsabhängige Natriumkanäle und ist daher ein wichtiges Hilfsmittel bei elektrophysiologischen Untersuchungen (Narahashi *et al.*, 1964; Hille, 2001). TTX-sensitive Natriumkanäle haben eine  $IC_{50}$  im einstellig nanomolaren Bereich während die TTX-resistenten Natriumkanäle mit einer  $IC_{50}$  im zweistellig mikromolaren Bereich nicht inhibiert werden (Kostyuk *et al.*, 1981). Verwendet wurde TTX (Latoxan, Rosans, Frankreich) einer 0.03 mM citrathaltigen Stammlösung.

### **Crobenetin**

Das von Boehringer Ingelheim Pharma KG (Ingelheim, Deutschland) synthetisierte Benzomorphanderivat Crobenetin ( $2R$ -[ $2\alpha,3(S^*),6\alpha$ ]-1,2,3,4,5,6-hexahydro-6,11,11-trimethyl-3-[2-(phenyl-methoxy)propyl]-2,6-methano-3-benzazocin-10-ol hydrochlorid), ein Natriumkanalblocker, wurde zu einer 5 mM Stammlösung in DMSO aufgelöst und entsprechend den angegebenen Konzentrationen in der Badlösung verdünnt. Da Crobenetin schwer löslich ist, wurde die Lösung aller Partikel visuell unter der Präparierlupe (s. Abschnitt 2.1.1; 6.4 fache Vergrößerung) kontrolliert. Wegen der chemischen Instabilität in Lösung wurde Crobenetin an jedem Experimentiertag neu aufgelöst und verwendet.

#### **2.1.4 Die *patch-clamp* Technik**

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die *patch-clamp* Technik (Hamill *et al.*, 1981), die erstmals von Neher & Sakmann (1976) beschrieben wurde. Die *patch-clamp* Technik ermöglicht es, kleine Membranbezirke elektrisch zu isolieren und Ströme, die im Bereich dieses Fleckens (*patch*) durch einzelne Ionenkanäle fließen, zu messen. Die Isolation der Membranflecken ist in unterschiedlichen Konfigurationen möglich (Abb.10). Weiterhin ist es möglich, in der sog. *whole-cell* Konfiguration (s. unten, Abb.10), die Membran der gesamten Zelle elektrisch zu kontrollieren und Ströme bzw. Potentialveränderungen der gesamten Zelle zu beobachten.

Um den Ionenfluß durch einen einzigen Ionenkanal beobachten zu können, ist aufgrund der sehr geringen Größe der Ströme (im pA-Bereich) die Verstärkung des Meßsignals notwendig. Mit der Etablierung eines sogenannten *giga-seal* ist es möglich, einen Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran in der Größenordnung mehrerer Gigaohm ( $G\Omega$ ) zu erreichen. Wichtige Vorteile eines *giga-seal* sind die Reduktion störender elektrischer Signale (s. Abschnitt 2.1.5), die Möglichkeit, das Potential eines Membranfleckes oder einer ganzen Zelle kontrollieren zu können, ohne Mikroelektroden einzusetzen; außerdem ist ein *giga-seal*

mechanisch relativ stabil, was durch einfaches Zurückziehen der Pipette von der Zelle die Bildung zellfreier Membranflecken erlaubt. Grundsätzlich ist die *patch-clamp* Technik an allen Zellen anwendbar. Entscheidend ist der freie Zugriff auf die Zelloberfläche mit der Pipettenspitze.

Die *patch-clamp* Technik erlaubt die direkte Messung von zwei elektrischen Parametern einer Zelle. In der als Spannungsklemme (*voltage-clamp*) bezeichneten Versuchsanordnung wird der über die Zellmembran fließende Strom und in der sogenannten Stromklemme (*current-clamp*) die bestehende transmembranäre Potentialdifferenz gemessen.

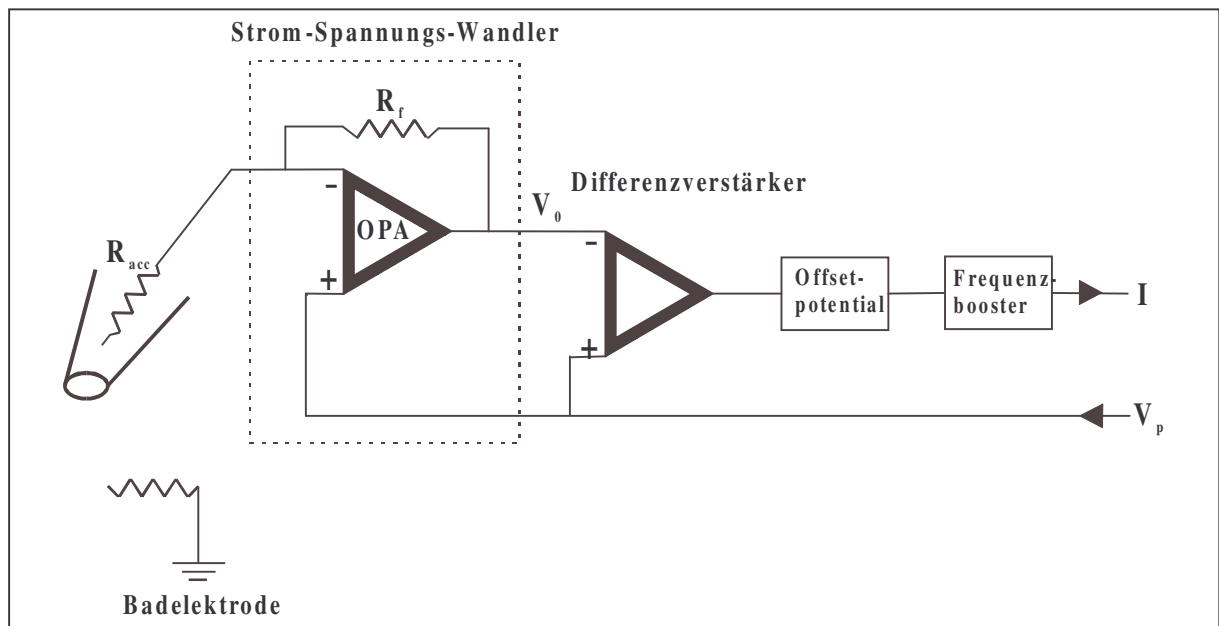
Zum Verständnis der *voltage-clamp* Anordnung kann man die Zellmembran als ein einfaches R-C Glied eines elektrischen Schaltkreises betrachten. Die Doppellipidmembran ist hierbei der Kondensator, der Ionenkanal ein Widerstand. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die über einer Zellmembran anliegende Spannung konstant gehalten. Dieses wird dadurch möglich, daß die vorgegebene Kommandospannung mit der tatsächlich über eine Elektrode gemessenen Spannung verglichen wird. Nun hängt die wirkliche Potentialdifferenz über eine porenhaltige Membran idealerweise im Wesentlichen vom Ionenfluß durch eben diese Poren ab. Fließt ein Strom  $I$  über den Widerstand  $R$ , die Pore, so ändert sich nach dem Ohmschen Gesetz die Spannung  $U$ . Um diese konstant zu halten, muß ein dem natürlicherweise fließenden Strom genau entgegengesetzter, gleichgroßer Strom in die Zelle injiziert werden. Dieser wird in der *voltage-clamp* Anordnung gemessen und entspricht dem Ionenfluß durch die Membranporen, Membrantransporter, aber auch dem sogenannten Leckstrom, der durch Undichtigkeiten des *giga-seal* fließt.

Ein Problem der *patch-clamp* Technik ist die Messung des Membranpotentials und die gleichzeitige Injektion des zum Halten der Kommandospannung nötigen Kompensationsstromes über nur eine Elektrode. Hierzu wird der Strom-Spannungs-Wandler benötigt, dessen wichtigsten Bauteile ein Operationsverstärker (OPA = *operational amplifier*) und ein Rückkopplungswiderstand  $R_f$  bzw. ein Rückkopplungskondensator  $C_f$  sind (Abb.8, Abb.9). Für Ganzzelleableitungen hat sich die Verwendung des Rückkopplungswiderstandes bewährt. Für Einzelkanalmessungen ist die Verwendung des Rückkopplungskondensators vorteilhaft, da dieser eine höhere Linearität aufweist und außerdem rauschärmer ist. Der hier verwendete OPA ist sowohl mit einem Rückkopplungswiderstand als auch mit einem Rückkopplungskondensator ausgestattet.

Der OPA hat zwei Eingänge mit sehr hohen Eingangswiderständen, über welche die Spannungen der Pipette (entspricht dem Potential der Zellmembran) und die Kommandospannung gemessen werden. Der Ausgang des OPA liefert eine stark verstärkte,

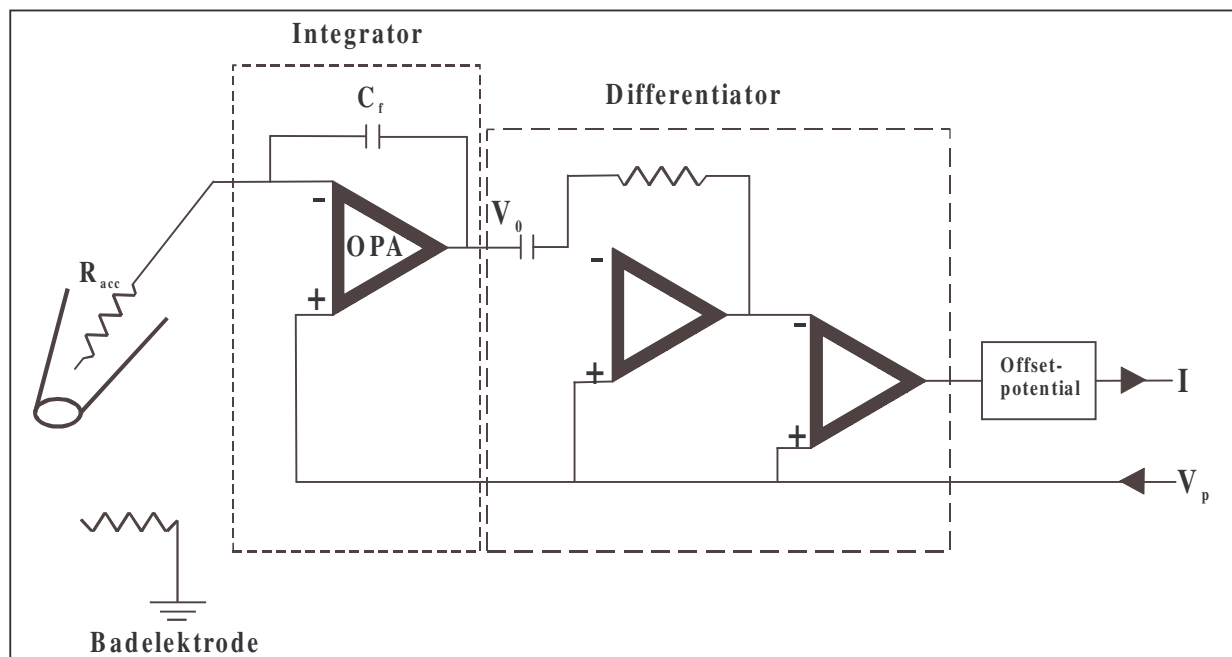
der Differenz beider Eingangsspannungen proportionale Spannung. Aufgrund dieser Schaltung muß nun nach dem Ohmschen Gesetz immer dann ein Strom durch  $R_f$  fließen bzw.  $C_f$  aufgeladen werden, wenn es zu einer Abweichung zwischen Pipetten- und Kommandospannung kommt. Durch den sehr hohen Eingangswiderstand des OPA kann der Strom aber nur in die Pipette fließen und wird dieses solange tun, bis der Unterschied zwischen Soll- und Ist-Spannung ausgeglichen ist, d.h. bis die Differenz zwischen den beiden Eingängen des OPA null ist. Vor der Strommessung muß nun noch durch einen hinter den OPA geschalteten Differenzverstärker die Kommandospannung von der Ausgangsspannung des OPA subtrahiert werden. Um die physiologischen Erregungsmuster an Zellmembranen in Form von Potentialschwankungen und Aktionspotentialen zu untersuchen, bedient man sich der Stromklemme, dem *current-clamp* Modus. Aufgrund der in *voltage-clamp* Experimenten gewonnenen Daten kann kaum auf die durch Ionenströme hervorgerufenen Veränderungen der Erregungsmuster in Form einzelner Aktionspotentiale und Aktionspotentialserien geschlossen werden. Außerdem kann man im *current-clamp* Modus das Ruhemembranpotential messen und Aufschluß über den Zustand der Zelle gewinnen (s.Abschnitt 2.1.7). Im *current-clamp* Modus kann man nun durch Stromimpulse definierter Stärke und Länge die Zellmembran depolarisieren und an erregbaren Zellen nach Überschreiten eines Schwellenwertes ein Aktionspotential auslösen, wodurch eine Unterscheidung erregbarer von nicht erregbaren Zellen möglich wird. Anhand der Aktionspotentialform und der Frequenz, mit der einige Neurone in der Lage sind, repetitiv Aktionspotentiale zu generieren kann man das untersuchte Neuron bestimmten Untergruppen zuordnen.

In der *patch-clamp* Technik bieten sich vier verschiedene Konfigurationen, aus denen elektrophysiologische Ableitungen möglich sind (Abb.10). Sofort nach Etablieren des *giga-seal* durch Anlegen eines leichten Unterdruckes an die Pipette befindet man sich in der *cell-attached* Konfiguration. Der elektrisch isolierte Membranfleck befindet sich weiterhin in der Zellmembran, intrazellulär bleiben *second-messenger* Systeme und die Ionenkonzentrationen unbeeinflusst. Außerdem bleibt über den Großteil der Zytoplasmamembran das Ruhepotential unbeeinflusst, nur der elektrisch isolierte Bezirk wird von außen kontrolliert. Zieht man die Pipette aus der *cell-attached* Konfiguration langsam zurück, ist es aufgrund der mechanischen Stabilität des *giga-seal* möglich, den isolierten Membranabschnitt aus der Zellmembran herauszulösen. Man erhält also einen zellfreien Membranfleck, dessen ehemals zytoplasmatische Seite nun der Badlösung zugekehrt ist. Diese Konfiguration wird als *inside-out* bezeichnet. Es ist möglich, daß sich vor der Bildung eines Membranfleckes zunächst ein Vesikel bildet, das man durch kurzes Herausheben der Pipettenspitze aus der Badlösung



**Abb. 8** *voltage-clamp* Anordnung mit Rückkopplungswiderstand

$V_p$  ist vorgegebene Kommandospannung,  $V_0$  die Differenz aus Kommandospannung und an der Zelle gemessener Spannung,  $I$  bezeichnet den auf einem Monitor oder Oszilloskop abgebildeten Strom, der über die Zellmembran fließt.  $R_{acc}$ : Eingangswiderstand der Pipette.



**Abb.9** *voltage-clamp* Anordnung mit Rückkopplungskondensator

$C_f$  ist der Rückkopplungskondensator, die anderen Bezeichnungen entsprechen Abb. 8.



zum Platzen bringt, um einen *inside-out patch* zu erhalten. Durchbricht man nach Etablierung der *cell-attached* Konfiguration durch Erhöhung des Unterdruckes in der Pipette oder einen kurzen Stromimpuls die Zellmembran, gelangt man in die *whole-cell* Konfiguration. Man erhält Zugriff auf die gesamte Zellmembran und kann damit die Gesamtleitfähigkeit, die durch alle aktiven Ionenkanäle verursacht wird, messen. Da in der *whole-cell* Konfiguration das Rauschen deutlich höher ist, als in den Konfigurationen, die einen kleinen Membranfleck elektrisch isolieren, sind Einzelkanalregistrierungen nahezu unmöglich. Durch den Austausch des Zytoplasmas mit der im Überschuß vorhandene Pipetteninnenlösung erhält man nach relativ kurzer Zeit eine klar definierte Zusammensetzung des Zellinnern, was die Auswertung beobachteter Phänomene erleichtert und Untersuchungen zuläßt, die mit einem physiologischen Zellinnern nicht oder nur unter erschwerten Bedingungen durchzuführen wären. Die vierte Möglichkeit, mit der *patch-clamp* Technik Messungen von Strömen durch Ionenkanäle durchzuführen, besteht in der *outside-out* Konfiguration. Einen *patch* in dieser Konfiguration erhält man, wenn die Pipette nach Etablierung der *whole-cell* Konfiguration vorsichtig von der Zelle zurückgezogen wird. Wie in der *inside-out* Konfiguration erhält man auch hier einen zellfreien, elektrisch isolierten Membranfleck, der die Registrierung von Einzelkanalaktivitäten ermöglicht. Allerdings ist nun die Außenseite der Zellmembran dem Bad und die Innenseite der Pipettenlösung zugewandt. Da sich nach Ziehen sowohl eines *inside-out* als auch *outside-out patches* die entstandenen Membrandefekte der Zelle durch hydrophobe Interaktionen innerhalb des Phospholipidbilayers sehr schnell wieder verschließen, ist die Gewinnung mehrerer *patches* von einer Zelle möglich. Ein Problem der Ganzzelleableitung ist der Serienwiderstand, der zwischen der Pipettenelektrode und der Zellmembran besteht. Soll durch eine Strominjektion Membranpotential geändert werden, so muß hierfür die Zellmembran vollständig umgeladen werden. Dieser Umladevorgang dauert, abhängig von der Kapazität der Zellmembran, eine gewisse Zeit. Außerdem muß der injizierte Strom den Serienwiderstand überwinden, der im Idealfall dem Widerstand der Pipettenöffnung entspricht. In der Realität werden beim Durchsaugen der Zytoplasmamembran aber immer kleine Verunreinigungen, so zum Beispiel Membranbestandteile vor die Pipettenöffnung gesogen, was zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führt. Um im *voltage-clamp* zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, sollte der Serienwiderstand also möglichst niedrig sein. Praktisch führen also eine geringe Membrankapazität und ein kleiner Serienwiderstand zu einer schnellen Umladung der Membran und damit zu einem schnellen Erreichen der gewünschten Kommandospannung. Je länger dieser Vorgang dauert, umso länger entzieht sich das Membranpotential der Kontrolle

des Experimentators und kann zu verfälschter Wiedergabe der Membranleitfähigkeit führen. Zusätzlich zum Problem des Serienwiderstandes tritt bei verzweigten Zellen, beispielsweise Neuronen, das sogenannte *space-clamp* Problem auf. Da sich Engstellen in Fortsätzen der Zellen wie Serienwiderstände auswirken, wird die Spannungskontrolle an hinter den Engstellen gelegenen Membranabschnitten ungenau.

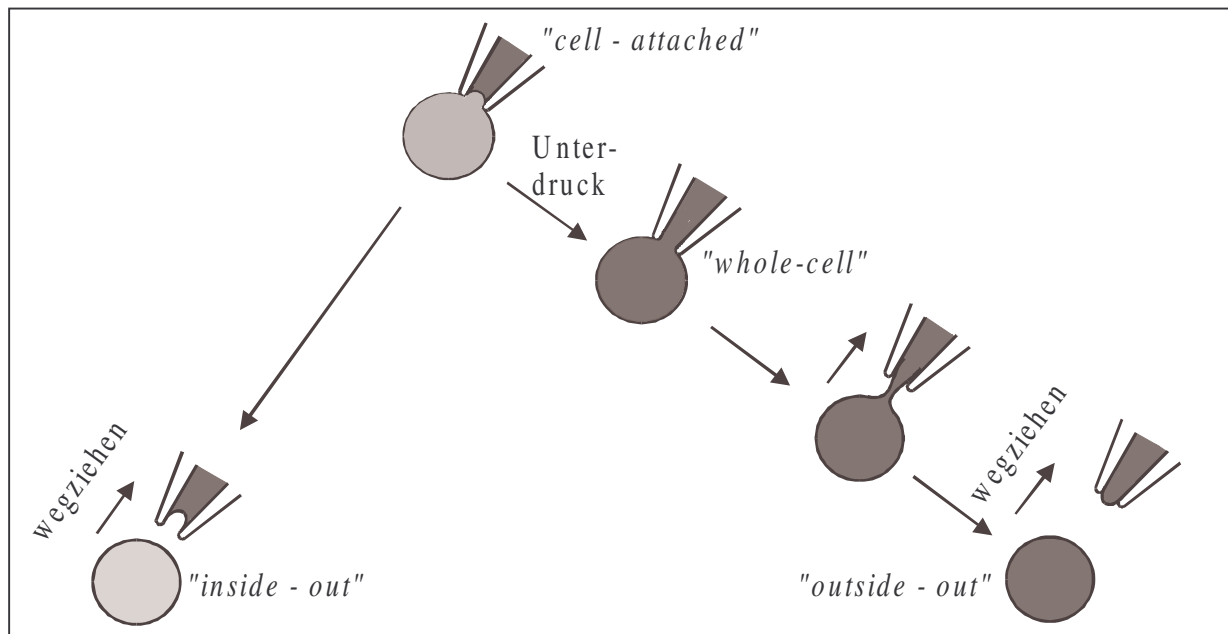


Abb. 10 Die vier möglichen *patch-clamp* Konfigurationen (Abb. modifiziert n. Hamill *et al.*, 1981)

### 2.1.5 Hintergrundrauschen

Die Auflösung von Messungen in der *patch-clamp* Technik wird durch das sogenannte Hintergrundrauschen begrenzt. Als solches werden hochfrequente Störsignale bezeichnet, welche im Bereich der Zellmembran, der Pipette und den elektronischen Geräten des Versuchsstandes entstehen. Quantifiziert wird das Hintergrundrauschen durch Varianz, Standardabweichung oder, frequenzabhängig, als spektrale Dichte der auftretenden Schwankungen elektrischer Signale.

Als intrinsisches *Johnson*-Rauschen der Membran–Pipetten–Kombination wird das durch die Leitfähigkeit der Zellmembran verursachte und die Qualität des *giga-seal* bestimmte Rauschen bezeichnet. Der Anteil des *Johnson*-Rauschens, der durch den Abdichtwiderstand des *giga-seal* verursacht wird, hat eine spektrale Dichte, die durch die Gleichung

$$S(f) = 4 kT \operatorname{Re} [Y(f)] \quad (11)$$

beschrieben wird, wobei  $k$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $\operatorname{Re} [Y(f)]$  der reale Anteil des komplexen Eingangswiderstandes ist. Betrachtet man die Membran–*giga-seal*–Kombination als einfaches, parallel geschaltetes R-C Glied, lässt sich  $\operatorname{Re} [Y(f)]$  als Reziprok des *giga-seal* Widerstandes  $R$  beschreiben.

$$\operatorname{Re} [Y(f)] = 1/R \quad (12)$$

Integration der resultierenden spektralen Dichte über die interessierende Frequenzbandbreite  $f_c$  ergibt die Amplitude des Signalrauschens  $\sigma$ .

$$\sigma = \sqrt{4kT * f_c / R} \quad (13)$$

Diese vermindert sich mit steigendem Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran. Zur Reduzierung des Rauschens und zur Verbesserung der Signalqualität ist also ein möglichst hoher *seal* Widerstand wünschenswert.

Eine andere Quelle intrinsischen Signalrauschens ist der sogenannte *shot noise*, der entsteht, wenn Ionen oder andere geladene Teilchen eine Potentialbarriere wie die Zellmembran passieren (z.B. durch Ionenkanäle und Pumpen). Geht man davon aus, daß ein Ion die Membran sehr schnell passiert, kann man die spektrale Dichte dieses Rauschens durch die Gleichung

$$S = 2 Iq \quad (14)$$

beschreiben.  $I$  ist in diesem Fall der unidirektionale Strom,  $q$  die Ladung des Moleküls. Wird der Membranwiderstand hauptsächlich durch sogenannte *leakage channels* (Leck–Kanäle) bestimmt, ist die Größe des *shot noise* mit der des *Johnson*-Rauschen vergleichbar.

Das *Johnson*-Rauschen der Membran–Pipetten–Kombination und der *shot noise* sind jedoch nur die theoretischen Grenzen des minimal möglichen Hintergrundrauschens. Bei *patch-clamp* Experimenten sind sowohl die Pipette als auch der Strom-Spannungs-Wandler zusätzliche Rauschquellen. Ein sich außen auf der Pipettenoberfläche emporziehender Flüssigkeitsfilm (Anstieg der Pipettenkapazität) ist eine weitere Quelle für ungewolltes Rauschen, dessen Bildung man durch Auftragen einer hydrophoben Substanz (z.B. *Sylgard*) um die Pipettenspitze herum verhindern kann. Dieses *coating* der Pipette reduziert die Kapazität der Pipettenwand, indem es diese verdickt, was das Rauschen reduziert. In der

vorliegenden Arbeit wurde auf das *coating* verzichtet, da das Hintergrundrauschen extrem niedrig war ( $< 0.5$  pA in Einzelkanalexperimenten, Abb.20).

Auch das Material der Pipet tengläser beeinflusst das Hintergrundrauschen. So haben weichere Gläser vergleichsweise schlechtere elektrische Eigenschaften und erzeugen starkes Rauschen. In dieser Arbeit verwendetes mittelhartes Borosilikat hat deutlich bessere Rauscheigenschaften. Nachteile weisen die mittelharten und harten Gläser vor allem in den Sealeigenschaften auf, außerdem sind sie schwerer zu bearbeiten. Beeinflusst wird das Rauschen auch durch den elektrischen Widerstand der Pipettenöffnung und durch die Steilheit der Flanken der Pipettenspitze. So zeigen sich relativ niederohmige Pipetten mit steilen Flanken zwar rauschärmer, allerdings ist die Haltbarkeit der *giga-seals* schlechter als mit einer hochohmigen Pipette.

Das durch den Strom-Spannungs-Wandler verursachte Rauschen entsteht zum einen als *Johnson*-Rauschen im Rückkopplungswiderstand  $R_f$  des Vorverstärkers, hier vor allem im Frequenzbereich bis 100 Hz. Der Beitrag des Operationsverstärkers selbst zum Rauschen ist in diesem niedrigen Frequenzbereich vernachlässigbar, bei höheren Frequenzen wird er jedoch zur wichtigsten Quelle des durch den Strom-Spannungs-Wandler verursachten Rauschens. Ursache ist eine Schleifenbildung zwischen Pipette und Verstärker. Die spektrale Dichte dieses Rauschens wird durch die Gleichung

$$S(f) = [2\pi f (C_p + C_{in})]^2 S_{V(A)}(f) \quad (15)$$

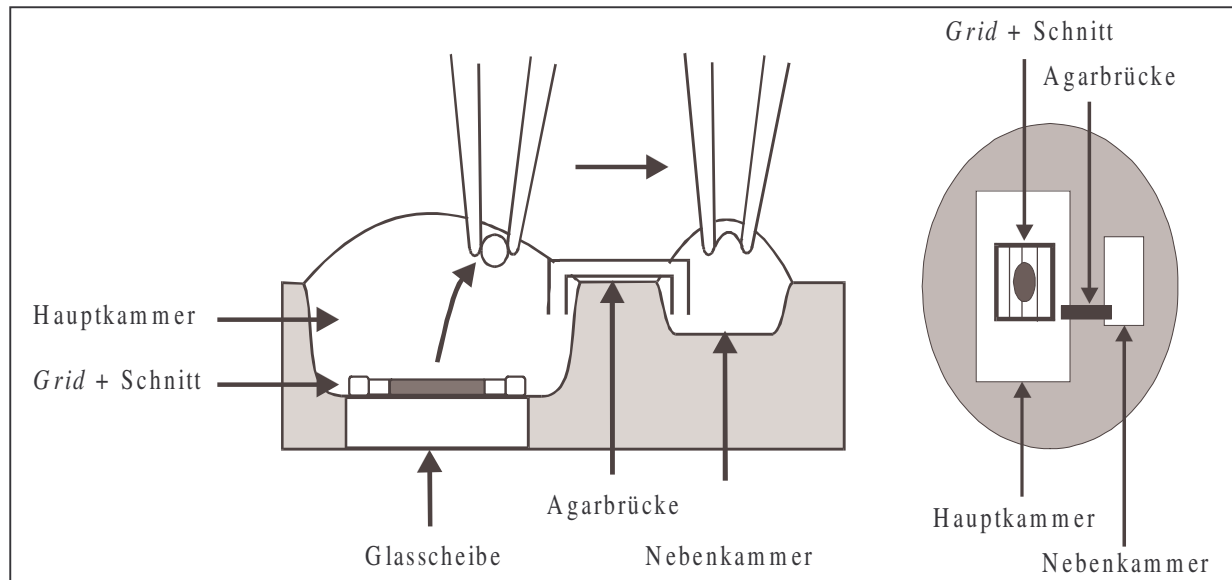
beschrieben, wobei  $f$  die Frequenz,  $S_{V(A)}$  die spektrale Dichte des Spannungsrauschens des Verstärkers,  $C_p$  die Kapazität von Pipette und Pipettenhalter und  $C_{in}$  die Eingangskapazität des Operationsverstärkers ist. Reduziert wird dieses Rauschen zum einen durch eine geringe Kapazität der Pipette, was durch einen niedrigen Flüssigkeitsspiegel im Bad und Vermeiden unnötiger Abschirmungen von Pipette und Halter erreicht wird, zum anderen durch einen Verstärker mit niedrigen Werten für  $C_{in}$  und  $S_{V(A)}$  (Benndorf, 1995; Hamill *et al.*, 1981).

### 2.1.6 Der Versuchsstand

#### Experimentierkammer

Die Experimentierkammer (Werkstatt Physiologisches Institut, Gießen, Deutschland) besteht aus einer 0.4 cm starken, 2 cm im Durchmesser messenden Delrinscheibe (Krüger, Hamburg, Deutschland). In die Delrinscheibe sind eine große und eine kleine ovale Vertiefung

hineingefräst. Beide Kammern sind durch einen schmalen Steg getrennt. Durch die Aufteilung in zwei Kammern ist es möglich, in der größeren Hauptkammer den Ganglienschnitt in der Standard-Bicarbonat-Ringerlösung aufzubewahren und in der kleineren



**Abb. 11 Experimentierkammer**

Links ein Querschnitt mit der Hauptkammer (ca. 1 ml) in der der Ganglienschnitt durch ein Gitter (*Grid*) fixiert ist, und der kleineren Nebenkammer (ca. 0.24 ml). Beide Kammern sind elektrisch über eine Agarbrücke verbunden. Rechts eine Aufsicht (Abb. modifiziert n. Gruß, 1998)

Nebenkammer zellfreie Membranflecken verschiedenen Testlösungen auszusetzen, ohne den Schnitt z.B. mit Toxinen zu kontaminieren. Der Boden der Hauptkammer besteht aus einem Deckgläschen. Elektrisch gekoppelt sind die Kammern durch eine Agarbrücke, bestehend aus einer U-förmigen Glaskapillare, gefüllt mit Agar (2% (w/v) in 120 mM KCl). Die Perfusion beider Kammern erfolgt unabhängig über ein Schwerkraft-getriebenes Perfusionssystem. Dieses erlaubt nur einen relativ langsamen Lösungswechsel, ist aber vorteilhaft, da aufgrund der fehlenden elektrischen Bauteile weniger Störungen der elektrophysiologischen Registrierungen verursacht werden. Zur Aufbewahrung der Kontroll- und Testlösungen dienen bis zu sechs, kontinuierlich mit verschiedenen Gasgemischen begasbare Perfusorspritzen (50 ml), aus denen die Lösungen über Teflonschläuche in einen Verteiler (Werkstatt Physiologisches Institut, Gießen, Deutschland) fließen. Dieser Verteiler besitzt sechs Eingänge und einen Ausgang. Die zuführenden Schläuche werden durch kleine Zylinder herabgedrückt, nur der Schlauch für die ausgewählte Lösung bleibt durchgängig.

Nach dem Verteiler fließt die Lösung durch einen Teflonschlauch und wird über eine gebogene Spritzenkanüle (Werkstatt Physiologisches Institut, Gießen, Deutschland) der Experimentierkammer zugeführt. Der zum Absaugen der Badlösung nötige Unterdruck wird für beide Kammern unabhängig durch zwei Aquariumpumpen (Wisa, Wuppertal, Deutschland) geliefert. Zum Absaugen wird ebenfalls eine gebogene Metallkanüle verwendet, über welche die Flüssigkeit per Schlauch in ein großes Vorratsgefäß geleitet wird. Zur Vermeidung von elektrischen Störungen wird darauf geachtet, daß sich beim Absaugen permanent Luftblasen im ableitenden Schlauch befinden, die das Entstehen einer Flüssigkeitssäule mit Antennenwirkung verhindern. Um Bewegungen des Schnittes, verursacht durch den permanenten Fluß der Badlösung, zu vermeiden, wird er mit einem kleinen Platinrahmen, auf den 3-4 einzelne Zahnseidefäden aufgezogen sind (*Grid*), am Boden der Experimentierkammer gehalten.

Die Durchflußrate für die Hauptkammer beträgt 1.7 ml/min, was bei einem Volumen von 1.0 ml ein Einströmen eines Badvolumens in durchschnittlich 35 s ermöglicht. Die kleine Nebenkammer hat ein Volumen von 0.24 ml, die Durchflußrate beträgt 1.55 ml/min. Das kleinere Volumen führt trotz niedrigerer Durchflußrate zum Einfließen eines Badvolumens in 9 s in die Nebenkammer.

### **Pipetten**

Die für die *patch-clamp* Experimente notwendigen Pipetten wurden aus dickwandigen Borosilikatkapillaren (GC150F-7.5 mit Filament, Clark Medical Instruments, Pangbourne, England) vor jedem Experiment neu gefertigt. Die Kapillaren haben eine Länge von 7.5 cm, ihr äußerer Durchmesser beträgt 1.5 mm, der innere Durchmesser 0.86 mm. Borosilikat hat gute elektrische Eigenschaften (geringes Rauschen) und läßt sich relativ einfach verarbeiten. Es stellt einen guten Kompromiß zwischen extrem harten Gläsern mit optimalen elektrischen Eigenschaften und den sehr weichen Kapillaren mit besseren Verarbeitungseigenschaften dar. Um das Füllen der Pipettenspitze zu erleichtern, besitzen die Kapillaren ein inneres Filament, entlang welchem die Pipettenlösung leicht bis an die Spitze der Pipette gelangt. Dadurch wird ein zweizeitiger Füllungsvorgang der Pipette mit Eintauchen der Spitze in die Innenlösung und retrograder Füllung der Pipette überflüssig. Vorbereitend wurden die Kapillarenden über der Flamme eines Bunsenbrenners abgerundet, damit keine scharfen Kanten den Pipettenhalter und die Elektrode beschädigen. Gezogen wurden die Pipetten in mehreren Stufen mittels eines Horizontal-Ziehgerätes (Modell P97, Instrument Co., Sutter, USA). Die

Kapillare wird mit Methanol abgerieben, um Verunreinigungen, insbesondere Fett, zu beseitigen. Danach wird sie in das Ziehgerät (*Puller*) eingespannt. Im *Puller* wird die Kapillare durch ein Glühwendel hindurchgeschoben, welches nach Starten des Ziehvorganges auf eine vorgegebene Temperatur erhitzt und zum Glühen gebracht wird. Dadurch wird das Borosilikat weich und kann im anschließenden Ziehvorgang auseinander gezogen werden. Am Ende des Ziehvorganges sind zwei Pipetten mit Öffnungen von 1–2  $\mu\text{m}$  im Durchmesser entstanden. Um die gezogenen Pipetten nun für *patch-clamp* Experimente verwenden zu können, ist es notwendig, sie an ihrer Spitze mit einer *Mikroforge* (engl. *forge* = Schmiede, Mikroskop: Hund, Wetzlar, Deutschland, ansonsten Werkstatt Physiologisches Institut, Universität Gießen, Deutschland) zu polieren. Dieses „Feuerpolieren“ entfernt letzte Verunreinigungen und Unebenheiten der Pipettenspitze, wodurch erst die Bildung eines hochohmigen *giga-seal* möglich wird (Hamill *et al.*, 1981). Praktisch wird so vorgegangen, daß die Pipette in einen Halter eingespannt wird, ihre Spitze unter visueller Kontrolle einem Platindraht (0.127 mm, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland) angenähert, dieser zum Glühen gebracht und dadurch die Pipettenspitze leicht angeschmolzen wird. Neben der Beseitigung von Verunreinigungen wird durch das Polieren auch nach dem Ziehen noch eine Verkleinerung der Pipettenspitze und damit eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes erreicht. In dieser Arbeit wurden für Ganzzelleableitungen Pipetten mit Widerständen von 1.5 M $\Omega$  bis 5 M $\Omega$  verwendet, Einzelkanalregistrierungen wurden mit hochohmigeren Pipetten 7 M $\Omega$  bis 15 M $\Omega$  durchgeführt. Der Widerstand der Pipettenöffnung wurde aus dem zwischen Pipetten- und Badlösung fließenden Strom nach Eintauchen der Pipettenspitze berechnet. Die Pipettenlösungen wurden in Insulinspritzen (1 ml) mit aufgesetzten Filtern (0.2  $\mu\text{m}$ , Renner, Darmstadt, Deutschland) aufbewahrt. Zum Füllen der Pipetten wurden spezielle, nicht metallische Kanülen (Microfil, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) verwendet, um Reaktionen des Kanülenmaterials mit der Innenlösung zu vermeiden. Die Pipette wurde zur Vermeidung unnötigen Hintergrundrauschens und zur Minimierung von Offset-Spannungsfehlern nur soweit gefüllt, daß die Elektrode gerade in die Pipettenlösung eintaucht.

## Elektroden

Als Pipettenelektrode wurde ein 0.5 mm starker Silberdraht (Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, der regelmäßig in KCl-Lösung (1 mM) chloriert wurde. Dazu wird der mit der Anode einer Batterie verbundene Silberdraht in die KCl-Lösung

getaucht. Die Kathode ist über einen Widerstand mit einem weiteren Draht verbunden, der in die gleiche Lösung eintaucht. Nach der Gleichung



bildet sich bei Verlagerung des Gleichgewichtes nach rechts Silberchlorid am Draht der Anode. Als Badelektrode wurde ebenfalls ein Silberdraht der Stärke 0,5 mm (Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, der, wie oben beschrieben chloriert wurde. Überprüft werden kann die suffiziente Chlorierung beider Elektroden dadurch, daß die Potentialdifferenz zwischen beiden Drähten bei Eintauchen in Lösungen gleicher Chloridkonzentrationen Null sein muß.

### **Pipettenhalter, Mikromanipulator**

Um das Rauschen möglichst gering zu halten, wurde als Material für den Pipettenhalter Kunststoff mit hoher Dielektrizitätskonstante gewählt. Als Oberflächenmaterial wurde, wie auch für die Experimentierkammer, das hydrophobe und harte Delrin (Krüger, Hamburg, Deutschland) gewählt. Der Pipettenhalter wird an der *headstage*, dem Bauteil des *patch-clamp* Verstärkers, das den Operationsverstärker enthält, befestigt. Die Einheit aus *headstage* und Pipettenhalter ist in einem Winkel von 30 – 50° gegen die Horizontale auf einem 3-achsigen Mikromanipulator (ZSS 32-200-1.2, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) angebracht. Die Steuerung des Mikromanipulators erfolgt elektrisch über einen 3-Achsen-Joystick. Die minimal möglich Schrittweite beträgt 0.1 µm. Scherbewegungen zwischen Pipette und Präparat sollen dadurch vermieden werden, daß Mikromanipulator und Kreuztisch, der die Experimentierkammer mit dem Präparat enthält, an verschiedenen, vom Mikroskop getrennten Haltern befestigt, jedoch auf einem Tisch montiert sind.

### **Mikroskop**

Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das auf einem schwingungsgedämpften Tischgestell (T250, Physik Instruments, Waldbrunn, Deutschland) aufgestellt ist. Um die Erschütterbarkeit des Tisches z.B. durch Fußtritte weiter zu vermindern, besteht die Tischplatte aus Marmor und ist zusätzlich mit Metallgewichten beschwert. Die grobe Orientierung über das Präparat verschafft man sich in 40-facher Vergrößerung um dann anschließend unter dem 400-fach



vergrößernden Wasserimmersionsobjektiv eine Zelle auszuwählen, die Pipette anzunähern und das *giga-seal* herzustellen. Um elektrische Einflüsse auf die Registrierungen durch Bauteile des Mikroskops, z.B. die Lampe, zu vermeiden, ist das Wasserimmersionsobjektiv vom Rest des Mikroskops elektrisch isoliert. An das Mikroskop ist eine Videokamera (WV-BP500, Panasonic Deutschland GmbH, Deutschland) angeschlossen, die das Bild auf einen Monitor (WV-5410N, Panasonic Deutschland GmbH, Deutschland) überträgt. Dadurch ist zum einen ein Mitbeobachten durch zusätzliche Personen möglich, zum anderen kann der Experimentator den Zustand der Zelle während des gesamten Experimentes visuell kontrollieren und ihren Durchmesser bestimmen.

### **Verstärker und Filter**

Verwendet wurde ein *patch-clamp* Verstärker des Typs Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, USA), der einen Verstärkungsbereich von 0.5 – 500 mV/pA besitzt und bis zu 20 nA große Ströme mißt. Die Applikation der Testimpulse, schneller Spannungsänderungen oder Strominjektionen, wurde computergesteuert durchgeführt. Die Befehle laufen vom Rechner (AT 386er, 40 MHz, später Intel Celeron, 466 MHz) über einen Digital-Analog-Wandler (Digidat 1200B, Axon Instruments, Foster City, USA) und den *patch-clamp* Verstärker in dessen *headstage* (CV201 AU, Axon Instruments, Foster City, USA), die den OPA enthält.

Bevor das *giga-seal* gebildet wird, bestimmt man mittels eines rechteckigen Spannungsimpulses den Widerstand der Pipettenspitze nach Eintauchen in die Badlösung. Dann wird die Pipette unter optischer Kontrolle bis nahe an die Zellmembran gebracht, um nun am Verstärker den Nullwert für das Potential einzustellen. Der Verstärker besitzt hierfür einen Modus, der es erlaubt, das gemessene Potential als Null zu definieren, d.h. eine solche Einstellung zu wählen, daß zwischen Pipetten- und Badelektrode kein Strom mehr fließt. Allerdings ist zu beachten, daß während des Experimentes an den Grenzflächen zwischen Elektroden und Lösungen Potentiale entstehen können (sog. *liquid junction potential*), die durch die vorher vorgenommene Einstellung am Verstärker nicht beeinflußt werden.

Die während der Reizimpulse besonders in der *whole-cell* Konfiguration großen kapazitiven Ströme, die durch den Umladeprozess der Zellmembran entstehen, sollten, um den Verstärker nicht an seine Grenzen zu treiben, so klein wie möglich gehalten werden. Eine Sättigung würde zu einem kurzzeitigen Ausfall der Spannungskontrolle führen und damit den Verlust der Kontrolle über die Membranspannung bedeuten. Um die kapazitiven Ströme zu

minimieren, bedient man sich der Kapazitätskompensation des Verstärkers. Über einen Seitenast wird der für den Umladevorgang notwendige Stromimpuls in die Pipette eingespeist und erscheint nicht als Signal im Strom-Spannungs-Wandler. Der verwendete Axopatch 200A Verstärker erlaubt die Kapazitätskompensation in zwei Zeitbereichen. Die sogenannte  $C_{fast}$  Kompensation erlaubt Korrekturen im Bereich von 0 - 10 pF mit einer Zeitkonstanten von 0.2 - 5  $\mu$ s, mit der  $C_{slow}$  Kompensation können Kapazitäten von 0 - 1 pF mit Zeitkonstanten von 0,1 - 10 ms kompensiert werden. Dieses Korrekturverfahren ermöglicht außerdem ein Abschätzen der ungefähren Kapazität der gesamten Zellmembran in der *whole-cell* Konfiguration und damit Rückschlüsse auf die Größe der untersuchte Zelle.

Weiterhin erlaubt der Verstärker eine Kompensation des Serienwiderstandes, über den schon vor Erreichen der Zellmembran ein Teil der Kommandspannung abfällt, also eigentlich eine zu geringe Potentialdifferenz über die Membran aufgebaut wird. Durch die zusätzliche Injektion von Strom kann der Verlust, der durch den Serienwiderstand entsteht, ausgeglichen werden.

Die Filterung der Signale erfolgte zum einen über den Tiefpaßfilter des Verstärkers (-3 dB, 4-Pol Bessel), der Filterfrequenzen von 1 kHz bis 100 kHz zulässt (Axopatch 200B). Zusätzlich war ein weiterer, feiner abstimmbarer Tiefpaßfilter (-3 dB, 10-Pol Bessel, Werkstatt Physiologisches Institut, Gießen, Deutschland) mit Filterfrequenzen von 0.5 kHz bis 20 kHz an den Signalausgang gekoppelt.

### 2.1.7 Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren

In der verwendeten Präparation korrelierte ein Ruhemembranpotential von positiver als -50 mV nahezu immer mit einem schlechten Zustand des Neurons, was sich in *voltage-clamp* Messungen durch einen hohen unspezifischen Leckstrom und eine nur kurze Überlebensdauer des Neurons bestätigte. Neurone mit Ruhemembranpotentialen positiv zu -50 mV und hohem unspezifischen Leckstrom wurden bei der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt. Die experimentell gewonnenen Daten wurden entweder über den AD/DA-Wandler (Digidat 1200B, Axon Instruments, Foster City, USA) digitalisiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert oder aber direkt mittels eines DAT Recorders (DTR 1204, Biologic, Claix, Frankreich) aufgenommen und gespeichert. Vom DAT-Medium können die Daten dann, wie oben beschrieben, digitalisiert und auf den Computer überspielt werden. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß lange, viel Speicherkapazität benötigende Registrierungen nicht in voller Länge auf den Computer kopiert werden müssen, sondern daß die Aufnahme

von Abschnitten einer Registrierung möglich wird, ohne daß die Rohdaten des gesamten Experimentes verloren gehen. Bewährt hat sich diese Art der Datenspeicherung besonders bei Einzelkanalexperimenten, bei denen beispielsweise Ein- und Auswaschphase eines Toxins aufgenommen werden sollen, für die Auswertung des Experimentes primär aber nicht von Bedeutung sind. Die Datenregistrierung wurde mit Hilfe der Programme Clampex und Fetchex, Version 6.0 auf einem 386er PC, bzw mit dem Programm Clampex, Version 8.0 (alle Axon Instruments, Foster City, USA) auf einem Intel Celeron 466 MHz PC durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde ebenfalls mittels spezieller Software durchgeführt. Mit den Programmen Clampfit, Fetchan, pStat, Version 6.0 und Clampfit, Version 8.0 (alle Axon Instruments, Foster City, USA) wurden Amplituden ausgemessen, Amplitudenhistogramme erstellt, Offenwahrscheinlichkeiten berechnet und Kurvenanpassungen vorgenommen. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Origin (Versionen 5.0 und 6.0, Microcal Software Inc., Northampton, USA) verwendet. Die Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Excel (Version 97, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), die schematischen Abbildungen des *patch-clamp* Verstärkers, der *patch-clamp* Konfigurationen und der Experimentierkammer mit Corel Draw (Version 8, Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. In den Abbildungen ist der SEM durch Balken über bzw. unter dem dazugehörigen Symbol für den Mittelwert dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Capsaicinrezeptoren in primär sensorischen Neuronen junger Ratten

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Untersuchung nativer Capsaicinrezeptoren primär sensorischer Neurone.

##### 3.1.1 Capsaicin-induzierte Einwärtsströme in der *whole-cell* Konfiguration

Zunächst wurden kleine bis mittelgroße (Durchmesser 15 – 28  $\mu\text{m}$ ) Neurone auf der Oberfläche der Spinalganglienschnitte ausgewählt und in der *whole-cell* Konfiguration auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Capsaicin (CAP) untersucht. Daß es sich bei den ausgewählten Zellen tatsächlich um Neurone handelt und nicht um Schwann-Zellen, wurde durch Messung eines spannungsabhängigen Natriumeinwärtsstromes und die Auslösbarkeit von Aktionspotentialen verifiziert.

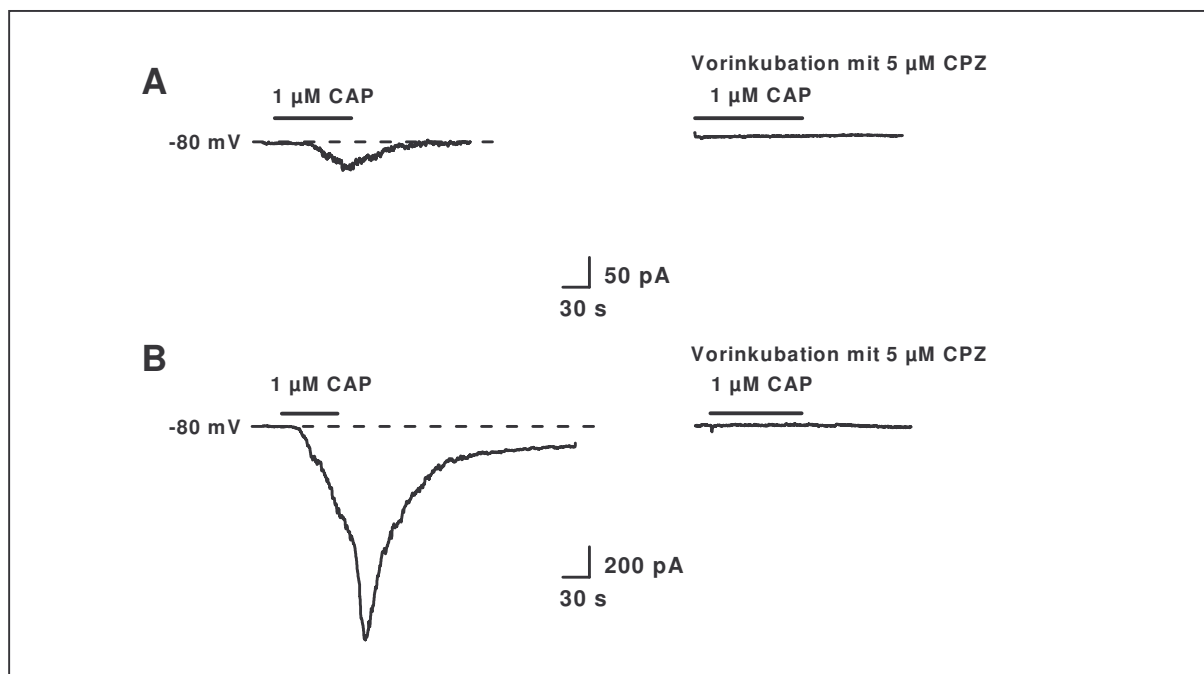
Bei einem Haltepotential von  $-80$  mV reagierten von 97 untersuchten Neuronen 86 (89 %) mit einem Einwärtsstrom auf die extrazelluläre Applikation von CAP (Abb.12). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  liegt im Bereich der halbmaximalen Wirkungskonzentration, die für den nativen Capsaicinrezeptor mit 1.1  $\mu\text{M}$  (Oh *et al.*, 1996) und für den klonierten Kanal mit 0.71  $\mu\text{M}$  (Caterina *et al.*, 1997) angegeben wird. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten, in denen akut dissoziierte oder kultivierte Neurone verwendeten wurden, um native, CAP-induzierte Ströme zu untersuchen, zeigte die Mehrzahl der Neurone in der Dünnschnittpräparation auffallend kleine Amplituden der Ganzzellströme der Median der Amplitude betrug 54 pA ( $n = 86$ ) bei einem Haltepotential von  $-80$  mV (Abb.13). Eine Abhängigkeit der Stromamplitude von der seit der Präparation vergangenen Zeit wurde nicht beobachtet (Tab.1).

**Tab. 1 Unabhängigkeit der Stromamplitude von der Zeit nach der Präparation**

Neuron 1	Neuron 2	Neuron 3	Neuron 4	Neuron 5	Neuron 6
87 pA	175 pA	15 pA	7.5 pA	48 pA	108 pA

Die Tabelle zeigt die Amplituden CAP-induzierter Ströme von sechs am gleichen Tag untersuchten Neuronen. Neuron 1 wurde eine Stunde nach der Präparation gemessen, Neuron 6 acht Stunden später.

Um eine calciumabhängige Desensibilisierung der Rezeptoren als Ursache für die kleinen Ströme auszuschließen, wurden Experimente auch in nominell calciumfreier Badlösung durchgeführt. Hier betrug der Median der Stromamplitude 151 pA ( $n = 12$ ). Da es Hinweise gibt, daß Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen die Aktivität des Capsaicinrezeptors beeinflussen (Docherty *et al.*, 1996), wurden einige Experimente in Gegenwart von 2 mM ATP (als Substrat für Phosphorylierungsreaktionen) in der Pipettenlösung durchgeführt. In der Tat kam es hierunter zu einer Vergrößerung der Stromamplituden (Median 198 pA,  $n = 5$ ). Resiniferatoxin (RTX, 0.1  $\mu\text{M}$ ) aktivierte in 7 von 10 getesteten Neuronen einen Einwärtsstromes bei  $-80$  mV, der Median der Amplitude betrug 173 pA.

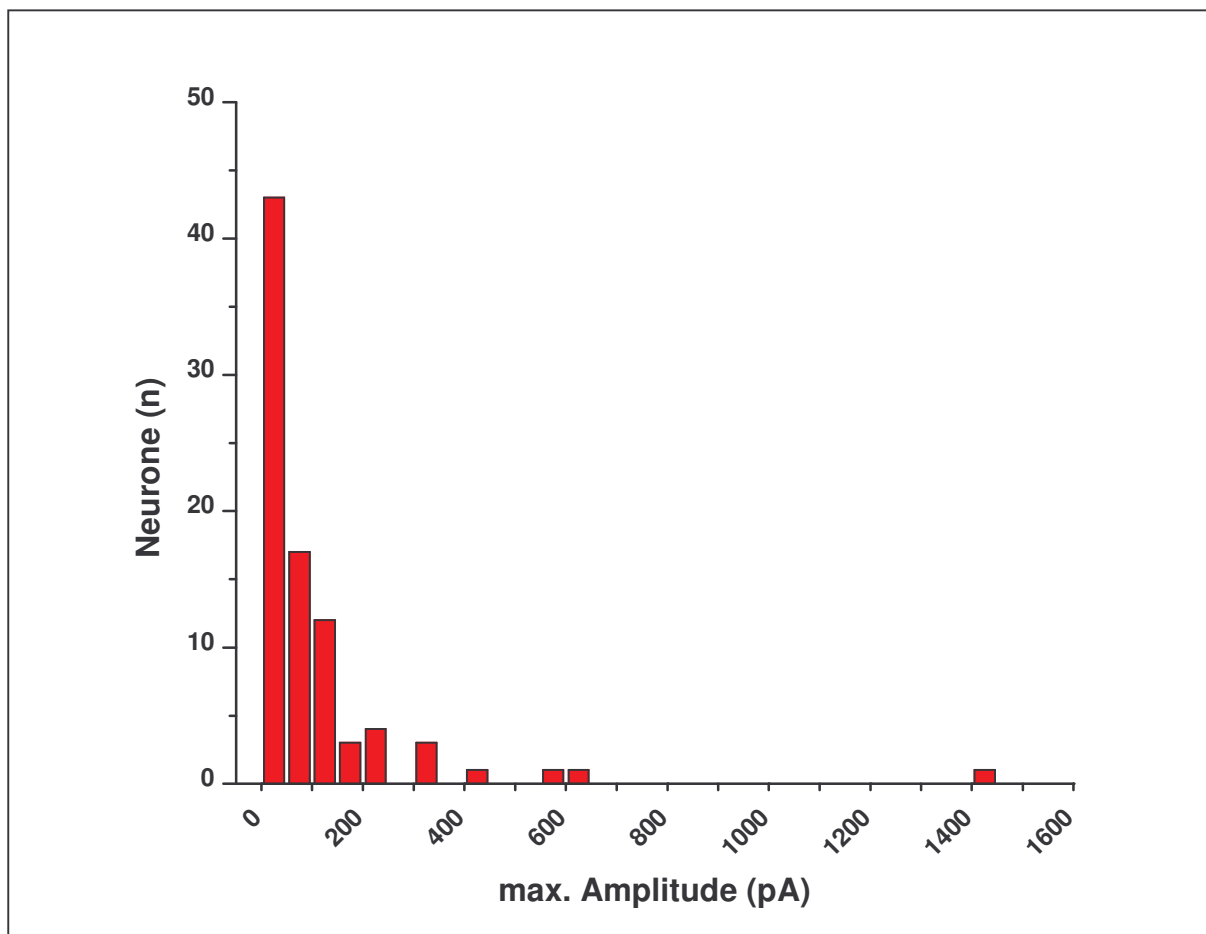


**Abb. 12 CAP-induzierte Einwärtsströme in der *whole-cell* Konfiguration**

(A) links: Originalregistrierung eines typischen Einwärtsstroms kleiner Amplitude nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$  CAP; rechts: vollständige Blockade des CAP-induzierten Stromes nach Vorinkubation (5 min) mit  $5 \mu\text{M}$  CPZ, Haltepotential  $-80$  mV, Filterfrequenz 1 kHz. (B) links: selten gemessener, großer CAP-induzierter Einwärtsstrom, der ebenfalls durch  $5 \mu\text{M}$  CPZ antagonisiert wurde (rechts), Haltepotential  $-80$  mV, Filterfrequenz 1 kHz. Man beachte die unterschiedlichen Amplituden-Maßstäbe in A und B! Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High- $\text{K}_i$  EGTA, Temperatur:  $23^\circ\text{C}$ .

Um zu zeigen, daß es sich bei den gemessenen Antworten tatsächlich um Ströme handelt, die durch den Capsaicinrezeptor vermittelt werden, wurden die CAP-induzierten Ströme durch

Applikation des kompetitiven Capsaicinrezeptor-Antagonisten Capsazepin (CPZ,  $5\mu\text{M}$ , 5 min Präinkubation) inhibiert (Abb.12). In jedem der 23 getesteten Neurone führte CPZ zu einer Blockade des Stromes. Lediglich 3 von 86 Neuronen zeigten Einwärtsströme, deren Amplitude größer als 500 pA war (Abb.12B). Ordnet man die Anzahl der Neurone nach dem maximalen Strom bei  $-80\text{ mV}$  Amplitudenbereichen von jeweils 50 pA zu, so erhält man das Histogramm in Abb.13. Deutlich zu erkennen ist die Häufung von 83% aller Neurone mit gemessenen Stromamplituden um Werte zwischen 50 und 150 pA.



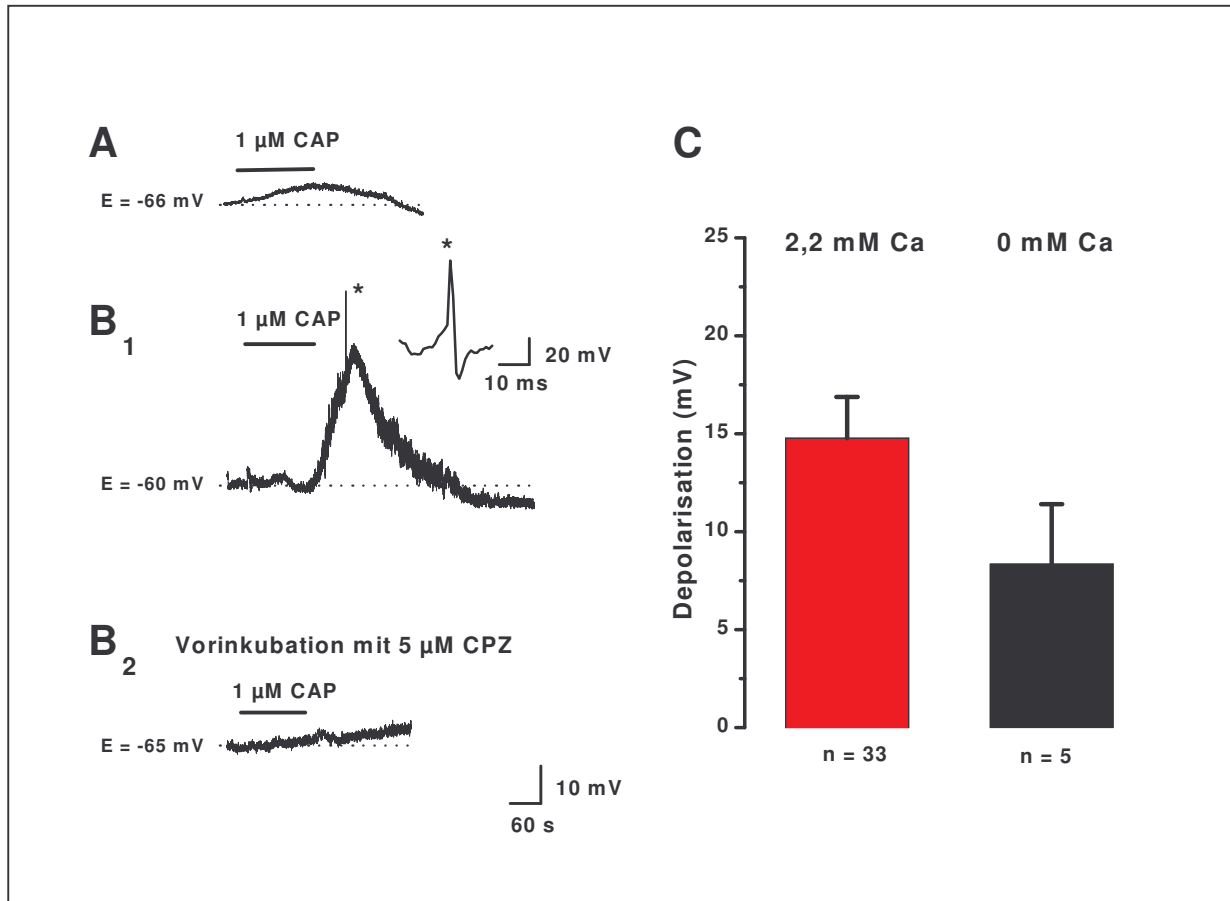
**Abb. 13 Amplituden-Histogramm für CAP-induzierte Einwärtsströme**

Aufgetragen ist die Anzahl der Neurone gegen die maximale Stromamplitude in Intervallen von 50 pA. 83% der Neurone antwortete auf die Applikation von  $1\mu\text{M}$  CAP mit Einwärtsströmen  $< 150\text{ pA}$ .

### 3.1.2 Capsaicin depolarisiert die Zellmembran

Da Erregung über neuronale Zellmembranen in Form von Potentialänderungen weitergegeben wird, wurden nicht nur CAP-induzierte Ströme bei einem vorgegebenen Haltepotential gemessen, sondern auch im *current-clamp* Modus Messungen des Membranpotentials

einzelner Neurone durchgeführt. Da CAP *in vivo*, auf die Haut bzw. Schleimhäute aufgetragen, ein Gefühl brennenden Schmerzes auslöst, würde man auch *in vitro* eine über-



#### Abb. 14 Effekte von CAP auf das Membranpotential sensorischer Neurone

(A) Unterschwellige Depolarisation eines Neurons, wie sie an 36 von 38 untersuchte Neurone zu beobachten war. (B<sub>1</sub>) Überschwellige Depolarisation mit Generierung eines Aktionspotentials (\*), die nur in 2 der 38 Neurone beobachtet wurde. (B<sub>2</sub>) Gleiches Neuron wie in (B<sub>1</sub>), nach Vorinkubation mit dem Capsicinrezeptor-Antagonisten CPZ ( $5 \mu\text{M}$ ) zeigt sich eine minimale Depolarisation nach der Applikation von CAP. Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High-K<sub>i</sub> EGTA Filterfrequenz: 1 kHz, Temperatur:  $23^\circ\text{C}$  (C) Blockdiagramm der mittleren Depolarisation sowohl in calciumhaltiger als auch in calciumfreier Badlösung aller im *current-clamp* untersuchten Neurone.

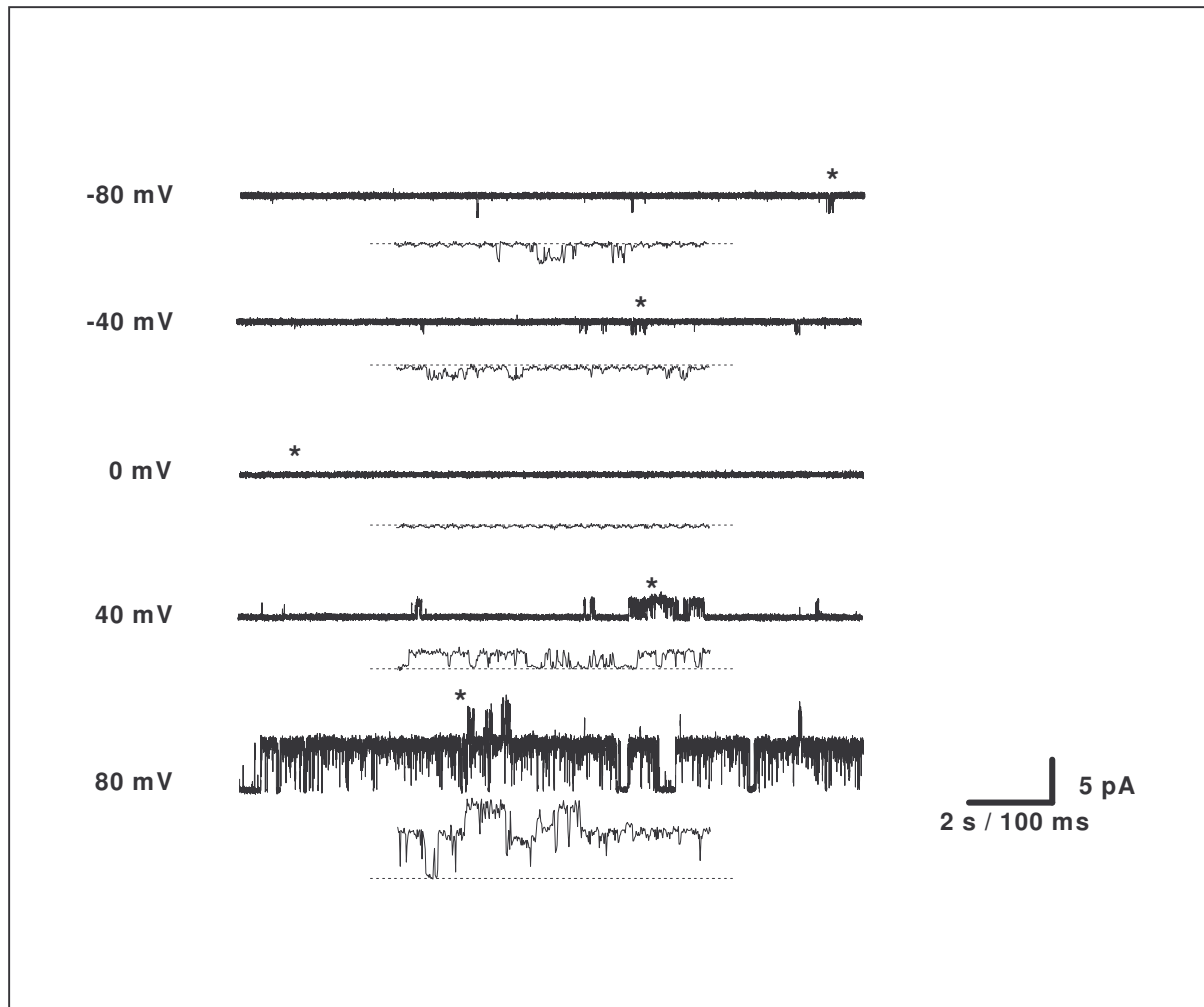
schwellige Depolarisation CAP-sensitiver Neurone nach Applikation der Substanz erwarten. An 38 CAP-sensitiven Neurone wurde der Verlauf des Membranpotentials während der extrazellulären Applikation von CAP ( $1 \mu\text{M}$ ) kontinuierlich gemessen. 33 dieser Experimente wurden in Gegenwart von  $2,2 \text{ mM}$  Calcium in der extrazellulären Lösung (Standard-Bicarbonat-Ringerlösung) durchgeführt. Die anderen 5 Neurone wurden in nominell (d.h.

ohne Zusatz von Chelatoren) calciumfreier extrazellulärer Lösung untersucht. Der nominell calciumfreien Lösung waren zusätzlich 4 mM Magnesiumionen zugesetzt, um positive Oberflächenladungen der Zellmembran gegenüber der calciumhaltigen Lösung nicht zu verändern (Hille, 2001). Analog zu den bereits beschriebenen *voltage-clamp* Experimenten zeigte sich bei den im *current-clamp* untersuchten Neuronen nur in 2 von 38 Fällen eine überschwellige Depolarisation und die Generierung von Aktionspotentialen (Abb.14B<sub>1</sub>). Die mittlere Depolarisation in calciumhaltiger Badlösung betrug  $14.7 \pm 2.1$  mV ( $n = 33$ ), in calciumfreier Außenlösung betrug die Depolarisation  $8.2 \pm 3.1$  mV ( $n = 5$ , Abb.14C). Betrachtet man die Depolarisation der Neurone in Gegenwart von extrazellulärem Calcium ohne Berücksichtigung der beiden Neurone, die mit der Generierung von Aktionspotentialen antworteten, so betrug die mittlere Depolarisation  $12.9 \pm 1.7$  mV ( $n = 31$ , Abb.14A). Keines der Neurone in nominell calciumfreiem Medium reagierte mit einer überschweligen Depolarisation. Daß es sich bei den CAP-induzierten Depolarisationen um Capsaicinrezeptorvermittelte Reaktionen handelt, wurde exemplarisch an einer Zelle durch die Inhibition der Depolarisation mittels CPZ gezeigt ( $n = 1$ , Abb 14B<sub>2</sub>).

### 3.1.3 Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors

Die Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors in primär sensorischen Neuronen wurden an zellfreien Membranflecken (*patch*) sowohl in der *inside-out* als auch der *outside-out* Konfiguration untersucht. Zur Aktivierung des Capsaicinrezeptors wurde CAP über die jeweilige Badlösung in einer Konzentration von 1  $\mu$ M appliziert. Um eine Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle und damit eine Überschneidung mit der Einzelkanalaktivität des Capsaicinrezeptors zu verhindern, wurde in den, an der jeweils intrazellulären Seiten der *patches* verwendeten Lösungen Kaliumchlorid durch Cäsiumchlorid ersetzt. Cäsium ist bekannt für seine blockierende Wirkung auf spannungsabhängige Kaliumkanäle (Hille, 2001). Die Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors wurden nach der Isolation zellfreier *patches* bei verschiedenen Haltepotentialen zwischen  $-80$  mV und  $80$  mV untersucht. Aus 37 von 53 (69.8%) untersuchten Neuronen ließen sich Membranflecken isolieren, in denen der Capsaicinrezeptor zu aktivieren war. Die relativ hohe Dichte, mit der Capsaicinrezeptoren in sensorischen Neuronen vorkommt, ist dadurch erkennbar, daß selbst in kleinen *patches* (Pipettenwiderstand  $> 10$  M $\Omega$ ) mehrere Einzelkanalniveaus beobachtet wurden.

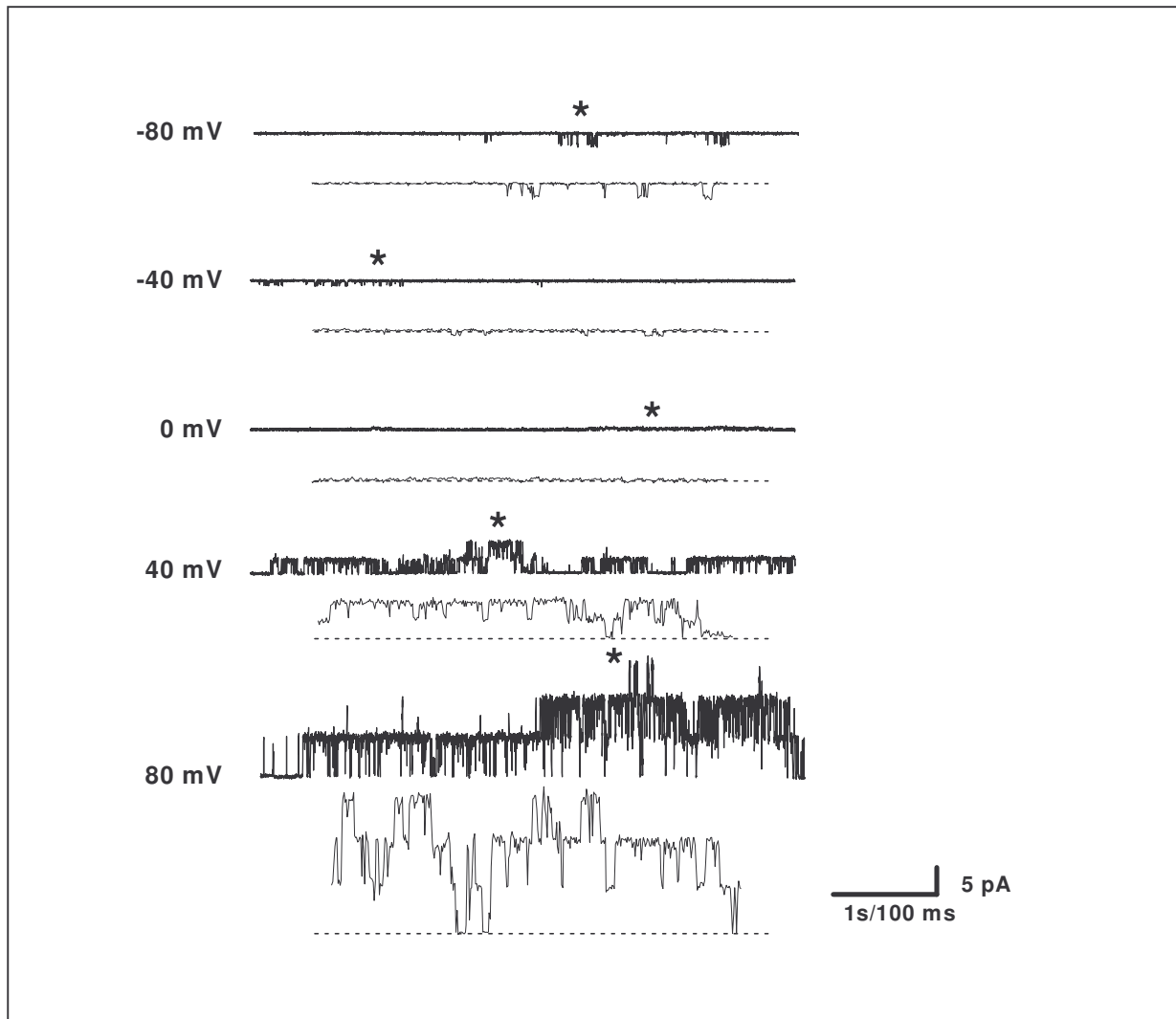




**Abb. 15 Einzelkanalaktivität des Capsaicinrezeptors in der *inside-out* Konfiguration**

Durch Applikation von  $1\mu\text{M}$  CAP von der intrazellulären Seite (Badseite) induzierte Einzelkanalaktivität bei verschiedenen Haltepotentialen. (\*) markiert die Ausschnitte, die unter der jeweiligen Registrierung mit anderer Zeitachse dargestellt sind. Auffällig ist die zunehmende Einzelkanalamplitude (Auswärtsgleichrichtung) sowie die steigende Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei positiven Potentialen. Man beachte die zusätzliche Aktivierung eines zweiten Kanalniveaus bei einem Haltepotential von 80 mV! Der Maßstab für die Zeitachse beträgt 2 s für die langen Registrierungen und 100 ms für die Ausschnitte.

Badlösung: CsCl EGTA; Pipettenlösung: Ringerlösung, HEPES gepuffert, pH 7.4; Filterfrequenz 1 kHz, Temperatur: 23°C.



**Abb. 16 Einzelkanalaktivität des Capsaicinrezeptors in der *outside-out* Konfiguration**

Registrierung in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  CAP in einem *outside-out patch* bei unterschiedlichen Haltepotentialen, (\*) markiert die Stelle des für jede Registrierung gezeigten Ausschnittes mit kürzerer Zeitachse. Auch hier deutliche Auswärtsgleichrichtung und höhere Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Haltepotentialen, zusätzliches zweites Kanalniveau bei 40 mV und 80 mV. Die gestrichelte Linie der Ausschnittsvergrößerung zeigt den Geschlossenenzustand des Kanales an. Keine messbare Einzelkanalleitfähigkeit bei 0 mV, da das Umkehrpotential für den unselektiven Kationenkanal bei den gewählten Lösungszusammensetzungen nahe 0 mV liegt.

Badlösung: Ringerlösung, HEPES gepuffert, pH 7.4; Pipettenlösung: CsCl EGTA; Filterfrequenz: 1kHz, Temperatur: 23°C

### 3.1.4 Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors

Zur Untersuchung der biophysikalischen Eigenschaften des Capsaicinrezeptors in Neuronen der Dünnschnittpräparation wurden zum einen die Offenwahrscheinlichkeiten des Kanals bei unterschiedlichen Haltepotentialen bestimmt, zum anderen wurden die Einzelkanalamplituden ausgemessen und daraus die Einzelkanalleitfähigkeiten berechnet.

Zur Messung der Offenwahrscheinlichkeiten des Capsaicinrezeptors wurden die teilweise mehrere Minuten langen Einzelkanalregistrierungen in 10 s lange Abschnitte unterteilt und die Offenwahrscheinlichkeit des jeweiligen Abschnitts mittels eines Computerprogramms analysiert (s. Abschnitt 2.1.7). Im Folgenden sind die Anzahl der untersuchte Abschnitte als  $n$  angegeben, die Anzahl der *patches* und damit der untersuchten Neurone wird gesondert angegeben.

**Tab. 2 Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors bei verschiedenen Haltepotentialen**

Haltepotential (mV)	$NP_{\text{open}}$	Anzahl (n)	Neurone
-80	$0.06 \pm 0.01$	108	37
-60	$0.05 \pm 0.03$	16	7
-40	$0.14 \pm 0.03$	40	17
-20	$0.006 \pm 0.002$	13	5
20	$0.11 \pm 0.09$	10	6
40	$0.37 \pm 0.05$	43	17
60	$0.37 \pm 0.08$	23	8
80	$0.51 \pm 0.03$	102	30

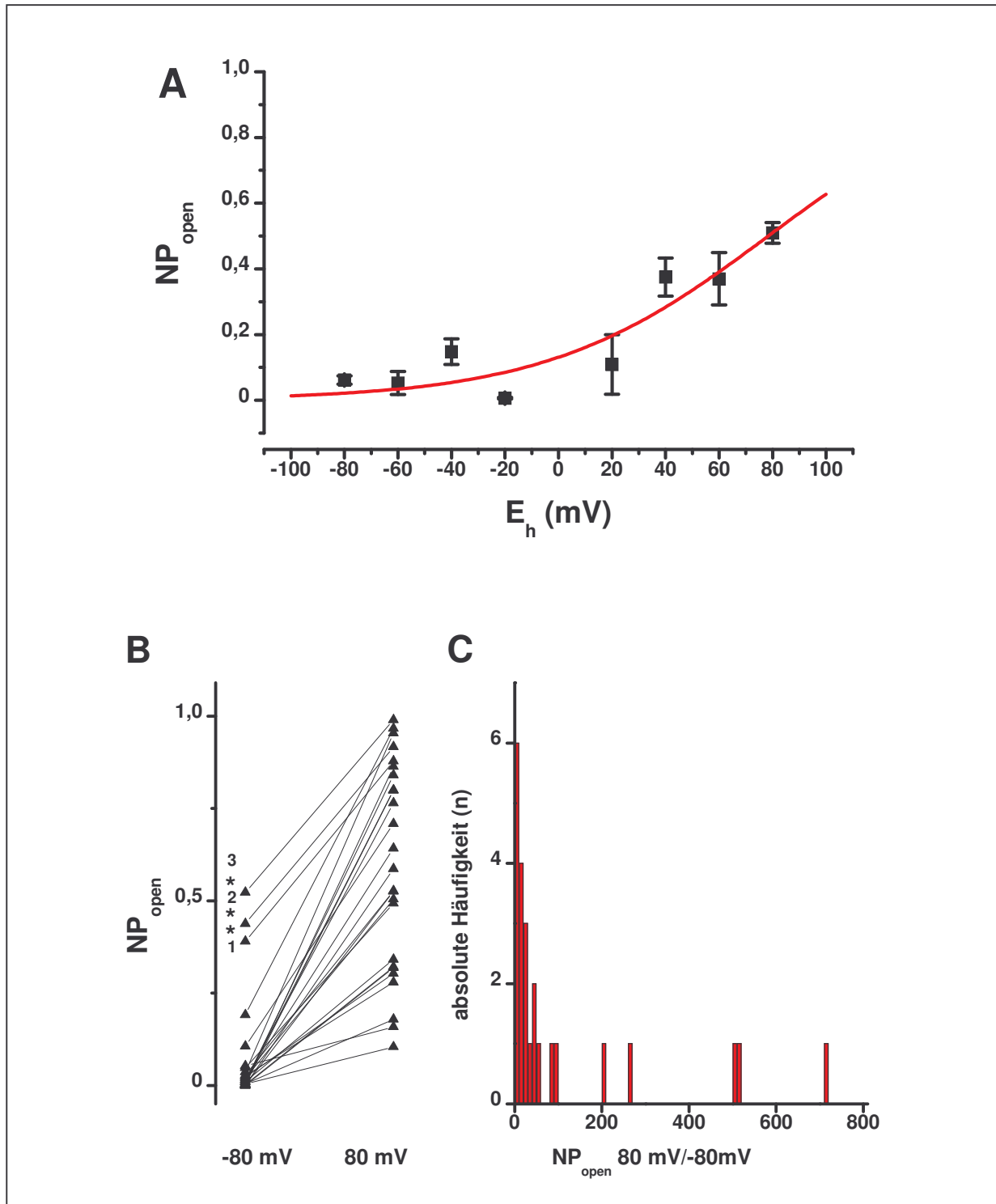
Für die unterschiedlichen Haltepotentiale ergaben sich die in Tab. 2 angegebenen Offenwahrscheinlichkeiten. Die erhaltenen Mittelwerte wurden sowohl aus *inside-out* als auch aus *outside-out* Registrierungen gewonnen. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, zeigt das *gating* des Capsaicinrezeptors eine deutliche Spannungsabhängigkeit. Mit positiven Haltepotentialen erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit signifikant. Immer jedoch war der Agonist CAP

notwendig, um Einzelkanalaktivität zu induzieren, die Depolarisation allein war kein adäquater Stimulus. Waren bei  $-80$  mV ausgesprochen selten Kanalöffnungen zu beobachten, so stieg die Offenwahrscheinlichkeit insbesondere für positive Haltepotentiale stark an (Abb.15 u. 16). In vielen *patches* war der Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Membranpotentialen mit dem Auftreten eines zweiten und teilweise dritten Kanalniveaus verbunden. Abb.17A zeigt die Ergebnisse aus Tab.1 noch einmal graphisch dargestellt. Die Mittelwerte der Daten wurden mit einer Boltzmann-Verteilung (Gl.17) angepasst.

$$NP_{open} = 1 / (1 + \exp((E - E_{50})/k)) \quad (17)$$

$NP_{open}$  ist die relative Offenwahrscheinlichkeit,  $E$  das jeweilige Membranpotential,  $E_{50}$  das Potential der halbmaximalen Kanalaktivierung ( $NP_{open} = 0.5$ ) und  $k$  der Steigungsfaktor der Kurve. Die Steilheit der Kurve, beschrieben durch  $k$ , gibt die Änderung des Potentials pro  $e$ -facher Änderung der Offenwahrscheinlichkeit an. Für  $E_{50}$  ergab sich ein Wert von  $78.4 \pm 9.5$  mV,  $k$  wurde mit  $41.4$  mV berechnet, unter der Annahme, daß die maximale  $NP_{open}$  1 ist.

Vergleicht man die Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors in verschiedenen Experimenten, so zeigt es sich, daß die Offenwahrscheinlichkeit bei gleichem Haltepotential erheblich variiert. So konnten für ein Haltepotential von  $80$  mV  $NP_{open}$  zwischen  $0.1$  und  $0.95$  beobachtet werden, der Bereich der Offenwahrscheinlichkeiten bei  $-80$  mV lag zwischen  $0$  und  $0.43$  (eine  $NP_{open}$  von  $0$  erklärt sich dadurch, daß in einigen *patches* bei  $-80$  mV keine Kanalaktivität beobachtet wurde, wohl aber bei  $80$  mV, Abb.17B). Die Werte der relativen Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit von  $-80$  mV nach  $80$  mV für  $23$  Neurone zeigen eine breite Streuung (Abb.17C). Die Kurvenschar in Abb.17C, bei der links die Werte der Offenwahrscheinlichkeit bei  $-80$  mV und rechts die entsprechenden Werte bei  $80$  mV aufgetragen und gleiche Neuronen jeweils durch eine Linie verbunden sind, zeigt durch die unterschiedliche Steilheit der Kurven, daß die Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors in verschiedenen Neuronen mit Depolarisation der Zellmembran unterschiedlich stark zunimmt. Drei der Neurone fallen durch eine relativ hohe Offenwahrscheinlichkeit schon bei  $-80$  mV auf (\*). Eine einheitliche Untergruppe scheinen die Neurone aber nicht darzustellen, die Leitfähigkeiten bei  $-80$  mV betragen für Neuron 1 ( $NP_{open}$   $0.39$ )  $36.9$  pS, für Neuron 2 ( $NP_{open}$   $0.44$ )  $15.9$  pS und für Neuron 3 ( $NP_{open}$   $0.52$ )  $27.5$  pS und decken somit nahezu die gesamte Streubreite der Leitfähigkeiten ab (s.Abschnitt 3.1.5). Eine Desensibilisierung des Capsaicinrezeptors als Ursache der beobachteten Unterschiede der  $NP_{open}$  kann ausgeschlossen werden, da die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals auch während mehrminütiger Registrierungen konstant blieb.

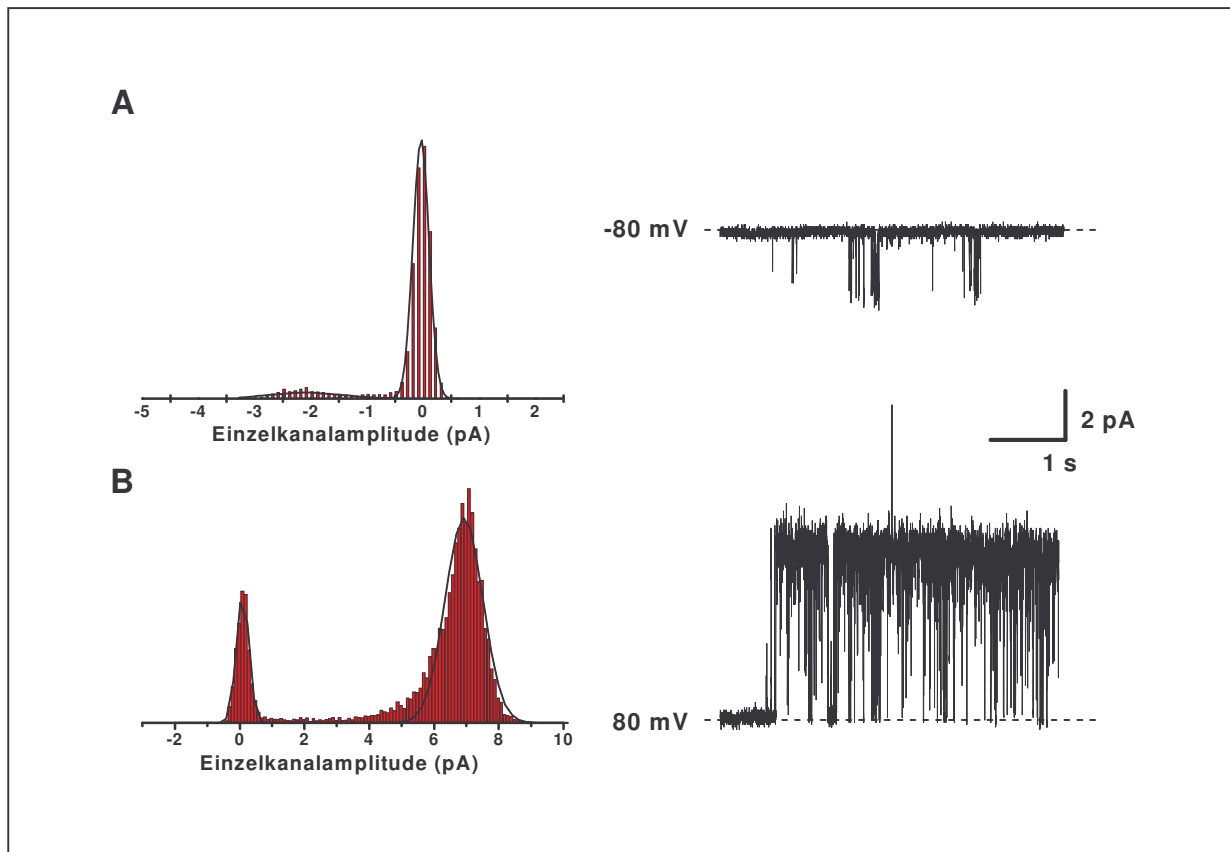


**Abb.17 Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors**

(A) Zunahme der  $NP_{open}$  bei positiven Potentialen. Die Datenpunkte wurden mit einer Boltzmann-Funktion (Gl. 17) angepaßt (rote Linie) (B) Kurvenschar für 23 Neurone, die korrespondierenden  $NP_{open}$  bei  $-80$  mV und  $80$  mV sind durch Linien verbunden. (C) Verteilung der Häufigkeiten des Quotienten aus  $NP_{open}$  bei  $80$  mV und  $-80$  mV. Deutlich wird die unterschiedliche Zunahme der  $NP_{open}$  bei positiven Potentialen in verschiedenen Neuronen.

### 3.1.5 Einzelkanalamplitude und Leitfähigkeit des Capsaicinrezeptors

Die Einzelkanalamplituden des Capsaicinrezeptors wurden durch die Erstellung von „Point-Amplitude-Histogrammen“ mittels eines Computerprogramms (s. Abschnitt 2.1.7, Abb.18) aus *patches* von 29 Neuronen bei  $-80$  mV und 30 Neuronen bei  $80$  mV bestimmt. Aus den gemessenen Amplituden wurde nach Gleichung 3 die Einzelkanalleitfähigkeit errechnet.

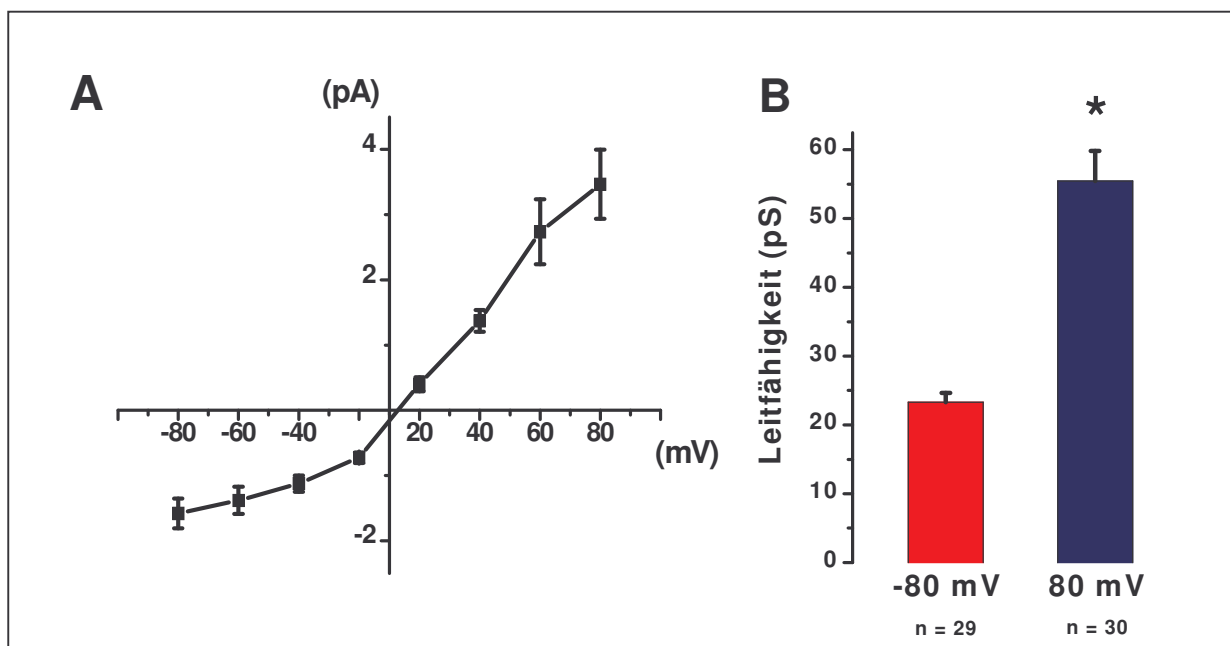


**Abb.18 Einzelkanalamplitude des Capsaicinrezeptors**

(A) Point-Amplitude-Histogramm einer 10 s langen Registrierung eines *outside-out patches* bei  $-80$  mV, nach Anpassung mit einer Gaussfunktion ergibt sich eine Amplitude von  $2.1$  pA, rechts eine Originalregistrierung aus dem gleichen *patch*. (B) wie A, Haltepotential hier  $80$  mV, Amplitude  $6.8$  pA. Badlösung: Ringerlösung, HEPES gepuffert, pH 7.4; Pipettenlösung: CsCl EGTA; Filterfrequenz:  $1$  kHz, Temperatur:  $23$  °C.

Die Häufigkeitsverteilung der Einzelkanalamplituden in den Point-Amplitude-Histogrammen wurde mit einer Gaussfunktion angepasst. Aus Tab. 2 lassen sich die Einzelkanalamplituden und Leitfähigkeiten für die Haltepotentiale  $-80$  mV und  $80$  mV ansehen.

Es zeigte sich, daß der Capsaicinrezeptor deutliche auswärtsgleichrichtende Eigenschaften besitzt, d.h. die Einzelkanalleitfähigkeit steigt mit zunehmend positiveren Membranpotentialen. Graphisch verdeutlicht wird die Auswärtsgleichrichtung in der Strom–Spannungs–Kurve des Capsaicinrezeptors (Abb.19). In *patches* aus 6 Neuronen wurde die Einzelkanalleitfähigkeit für 8 Haltepotentiale zwischen  $-80$  mV und  $80$  mV gemessen. Die Amplitude des Kanals bei  $-80$  mV lag bei  $[1.57\pm 0.22$  pA ( $n = 6$ )]  $1.86\pm 0.1$  pA ( $n = 29$ ), für  $80$  mV konnte eine mittlere Amplitude von  $[3.47\pm 0.52$  pA ( $n = 5$ )]  $4.43\pm 0.35$  pA ( $n = 30$ ) ermittelt werden (in eckigen Klammern die Daten der Neurone aus Abb.19A).



#### Abb. 19 Der Capsaicinrezeptor hat auswärts gleichrichtende Eigenschaften

(A) Strom–Spannungs–Kurve für Capsaicinrezeptor-Einzelkanäle ( $n = 4 - 6$ ). Deutlich zu erkennen die auswärts gleichrichtende Eigenschaft des Kanals mit Einzelkanalamplituden von  $1.57\pm 0.22$  pA ( $n = 6$ ) bei  $-80$  mV und  $3.47\pm 0.52$  pA ( $n = 5$ ) bei  $80$  mV. Die Einzelkanalamplituden wurden mit „Point-Amplitude-Histogrammen“ und die Daten durch eine Gaussfunktion angepaßt. Das Umkehrpotential lag bei  $6.1$  mV. (B) Leitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors bei  $-80$  mV und  $80$  mV (vergl. Tab.2).

Das Umkehrpotential der gemessenen Einzelkanalströme lag bei  $6.1\pm 1.5$  mV ( $n = 5$ ), was bei den gewählten Lösungen die Unselektivität des untersuchten Kanals für monovalente Kationen zeigt.

**Tab. 3 Einzelkanalamplituden und –leitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors**

Haltepotential (mV)	Amplitude (pA)	Leitfähigkeit (pS)	Anzahl (n)
-80	1.9 ± 0.1	23.3 ± 1.3	29
80	4.4 ± 0.4	55.4 ± 4.4	30

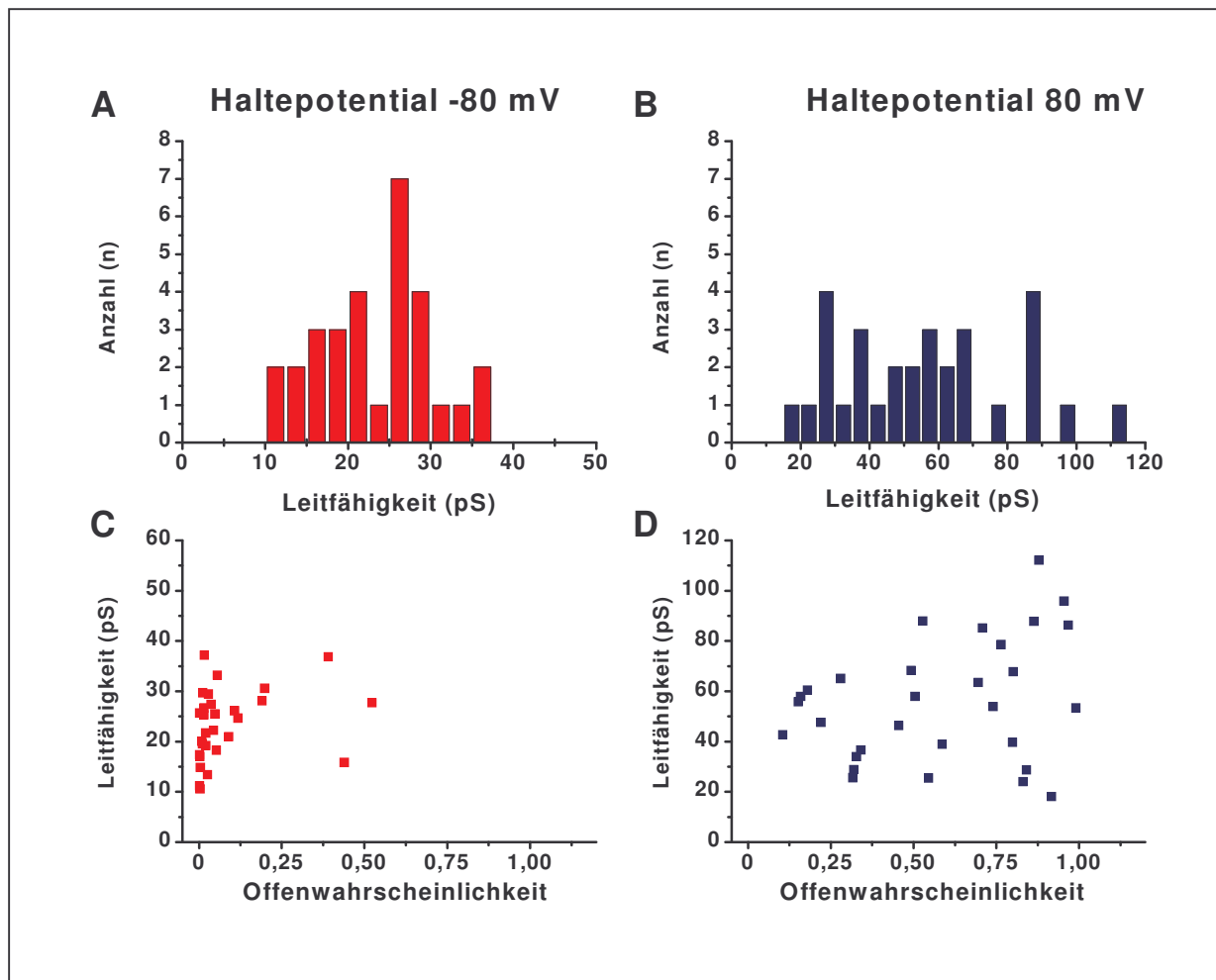
Amplituden und Leitfähigkeiten bei Membranpotentialen von –80 mV und 80 mV, die aus *inside-out* und *outside-out* Registrierungen ermittelt wurden. Die Anzahl der untersuchten Neurone bei –80 mV ist geringer als in Tab.1, da wegen der geringen Offenwahrscheinlichkeit des Kanals Amplituden-Histogramme bei 8 Zellen nicht zu erstellen waren.

Es zeigte sich eine relativ große Streuung der Einzelkanalleitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors. Die kleinste berechnete Leitfähigkeit betrug bei –80 mV 10.6 pS, bei 80 mV 18.2 pS. Maximale Leitfähigkeiten ergaben sich mit 37.2 pS für –80 mV und 112.1 pS für 80 mV. Abb. 22 zeigt die Verteilung der ermittelten Leitfähigkeiten nach Häufigkeit ihres Vorkommens. Es wurden für –80 mV die absoluten Häufigkeiten in 2.5 pS großen Abschnitten gezählt, für 80 mV wurden Abschnitte von 5 pS gewählt. Insbesondere für ein Haltepotential von 80 mV zeigte sich eine sehr inhomogene Verteilung der Leitfähigkeiten, die eine Interpretation im Sinne der Streuung um einen Mittelwert nahezu ausschließt. Auch eine zwei-oder mehrgipflige Verteilung war nicht zu erkennen (Abb.20B). Für –80 mV lässt sich eine Verteilung der Leitfähigkeiten um einen Mittelwert bei 23.3 pS erkennen, aber auch hier ist die Anpassung der Daten mit einer Gauss-Funktion wegen der im Bereich von 22.5-25 pS geringen Anzahl (n) schwierig.

Um zu untersuchen, ob den unterschiedlichen Leitfähigkeiten möglicherweise die Existenz verschiedener Subtypen CAP-aktivierbarer Ionenkanäle in Spinalganglienneuronen zugrunde liegt, wurde in einem weiteren Schritt die Leitfähigkeit gegen die ebenfalls variierende mittlere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals aus dem entsprechenden *patch* aufgetragen (Abb. 20C u. D). Es ließ sich kein eindeutiges *clustering* (Kumulation der Datenpunkte in zwei unterscheidbaren Gruppen) erkennen und damit keine Zuordnung bestimmter Leitfähigkeiten zu korrespondierenden Offenwahrscheinlichkeiten machen. Daher kann man anhand dieses Vergleiches nicht von mehreren klar abgrenzbaren Kanaltypen ausgehen.

Weiterhin wurden die Offenwahrscheinlichkeiten des untersuchten Kanals in der *inside-out* Konfiguration einerseits und in der *outside-out* Konfiguration andererseits gegenübergestellt.





**Abb. 20** Verteilung der Leitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors

(A) und (B) zeigen die absoluten Häufigkeiten der gemessenen Leitfähigkeiten ( $n = 30$ ). Zu erkennen ist die inhomogene Verteilung bei einem Haltepotential von 80 mV, bei  $-80$  mV kann man eine Streuung der Werte um einen Mittelwerte vermuten (Intervalle:  $-80$  mV: 2,5 pS (A); 80 mV: 5 pS (B)). In (C) und (D) dargestellt ist die korrespondierende Beziehung von Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit für Haltepotentiale von  $-80$  mV bzw. 80 mV ( $n = 30$ ).

Es zeigte sich, daß sich die Offenwahrscheinlichkeiten, die in den unterschiedlichen Konfigurationen gemessen wurden, sowohl bei einem Haltepotential von  $-80$  mV als auch bei 80 mV nicht signifikant unterscheiden (Tab.3; Abb.21). Untersucht man hingegen die Einzelkanalleitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors in *inside-out* und *outside-out* Registrierungen getrennt, so fällt auf, daß sich für diesen Parameter durchaus signifikante Unterschiede zwischen den beiden Konfigurationen ergeben.

Tab. 4 Offenwahrscheinlichkeiten in der *inside-out* und *outside-out* Konfiguration

Haltepotential (mV)	NP <sub>open</sub> <i>inside-out</i>	Anzahl (n)	NP <sub>open</sub> <i>outside-out</i>	Anzahl (n)
-80	0.06 ± 0.01	79	0.05 ± 0.01	28
80	0.49 ± 0.03	67	0.55 ± 0.05	36

Die Unterschiede der Offenwahrscheinlichkeiten in den verschiedenen Konfigurationen waren nicht signifikant ( $p > 0.05$ , *t*-Test für 2 unabhängige Populationen).

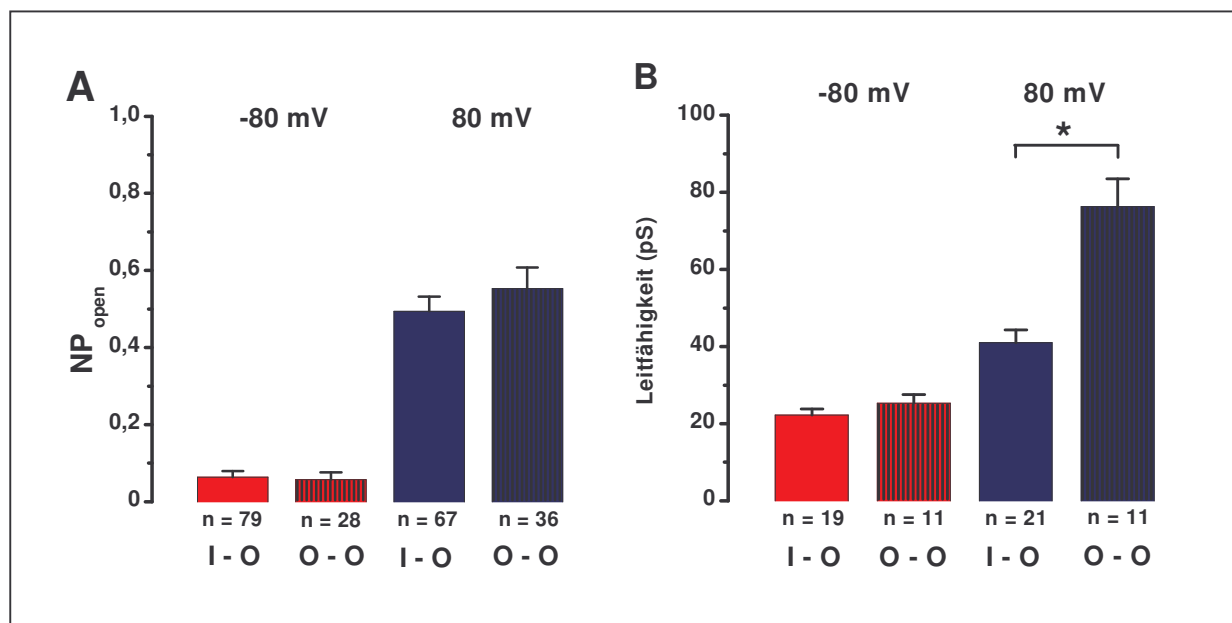


Abb. 21 Offenwahrscheinlichkeiten und Leitfähigkeiten in verschiedenen Konfigurationen

(A) Die Offenwahrscheinlichkeiten des Capsaicinrezeptors in *inside-out* (I-O) und *outside-out* (O-O) patches unterscheiden sich weder bei -80 mV noch bei 80 mV signifikant. (B) zeigt, daß bei 80 mV die Leitfähigkeit in der *outside-out* (O-O) Konfiguration signifikant größer als in *inside-out* (I-O) patches ist.

Bei einem Haltepotential von 80 mV ist die mittlere Leitfähigkeit des Kanals im *outside-out* patch nahezu doppelt so groß wie in der *inside-out* Konfiguration, während bei einem Haltepotential von -80 mV nur eine geringer, nicht signifikanter Unterschied besteht (Tab.5; Abb.21).

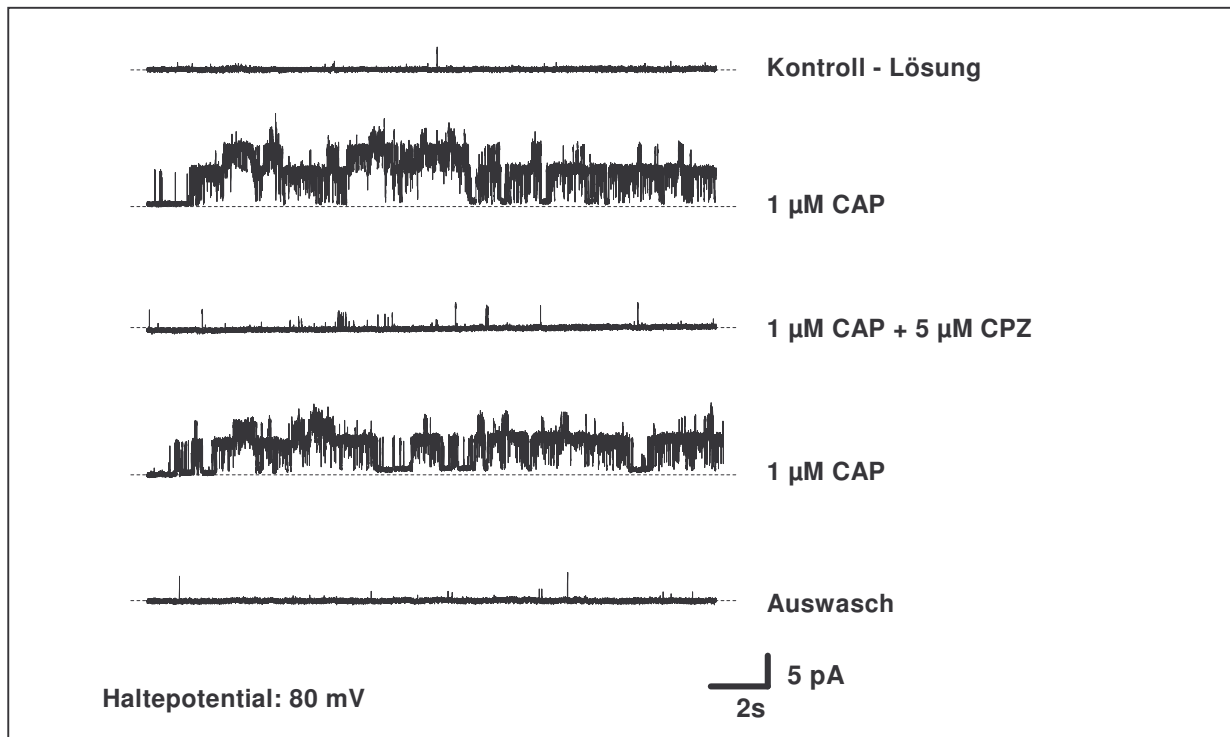
**Tab. 5 Leitfähigkeiten in der *inside-out* und *outside-out* Konfiguration**

Haltepotential (mV)	Leitfähigkeit (pS) <i>inside-out</i>	Anzahl (n)	Leitfähigkeit (pS) <i>outside-out</i>	Anzahl (n)
-80	22.3 ± 1.5	19	25.3 ± 2.2	11
80	40.9 ± 3.3	21	76.2 ± 7.2	11

Bei einem Haltepotential von 80 mV war der Unterschied der Leitfähigkeiten signifikant ( $p < 0.05$ ,  $t$ -Test für 2 unabhängige Populationen). Die Leitfähigkeiten bei  $-80$  mV unterschieden sich hingegen nicht signifikant.

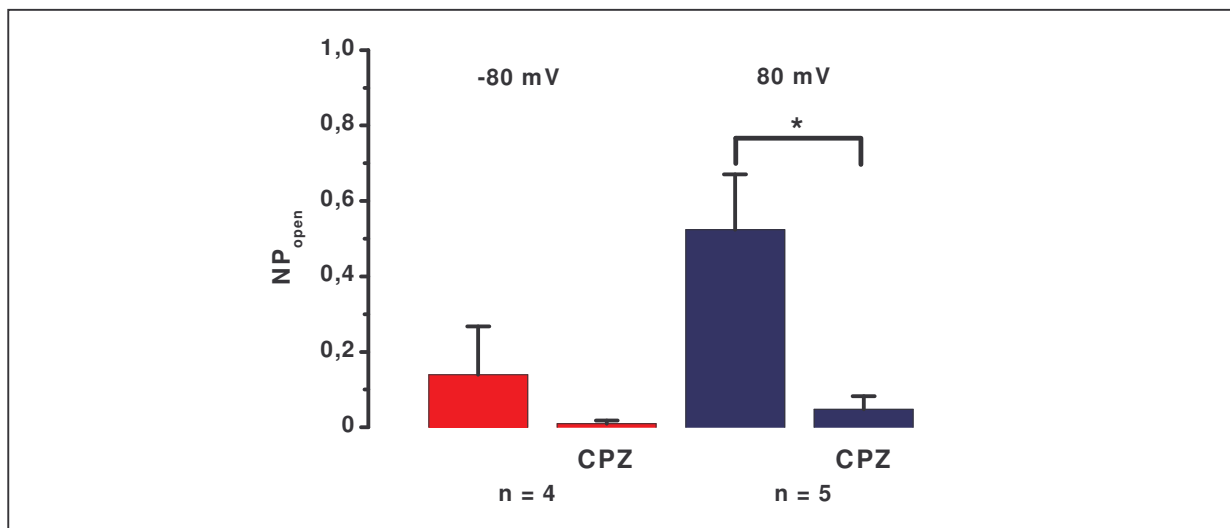
### 3.1.6 Capsazepin blockiert die Capsaicinrezeptor-Einzelkanalaktivität

Die Sensitivität des Capsaicinrezeptors gegenüber dem kompetitiven Antagonisten Capsazepin (CPZ) ist als eine wichtige pharmakologische Eigenschaft heterolog exprimierter Vanilloidrezeptoren (Caterina *et al.*, 1997) und nativer Capsaicinrezeptoren in akut dissoziierten und kultivierten Neuronen des Spinalganglions (Oh *et al.*, 1996) beschrieben. Daher sollte untersucht werden, ob die Blockade der Capsaicinrezeptoren auch für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Präparat, die Dünnschnittpräparation, nachzuweisen ist. Es wurden CAP aktivierte Einzelkanäle in *inside-out patches* bei Haltepotentialen von  $-80$  mV und  $80$  mV auf ihre Sensitivität gegenüber CPZ nach folgendem Protokoll untersucht: zuerst wurde CAP in  $1 \mu\text{M}$  Konzentration von der Badseite für mindestens  $2$  min appliziert. Anschließend erfolgte der zusätzliche Einwasch des Antagonisten CPZ in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$ . Um die Reversibilität der Blockade zu untersuchen, wurde CPZ im nächsten Schritt bei weiterer CAP Applikation wieder ausgewaschen. Dieses Protokoll wurde sowohl für ein Haltepotential von  $-80$  mV als für  $80$  mV angewendet. Abb. 22 zeigt den Effekt von CPZ auf CAP aktivierte Einzelkanäle in *inside-out patches* der Dünnschnittpräparation. In allen untersuchten *patches* ( $n = 4$ ,  $-80$  mV;  $n = 5$ ,  $80$  mV) ließ sich die durch  $1 \mu\text{M}$  CAP ausgelöste Einzelkanalaktivität durch Applikation von  $5 \mu\text{M}$  CPZ reversibel hemmen. Dabei sank die mittlere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ( $\text{NP}_{\text{open}}$ ) unter CPZ bei einem Haltepotential von  $-80$  mV von  $0.14 \pm 0.12$  ( $n = 4$ ) auf  $0.01 \pm 0.01$  ( $n = 4$ ), für ein Haltepotential von  $80$  mV ergab sich eine Reduktion von  $0.52 \pm 0.14$  ( $n = 5$ ) auf  $0.04 \pm 0.03$  ( $n = 5$ , Abb.23).



**Abb. 22 Reversible Blockade CAP-aktivierter Einzelkanäle durch Capsazepin**

Gezeigt ist die Registrierung von einem *inside-out patch*. Man erkennt die blockierende Wirkung von CPZ auf CAP-aktivierte Kanäle, die im Auswasch reversibel ist. Badlösung: CsCl EGTA; Pipette: Ringerlösung, HEPES gepuffert, pH 7.4; Filterfrequenz: 1 kHz, Temperatur: 23 °C.



**Abb. 23 Effekt von Capsazepin auf CAP-aktivierte Einzelkanäle**

Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit in der *inside-out* Konfiguration durch 5 µM CPZ. Rot: Wirkung bei -80 mV, hier sank die Offenwahrscheinlichkeit unter CPZ von  $0.14 \pm 0.12$  auf  $0.01 \pm 0.01$  (n = 4). Blau: Effekt von CPZ bei 80 mV; es kam zu einer Reduktion der NP<sub>open</sub> von  $0.52 \pm 0.14$  auf  $0.04 \pm 0.03$  (n = 5, -80 mV nicht signifikant, 80 mV signifikant, *t*-Test paarweise,  $p < 0.05$ )

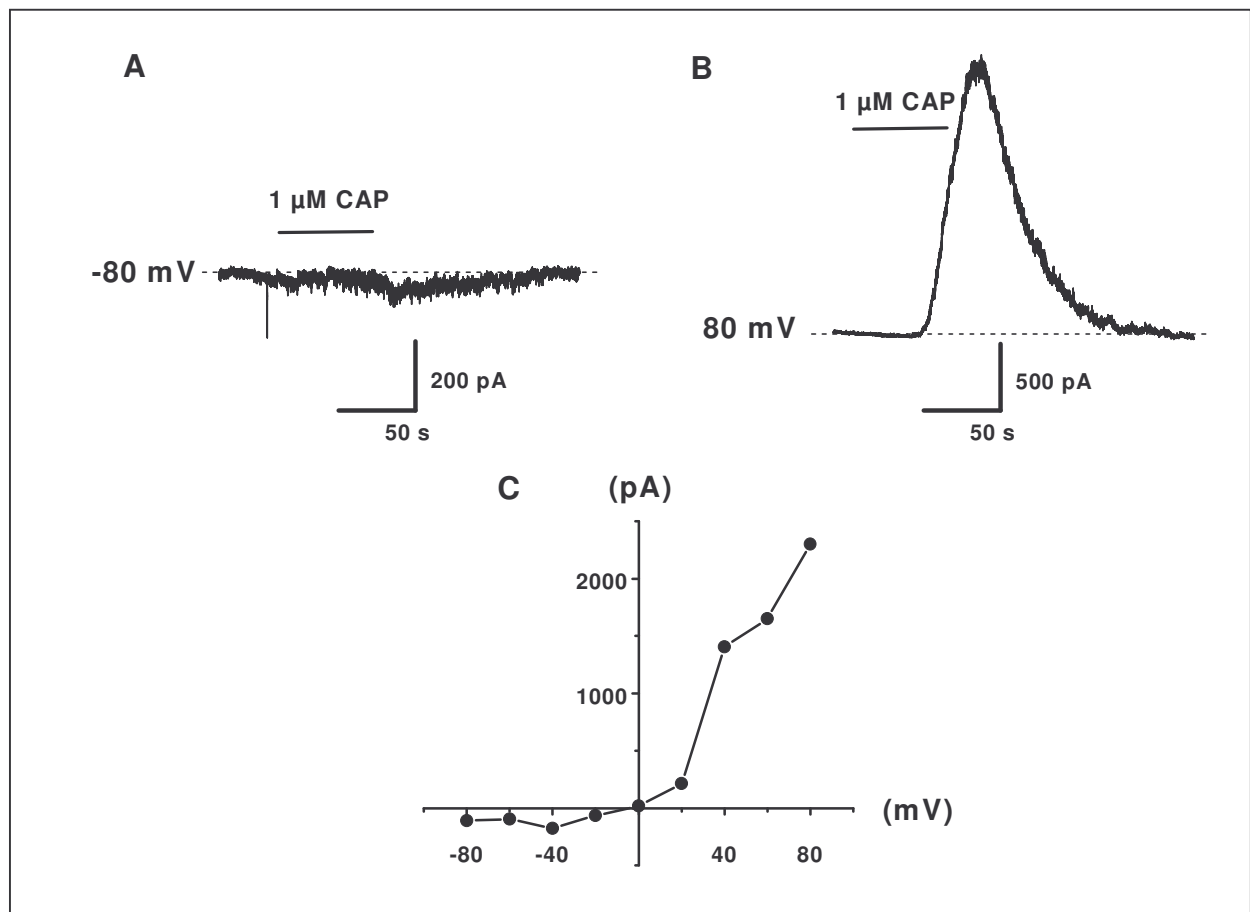
### 3.1.7 Eigenschaften Capsaicin induzierter Ganzzellströme bei unterschiedlichen Haltepotentialen

Um zu untersuchen, ob die auf Einzelkanalebene in zellfreien *patches* beobachteten Phänomene der höheren Offenwahrscheinlichkeit und der Auswärtsgleichrichtung bei positiven Haltepotentialen auch im Ganzzellstrom eines CAP-sensitiven Neurons zu beobachten sind, wurden Ableitungen von CAP-aktivierten Strömen in der *whole-cell* Konfiguration bei verschiedenen Haltepotentialen gemacht. Um bei Haltepotentialen positiv zu  $-80$  mV eine Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle zu verhindern, wurde Kalium in der Pipettenlösung durch Cäsium ersetzt. Zuerst wurde CAP ( $1\mu\text{M}$ ) von der extrazellulären Seite über das Badperfusionssystem appliziert und der induzierte Einwärtsstrom bei einem Haltepotential von  $-80$  mV gemessen. Nach dem Auswaschen von CAP (mindestens 20 min) wurde in einem zweiten Schritt die gleiche Zelle bei einem Membranpotential von  $80$  mV gehalten. Trotz der Substitution von Kalium durch Cäsium in der intrazellulären Lösung kam es in einigen Experimenten nach Einstellung des Membranpotentials von  $80$  mV zur Aktivierung eines Auswärtsstromes, der aber innerhalb kurzer Zeit inaktivierte. Erst nach Inaktivierung dieses spannungsabhängigen Auswärtsstroms und Erreichen eines Gleichgewichtes des Haltestromes wurde erneut CAP ( $1\mu\text{M}$ ) appliziert und der resultierende Auswärtsstrom bei  $80$  mV gemessen. Diese Reihenfolge wurde gewählt, da für CAP-induzierte Ströme eine Tachyphylaxie bei wiederholter Applikation beschrieben ist (Szallasi & Blumberg, 1999), die jedoch bei positiven Membranpotentialen als sehr viel geringer ausgeprägt beschrieben wird (Piper *et al.*, 1999). Interessanterweise wurde die erwähnte Tachyphylaxie in der vorliegenden Arbeit aber auch bei einem Haltepotential von  $80$  mV beobachtet. Um den Einfluß der wiederholten Applikation von CAP auf die Spitzenstromamplitude zu minimieren, wurde ein Intervall von 20 Minuten zwischen den Applikationen gewählt. Zum Erstellen einer Strom-Spannungs-Kurve für die Ganzzellströme wurde von Neuronen die Stromantworten auf CAP-Applikation bei verschiedenen Haltepotentialen zwischen  $-80$  mV und  $80$  mV gemessen.

Wie erwartet, zeigte sich bei einem Haltepotential von  $80$  mV ein um ein Vielfaches größerer CAP-induzierter Strom als bei  $-80$  mV (Abb.24A u. B). Während bei  $-80$  mV die mediane Stromantwort  $54$  pA ( $n = 86$ ) betrug, betrug bei  $80$  mV der Median der Amplitude  $1855$  pA ( $n = 10$ , Abb.24C u. D).

Exemplarisch an 2 Neuronen bei einem Haltepotential von  $80$  mV und an einem Neuron bei  $60$  mV wurde untersucht, ob sich die für capsaicininduzierte Ganzzellströme beschriebene

Tachyphylaxie auch bei den genannten Haltepotentialen beobachten lässt. Nach der ersten Applikation von CAP wurde nach dem Auswasch in einem Intervall von 10 min erneut CAP appliziert. Bei 80 mV betrug die mittlere maximale Amplitude  $1855 \pm 15$  pA ( $n = 2$ ), die zweite Applikation führte zu einer deutlich reduzierten Spitzenstromamplitude von  $852.5 \pm 107.5$  pA ( $n = 2$ ), was einer Reduktion auf 45.9 % entspricht. Noch größer war die Differenz der Stromamplitude zwischen erster und zweiter CAP-Applikation bei einem Haltepotential von 60 mV. Das untersuchte Neuron reagierte auf die erste Applikation mit einem Strom von 1650 pA, die erneute Messung nach 10 min zeigte eine Verringerung der Amplitude auf 105 pA (6.3 %).



**Abb. 24 Spannungsabhängigkeit des CAP-induzierten Ganzzellstroms**

(A) Durch 1 μM CAP aktivierbarer Einwärtsstrom eines Neurons in der *whole-cell* Konfiguration bei einem Haltepotential von -80 mV. (B) Dieselbe Zelle bei einem Haltepotential von 80 mV. Zu erkennen ist, daß die Stromantwort deutlich größer ausfällt, als bei -80 mV. Bad: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipette: CsCl 3EGTA, Filterfrequenz 5 kHz, Temperatur: 23°C. (C) Strom-Spannungs-Kurve für CAP aktivierte Ganzzellströme. Aufgetragen ist die maximale Amplitude des Ganzzellstroms gegen das jeweilige Haltepotential ( $n = 7$ ).

**Tab. 6 Amplituden CAP-induzierter Ganzzellströme bei negativem und positivem Haltepotential**

Haltepotential (mV)	Amplitude (Median, pA)	Anzahl (n)
-80	54	86
80	1855	10

### 3.1.8 Wirkung von Capsaicin auf Aktionspotentiale in sensorischen Neuronen

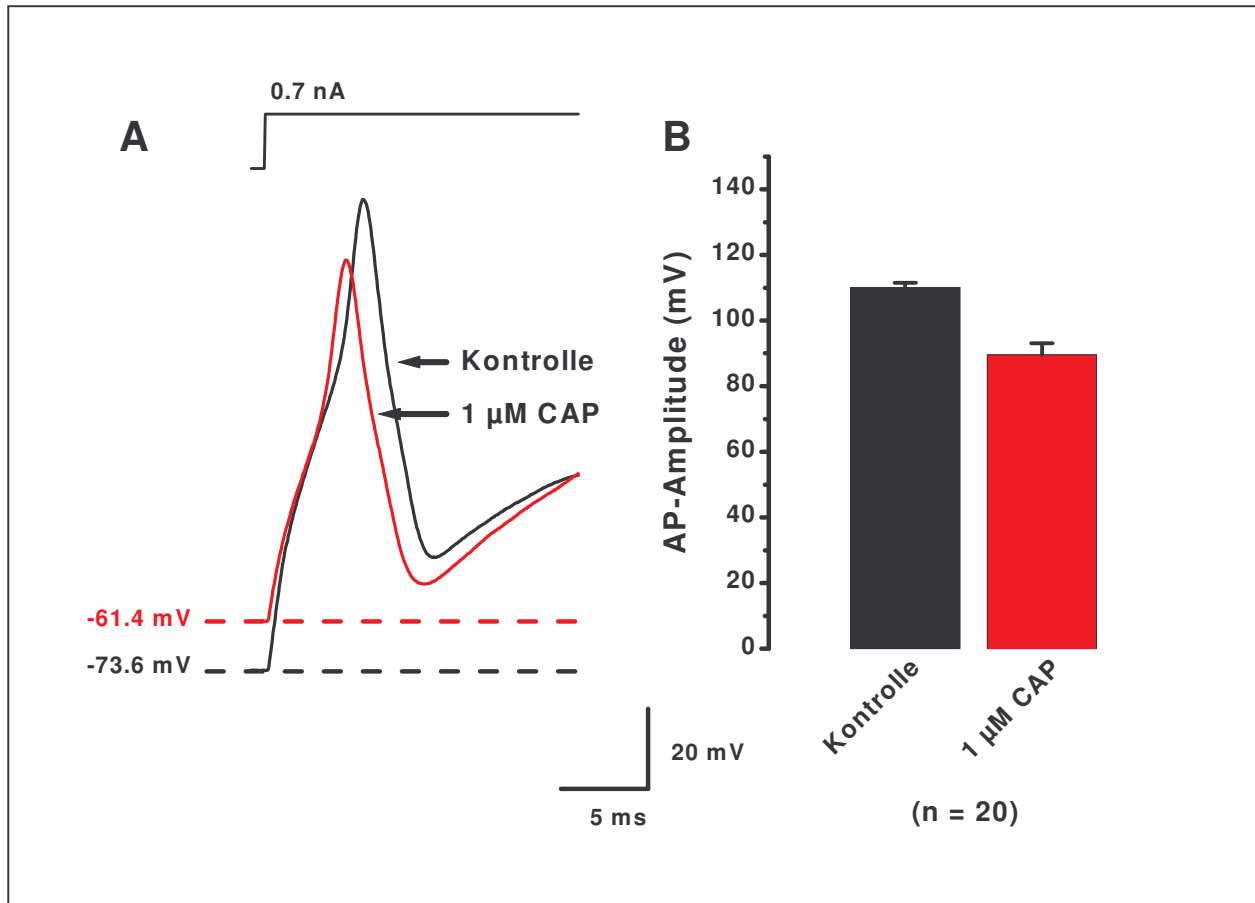
Die Wirkung von CAP auf Amplitude und Dauer von Aktionspotentialen wurde an insgesamt 26 primär sensorischen Neuronen untersucht. Hierfür wurden die Neurone im *current-clamp* Modus durch 12 aufeinanderfolgende, 40 ms lange Strominjektionen steigender Stärke zur Generierung von Aktionspotentialen stimuliert. Zunächst wurden Aktionspotentiale in Ringer-Kontrollösung registriert, anschließend CAP-haltige Lösung (1 $\mu$ M) über das Perfusionssystem appliziert und nach 2 Minuten erneut Aktionspotentiale ausgelöst. 25 Neurone reagierten auf die Applikation von CAP mit einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials von  $-68.2 \pm 1.4$  mV nach  $-53.7 \pm 2.7$  mV. Bei einem Neuron hingegen löste CAP eine Hyperpolarisation von  $-62$  mV nach  $-71$  mV aus. Dieser Effekt war nicht reversibel, so daß es sich hier wahrscheinlich um ein CAP-insensitives Neuron handelt.

Die Aktionspotentialamplitude nahm bei 20 der 26 untersuchten Neurone von  $110.1 \pm 1.4$  mV um  $20.5 \pm 3.2$  mV ab (Abb.25). Alle 20 Neurone gehörten zu der Gruppe von Neuronen, bei denen es zu einer Depolarisation nach CAP-Applikation kam.

Bei 3 Neuronen führte CAP zu einer Zunahme der Aktionspotentialamplitude um  $5.4 \pm 2.8$  mV, die durchschnittliche Amplitude in Kontrollösung betrug bei dieser Gruppe  $104.7 \pm 3.9$  mV. Bei 3 weiteren Neuronen ließ sich während der CAP-Applikation kein Aktionspotential auslösen. In einem Fall war dieses Ereignis nach dem Auswasch von CAP irreversibel.

Die durchschnittliche Aktionspotentialdauer in Kontrollösung (gemessen bei halbmaximaler Amplitude) betrug  $4.3 \pm 0.2$  ms (n = 23). Auch bezüglich der Aktionspotentialdauer ließen sich 3 Gruppen unterscheiden. Bei 11 Neuronen nahm die Aktionspotentialdauer um  $0.5 \pm 0.1$  ms ab, in 9 Fällen kam es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials um  $1.4 \pm 0.4$  ms. 3 Neurone zeigten keine Veränderung der Aktionspotentialdauer unter dem Einfluß von CAP.

Eine Korrelation von Änderung der Aktionspotentialamplitude und Änderung der Aktionspotentialdauer ergab sich nicht.



**Abb. 25 Capsaicin reduziert die Aktionspotentialamplitude sensorischer Neurone**

(A) Originalregistrierung von Aktionspotentialen eines sensorischen Neurons in Kontrolllösung und während der Applikation von CAP (1 μM). Es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran und zur Abnahme der Aktionspotentialamplitude. Bad: Standard Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High K<sub>i</sub>, 3 EGTA, Filterfrequenz 5 kHz, Temperatur: 23°C.

(B) Reduktion der mittleren Aktionspotentialamplitude in der Gegenwart von CAP (1 μM).



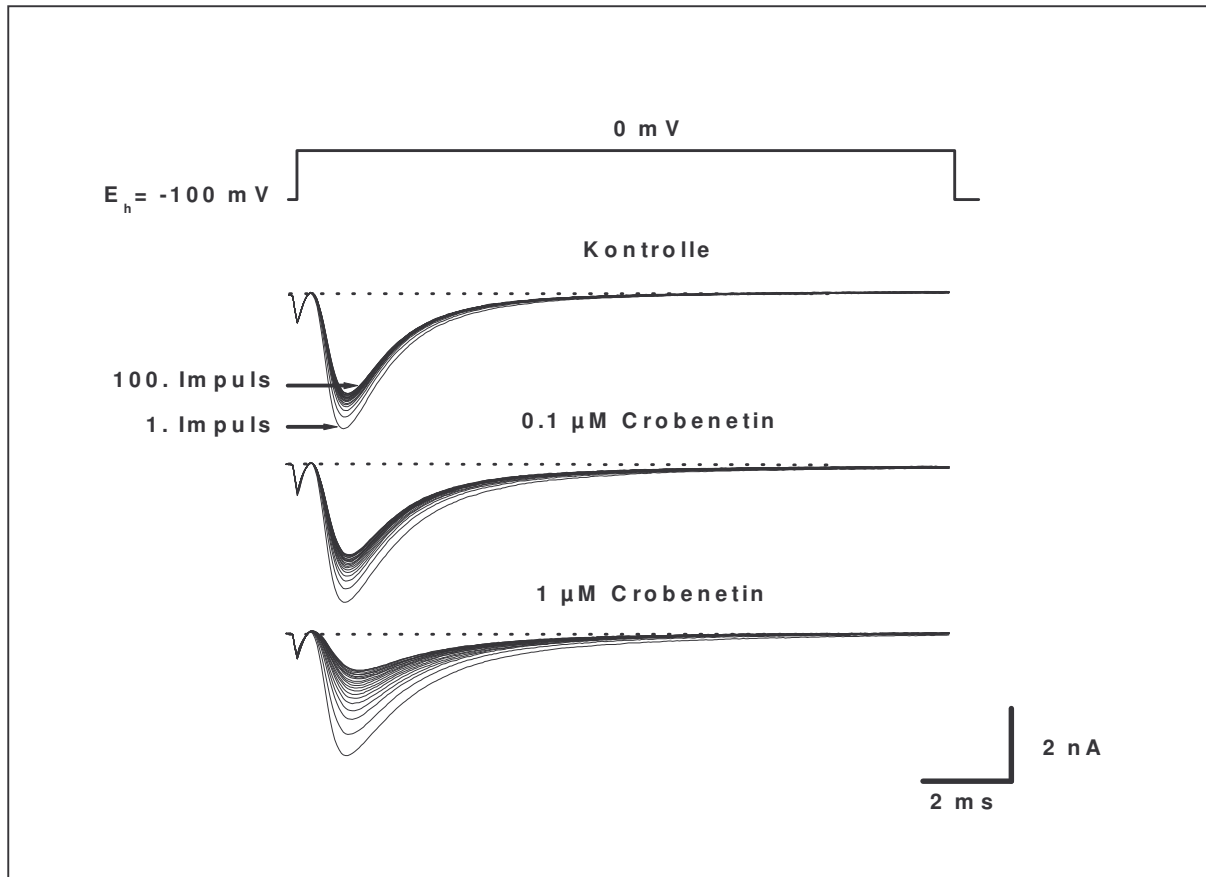
### **3.2 Die Wirkung des Natriumkanalblockers Crobenetin (BIII 890 CL) auf Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle primär sensorischer Neurone**

#### **3.2.1 Benutzungabhängig Blockade TTX-resistenter Natriumströme**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit dem TTX-resistenten (TTXr) Natriumkanal ein anderer, an der Weiterleitung von Schmerzinformationen beteiligter Ionenkanal untersucht. Wie der Capsaicinrezeptor kommt der TTXr Natriumkanal vor allem auf sensorischen Neuronen kleinen Durchmessers vor. Im Gegensatz zum Capsaicinrezeptor handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kanal, der keiner anderen Liganden bedarf, um aktiviert zu werden (s. Abschnitt 1.3.5). Da eine Beteiligung TTXr Natriumströme an der Entstehung und Weiterleitung akuter und chronischer Schmerzen sehr wahrscheinlich ist, besteht starkes Interesse an der Entwicklung von Pharmaka, die TTXr Natriumströme selektiv inhibieren, ohne andere sensorische Modalitäten, motorische oder kardiale Funktionen zu beeinträchtigen. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die von der Firma Boehringer Ingelheim als Neuroprotektivum entwickelte Substanz Crobenetin (früher: BIII 890 CL) in der Lage ist, TTXr Natriumströme zu blockieren.

Es wurden *voltage-clamp* Experimente in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt. Um einen Beitrag von TTX-sensitiven (TTXs) Natriumströmen zum Ganzzell-Natriumstrom auszuschließen, wurden alle Experimente in Gegenwart von 300 nM TTX in der Badlösung durchgeführt. Zusätzlich enthielt die extrazelluläre Lösung 200  $\mu$ M CdCl zur Inhibition spannungsabhängiger Calciumkanäle. Die Pipettenlösung enthielt CsF. Cäsium blockiert spannungsabhängige Kaliumkanäle, Fluorid wurde wie Cadmium zur Hemmung von Calciumkanälen eingesetzt (s. Abschnitt 2.1.2). Um möglichst alle TTXr Natriumkanäle vor dem aktivierenden Testpuls in den ruhenden, geschlossenen Zustand (s. Abschnitt 1.3.1) zu bringen, wurde für diesen Teil der Arbeit ein Haltepotential von  $-100$  mV gewählt. Von diesem Potential wurde der TTXr Natriumstrom durch einen 15 ms dauernden depolarisierenden Testimpuls nach 0 mV aktiviert. In einem ersten Versuchsprotokoll wurden 100 dieser Testpulse nacheinander mit einer Frequenz von 5 Hz appliziert. Die repetitive Stimulation wurde durchgeführt, um für den Fall einer Blockade des TTXr Natriumstromes durch Crobenetin eine mögliche Benutzungabhängigkeit (*use-dependence*) dieser Hemmung zu untersuchen. Erwartet wurde ein benutzungsabhängiger Block, da für Crobenetin eine benutzungsabhängige Blockade TTXs Natriumkanäle beschrieben ist und die Substanz

außerdem mit der Lokalanästhetikabindungsstelle des Natriumkanals reagiert (Carter *et al.*, 2000).



#### Abb.26 Wirkung von Crobenetin auf TTX-resistente Natriumströme

Originalregistrierungen TTXr Natriumströme, die durch steigende Konzentrationen von Crobenetin blockiert werden. Das Pulsprotokoll bestand aus 15 ms dauernden, aufeinanderfolgenden Spannungssprüngen (100) von  $-100 \text{ mV}$  nach  $0 \text{ mV}$  mit einer Frequenz von 5 Hz. Abgebildet ist nur jede fünfte Stromantwort auf den entsprechenden Impuls, der unspezifische Leckstrom wurde subtrahiert. Betrachtet man die Stromantwort auf den jeweils 100. Puls, erkennt man deutlich bereits unter Kontrollbedingungen eine intrinsische benutzungsabhängige Blockade, d.h. die maximale Amplitude der 100. Antwort ist bei gleicher Impulsstärke geringer. Dieser Effekt verstärkt sich in Gegenwart von Crobenetin.

Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, 300 nM TTX, 200  $\mu\text{M}$  Cd; Pipettenlösung: CsF; Filterfrequenz: 5 kHz, Temperatur: 23°C.

Zur Subtraktion des unspezifischen Leckstromes wurden im Anschluß an jede Messung 5 hyperpolarisierende Spannungssprünge von ebenfalls 15 ms Dauer nach  $-120 \text{ mV}$

durchgeführt, der gemessene Strom gemittelt und von dem bei 0 mV erhaltenen Wert nach entsprechender Skalierung abgezogen.

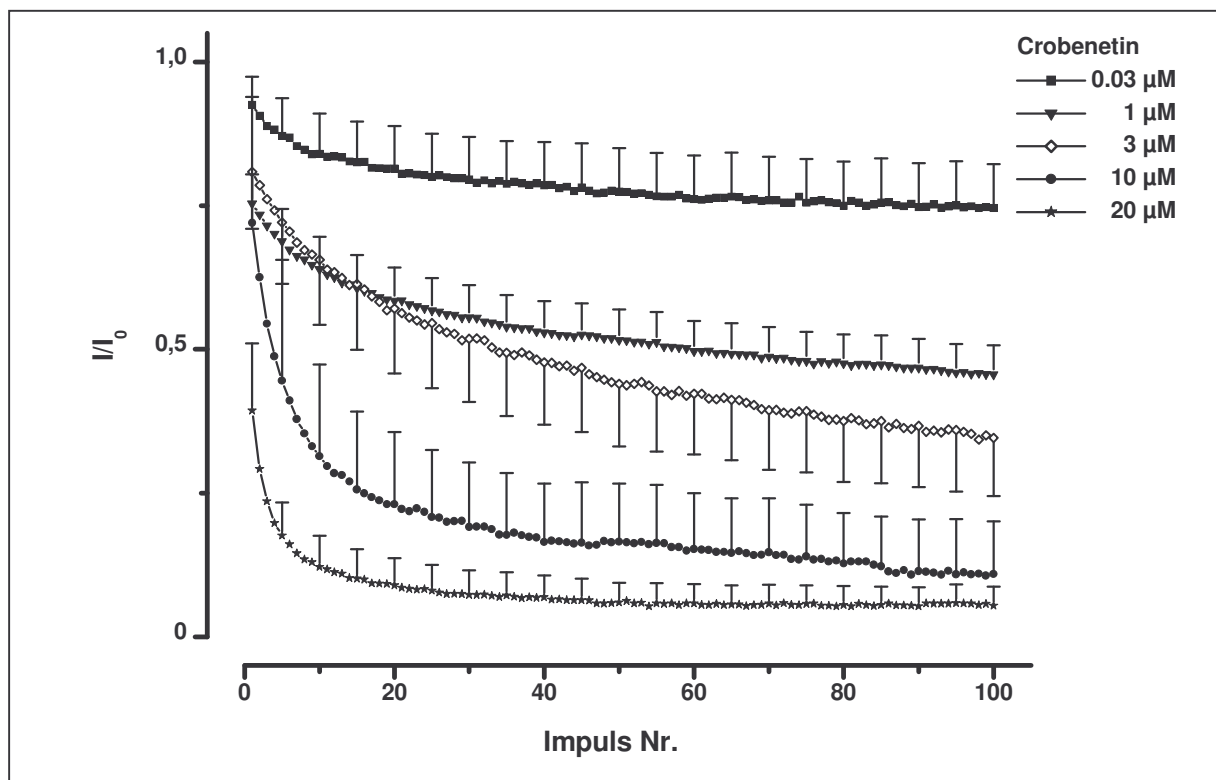
**Tab. 7 Relative Stromamplituden TTX-resistenter Natriumströme in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Crobenetin**

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	$I/I_0$ 1. Impuls	$I/I_0$ 100. Impuls	Anzahl (n)
<b>0.03</b>	$0.93 \pm 0.05$	$0.74 \pm 0.07$	14
<b>0.1</b>	$0.91 \pm 0.04$	$0.75 \pm 0.04$	30
<b>0.3</b>	$0.93 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.03$	27
<b>1</b>	$0.75 \pm 0.05$	$0.45 \pm 0.05$	20
<b>3</b>	$0.81 \pm 0.09$	$0.34 \pm 0.1$	8
<b>10</b>	$0.71 \pm 0.22$	$0.11 \pm 0.09$	3
<b>20</b>	$0.39 \pm 0.11$	$0.05 \pm 0.03$	5

Mit dem oben beschriebenen Protokoll wurde die Wirkung von Crobenetin auf TTX-resistente Natriumströme an 95 Neuronen untersucht. Da TTXr Natriumkanäle vornehmlich auf primär sensorischen Neuronen kleinen und mittleren Durchmessers (Somata der schmerzleitenden C- und A $\delta$ -Fasern) vorkommen, wurden nur solche Zellen für die Experimente ausgewählt (Durchmesser: 15 – 25  $\mu\text{m}$ ). Nach dem Herstellen der *whole-cell* Konfiguration wurden die Neurone für mindestens 3 Minuten bei einem Haltepotential von –100 mV gehalten, um alle TTXr Natriumkanäle in den geschlossenen, aktivierbaren Zustand zu bringen. Aus Vorexperimenten war bekannt, daß sich ein Teil der TTXr Natriumkanäle bereits in inaktiviertem Zustand befindet, wenn man das Experiment beginnt, ohne die Neurone einige Minuten bei einem Membranpotential von –100 mV zu halten. Der TTXr Ganzzellstrom wurde unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit steigenden Konzentrationen von Crobenetin gemessen. Für jeden der 100 Impulse wurde die maximale Amplitude der Stromantwort ausgemessen und daraus der unter Crobenetin verbleibende relative Reststrom nach der Formel

$$I_{rel} = I_{Crobene\text{tin}} / I_0 \quad (18)$$

berechnet.  $I_{rel}$  ist der relativ verbleibende Strom,  $I_{Crobene\text{tin}}$  die absolute Stromamplitude in Gegenwart der Testsubstanz und  $I_0$  die Stromamplitude unter Kontrollbedingungen. Aus den so gewonnenen Werten konnte für den jeweils ersten Impuls in Crobenetin die sogenannte tonische Blockade, für den 100. Puls die phasische (benutzungsabhängige) Hemmung ermittelt werden. Der in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Crobenetin relativ verbleibende Strom wurde gegen die Impulsnummer aufgetragen (Abb.27). Die relativen Werte wurden berechnet, indem für die unterschiedlichen Konzentrationen die Amplitude bei einem bestimmten Impuls durch die Amplitude des korrespondierenden Impulses unter Kontrollbedingungen dividiert wurde. Aus Abb. 27 ersieht man, daß bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vor allem die phasische Blockade dominiert, die halbmaximale Hemmkonzentration für die tonische Blockade liegt bei 17.4  $\mu\text{M}$  (s Abschnitt 3.2.3).



**Abb. 27 Verlauf der Blockade TTX-resistenter Natriumströme durch Crobenetin**

Abgebildet sind die Mittelwerte der relativen Stromamplituden für 5 verschiedene Konzentrationen. Die Anzahl der für jede Konzentration untersuchten Neurone entnimmt man Tabelle 7 ( $n = 3 - 20$ ). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur jeder fünfte Fehlerbalken abgebildet. Erkennbar ist die ausgeprägte phasische Hemmung vor allem im Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ .

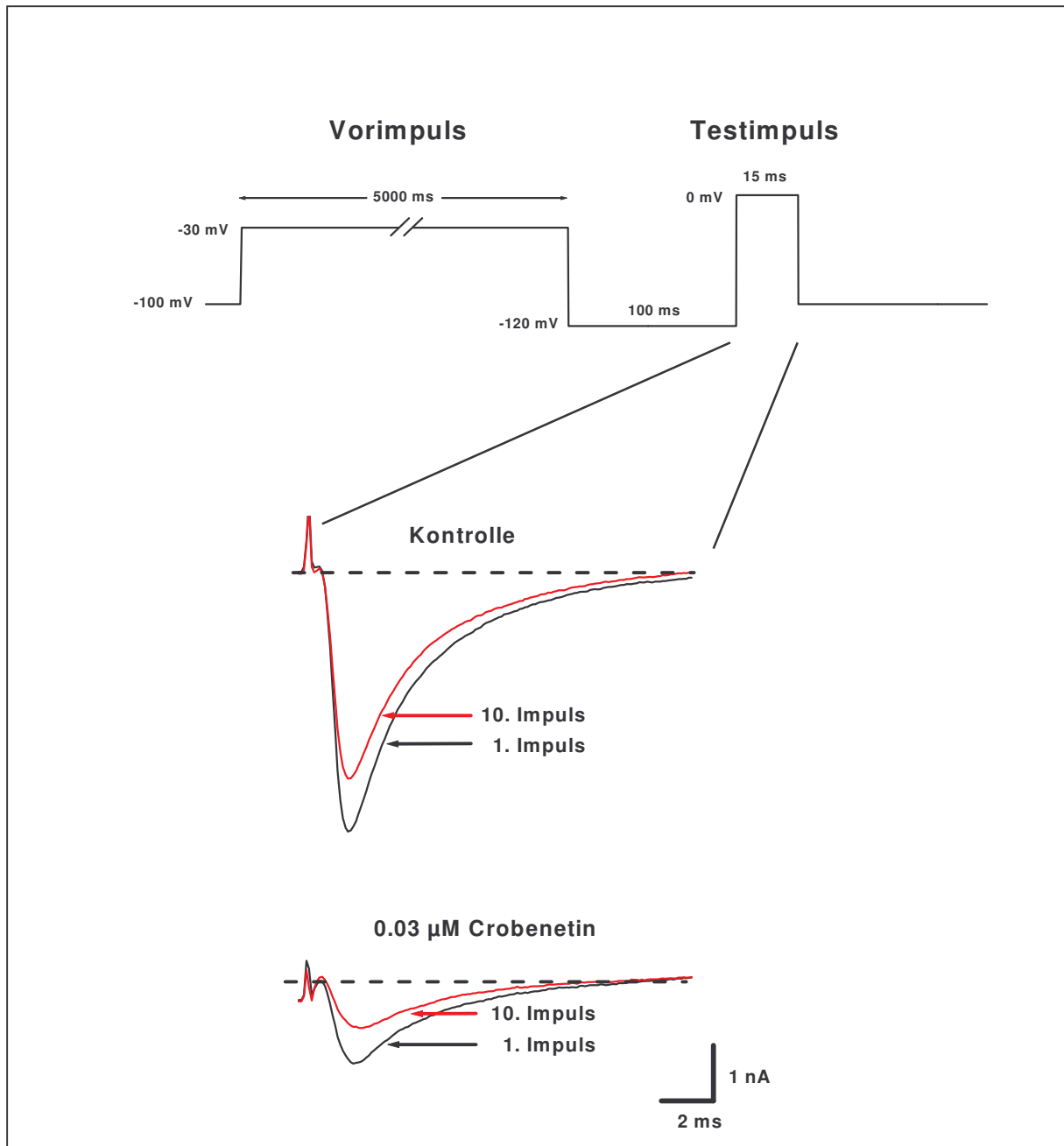
### 3.2.2 Crobenetin bindet hochaffin an inaktivierte TTX-resistente Natriumkanäle

Um zu untersuchen, ob Crobenetin den inaktivierten Zustand des TTXr Natriumkanals für seine Bindung bevorzugt, wie es für TTXs Typ IIA Natriumkanäle beschrieben ist (Carter *et al.*, 2000) und die gezeigte benutzungsabhängige Blockade vermuten läßt, wurde ein Impulsprotokoll verwendet, das vor dem eigentlichen Testpuls einen 5 s dauernden, depolarisierenden Vorimpuls vom Haltepotential  $-100$  mV nach  $-30$  mV appliziert. Bei einem Membranpotential von  $-30$  mV wird ein Großteil der TTXr Natriumkanäle nach einer transienten Aktivierung in den inaktiven Zustand überführt. Nach dem depolarisierenden Vorimpuls wurde die Zelle für 100 ms bei  $-120$  mV gehalten um den Natriumkanälen eine Rückkehr in den Ruhezustand zu erlauben, aus dem heraus eine erneute Aktivierung möglich ist. Der Ruhezustand des Kanals würde per se Crobenetin zwar wieder mit niedrigerer Affinität binden, da jedoch einige Zeit zur Dissoziation der während des Vorimpulses vom Rezeptor gebundenen Moleküle notwendig ist ( $> 100$  ms), mißt man mit dem beschriebenen Protokoll TTXr Natriumkanäle, die Crobenetin im inaktivierten Zustand gebunden haben. Die Aktivierung der Natriumkanäle wurde durch den folgenden 15 ms dauernden Testimpuls von  $-120$  mV nach  $0$  mV erreicht. Die graphische Darstellung (Abb.28) zeigt das verwendete Pulsprotokoll mit einer Zeitachse.

**Tab. 8 Wirkung von Crobenetin auf vordepolarisierte TTX-resistente Natriumströme**

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	$I/I_0$	Anzahl (n)
0.03	$0.67 \pm 0.07$	10
0.1	$0.53 \pm 0.1$	9
0.3	$0.37 \pm 0.05$	2
1	0.18	1
3	0.002	1
10	$0.05 \pm 0.03$	2

Um den unspezifischen Leckstrom von den gemessenen Natriumströmen subtrahieren zu können, wurde die Zelle für 5100 ms vom Haltepotential  $-100$  mV nach  $-80$  mV



### Abb. 28 Crobenetin bindet an inaktivierte TTX-resistente Natriumkanäle

Der obere Teil der Abbildung zeigt das verwendete Pulsprotokoll wie im Text beschrieben, darunter Originalregistrierungen TTX-resistenter Natriumströme nach depolarisierendem Vorimpuls. Gezeigt sind jeweils der 1. und der 10. Impuls. Die sehr niedrige Konzentration von 0.03  $\mu\text{M}$  Crobenetin führt bei diesem Neuron zu einer ausgeprägten Inhibition des Stromes.

Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, 300 nM TTX, 200  $\mu\text{M}$  Cd; Pipettenlösung: CsF; Filterfrequenz: 5 kHz, Temperatur: 23 °C.

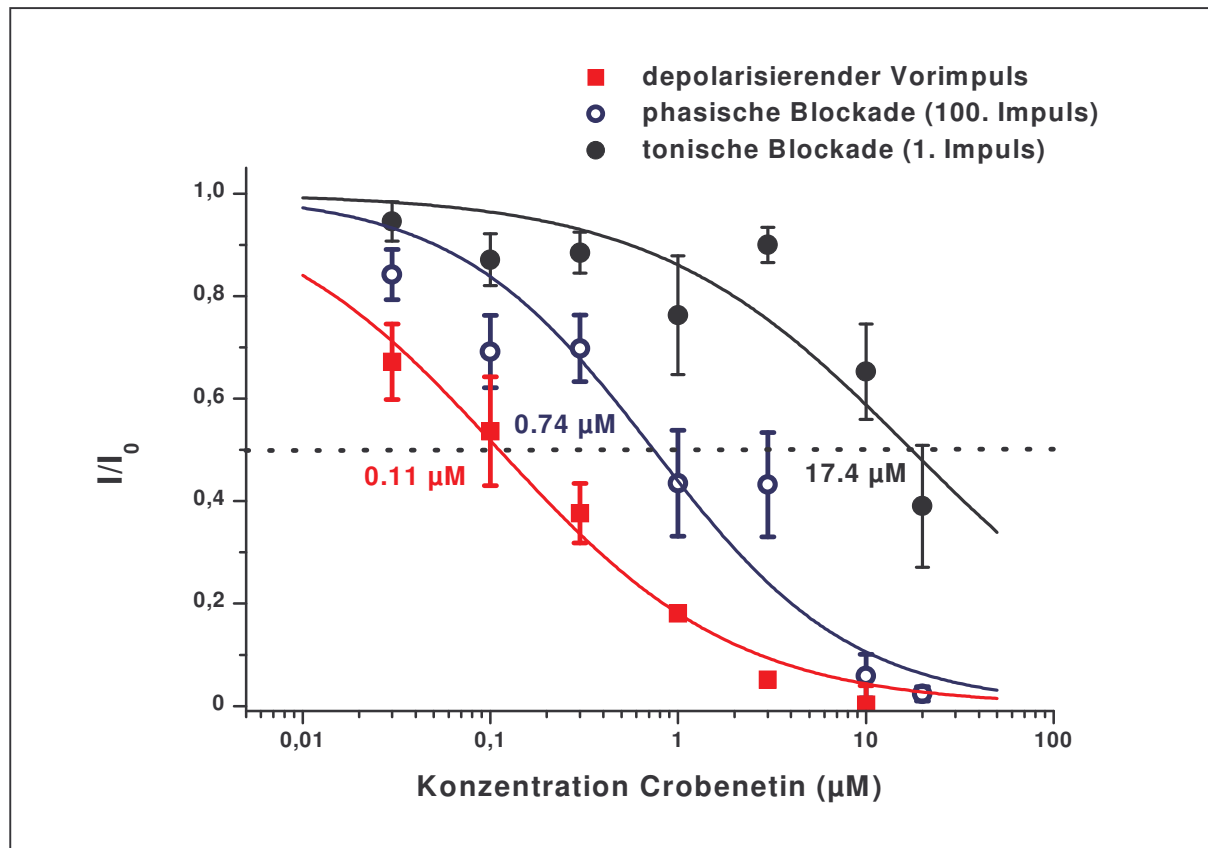
depolarisiert, anschließend wurde ein hyperpolarisierender Spannungssprung von 15 ms Dauer nach  $-120$  mV durchgeführt. Die Werte drei aufeinanderfolgender Registrierungen wurden jeweils gemittelt und der Mittelwert nach entsprechender Skalierung dann von dem, mit dem oben beschriebenen Protokoll gemessenen Natriumstrom subtrahiert. Aus Tabelle 8 läßt sich die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Crobenetin auf vordepolarisierte TTXr Natriumkanäle ersehen. Tatsächlich bindet Crobenetin bevorzugt an TTXr Natriumkanäle, die sich im inaktivierten Zustand befinden. Vor allem niedrige Konzentrationen ( $0.03 \mu\text{M}$ ,  $0.1 \mu\text{M}$ ) haben nach einem depolarisierenden Vorimpuls einen deutlich stärkeren Effekt als dieses bei ruhenden Natriumkanälen der Fall ist (vgl. Tab. 7).

### 3.2.3 Konzentrations–Wirkungs-Beziehung von Crobenetin

Die Konzentrations–Wirkungs–Beziehung von Crobenetin für TTXr Natriumkanäle wurde sowohl für die tonische als auch die phasische Blockade aus dem geschlossenen Kanalzustand heraus untersucht. Außerdem wurde die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Hemmung nach inaktivierendem Vorimpuls untersucht. Für die tonische Hemmung wurde die relative verbleibende Stromamplitude in Gegenwart von Crobenetin nach dem ersten Impuls des in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Protokolls gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Für die Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei phasischer Blockade wurde der relative Reststrom während des 100. Impulses in Gegenwart der verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die verwendeten Konzentrationen betragen  $0.03 \mu\text{M}$ ,  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $0.3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  und  $20 \mu\text{M}$  Crobenetin. Zur Untersuchung der Konzentrations–Wirkungs–Beziehung von Crobenetin für inaktivierten TTXr Natriumkanäle wurden die mit dem aus Abschnitt 3.2.2 bekannten Impulsprotokoll gewonnen Daten verwendet. Abb.29 zeigt die Konzentrations–Wirkungs–Kurven für die tonische und phasische Blockade aus dem Geschlossenenzustand heraus und die Kurve für TTXr Natriumkanäle nach depolarisierendem Vorimpuls. Die Anpassung der Kurven mit einer Hill Funktion

$$\text{rel block}(c) = [max / (1 + (IC_{50} / c)^a) + resid] \quad (19)$$

ergab halbmaximale Wirkungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) für die verschiedenen Kanalzustände;  $\text{rel block}(c)$  ist die relative Reduktion der Ganzzell-Stromamplitude,  $c$  die Crobenetinkonzentration,  $a$  der Hill-Koeffizient,  $max$  die maximale Stromamplitude,  $resid$  der bei maximaler Crobenetinkonzentration verbleibende Strom.



**Abb. 29 Konzentrations–Wirkungs–Kurven**

Gezeigt sind die Konzentrations–Wirkungs–Kurven für die tonische und die phasische Blockade, sowie die Hemmung nach einem 5 s dauernden, depolarisierendem Vorimpuls nach  $-30 \text{ mV}$ . Die Kurven wurden mit einer Hill-Funktion angepaßt und es ergaben sich die jeweiligen halbmaximalen Wirkungskonzentration.

Für die tonische Blockade ergab sich eine  $IC_{50}$  von  $17.4 \mu\text{M}$  der Hill-Koeffizient lag bei  $0.64$  ( $n = 5-14$ ), die entsprechenden Werte für die phasische Hemmung lagen bei  $0.74 \mu\text{M}$  bzw.  $0.82$  ( $n = 5-14$ ). Noch niedriger war die  $IC_{50}$  mit  $0.11 \mu\text{M}$  (Hill-Koeffizient  $0.69$ ,  $n = 1-10$ ) für die Blockade nach einem depolarisierenden Vorimpuls. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Crobenetin zeigt zum einen also die starke Benutzungsabhängigkeit der Blockade, zum anderen die hohe Affinität der Substanz zum inaktivierten Zustand des TTXr Natriumkanals.

### 3.2.4 Erholung vom benutzungsabhängigen Block

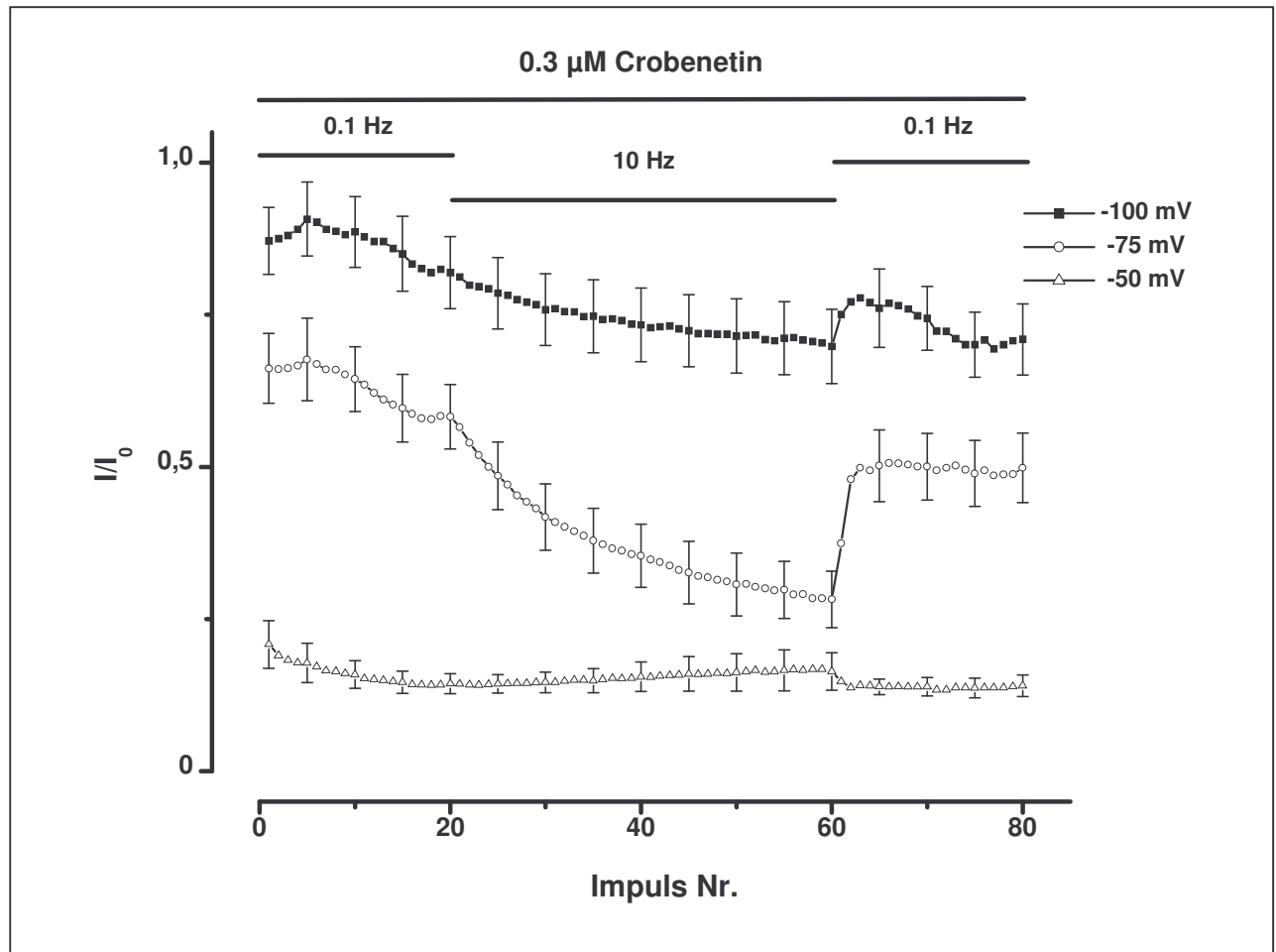
Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ist die Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle durch Crobenetin ausgesprochen benutzungsabhängig. Stimuliert man die in einem Neuron vorhandenen Kanäle mit einer Serie von Impulsen in ausreichend hoher Frequenz, kommt es



im Verlauf der Stimulation vom ersten bis zum letzten Impuls zu einer Abnahme des verbleibenden Stromes bzw. zu einer Zunahme der Blockade. Das Ausmaß dieser benutzungsabhängigen Hemmung ist zum einen an eine ausreichend hohe Stimulationsfrequenz gebunden, zum anderen abhängig von der verwendeten Konzentration (Abb.29). Schließlich hängt die Amplitude des TTXr Natriumstromes vom jeweils vorliegenden Haltepotential ab. Je depolarisierter das Membranpotential ist, um so mehr Kanäle liegen im inaktivierten Zustand vor, können per se nicht zum Ganzzellnatriumstrom beitragen und binden zudem Crobenetin mit sehr viel höherer Affinität.

In diesem Teil der Arbeit soll nun anhand einer ausgewählten Konzentration dargestellt werden, welchen Einfluß Haltepotential und Stimulationsfrequenz auf die benutzungsabhängige Blockade von TTXr Natriumströmen durch Crobenetin haben. Außerdem soll gezeigt werden, daß der benutzungsabhängige Anteil der Hemmung, ausgelöst durch eine hohe Stimulationsfrequenz, allein durch eine Erniedrigung der Reizfrequenz reversibel ist. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit folgendem Impulsprotokoll in Kontrolllösung und in Gegenwart von  $0.3 \mu\text{M}$  Crobenetin bei Haltepotentialen von  $-100 \text{ mV}$ ,  $-75 \text{ mV}$  und  $-50 \text{ mV}$  durchgeführt. Um einen Gleichgewichtszustand der Aktivierbarkeit der TTXr Natriumkanäle herzustellen, wurden zuerst 20 Spannungssprünge von jeweils  $15 \text{ ms}$  Dauer mit einer Frequenz von  $0.1 \text{ Hz}$  ausgehend vom jeweiligen Haltepotential nach  $0 \text{ mV}$  durchgeführt. Direkt im Anschluß wurden zum Auslösen der benutzungsabhängigen Hemmung 40 identische Impulse nach  $0 \text{ mV}$ , jetzt aber mit der 100-fach höheren Frequenz von  $10 \text{ Hz}$  appliziert. Um eine Erholung der TTXr Natriumkanäle von der benutzungsabhängigen Blockade zu erreichen, wurden die Neurone am Ende des Protokolls wieder mit 20 Spannungssprüngen vom jeweiligen Haltepotential nach  $0 \text{ mV}$  in einer Frequenz von  $0.1 \text{ Hz}$  gereizt. Der relativ verbleibende TTXr Natriumstrom bei den unterschiedlichen Haltepotentialen in Gegenwart von  $0.3 \mu\text{M}$  Crobenetin wurde berechnet, indem der absolute Wert der Stromamplitude eines Impulses bei dem jeweiligen Haltepotential nach Subtraktion des unspezifischen Leckstromes durch den korrespondierenden, ebenfalls korrigierten Wert in Kontrolllösung bei  $-100 \text{ mV}$ , dividiert wurde.

Für ein Haltepotential von  $-100 \text{ mV}$  ergab sich in Gegenwart von  $0.3 \mu\text{M}$  Crobenetin für den letzten Impuls bei  $0.1 \text{ Hz}$  Reizfrequenz eine relativ verbleibende Stromamplitude von  $0.87 \pm 0.06$  ( $n = 9$ ), für den ersten Impuls bei einer Frequenz von  $10 \text{ Hz}$  betrug der entsprechende Wert  $0.81 \pm 0.06$  ( $n = 9$ ).



**Abb. 30 Reversibilität der benutzungsabhängigen Blockade durch Crobenetin bei verschiedenen Haltepotentialen**

Aufgetragen sind die Mittelwerte des relativ verbleibenden Stroms  $I/I_0$  gegen die Impulsnummer bei den Haltepotentialen  $-100$  mV,  $-75$  V und  $-50$  mV in Gegenwart von  $0.3 \mu\text{M}$  Crobenetin ( $n$  für alle Haltepotentiale = 9). Die Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für jeden fünften Impuls abgebildet.

Nach 40 Impulsen bei einer Reizfrequenz von 10 Hz zeigte sich die benutzungsabhängige Blockade in einer Abnahme der verbleibenden Stromamplitude auf einen relativen Wert von  $0.69 \pm 0.06$  ( $n = 9$ ). Die folgende Erniedrigung der Stimulationsfrequenz auf 0.1 Hz führte nach drei Impulsen zunächst zu einem Wiederanstieg des relativen Stromes auf  $0.77 \pm 0.05$  ( $n = 9$ ), um dann mit fortdauernder Reizung wieder auf  $0.69 \pm 0.55$  ( $n = 9$ ) abzufallen. Bei einem Haltepotential von  $-75$  mV zeigte sich bei gleicher Crobenetinkonzentration ( $0.3 \mu\text{M}$ ) bereits beim 1. Impuls der 0.1 Hz – Serie ein gegenüber einem Haltepotential von  $-100$  mV deutlich reduzierter verbleibender relativer Natriumstrom von  $0.66 \pm 0.05$  ( $n = 9$ ), der bis zum 20. Reiz weiter reduziert wurde und sich im Mittel nur noch ein relativer Strom von

0.58±0.05 (n = 9) messen ließ. Ebenfalls erheblich stärker ausgeprägt als bei -100 mV stellte sich bei -75 mV der benutzungsabhängige Block nach 40 Impulsen bei einer Reizfrequenz von 10 Hz dar, die relative Stromamplitude betrug nur noch 0.28±0.04 (n = 9). Auch hier war die benutzungsabhängige Hemmung nach Verminderung der Stimulationsfrequenz auf 0.1 Hz reversibel, nach sechs Impulsen war eine Erholung des Natriumstromes auf einen relativen Wert von 0.51±0.06 (n = 9) zu messen. Im weiteren Verlauf der Impulsserie blieb die relative Stromamplitude mit einem Minimum von 0.48±0.05 (n = 9) im Gegensatz zum Haltepotential von -100 mV stabil.

Wurde ein Haltepotential von -50 mV gewählt, konnte schon beim ersten Reiz eine Reduktion des Stromes auf nur noch etwa 20% des Kontrollwertes gemessen werden, für 9 untersuchte Neurone ergab sich ein Mittelwert von 0.21±0.04 für die relative Stromamplitude, die im Verlauf der Stimulation mit einer Frequenz von 0.1 Hz auf 0.14±0.01 beim 20. Stimulus absank. Im Gegensatz zu den Haltepotentialen von -100 mV und -75 mV zeigte sich bei einem Potential von -50 mV keine benutzungsabhängige Blockade mehr, nach 40 weiteren Impulsen bei einer Reizfrequenz von nun 10 Hz wurde die relative Stromamplitude mit 0.16±0.03 (n = 9) berechnet. Da sich keine benutzungsabhängige Hemmung beobachten ließ, wurde auch mit Reduzierung der Reizfrequenz keine Erholung der Stromes von der Blockade erwartet, eine relative Stromamplitude von 0.14±0.01 (n = 9) bestätigte diese Erwartung.

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit noch einmal graphisch dargestellt (Abb.30), sind vor allem die starke benutzungsabhängige Hemmung und deren Reversibilität bei einem Haltepotential von -75 mV sowie die fehlende benutzungsabhängige Komponente bei einem Haltepotential von -50 mV auffällig.

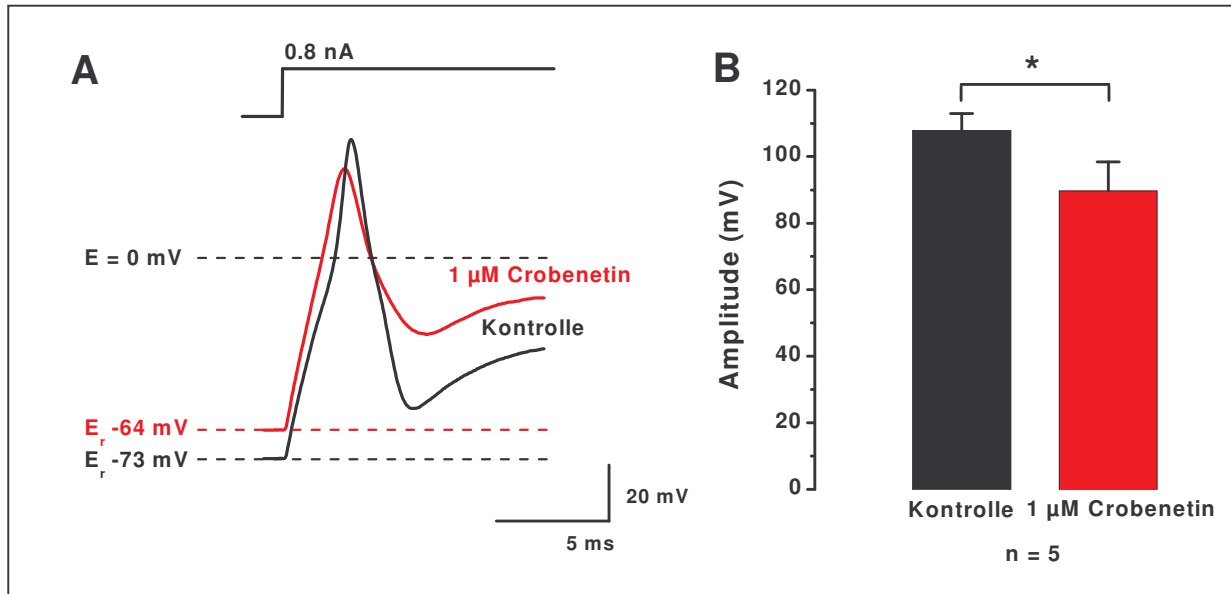
### 3.2.5 Der Effekt von Crobenetin auf einzelne TTX-resistente Aktionspotentiale

In den vorangehenden Abschnitten der Arbeit wurde die Wirkung von Crobenetin auf TTXr Natriumkanäle anhand der Messung von TTXr Natriumströmen im *voltage-clamp* Modus untersucht. Da Information entlang von Nervenzellmembranen aber als Membranpotentialänderung in Form von Aktionspotentialen, deren Aufstrichphase ein Natriumeinwärtsstrom zugrunde liegt, weitergeleitet wird, soll im folgenden Teil die Wirkung von Crobenetin zum einen auf einzelne TTXr Aktionspotentiale, zum anderen auf Serien von TTXr Aktionspotentialen primär sensorischer Neurone beschrieben werden. Das Soma des Spinalganglienneurons, von welchem die elektrophysiologischen Daten gewonnen wurden,

diente mit seinen Ionenkanälen als Modell für das periphere Ende des Axons (den Rezeptor), sowie dessen peripheren und zentralen Fortsatz (s. Abschnitt 1.1.4).

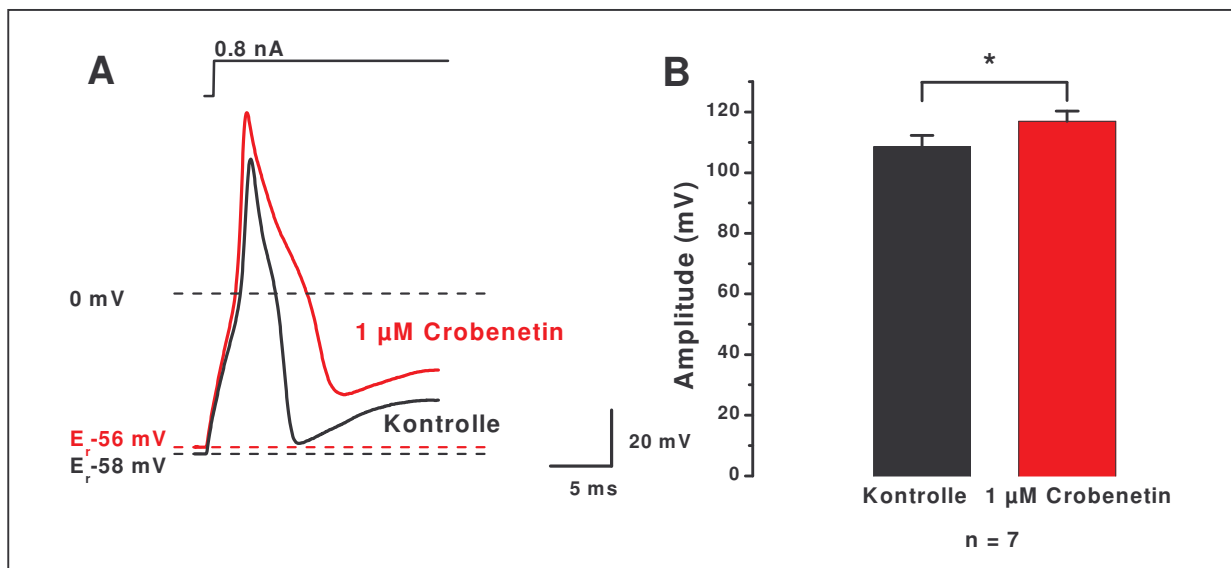
Zur Messung einzelner Aktionspotentiale wurde nach Erreichen eines *giga-seals* und der *whole-cell* Konfiguration aus dem *voltage-clamp* Modus in den *current-clamp* Modus umgeschaltet (s. Abschnitt 2.1.4). Zunächst wurde das Ruhemembranpotential der Neurone gemessen ( $-63.5 \pm 1.8$  mV,  $n = 12$ ). Daraufhin wurden erst in Kontrollösung, danach in Gegenwart steigender Toxinkonzentrationen einzelne Aktionspotentiale durch Strominjektionen ausgelöst. Die Stimulation der Neurone wurde mit 12 aufeinanderfolgenden, 40 ms langen Stromreizen steigender Stärke, beginnend bei 0.1 nA durchgeführt. Mit jedem Stimulus wurde die Reizstärke um 0.1 nA erhöht. Die Messungen von Amplitude und Aktionspotentialdauer wurden immer am zweiten vollständigen Aktionspotential einer Impulsserie durchgeführt. Ließ sich beispielsweise mit einer Reizstärke von 0.7 nA das erste Aktionspotential auslösen, wurde das auf einen 0.8 nA starken Stimulus folgende Aktionspotential ausgemessen. Die Amplitude wurde vom jeweils vor dem Impuls herrschenden Ruhemembranpotential bis zur Spitze des Aktionspotentials, die Aktionspotentialdauer bei halbmaximaler Amplitude bestimmt.

Da Crobenetin TTXr Natriumströme blockiert und diese für die Depolarisation während der Aufstrichphase TTXr Aktionspotentiale verantwortlich sind, erwartet man einen Einfluß des Toxins auf die Aktionspotentialamplitude im Sinne einer Reduktion. 5 Neurone, deren mittlere Aktionspotentialamplitude in Kontrollösung  $107.8 \pm 5.1$  mV betrug, reagierten auf die Applikation von 1  $\mu$ M Crobenetin mit einer signifikanten Reduktion der Amplitude auf  $89.6 \pm 8.7$  mV (t-Test,  $p < 0.05$ , Abb. 31). Entgegen der Erwartung zeigte Crobenetin an einer anderen Gruppe von Neuronen aber eine genau gegensätzliche Wirkung, die Aktionspotentialamplitude wurde vergrößert. An 7 untersuchten Neuronen konnte ein signifikanter Anstieg der mittleren Amplitude von  $108.5 \pm 3.7$  mV unter Kontrollbedingungen auf  $116.9 \pm 3.3$  mV ( $n = 7$ ) während der Applikation von 1  $\mu$ M Crobenetin gemessen werden (t-Test,  $p < 0.05$ , Abb. 32) Es lassen sich somit bezüglich der Aktionspotentialamplitude zwei Gruppen von Neuronen unterscheiden. In der ersten Gruppe wurde die Aktionspotentialamplitude, wie man es von einer Natriumkanal blockierenden Substanz erwartet, reduziert. Das mittlere Ruhepotential in dieser Gruppe betrug  $-62.3 \pm 1.9$  mV ( $n = 5$ ). Die Neurone der zweiten Gruppe hingegen reagierten mit einer Vergrößerung der Aktionspotentialamplitude auf die Applikation von Crobenetin. Das Ruhepotential dieser Neurone unterschied sich nicht vom Ruhepotential der ersten Gruppe, der Mittelwert betrug  $-62.6 \pm 2.7$  mV ( $n = 7$ ).



### Abb. 31 Crobenetin reduziert die Amplitude einzelner TTX-resistenter Aktionspotentiale

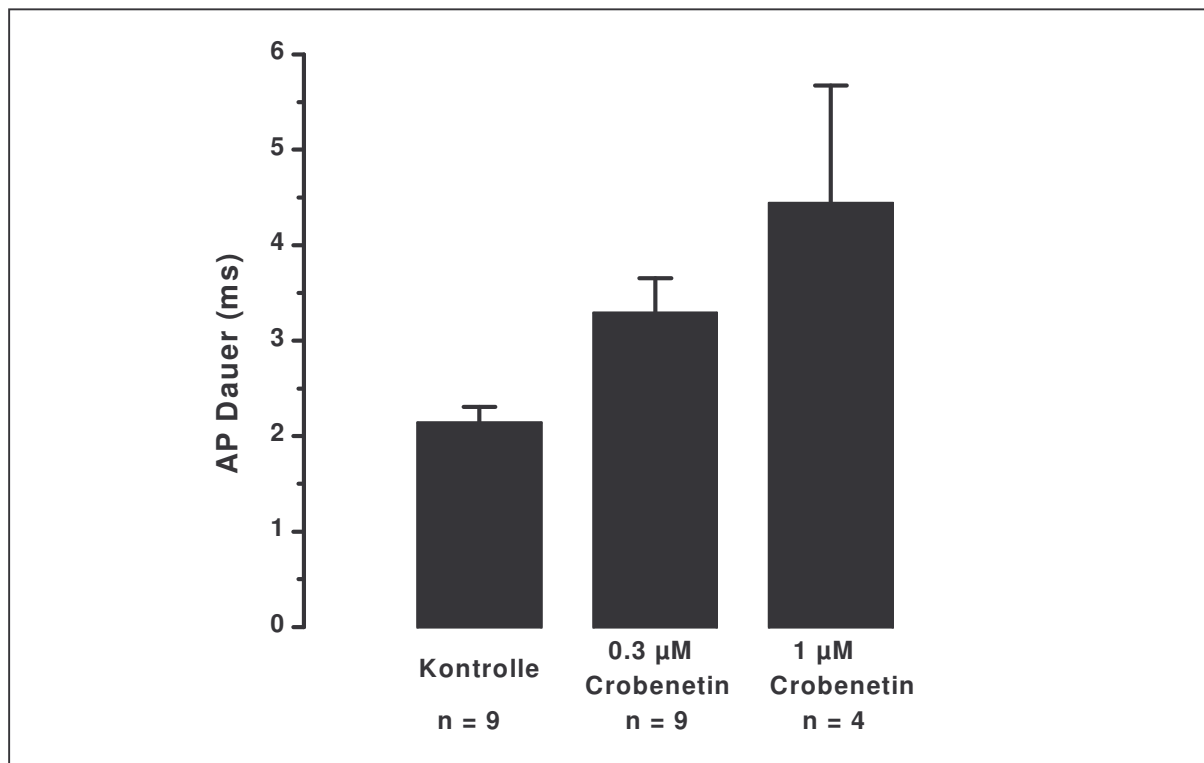
(A) Originalregistrierung TTX-resistenter Aktionspotentiale, ausgelöst durch einen 40 ms anhaltenden Stromimpuls von 0.8 nA. Schwarz das AP in Kontrolle, rot das AP in 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin. Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High  $\text{K}_i$  EGTA, Filterfrequenz 5 kHz, Temperatur: 23°C. (B) zeigt den signifikanten Unterschied (\*) der Mittelwerte der Aktionspotentialamplituden von 5 Neuronen in Kontrolle und 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin.



### Abb. 32 Crobenetin vergrößert die Amplitude einzelner TTX-resistenter Aktionspotentiale

(A) Originalregistrierung TTX-resistenter Aktionspotentiale, schwarz das AP in Kontrolllösung, rot das AP in Crobenetin; Impulsprotokoll wie in Abb.31. Man beachte außerdem den Anstieg der AP-Dauer in Toxin. Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High  $\text{K}_i$  EGTA, Filterfrequenz 5 kHz, Temperatur: 23°C. (B) zeigt den signifikanten Unterschied (\*) der Mittelwerte der Aktionspotentialamplituden von 7 Neuronen in Kontrolle und 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin

Als weitere, möglicherweise durch Crobenetin beeinflussbare Größe eines Aktionspotentials wurde die Aktionspotentialdauer ausgemessen. Für diese ergab sich übereinstimmend bei allen untersuchten Neuronen eine Verlängerung mit steigender Konzentration von Crobenetin. In Kontrolllösung betrug die mittlere Aktionspotentialdauer  $2.13 \pm 0.16$  ms ( $n = 9$ ). Unter der Applikation von  $0.3 \mu\text{M}$  Crobenetin ließ sich eine Verlängerung auf  $3.36 \pm 0.33$  ms ( $n = 9$ ) messen, unter  $1 \mu\text{M}$  Crobenetin betrug die Länge eines einzelnen Aktionspotentials im Mittel  $4.38 \pm 0.957$  ms ( $n = 4$ ; Abb.33). Interessanterweise fiel bei allen untersuchten Zellen unabhängig von der Aktionspotentialdauer nach der Applikation von Crobenetin eine Verkleinerung des hyperpolarisierenden Nachpotentials auf (Abb.31 u. 32).



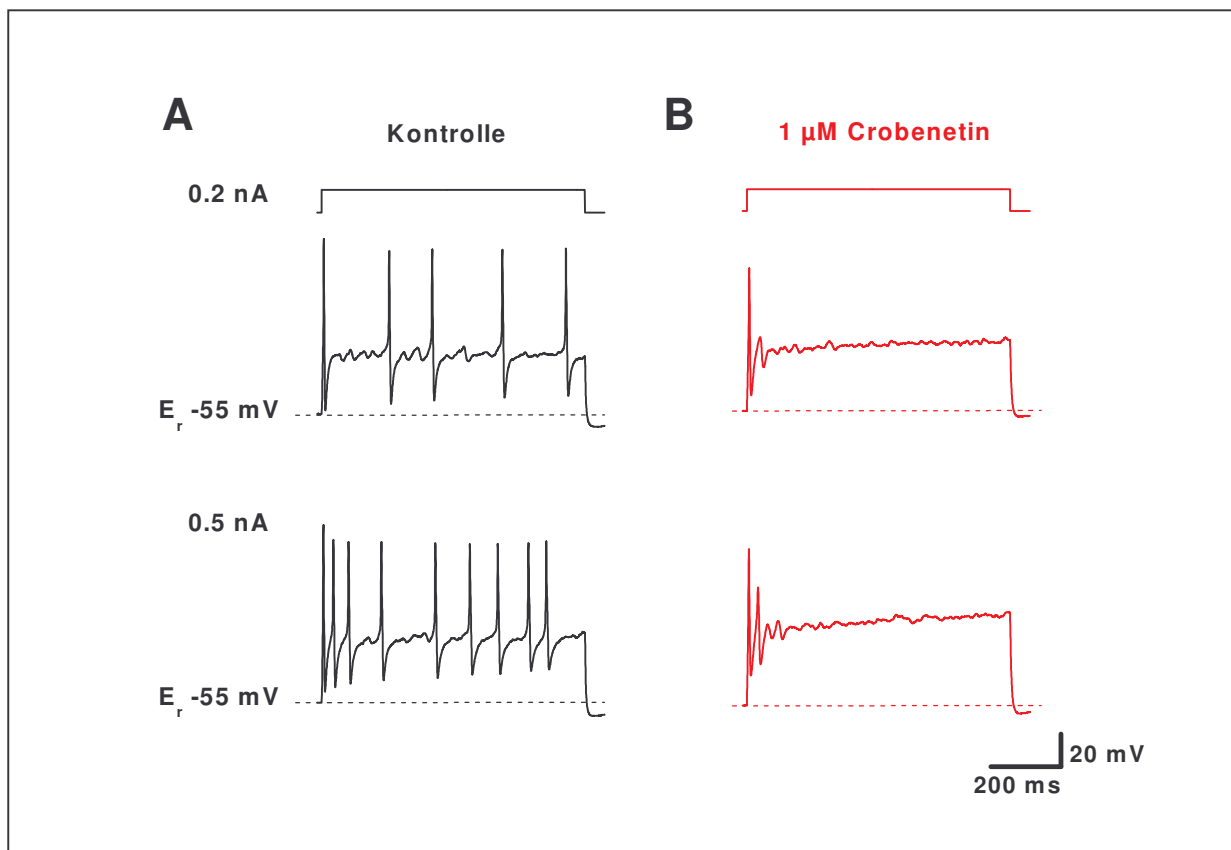
**Abb. 33 Crobenetin verlängert die Dauer TTX-resistenter Aktionspotentiale**

Steigende Konzentrationen von Crobenetin zeigen einen deutlich verlängernden Effekt auf die Aktionspotentialdauer. Gemessen wurde die Aktionspotentialdauer bei halbmaximaler Amplitude an einzelnen Aktionspotentialen in Gegenwart von  $300 \text{ nM}$  TTX. Auch in Originalregistrierungen TTXr-Aktionspotentiale ist die verlängerte Aktionspotentialdauer unter Crobenetin erkennbar (Abb.31 u. 32).

### 3.2.6 Crobenetin hemmt Serien TTX-resistenter Aktionspotentiale

Im sensorischen Nervensystem wird die empfundene Stärke eines Reizes nicht durch Amplitude und Dauer eines einzelnen Aktionspotentials verschlüsselt, sondern über die

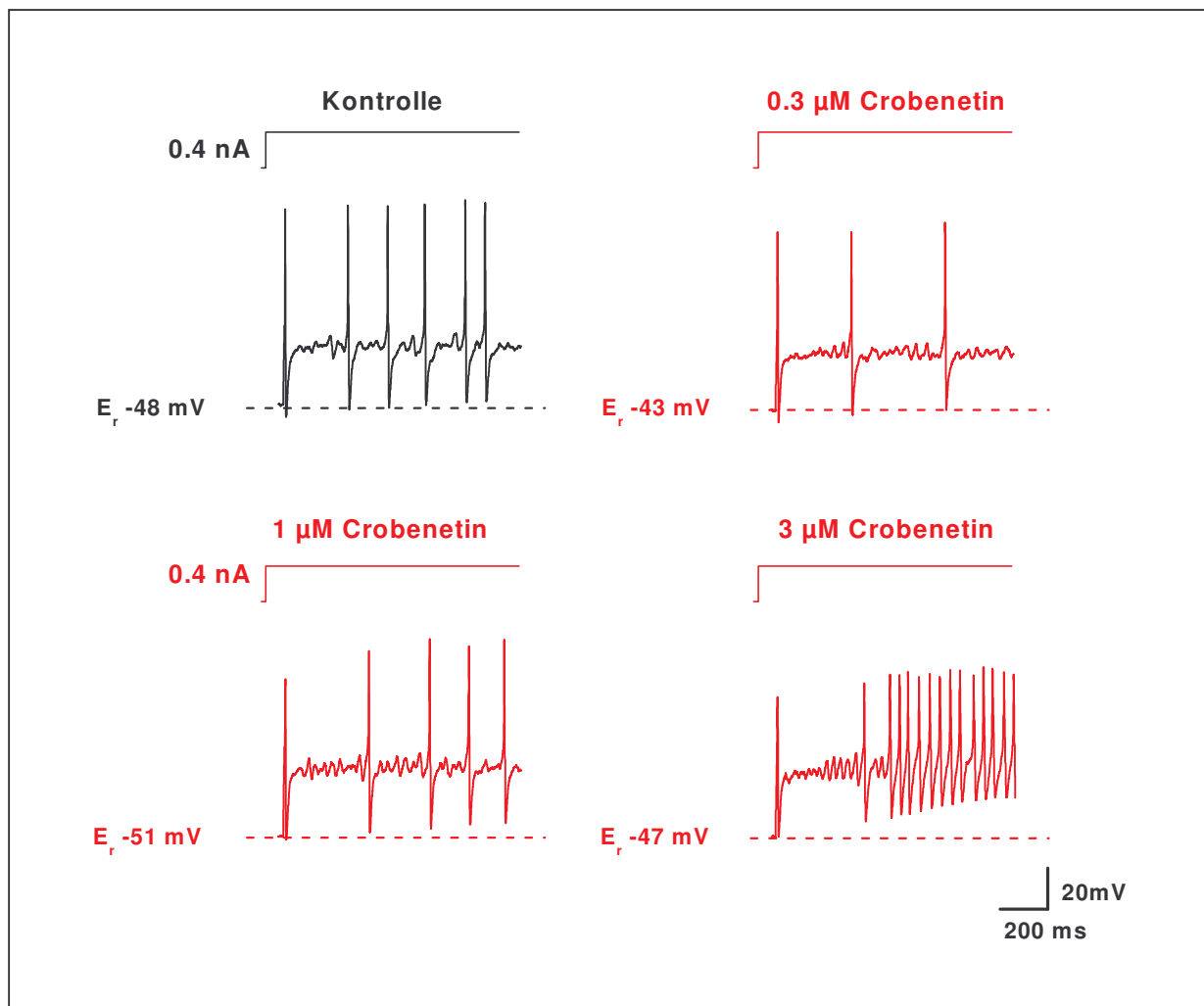
Frequenz, mit der Aktionspotentiale über Nervenzellmembranen weitergeleitet werden. Daher sollte untersucht werden, inwiefern Crobenetin Serien von TTXr Aktionspotentialen beeinflusst. Dazu wurde eine Untergruppe sensorischer Neurone ( $n = 8$ ) untersucht, die auf einen langen Stromimpuls hin mit der Generierung von Serien von Aktionspotentialen reagieren. Wie zur Untersuchung der einzelnen Aktionspotentiale, wurden auch hier die Neurone mit konsekutiven Stromimpulsen steigender Reizstärke stimuliert, allerdings waren die einzelnen Stromreize aber mit 1 s Dauer erheblich länger. Begonnen wurde mit 0.1 nA, mit jedem weiteren Reiz stieg die Impulsstärke um 0.1 nA. Insgesamt wurden jeweils 8 aufeinanderfolgende Stromimpulse appliziert.



**Abb. 34 Crobenetin reduziert die Feuerrate sensorischer Neurone**

(A) Serien von Aktionspotentialen (Reizdauer 1 s) in Kontrolllösung. Mit steigender Reizstärke nimmt die Aktionspotentialfrequenz zu. (B) Die Reaktion des gleichen Neurons auf identische Stimuli, jetzt in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin. Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High- $\text{K}_i$  EGTA, Filterfrequenz 5 kHz, Temperatur: 23°C.

Das mittlere Ruhemembranpotential der in diesem Abschnitt untersuchten Neurone betrug in Kontrollösung  $-56.8 \pm 7.5$  mV ( $n = 8$ ), alle der Zellen reagierten auf die Applikation 1 s langer Reize ( $0.3 - 0.6$  nA) mit der Generierung von Aktionspotentialserien. Zur Bestimmung der initialen Feuerfrequenz wurde die Latenz zwischen jeweils dem ersten und zweiten AP einer Serie ausgemessen und hieraus die Feuerfrequenz berechnet. Die initiale Feuerfrequenz ist das Reziproke der Zeit, die zwischen dem ersten und zweiten Aktionspotential einer Serie



**Abb. 35 Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz unter Crobenetin**

Gezeigt ist die komplexe Antwort eines Neurons auf die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen Crobenetin. Kommt es unter dem Einfluß von  $0.3 \mu$ M zu einer Reduktion der Feuerfrequenz, steigt diese unter  $1 \mu$ M wieder an und übersteigt unter  $3 \mu$ M sogar die Feuerfrequenz unter Kontrollbedingungen. Badlösung: Standard-Bicarbonat-Ringerlösung, Pipettenlösung: High- $K_i$  EGTA, Filterfrequenz: 5 kHz, Temperatur:  $23^\circ\text{C}$ .



vergeht. 4 der 8 Neurone reagierten auf die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin mit einer Verkleinerung der initialen Feuerfrequenz von  $26.4 \pm 9.9$  auf  $1.2 \pm 0.7$  Hz. Allerdings reduzierte sich die Anzahl der Aktionspotentiale während des 1 s langen Reizes nur bei 3 der 4 Neurone, ohne jedoch die Generierung von Aktionspotentialen komplett zu unterdrücken (Abb.34). Mindestens 1 Aktionspotential am Anfang des Reizes konnte immer ausgelöst werden. Bei einer der Zellen kam es jedoch zu einer Zunahme der Anzahl der Aktionspotentiale unter dem Einfluß von Crobenetin (1  $\mu\text{M}$ ). Um einen Einfluß der Reizstärke auf die Anzahl der Aktionspotentiale und die initiale Feuerfrequenz auszuschließen, wurden immer Registrierungen bei gleicher Reizstärke in Kontrolllösung und in der Gegenwart von Crobenetin analysiert. Eine andere Gruppe von repetitiv feuernenden Neuronen zeigte die Komplexität der Beeinflussung von Aktionspotentialserien durch Crobenetin. 3 der 4 Neurone reagierten auf die Applikation einer relativ niedrigen Konzentration Crobenetin (0.3  $\mu\text{M}$ ) mit einer nur sehr geringen Verkleinerung der initialen Feuerfrequenz von  $39.4 \pm 28.3$  Hz auf  $37.8 \pm 25.9$  Hz. Andererseits verlor eines der Neurone unter dem Einfluß von Crobenetin die Fähigkeit zur Generierung von Aktionspotentialserien. Zwei der Neurone dieser Gruppe wurden auch in Gegenwart höherer Konzentrationen von Crobenetin (1 – 3  $\mu\text{M}$ ) untersucht (Abb.35). Beide Neurone reagierten auf die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin mit einer Verkleinerung der initialen Feuerfrequenz, wie für die andere Gruppe von Zellen oben beschrieben. Wurde die Konzentration der Substanz auf 3  $\mu\text{M}$  erhöht, kam es interessanterweise nur bei einer der beiden Zellen zu einer weiteren Reduktion der Feuerfrequenz, die andere Zelle reagierte mit einer Zunahme (Abb.35). Insgesamt reagierten die untersuchten Neurone mit sehr heterogenen Veränderungen ihrer Aktionspotentialfrequenzen auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Crobenetin (Abb. 34, Abb.35).

## 4 Diskussion

### 4.1 Die *thin slice* Präparation

Dünnschnittpräparationen von Geweben besitzen gegenüber der enzymatischen Dissoziation und Kultivierung von Zellen einige Vorteile, weshalb die Methode vor allem in der Neurophysiologie zunehmend breitere Verwendung findet. Seit der ersten Beschreibung der *thin slice* Präparation für die Anwendung der *patch-clamp* Technik in neuronalen Geweben (Edwards *et al.*, 1989) wurden Dünnschnittpräparate von unterschiedlichen Bereichen des Nervensystems angefertigt und für elektrophysiologische Experimente verwendet. Neben Präparaten des Zentralnervensystems (z.B. Hypothalamus, Kleinhirn, Rückenmark; Edwards *et al.*, 1989) wurde auch die Dünnschnittpräparation von Spinalganglien junger Ratten beschrieben, die es ermöglicht, Neurone des peripheren Nervensystems mit der *patch-clamp* Technik zu untersuchen (Safronov *et al.*, 1996). Die sensorischen Neurone bleiben weitgehend in ihrer physiologischen Umgebung eingebettet, behalten den Kontakt zu benachbarten Zellen und Strukturen und werden nicht durch eine enzymatische Dissoziation und die Zusammensetzung eines Kulturmediums in ihren Eigenschaften beeinflusst. Daß die Art der Präparation und die Kultivierung von Neuronen die Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren qualitativ und quantitativ verändern können, zeigen Arbeiten über NMDA Rezeptoren (Allen *et al.*, 1988), purinerge P2X Rezeptoren (Stebbing *et al.*, 1998), Bradykininrezeptoren (Segond *et al.*, 1996) und TTXr Natriumkanäle (Tate *et al.*, 1998).

In der hier verwendeten Dünnschnittpräparation lassen sich mit der *patch-clamp* Technik nur die kleinen bis mittelgroßen Neurone, deren Somata Ursprung der nozizeptiven C- und A $\delta$ -Fasern sind (Harper & Lawson, 1985), untersuchen. Große Neurone sind der *patch-clamp* Pipette nicht zugänglich, da ihre Oberflächen von Satellitenzellen bedeckt sind. Von den kleinen bis mittelgroßen Neuronen lassen sich nur solche untersuchen, die direkt an der Oberfläche des Schnitts liegen und deren Membranen nicht von Bindegewebsanteilen oder Zelltrümmern bedeckt sind. Im Gegensatz zu Schnitten des Zentralnervensystems, die das Säubern oberflächlicher Neurone durch die Anwendung von Überdruck mittels einer zweiten Pipette erlauben (Edwards *et al.*, 1989; Takahashi, 1990), ist ein solches Vorgehen in Schnitten von Spinalganglien wegen des festeren Bindegewebes nicht möglich (Safronov *et al.*, 1996). Auch der Zugriff auf Neurone in tieferen Lagen des Schnittes ist, anders als in ZNS-Präparationen dadurch unmöglich.

Da die Neurone in der *thin slice* Präparation im Gewebeverband liegen, kann in vielen Fällen auch der Anfangsteil des Axons in seinem natürlichen Verlauf erhalten werden (Abb.7). Bei

der enzymatischen Dissoziation primär sensorischer Neurone hingegen kommt es reglmässig zur Abtrennung des Axons kurz nach seinem Abgang aus dem Soma und das akut dissoziierte Neuron imponiert als Soma ohne Fortsatz. Erst nach einiger Zeit in Kultur kommt es zum Aussprossen von Fortsätzen. Diese entsprechen morphologisch allerdings nicht dem normalerweise einzelnen aus dem Soma eines sensorischen Neurons entspringenden Axon (Vyklícky & Knotkova-Urbancova, 1996). Gegenüber dissoziierten und kultivierten sensorischen Neuronen präsentieren sich die Zellen der Dünnschnittpräparation in einem besseren Zustand. Wichtige Indikatoren hierfür sind zum einen das negativere Ruhemembranpotential, zum anderen der höhere Eingangswiderstand der Zelle ( $> 1 \text{ G}\Omega$ ). Werte für Ruhemembranpotentiale von enzymatisch präparierten Neuronen schwanken je nach verwendeter Methode für die elektrophysiologischen Registrierungen. Für *patch-clamp* Experimente sind Potentiale im Bereich von  $-50 \text{ mV}$  beschrieben (Liu *et al.*, 2001). Die Neurone in der Dünnschnittpräparation hatten regelmäßig Ruhemembranpotentiale, die negativ zu  $-60 \text{ mV}$  waren. Die unterschiedlichen Ruhepotentiale können durch Beeinflussung spannungsabhängiger Ionenkanäle die Erregbarkeit sensorischer Neurone verändern.

Durch die Verwendung einer Nebenkammer für Einzelkanalexperimente ist es möglich, den Schnitt in der Hauptkammer vor unphysiologischen Badlösungen (besonders bei *inside-out* Experimenten, wenn die intrazelluläre Lösung als Badlösung appliziert wird) und der Wirkung von Toxinen zu schützen. Durch dieses Vorgehen, das sowohl für die *inside-out* als auch die *outside-out* Konfiguration anwendbar ist, ist es möglich, mehrere zellfreie *patches* aus einem unbeeinflussten Schnitt zu gewinnen. Ein weiterer Vorteil der Nebenkammer ist ihr geringeres Volumen und der damit verbundene schnellere Lösungswechsel.

Ein Nachteil der Dünnschnittpräparation ist die geringe Auswaschbarkeit einiger Toxine, insbesondere lipophiler Substanzen und Peptidtoxine. So zeigte es sich beispielsweise, daß sich die untersuchte Substanz Crobenetin auch durch lange Auswaschphasen nicht aus dem Schnitt eliminieren ließ. Hingegen ließen sich Capsaicin und Capsazepin innerhalb weniger Minuten entfernen. Um sicherzustellen, daß die untersuchten Neurone nicht dem ungewollten Einfluß zuvor verwendeter Toxine unterliegen, wurde für jedes in der Hauptkammer durchgeführte Experiment ein neuer Schnitt verwendet. Für pharmakologische Experimente sind deshalb dissoziierte Zellen eine wichtige Alternative, da sie einzeln den Testsubstanzen ausgesetzt werden können, ohne die gesamte Kultur zu kontaminieren.

Die Anwendbarkeit der *thin slice* Präparation von Spinalganglien beschränkt sich bei der Verwendung von Ratten auf neugeborene Tiere bis zu einem Alter von 24 Tagen. Bei älteren Tieren ist das Bindegewebe der Spinalganglien zu fest und mit den verwendeten Geräten sind

schlechtere Schnittflächen und nur extrem wenige, der *patch-clamp* Technik zugänglichen Neurone zu erhalten.

## 4.2 Capsaicinrezeptoren in primär sensorischen Neuronen

Daß den exzitatorischen Eigenschaften von Capsaicin die Wirkung auf mindestens einen, in primär sensorischen Neuronen vorkommenden, ligandengesteuerten Ionenkanal unterliegt, ist seit der Beschreibung eines nativen Capsaicinrezeptors und der Klonierung eines capsaicinempfindlichen Ionenkanals bekannt (Oh *et al.*, 1996; Caterina *et al.*, 1997). Seither sind die molekularbiologischen, biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des nativen Capsaicinrezeptors und von VR1 in vielen Arbeiten untersucht worden und mehrere, umfangreiche Übersichtsartikel zum Thema „Capsaicin“ und „Capsaicinrezeptoren“ erschienen (Holzer, 1991; Wood, 1993; Szallasi & Blumberg, 1999; Caterina & Julius, 2001). Die bisherigen Untersuchungen von Capsaicinrezeptoren wurden aber immer an enzymatisch dissoziierten bzw. kultivierten sensorischen Neuronen oder an rekombinanten, heterolog exprimierten Vanilloidrezeptoren durchgeführt. Die vorliegende Arbeit liefert mit Verwendung einer Dünnschnittpräparation und unter Verzicht auf die Anwendung von Enzymen zum ersten Mal Untersuchungsergebnisse über den nativen Capsaicinrezeptor, die an Kanälen in einer physiologischeren Umgebung gewonnen wurden. Capsaicinrezeptor-vermittelte Ströme wurden mittels der *patch-clamp* Technik in der Ganzzellkonfiguration sowie in zellfreien *patches* auf Einzelkanalebene gemessen. Außerdem wurde im *current-clamp* Modus der Einfluß von Capsaicin auf das Membranpotential sensorischer Neurone analysiert.

### 4.2.1 Capsaicinaktivierte Ganzzellströme

Die Untersuchung von Capsaicinrezeptor-vermittelten Ganzzellströmen wurde zunächst bei einem Haltepotential von  $-80$  mV durchgeführt. Der prozentuale Anteil der untersuchten kleinen bis mittelgroßen Neurone, die auf die Applikation von Capsaicin mit einem Einwärtsstrom reagierten, lag bei 89 % (86 von 97 untersuchten Zellen). Diese Zahl stimmt gut mit den an dissoziierten und kultivierten kleinen sensorischen Neuronen erhobenen Befunden überein ( $\sim 80\%$ ; Liu & Simon, 1996; Oh *et al.*, 1996; Zeilhofer *et al.*, 1997; Vyklicky *et al.*, 1998). Verzichtet man auf die Vorauswahl der den C- und A $\delta$ -Fasern zugeordneten Neurone (Harper & Lawson, 1985), finden sich in der Literatur Werte von

60 – 70% für den Anteil capsaicinsensitiver Zellen in sensorischen Neuronen (Baccaglini & Hogan, 1983; Marsh *et al.*, 1987; Liu & Simon, 1996).

Die in der *whole-cell* Konfiguration gemessenen Stromamplituden nach der Applikation von 1  $\mu$ M Capsaicin erwiesen sich als unerwartet klein, der Median der Amplitude betrug nicht mehr als 54 pA. Ausgehend von Arbeiten über Capsaicinrezeptoren, in denen dissoziierte bzw. kultivierte sensorische Neurone verwendet wurden, rechnete man mit Einwärtsströmen im nA – Bereich (Liu & Simon, 1996; Oh *et al.*, 1996; Docherty *et al.*, 1996; Koplas *et al.*, 1997; Piper *et al.*, 1999; Nagy & Rang, 1999b). Allerdings finden sich in der Literatur auch Angaben über kleine Amplituden capsaicininduzierter Ganzzellströme in enzymatischen Präparationen. Vyklicky *et al.* (1998) und Lopshire & Nicol (1998) beschreiben Amplituden, die, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, im Bereich zwischen 100 und 200 pA liegen. Relativiert werden diese Ergebnisse allerdings durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Die Capsaicinkonzentration in den Experimenten von Lopshire & Nicol (1998) betrug nur 100 nM, was deutlich unter der für native Capsaicinrezeptoren beschriebenen  $EC_{50}$  von 1.1  $\mu$ M liegt (Oh *et al.*, 1996). Außerdem wurden in der Arbeit Zellen embryonaler Ratten verwendet. Vyklicky *et al.* (1998) verwendeten zwar Tiere ähnlichen Alters (2-3 d), allerdings wurden die dissoziierten Neurone ohne die exogene Zugabe von Nervenwachstumsfaktor (NGF) auf einem hippocampalen Gliazell-Monolayer mehrere Tage vor den elektrophysiologischen Experimenten kultiviert. Da die Expression des Capsaicinrezeptors in Neuronen des Spinalganglions der Regulation durch NGF unterliegt (Helliwell *et al.*, 1998), könnte eine inadäquate Versorgung der kultivierten Neurone mit NGF und die konsekutive verminderte Expression des Capsaicinrezeptors eine Ursache für die beobachteten kleinen Amplituden sein. Den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuronen wurde nach der Präparation ebenfalls kein NGF angeboten. Eine Beeinflussung der Capsaicinrezeptor-Expression durch fehlende trophische Faktoren ist aber wenig wahrscheinlich, da alle Experimente innerhalb weniger Stunden nach der Präparation durchgeführt wurden. Auch zeigte sich keine Abhängigkeit der Stromamplitude von der Zeit, die seit der Präparation vergangen war (Tab.1).

Die Anwesenheit von Calcium in der verwendeten extrazellulären Lösung könnte wegen des relativ langsamen Perfusionssystems über eine Desensibilisierung der Capsaicinrezeptoren zu einer Reduktion der Stromamplitude führen (Liu & Simon, 1998; Koplas *et al.*, 1997; Docherty *et al.*, 1996; Liu & Simon, 1996). Experimente in der Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zeigten jedoch nur einen geringen Anstieg der medianen Stromamplitude auf 151 pA. Auch Docherty *et al.* (1996) zeigten, daß die Amplitude des

CAP-aktivierten Stromes in sensorischen Neuronen in calciumfreier Extrazellulärlösung größer ist, als in Gegenwart von Calcium. Erklärung hierfür könnte eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit, bedingt durch extrazelluläre Calciumionen sein (Oh *et al.*, 1996). Ferner liefert die Literatur Beispiele, daß trotz einer extrazellulären Calciumkonzentration im Bereich von 2 mM capsaicinaktivierte Einwärtsströme mit Amplituden im nA Bereich gemessen wurden (Liu & Simon, 1996; Koplas *et al.*, 1997). Calciumabhängige Desensitisierungsvorgänge scheinen also nicht die Hauptursache für die beobachteten, kleinen Stromamplituden zu sein. Der Anstieg der Stromamplitude in Gegenwart von ATP in der Pipettenlösung ist nicht überraschend, da der Capsaicinrezeptor Nukleotidbindungsstellen besitzt, die unabhängig von Phosphorylierungen eine Steigerung der Kanalaktivität vermitteln (Kwak *et al.*, 2000).

Daß die gemessenen Ganzzellströme auf einer Aktivierung des Capsaicinrezeptors beruhen, konnte durch ihre Blockade durch den kompetitiven Capsaicinrezeptor-Antagonisten Capsazepin gezeigt werden. Obwohl Capsazepin kein absolut spezifischer Inhibitor des Capsaicinrezeptors ist, sondern in der verwendeten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auch spannungsabhängige Calciumkanäle blockiert ( $\text{IC}_{50}$  7.7  $\mu\text{M}$ ; Docherty *et al.*, 1997), handelt es sich hier doch am ehesten um eine Hemmung Capsaicinrezeptor-vermittelter Ströme. Zum einen ist der Beitrag spannungsabhängiger Calciumkanäle zum Gesamtstrom bei einem Haltepotential von  $-80$  mV minimal, zum anderen wurden CAP-induzierte Ströme auch in calciumfreier Extrazellulärlösung gemessen. Da sich die Stromamplitude bei einem Beitrag von Calciumkanälen zum Ganzzellstrom in calciumfreier Badlösung reduzieren würde, dieses aber nicht beobachtet wurde, ist der nach CAP-Applikation gemessene Strom durch den Capsaicinrezeptor vermittelt.

#### 4.2.2 Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors in der Schnittpräparation

Die Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors wurden in zellfreien *patches* sowohl in der *inside-out* als auch in der *outside-out* Konfiguration untersucht. Der Capsaicinrezeptor scheint in hoher Dichte in den Membranen sensorischer Neurone vorzukommen, da selbst in kleinen *patches* die gleichzeitige Aktivität mehrerer Kanäle zu messen war. Der hohen Dichte der Capsaicinrezeptoren kann einerseits eine gleichmäßige Verteilung über die Zellmembran, andererseits aber auch ein *clustering* vieler Kanäle in bestimmten Membranbezirken zugrunde liegen. Würden die Kanäle *geclustert* vorkommen, wäre zu erwarten, daß die Isolation mehrerer *patches* aus dem gleichen Neuron bisweilen auch *patches* ohne Kanäle ergeben würde. Da dieses nicht der Fall war, sondern alle *patches* aus CAP-positiven Neuronen auch

Einzelkanalaktivität zeigten, kann von einer gleichmäßig dichten Verteilung der Kanäle auf der Membran des Somas ausgegangen werden. Ob diese Verteilung der Capsaicinrezeptoren aber auch für andere Abschnitte des sensorischen Neurons, wie z.B. das periphere Ende zutrifft, bleibt unklar, da diese Strukturen in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnten. Pipetten mit Widerständen  $< 7 \text{ M}\Omega$  für die Einzelkanalexperimente nicht zu verwenden, da die Anzahl der im isolierten Membranfleck enthaltenen Kanäle zu groß war, um eine zuverlässige Auswertung der Offenwahrscheinlichkeiten durchführen zu können. Durch die Applikation von Capsaicin sowohl von der extra- wie auch von der intrazellulären Seite der Membran ließ sich der Capsaicinrezeptor aktivieren, die beobachtete Einzelkanalaktivität war durch den Antagonisten Capsazepin reversibel unterdrückbar.

Das *gating* der in sensorischen Neuronen der Dünnschnittpräparation untersuchten Capsaicinrezeptoren ist nicht nur von der Gegenwart eines Agonisten, z.B. Capsaicin abhängig. Neben der Bindung eines Liganden wird die Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors wesentlich durch das Membranpotential bestimmt, der Kanal zeigt also auch spannungsabhängige Eigenschaften. Allerdings reicht eine Depolarisation der Zellmembran allein nicht aus, um den Capsaicinrezeptor zu aktivieren, es bedarf immer der Anwesenheit eines Agonisten und eines adäquat depolarisierten Membranpotentials. Zwar ist aus der Literatur eine höhere Offenwahrscheinlichkeit nativer Capsaicinrezeptoren bei positiven Membranpotentialen bekannt, allerdings liegt das halbmaximale Aktivierungspotential ( $E_{50}$ ) für den Capsaicinrezeptor in enzymatisch dissoziierten Neuronen im Bereich von  $-10 \text{ mV}$  (Oh *et al.*, 1996; Lopshire & Nicol, 1998). In sensorischen Neuronen der Dünnschnittpräparation hingegen ist die Aktivierung zu weit positiveren Potentialen verschoben, eine halbmaximale Aktivierung findet sich erst bei etwa  $80 \text{ mV}$  (Abb.19). Bemerkenswert ist auch der mit einem Steigungsfaktor von  $41 \text{ mV}$  flache Anstieg der Kurve vor allem im Bereich negativer Membranpotentiale, die durch die Anpassung der Mittelwerte der Offenwahrscheinlichkeiten erhalten wurde. In den Arbeiten von Oh *et al.*, (1996) und Lopshire & Nicol (1998) werden Steigungsfaktoren der mit einer identischen Anpassung erhaltenen Kurven von  $29 \text{ mV}$  bzw.  $20 \text{ mV}$  beschrieben. Auch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in Neuronen der Dünnschnittpräparation unterscheidet sich von den Daten für dissoziierte Neurone. Lopshire & Nicol (1998) konnten bei einem Haltepotential von  $-60 \text{ mV}$   $NP_{\text{open}}$  von  $0.35$  messen, in der vorliegenden Arbeit lag der entsprechende Wert bei  $0.05$  (Tab.2). Es zeigt sich also, daß sich die Spannungsabhängigkeit des Capsaicinrezeptors in der Dünnschnittpräparation deutlich von den aus enzymatisch behandelten Neuronen gewonnen Daten unterscheidet. Nur 3 der 30 untersuchten Neurone zeigten schon bei  $-80 \text{ mV}$  eine

relativ hohe Offenwahrscheinlichkeit (Abb.19). Da auch in der *whole-cell* Konfiguration einige der Neurone analog zu einer hohen Offenwahrscheinlichkeit der Capsaicinrezeptoren mit großen Stromamplituden auf die Applikation von CAP reagierten, könnte sich hierbei um Subtypen oder Splicevarianten des Capsaicinrezeptors handeln, deren Aktivierungskurve in negativere Potentialbereiche verschoben ist. Eine Messung des Ganzzellstromes wurde bei den entsprechenden Zellen aber nicht vorgenommen. Betrachtet man die unterschiedlichen Leitfähigkeiten der Kanäle mit den hohen Offenwahrscheinlichkeit bei  $-80$  mV, so scheinen sie keiner einheitlichen Gruppe anzugehören.

Welche physiologische Bedeutung das hier gefundene halbmaximale Aktivierungspotential von  $80$  mV hat, bedarf weiterer Diskussion. In der vorliegenden Arbeit wurde als Capsaicinrezeptor-Agonist der exogene Ligand Capsaicin verwendet. Weitere Experimente müssen zeigen, ob das *gating* des Capsaicinrezeptors bei Applikation endogener, physiologischerer Agonisten wie Hitze, Protonen und Arachidonsäurederivate im gleichen Maße spannungsabhängig ist bzw. ob und wie weit die Aktivierungskurve für diese Liganden zu negativeren Potentialen verschoben ist. Auch der Effekt auf die Spannungsabhängigkeit des Capsaicinrezeptors durch die Stimulation mit mehreren Agonisten gleichzeitig, wie es in entzündetem Gewebe (Hitze, Azidose) der Fall ist, ist unbekannt. Eine dramatische Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit capsaicinaktivierter Ionenkanäle bei negativem Membranpotential durch die Ansäuerung des extrazellulären Milieus zeigt die Arbeit von Baumann & Martenson (2000). Diese Beobachtung und die Potenzierung capsaicinaktivierter Ganzzellströme durch Hitze und Protonen (Tominaga *et al.*, 1998) lassen die Verschiebung der Aktivierungskurve des Capsaicinrezeptors zu negativeren Potentialen bei gleichzeitiger Stimulation des Kanals durch mehrere Agonisten sehr wahrscheinlich werden. Die beobachtete breite Streuung der Offenwahrscheinlichkeiten besonders bei positiven Potentialen könnte durch die Temperaturempfindlichkeit mitverursacht sein. Ein Temperaturkoeffizient ( $Q_{10}$ ) für die Offenwahrscheinlichkeit capsaicinaktivierter Einzelkanäle von  $\sim 8$  (Babes *et al.*, 2002) läßt eine Beeinflussung der Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors durch kleinere Änderungen der Umgebungstemperatur möglich erscheinen. Ursachen einer Temperaturänderung können Unterschiede der Raum- oder Lösungstemperatur sein.

Die in der dieser Arbeit gemessenen Einzelkanalleitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors lagen mit  $23.3$  pS bei  $-80$  mV und  $55.4$  pS bei einem Potential von  $80$  mV in einem Bereich, der gut mit den Daten von Lopshire & Nicol (1998) übereinstimmt. Dieser Anstieg der Einzelkanalleitfähigkeit auf ungefähr das Doppelte bei positiven Membranpotentialen zeigt



die bekannten auswärtsgerichtenden Eigenschaften des Capsaicinrezeptors (Oh *et al.*, 1996; Caterina *et al.*, 1997). Wahrscheinliche Ursache für die in anderen Arbeiten (Oh *et al.*, 1996; Caterina *et al.*, 1997) beschriebene insgesamt größere Leitfähigkeit des Kanals sind die Unterschiede des Calciumgehaltes der extrazellulären Lösungen. In Gegenwart von Calcium als Ladungsträger scheint die Einzelkanalleitfähigkeit reduziert zu werden (Oh *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Einzelkanalexperimente zwar nominell calciumfreie Lösungen verwendet, jedoch ohne den Zusatz eines Calciumpuffers, so daß geringe Konzentrationen von Calciumionen vorhanden sein können und so möglicherweise die Leitfähigkeit beeinflusst wurde. Außerdem ist eine Beeinflussung der Leitfähigkeit durch die in der calciumfreien Lösung vorhandenen Magnesiumionen möglich. Für die Auswärtsgerichtung des Capsaicinrezeptors scheinen divalente Kationen keine Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu anderen ligandengekoppelten Ionenkanälen wird die Auswärtsgerichtung heterolog exprimierter Vanilloidrezeptoren nicht durch Veränderungen der extrazellulären Konzentration divalenter Kationen verändert (Gunthorpe *et al.*, 2000). Die Arbeit von Piper *et al.* (1999) zeigte das gleiche Ergebnis für native Capsaicinrezeptoren in sensorischen Neuronen. Die Ursachen der auswärtsgerichtenden Eigenschaften von Vanilloidrezeptoren bzw. nativen Capsaicinrezeptoren sind also bisher unbekannt. Das in dieser Arbeit gemessene Umkehrpotential von 6.1 mV liegt in einem Bereich, der für einen unselektiven Kationenkanal bei den vorliegenden Ionenkonzentrationen erwartet wurde.

Schwer erklärbar sind die sehr große Streuung der Einzelkanalleitfähigkeiten und die signifikant größere Leitfähigkeit des Kanals bei 80 mV in der *outside-out* Konfiguration verglichen mit *inside-out* Experimenten. Für -80 mV können die variierenden Leitfähigkeiten als Streuung um einen Mittelwert gedeutet werden, eine Anpassung mittels einer Gauss-Funktion war allerdings nicht möglich. Bei einem Membranpotential von 80 mV hingegen sind keine Gruppierung der Daten um einen oder mehrere Mittelwert zu erkennen, vielmehr erscheint die Streuung zufällig. Aus dieser Analyse ergab sich kein Hinweis darauf, daß es sich um unterschiedliche Kanalpopulationen bzw. -typen handeln könnte. Auch der Vergleich der ebenfalls variierenden Offenwahrscheinlichkeiten mit den Leitfähigkeiten ergab insbesondere für die Daten bei 80 mV das Bild einer zufälligen Verteilung (Abb.22) und ebenfalls keine Evidenz für die Existenz mehrerer Kanaltypen. Da technische Ursachen, wie eine falsche Einstellung des Verstärkungsfaktors am Verstärker oder die Verwendung anderer Lösungen für die größere Leitfähigkeit in der *outside-out* Konfiguration ausgeschlossen werden können (man würde bei einer technischen Ursache einen Unterschied der

Leitfähigkeit auch bei  $-80$  mV erwarten), bleibt als mögliche Erklärung für das Phänomen das Vorhandensein oder die Abwesenheit intrazellulärer Regulationsfaktoren in den beiden Konfigurationen. So ist anzunehmen, daß in der *outside-out* Konfiguration die intrazelluläre Seite des *patches* durch membranständige und gelöste Cytoplasmabestandteile noch beeinflußt werden kann. In der *inside-out* Konfiguration ist die intrazelluläre Seite der Membran dem Bad zugewandt. Durch die Badperfusion kommt es zum Auswasch gelöster cytoplasmatischer Faktoren, außerdem ist durch die Perfusion die mechanische Entfernung membranständiger Regulationsysteme vorstellbar. Daß der Unterschied der Leitfähigkeiten nur bei positiven Membranpotentialen ( $80$  mV) signifikant ist, könnte an einer Beeinflussung der Rektifizierung liegen.

### 4.2.3 Spannungsabhängigkeit capsaicinaktivierter Ganzzellströme

Um zu untersuchen, ob die in zellfreien Membranflecken erhobenen Befunde der Spannungsabhängigkeit capsaicinaktivierter Ströme auch für Ganzzellströme gelten, wurden die Stromantworten sensorischer Neurone nach Capsaicinapplikation bei unterschiedlichen Haltepotentialen untersucht. Die in der *whole-cell* Konfiguration beobachtete Auswärtsgleichrichtung der Strom–Spannungs–Beziehung wird einerseits sicher durch die auswärtsgleichrichtenden Einzelkanaleigenschaften des Capsaicinrezeptors, wesentlich aber von der Spannungsabhängigkeit des Kanals bestimmt. Der steile Anstieg der Strom–Spannungs–Kurve für Ganzzellströme bei positiven Membranpotentialen korreliert mit dem Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit des Einzelkanals. Diese zeigt ebenfalls bei positiven Testpotentialen eine stärkere Zunahme als im negativen Bereich. Vergleicht man die mittleren Stromamplituden bei  $-80$  mV und bei  $80$  mV, zeigt sich, daß der durchschnittlich gemessene Spitzenstrom bei  $80$  mV um den Faktor 15 größer ist, als bei  $-80$  mV, die Mediane differieren sogar um den Faktor 34. Diese Resultate unterscheiden sich deutlich von den an dissoziierten Neuronen gemachten Beobachtungen. Oh *et al.* (1996) beschreiben zwar auch für die Ganzzellströme eine Auswärtsgleichrichtung, seine Daten zeigen allerdings einen sehr viel geringeren Anstieg der Stromamplitude bei positiven Haltepotentialen. Auch die in der Arbeit von Piper *et al.* (1999) beschriebene Strom–Spannungs–Beziehung unterscheidet sich vor allem im Bereich negativer Haltepotentiale deutlich von den hier erhobenen Daten. Interessanterweise konnte die beschriebene geringere Ausprägung der Tachyphylaxie capsaicinaktivierter Ganzzellströme durch repetitive CAP–Applikation bei einem Haltepotentialen von  $40$  mV (Piper *et al.*, 1999) an Neuronen in der Schnittpräparation nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich eine profunde Reduktion der Stromamplitude bei

wiederholter Stimulation der Zellen durch Capsaicin bei Haltepotentialen von 60 mV und 80 mV. Da in der vorliegenden Arbeit die Tachyphylaxie des Capsaicinrezeptors nur bei 60 mV und 80 mV und nicht bei 40 mV untersucht wurde, könnte hier die Ursache für den beobachteten Unterschied liegen.

Der in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Strom–Spannungs–Beziehung für capsaicinaktivierte Ganzzellströme sehr ähnlich ist das Ergebnis einer Arbeit, die an heterolog exprimierten Vanilloidrezeptoren der Ratte durchgeführt wurde (Gunthorpe *et al.*, 2000). Die in der Arbeit von Gunthorpe *et al.* (2000) gemessenen Ganzzellströme zeigen ebenfalls eine Auswärtgleichrichtung, deren zeitlicher Verlauf der Gleichrichtung spannungsabhängiger Ionenkanäle ähnelt. Die Autoren diskutieren daher die Möglichkeit, daß der Vanilloidrezeptor einen Spannungssensor besitzt, der zu einer Vergrößerung der Leitfähigkeit bei positiven Potentialen führt. Die hier vorliegende Arbeit zeigt auf Einzelkanalebene, daß native Capsaicinrezeptoren tatsächlich einen Spannungssensor zu besitzen scheinen, der für die höhere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei positiven Potentialen verantwortlich ist.

#### **4.2.4 Depolarisation der Zellmembran durch Capsaicin**

Die Depolarisationen der Zellmembran nach der Applikation von Capsaicin wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl in Gegenwart von extrazellulärem Calcium als auch in nominell calciumfreier extrazellulärer Lösung durchgeführt, um die schon erwähnten calciumabhängigen Desensitisierungsvorgänge zu berücksichtigen. In Gegenwart von Calcium konnte an 2 von 33 untersuchten Neuronen eine überschwellige Depolarisation mit der Generierung von Aktionspotentialen beobachtet werden, in calciumfreier Lösung hingegen blieben alle Depolarisationen unter-schwellig. Dieses Resultat ist interessant, da 63% der kleinen und mittelgroßen Neurone des Spinalganglions den großen calciumaktivierten Kaliumkanal (BK<sub>Ca</sub>) exprimieren (Scholz *et al.*, 1998b). In Gegenwart von extrazellulärem Calcium würde man, bei einer Coexpression von Capsaicinrezeptor und BK<sub>Ca</sub> Kanal einen gegensätzlichen Einfluß beider Kanäle auf das Membranpotential erwarten. In calciumfreier Extrazellulärlösung dagegen sollte im Fall einer Coexpression der depolarisierende Effekt des Capsaicinrezeptors überwiegen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, ist die Wahrscheinlichkeit, daß zumindest ein Teil der untersuchten Neurone neben dem Capsaicinrezeptor auch den BK<sub>Ca</sub> Kanal exprimieren, recht hoch, da beide Kanäle in weit über der Hälfte aller kleinen bis mittelgroßen Neurone des Spinalganglions vorkommen (88% bzw. 63%; Scholz *et al.*, 1998b). Daß es trotz der wahrscheinlichen Coexpression beider Kanäle in den hier durchgeführten Experimenten vermutlich nicht zu einer funktionellen

Interaktion von Capsaicinrezeptor und BK<sub>Ca</sub> Kanal gekommen ist, kann an einer möglichen räumlichen Trennung beider Kanäle in der Zellmembran liegen, so daß durch den Capsaicinrezeptor einströmendes Calcium den BK<sub>Ca</sub> Kanal nicht erreicht, was durch die Verwendung des Calciumpuffers EGTA in der Pipettenlösung begünstigt würde.

Analog zu den im *voltage-clamp* Modus beobachteten Diskrepanzen zwischen den Resultaten in enzymatischen Präparationen zeigen sich also auch im *current-clamp* unterschiedliche Ergebnisse. Arbeiten an dissoziierten bzw. kultivierten Neuronen zeigen, daß die meisten der dort untersuchten Zellen mit überschwelligem Depolarisationen auf die Applikation von Capsaicin reagieren (Baccaglioni & Hogan, 1983; Koplas *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001). Ursächlich für die meist unterschwelligen Depolarisationen in der Schnittpräparation könnte einerseits das negativere Ruhemembranpotential der Neurone sein. Die Membranpotentiale für die halbmaximale Aktivierung spannungsabhängiger Natriumströme in Neuronen des Spinalganglions liegen zwischen -35 mV und -12 mV (Rush *et al.*, 1998, Scholz *et al.*, 1998a). Die Depolarisation einer Membran mit einem Ruhepotential von -70 mV um den Betrag von 15 mV wird also zur Aktivierung einer sehr geringen Anzahl von spannungsabhängigen Natriumkanälen führen und die Generierung eines Aktionspotentials ist unwahrscheinlich. Andererseits kommt auch eine zunehmende Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle durch die relativ langsamen Depolarisationen als weitere Ursache für das Fehlen von Aktionspotentialen in Betracht. Im Gegensatz zu den relativ positiven Potentialen, die zur spannungsabhängigen Aktivierung der Natriumkanäle notwendig sind, nimmt ihre Verfügbarkeit inaktivierungsbedingt schon bei deutlich negativeren Membranpotentialen ab (Rush *et al.*, 1998). Auch die beschriebene Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle durch Capsaicin ist als Ursache für die beobachteten unterschwelligen Depolarisationen in Betracht zu ziehen (Liu *et al.*, 2001). Wichtigster ursächlicher Faktor für die geringe Depolarisation der Neurone ist am wahrscheinlichsten aber der kleine Capsaicinrezeptor-vermittelte Einwärtsstrom, da die genannten Eigenschaften der Natriumkanäle gerade an dissoziierten und kultivierten Neuronen beschrieben wurden.

Daß Capsaicin auf Haut und Schleimhäute appliziert das Gefühl brennender Schmerzen hervorruft, ist in Indiz dafür, daß es *in vivo* sehr viel häufiger zur überschwelligem Depolarisation der Membran des peripheren Endes sensorischer Neurone kommt. Allerdings ist es bislang noch nicht gelungen, Ionenströme bzw. Aktionspotentiale des rezeptiven Endes sensorischer Neurone zu messen mittels der *patch-clamp* Technik zu messen.

#### 4.2.5 Beeinflussung von Aktionspotentialamplitude und –dauer durch Capsaicin

Da CAP konzentrationsabhängig spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert und dadurch Einfluß auf Aktionspotentiale capsaicinsensitiver sensorischer Neurone des Ganglion trigeminale nimmt (Liu *et al.*, 2001), wurde untersucht, ob sich ein solcher Effekt auf Aktionspotentiale auch an Neuronen des Spinalganglions beobachten läßt. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Wirkung von CAP auf Aktionspotentiale von Neuronen des Spinalganglions beschrieben werden. 1  $\mu\text{M}$  CAP reduzierte in 20 von 26 Zellen die Aktionspotentialamplitude, bei 3 Neuronen war unter dem Einfluß von CAP kein Aktionspotential mehr auszulösen. Verantwortlich für die Reduktion der Amplitude könnte eine indirekte Inhibition spannungsabhängiger Natriumkanäle durch CAP sein. CAP führt zum Anstieg des intrazellulären cAMP Gehaltes in Neuronen des Spinalganglions, dieses wiederum zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA; Lopshire & Nicol, 1998). Die Leitfähigkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle wird durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung reduziert (Catterall, 2000). Diese intrazellulären, CAP-induzierten Vorgänge können also über eine Verringerung des spannungsabhängigen Natriumstromes zur Reduktion der Aktionspotentialamplitude bzw. zur vollständigen Unerregbarkeit von Neuronen führen. Interessanterweise führte die Applikation von CAP bei 3 Zellen zu einer Zunahme der Aktionspotentialamplitude. Setzt man voraus, daß ein Teil des spannungsabhängigen Natriumstromes in diesen Neuronen von TTXr Natriumkanälen getragen wird, könnte eine ebenfalls beschriebene cAMP-abhängige Vergrößerung dieses Stromes hierfür verantwortlich sein (England *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1996).

Die mittlere Aktionspotentialdauer von 23 untersuchte Neurone betrug 4.3 ms. Es wurden bei der Ausmessung in Kontrollösung nur die Neurone berücksichtigt, die auch in CAP Aktionspotentiale generierten. Da 63% der kleinen bis mittelgroßen Neurone des Spinalganglions den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanal exprimieren (Scholz *et al.*, 1998b), könnte es über den Capsaicinrezeptor-vermittelten Einstrom von Calciumionen zu einer verstärkten  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Aktivität und einer beschleunigten Repolarisation nach dem Aktionspotential kommen, was die in 11 Neuronen beobachtete Abnahme der Aktionspotentialdauer bewirken könnte. Dieses setzt aber voraus, daß in den untersuchten Neuronen die einströmenden Calciumionen den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanal auch in genügend hoher Konzentration erreichen (s.o.). Im Gegensatz zu den unterschwellig genutzten Depolarisationen bei alleiniger CAP-Applikation kommt es bei der elektrischen Stimulation von Neuronen durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen zu einem sehr viel stärkeren Anstieg der intrazellulären

Calciumkonzentration. So können auch BK<sub>Ca</sub>-Kanäle, die nicht in unmittelbarer Nähe des den Calciumeinstrom vermittelnden Ionenkanals liegen, aktiviert werden. Im Gegensatz zu der Capsaicinrezeptor-bedingten geringen Depolarisation kommt es durch sehr viel stärkere Depolarisation während eines Aktionspotentials außerdem zur spannungsabhängigen Aktivierung von BK<sub>Ca</sub>-Kanälen.

Die 9 Neurone, die mit einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer auf die Applikation von CAP reagierten, könnten zu einer Gruppe von Neuronen gehören, die nur den Capsaicinrezeptor und keine BK<sub>Ca</sub>-Kanäle exprimieren. Durch die Aktivierung des Capsaicinrezeptors kommt es zum Einstrom von Calciumionen, welche direkt die Zellmembran depolarisieren und zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führen. Es könnte also über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Neuronen, die keine BK<sub>Ca</sub>-Kanäle exprimieren, zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer kommen. Bei den 3 Neuronen, deren Aktionspotentialdauer unter dem Einfluß von Capsaicin unverändert blieb, handelt es sich wahrscheinlich um Neurone ohne Capsaicinrezeptoren.

#### **4.3 Die Wirkung von Crobenetin auf TTX-resistente Natriumströme und Aktionspotentiale primär sensorischer Neurone**

Crobenetin, ein von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG entwickelter Blocker spannungsabhängiger TTXs Natriumkanäle, wurde auf seine Fähigkeit, auch TTXr Natriumkanäle des peripheren Nervensystems zu inhibieren, untersucht. Hierzu wurden mittels der *patch-clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration TTXr Natriumströme sensorischer Neurone in der beschriebenen Dünnschnittpräparation gemessen. Um die Wirkung der Substanz auf die Erregbarkeit der Zellen zu bestimmen, wurden außerdem der Einfluß von Crobenetin auf einzelne Aktionspotentiale und auf Serien von Aktionspotentialen untersucht.

Es zeigte sich, daß es sich bei Crobenetin um einen hochpotenten Inhibitor TTXr Natriumkanäle handelt. Mit einer IC<sub>50</sub> von 0.11 µM für die Blockade inaktivierter TTXr Natriumkanäle ist Crobenetin eine der potentesten Substanzen, die spannungsabhängige Natriumkanäle über die Lokalanästhetikabindungsstelle hemmen (Scholz *et al.*, 1998c; Bräu & Elliott, 1998; Roy & Narahashi, 1994). Die Affinität von Crobenetin für TTXr Natriumkanäle sensorischer Neurone ist nahezu identisch mit der Affinität für TTXs

Natriumkanäle (Carter *et al.*, 2000). Andere Lokalanästhetika binden hingegen mit höherer Affinität an TTXs Natriumkanäle.

#### **4.3.1 Potente, benutzungsabhängige Blockade TTX-resistenter Natriumströme durch Crobenetin**

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß es sich bei Crobenetin um eine Substanz handelt, die hochpotent und benutzungsabhängig TTXr Natriumkanäle sensorischer Neurone blockiert. Die halbmaximalen Wirkungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) für verschiedene Kanalzustände liegen weitaus niedriger, als für andere Natriumkanalblocker, die ihre Wirkung über die Lokalanästhetikabindungsstelle entfalten, bekannt ist. Während Lidocain ruhende TTXr Natriumkanäle mit einer  $IC_{50}$  von 200  $\mu$ M hemmt (tonische Blockade) und für inaktivierte Kanäle die  $IC_{50}$  60  $\mu$ M beträgt (Scholz *et al.*, 1998c), führen bereits 17.4  $\mu$ M bzw. 0.11  $\mu$ M Crobenetin zur halbmaximalen Blockade TTXr Natriumkanäle. Auffällig ist vor allem die hohe Affinität der Substanz für den inaktivierten Kanalzustand. Während sich die  $IC_{50}$ -Werte von Lidocain und Crobenetin für die tonische Blockade ruhender Kanäle um etwa den Faktor 10 unterscheiden, ist die Affinität von Crobenetin für inaktivierte Kanäle um den Faktor ~550 höher als die Affinität von Lidocain! Möglicherweise liegt die wahre  $IC_{50}$  von Crobenetin für inaktivierte TTXr Natriumkanäle sogar noch niedriger, da das verwendete Impulsprotokoll (Abb.28) nur einen Kompromiß darstellt. Dieser Kompromiß, nach dem depolarisierenden Vorimpuls das Neuron für 100 ms zu hyperpolarisieren, wurde gewählt, da durch den folgenden Testimpuls nur dann ein ausreichender großer Natriumstrom zu messen war, wenn einige der Kanäle durch die Hyperpolarisation wieder in den Ruhezustand zurückgekehrt waren. Andererseits war die Hyperpolarisation so kurz gewählt, daß ein Verlust von gebundenen Crobenetinmolekülen und damit eine Unterschätzung der  $IC_{50}$  klein sein dürfte. Die hier gefundenen  $IC_{50}$ -Werte stimmen gut mit den von (Carter *et al.*, 2000) beschriebenen Werten für TTXs Natriumkanäle überein. Dieser Befund ist interessant, da die Affinität bekannter Lokalanästhetika zu TTXs Natriumkanälen deutlich höher ist als zu TTXr Natriumkanälen (Bräu *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1998c).

Neben der hohen Potenz der Blockade ist die Benutzungsabhängigkeit der Wirkung ein weiteres Charakteristikum von Crobenetin. Der Grad der Benutzungsabhängigkeit wird durch Stimulationsfrequenz und Haltepotential bestimmt. Diese Arbeit zeigt, daß bei einem Membranpotential von -75 mV, das dem physiologischen Ruhemembranpotential der meisten sensorischen Neurone nahe kommt, die Benutzungsabhängigkeit am stärksten ausgeprägt ist.

Nur die hochfrequente Aktivierung TTXr Natriumkanäle führt zur benutzungsabhängigen Blockade. Wird die Reizfrequenz reduziert, kommt es innerhalb kürzester Zeit (ms) zur nahezu kompletten Erholung des Stromes von der phasischen Blockade.

Da TTXr Natriumkanälen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Weiterleitung chronischer Schmerzen zugeschrieben wird (Waxman, 1999; Porreca *et al.*, 1999), wäre für die adäquate Therapie chronischer Schmerzen eine selektive, hochpotente Hemmung TTXr Natriumkanäle von großer Bedeutung. Da TTXr Natriumkanäle nur im peripheren Nervensystem (der Natriumkanal von Herzmuskelzellen ist ebenfalls durch TTX blockierbar, wenn auch mit höherer  $IC_{50}$  als TTXs Kanäle) und hier bevorzugt auf Neuronen mit den Eigenschaften von Nozizeptoren vorkommen, wäre eine gezielte Behandlung chronischer Schmerzen ohne unerwünschte Nebenwirkungen, z.B. kardiale Rhythmusstörungen oder motorische Störungen, möglich. Wie für die neuroprotektive Wirkung von Crobenetin (Carter *et al.*, 2000) ist auch für die mögliche analgetische Wirkung die benutzungs- und frequenzabhängige Blockade von wesentlicher Bedeutung. Es würden präferentiell solche Neurone und Nervenfasern blockiert werden, die hochfrequent Aktionspotentiale generieren und weiterleiten. Auch die hohe Affinität für den inaktivierten Kanalzustand würde eine Blockade aktiver Nervenfasern und Neurone fördern. Je aktiver ein Neuron ist, d.h. je mehr Aktionspotentiale es generiert und weiterleitet, umso höher ist die Anzahl der aktiven Natriumkanäle und damit auch der inaktiven Kanäle. Die schnelle Erholung vom benutzungsabhängigen Block nach hochfrequenter Stimulation ist ebenfalls eine wünschenswerte Eigenschaft für einen Natriumkanalblocker, da so niedrigfrequent kodierte Information eher weitergeleitet wird, als hochfrequente Signale. Da die empfundene Reizstärke im Nervensystem durch die Frequenz der Aktionspotentiale kodiert wird, würden (unter der Annahme, daß die Frequenz der Natriumkanalaktivierung mit der Aktionspotentialfrequenz korreliert) nur niedrigfrequente, nicht schmerzhafte Reize weitergeleitet werden.

#### **4.3.2 Beeinflussung einzelner Aktionspotentiale durch Crobenetin**

Die Aktivierung von TTXr Natriumkanälen primär sensorischer Neurone kann zur Generierung TTXr Aktionspotentiale führen. Wie TTXr Natriumströme werden auch die TTXr Aktionspotentiale durch Lokalanästhetika inhibiert (Scholz & Vogel, 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt, daß auch Crobenetin in Konzentrationen, die TTXr Natriumkanäle wirkungsvoll blockieren, Einfluß auf TTXr Aktionspotentiale hat. Quantifiziert wurde die



Wirkung von Crobenetin auf einzelne TTXr Aktionspotentiale durch die Messung von Aktionspotentialamplitude und Aktionspotentialdauer. Im Gegensatz zu der beschriebenen einheitlichen Verringerung der Amplitude TTXr Aktionspotentiale durch Lokalanästhetika (Scholz & Vogel, 2000) zeigt Crobenetin an verschiedenen Neuronen unterschiedliche Wirkungen. Bei einer Gruppe von Zellen kommt es, wie von einer Substanz, die spannungsabhängige Natriumkanäle hemmt erwartet, zu einer signifikanten Reduktion der Aktionspotentialamplitude. Vergleicht man die Wirkung von 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin auf TTXr Natriumströme mit der Verringerung der Aktionspotentialamplitude, zeigt sich, daß die Substanz in der verwendeten, niedrigen Konzentration TTXr Natriumströme und TTXr Aktionspotentiale quantitativ ähnlich beeinflusst. Die tonische Blockade der TTXr Natriumströme durch 1  $\mu\text{M}$  Crobenetin beträgt ca. 25%, die Aktionspotentialamplitude wird durch die gleiche Konzentration um 17% reduziert. Da in der vorliegenden Arbeit die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Beeinflussung von TTXr Aktionspotentialen durch Crobenetin nicht untersucht wurde, ist es schwer vorauszusagen, ob, wie für Lokalanästhetika beschrieben (Scholz & Vogel, 2000), die halbmaximale Wirkungskonzentration von Crobenetin zur Reduktion der Aktionspotentialamplitude ebenfalls höher ist als für die tonische Blockade der TTXr Natriumströme. Diese Diskrepanz der halbmaximalen Wirkungskonzentrationen liegt der sog. „Sicherheitsfaktor“ zugrunde, d.h. nur ein Bruchteil der in einer Nervenzellmembran vorhandenen Natriumkanäle ist zur Generierung eines Aktionspotentials notwendig (Hodgkin & Rushton, 1946).

Interessanterweise zeigte eine zweite Gruppe von Neuronen genau das Gegenteil des erwarteten Effektes, nämlich eine Vergrößerung der Amplitude nach der Applikation von Crobenetin. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte eine bisher unbekannte Wirkung der Substanz auf andere Ionenkanäle oder Rezeptoren sein. So würde eine Blockade spannungsabhängige Kaliumkanäle, insbesondere sog. *delayed rectifier* Kaliumkanäle, die für die Repolarisation nach einem Aktionspotential verantwortlich sind (Hille, 2001), zur Vergrößerung der Aktionspotentialamplitude führen.

### 4.3.3 Komplexe Wirkung von Crobenetin auf Aktionspotentialserien

Eine Untergruppe primär sensorischer Neurone antwortet auf eine längere Stimulation (1 s) mit der Generierung von Aktionspotentialserien. Da im Nervensystem die Intensität eines Reizes durch die Aktionspotentialfrequenz kodiert wird, eignen sich Neurone der beschriebenen Untergruppe zur Untersuchung des Einflusses von Pharmaka, z.B. Crobenetin,

auf die Reizweiterleitung. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Parameter waren die initiale Aktionspotentialfrequenz und die Anzahl der Aktionspotentiale während eines Reizes. Die Hälfte der untersuchten Neurone reagierte auf die Applikation von 1  $\mu$ M Crobenetin mit einer Erniedrigung der initialen Feuerfrequenz, bei 3 dieser Zellen wurde zusätzlich die Anzahl der Aktionspotentiale während des Reizes gesenkt. Diese Reaktion läßt sich durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle erklären. Wie auch für einzelne Aktionspotentiale beobachtet, ließ sich durch Applikation von Crobenetin die Generierung von Aktionspotentialen nicht komplett inhibieren. Die Reduktion der initialen Feuerfrequenz und der Aktionspotentialanzahl von sensorischen Neuronen, die aufgrund ihrer Größe als nozizeptive Neurone einzustufen sind, läßt die Vermutung zu, daß Crobenetin neben seiner Verwendung als Neuroprotektivum (Carter *et al.*, 2000) zukünftig auch als Analgetikum zur Therapie chronischer Schmerzen eingesetzt werden könnte. Tatsächlich wurde die Substanz an einem Tiermodell für chronische Schmerzen getestet und eine analgetische Wirkung von Crobenetin beschrieben. Allerdings war die analgetische Potenz niedriger, als man es von einem hochpotenten Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle erwarten würde (Laird *et al.*, 2001). Die andere Hälfte der repetitiv Aktionspotentiale generierenden Neurone reagierte sehr viel komplexer auf die Applikation von Crobenetin. Niedrige Konzentrationen beeinflussten die Feuerrate kaum, eine Steigerung der Konzentration führte erst zu einer Reduktion der Feuerfrequenz, mit höheren Konzentrationen wurde dann aber eine erneute Zunahme der Feuerfrequenz sowie der Aktionspotentialanzahl beobachtet. Dieser nicht einheitlichen Wirkung von Crobenetin liegt wahrscheinlich die Beeinflussung anderer Ionenkanäle zugrunde. Vorstellbar wäre eine Blockade von Subtypen spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Daß eine Blockade bestimmter spannungsabhängiger Kaliumkanäle nicht zu einem einheitlichen Effekt auf die Erregbarkeit sensorischer Neurone führen würde, liegt an der Vielzahl der unterschiedlichen Kaliumkanaltypen und die unterschiedliche Ausstattung verschiedener sensorischer Neurone mit diesen (Safronov *et al.*, 1996). Da bei einzelnen Aktionspotentialen beobachtet wurde, daß die einem Aktionspotential folgende Nachhyperpolarisation unter dem Einfluß von Crobenetin regelmäßig kleiner ausfiel, wäre so eine weniger starke und kürzere Depolarisation notwendig, um das Membranpotential erneut in den überschwelligeren Bereich zu depolarisieren und somit die Generierung eines neuen Aktionspotentials auszulösen. Ein weiterer Hinweis auf eine zusätzliche Blockade von Kaliumkanälen ist die durch Crobenetin ausgelöste Depolarisation des Ruhemembranpotentials. Eine solche Depolarisation kann einerseits die Erregbarkeit der Zelle steigern, indem das Membranpotential der Schwelle für die Aktionspotentialgenerierung

angenähert wird. Andererseits kann eine Depolarisation auch zu einer verminderten Erregbarkeit führen, indem sich ein größerer Anteil spannungsabhängiger Natriumkanäle im inaktivierten Zustand befindet und weniger Natriumstrom für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials zur Verfügung steht.

Crobenetin ist ein hochaffiner Blocker TTXr Natriumkanäle mit analgetischen Eigenschaften und könnte bei geringen zu erwartenden Nebenwirkungen (Carter *et al.*, 2000; Laird *et al.*, 2001) zur Behandlung chronischer Schmerzen eingesetzt werden. Auch andere Schmerzreize, an deren Weiterleitung TTXr Natriumkanäle beteiligt sind, wären mit Crobenetin zu therapieren, z.B. inflammatorische Schmerzen, an deren Transduktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Capsaicinrezeptor wesentlich beteiligt ist (Caterina *et al.*, 2000)

## 5 Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurden in Teil I native Capsaicinrezeptoren sensorischer Neurone zum ersten Mal in einer Dünnschnittpräparation von Spinalganglien junger Ratten untersucht. Unter Anwendung der *patch-clamp* Technik wurden die funktionellen Eigenschaften des Capsaicinrezeptors in der *whole-cell* Konfiguration und auf Einzelkanalebene beschrieben.
- 2) Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung des von der Firma Boehringer Ingelheim als Neuroprotektivum synthetisierten Natriumkanalblockers Crobenetin (BIII 890 CL) auf TTX-resistente Natriumkanäle und TTX-resistente Aktionspotentiale sensorischer Neurone ebenfalls in der Dünnschnittpräparation untersucht.
- 3) Der Median der Amplitude des Capsaicin-induzierten Ganzzellstromes betrug bei einem Haltepotential von  $-80$  mV nur  $54$  pA. Diese niedrige Amplitude steht im Gegensatz zu den im nA-Bereich liegenden Capsaicin-aktivierten Ganzzellströmen, die in akut dissoziierten oder kultivierten sensorischen Neuronen bei ähnlich negativen Membranpotentialen beschrieben wurden. Die Strom-Spannungs-Beziehung des Capsaicin-aktivierten Ganzzellstromes zeigte starke auswärtsgerichtete Eigenschaften, bei einem Haltepotential von  $80$  mV betrug der Median der Stromamplitude  $1.8$  nA.
- 4) Nur 2 von 38 untersuchten Neuronen reagierten auf die Applikation von Capsaicin mit der Generierung von Aktionspotentialen. In den anderen Neuronen blieb die Depolarisation unterschwellig. Auch diese Ergebnisse unterscheiden sich von den in der Literatur beschriebenen Daten, wo es in dissoziierten und kultivierten sensorischen Neuronen nach Stimulation mit Capsaicin regelmäßig zur Generierung von Aktionspotentialen kam.

- 5) Sowohl die Capsaicin-aktivierten Ströme als auch die Depolarisation der Zellmembran durch Capsaicin waren durch den Capsaicinrezeptor-Antagonisten Capsazepin zu blockieren.
- 6) Capsaicin induzierte in *patches* sowohl in der *outside-out* als auch in der *inside-out* Konfiguration Einzelkanalaktivität, die durch Capsazepin blockiert wurde. Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit der Capsaicin-aktivierten Kanäle stieg spannungsabhängig von 0.06 bei einem Haltepotential von  $-80$  mV auf 0.5 bei  $80$  mV an. Die Einzelkanalleitfähigkeit zeigte auswärtsgerichtete Eigenschaften. Bei  $-80$  mV ergab sich eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $23$  pS, bei  $80$  mV betrug diese  $55$  pS. Der Capsaicinrezeptor benötigt also für eine hohe Offenwahrscheinlichkeit nicht nur die Bindung eines Liganden sondern besitzt auch eine spannungsabhängige Komponente. Diese beobachtete Spannungsabhängigkeit erklärt die in der *whole-cell* Konfiguration gemessenen kleinen Amplituden bei negativen Haltepotentialen.
- 7) Durch Strominjektion ausgelöste Aktionspotentiale wurden sowohl in ihrer Amplitude als auch in ihrer Länge durch Capsaicin beeinflusst. Bei der Mehrzahl der untersuchten Neurone ( $76\%$ ) kam es zu einer Abnahme der Aktionspotentialamplitude bzw. dem Verlust des gesamten Aktionspotentials. Eine kleine Gruppe von Neuronen ( $11.5\%$ ) reagierte mit einem Anstieg der Aktionspotentialamplitude. Bezüglich der Aktionspotentialdauer ließen sich ebenfalls drei Gruppen von Neuronen unterscheiden. Es wurden sowohl längere als auch kürzere Aktionspotentiale unter dem Einfluß von Capsaicin beobachtet. In einer kleinen Gruppe kam es zu keiner Änderung der Aktionspotentialdauer.
- 8) Die in Teil II der vorliegenden Arbeit untersuchten TTX-resistenten Natriumströme werden hochpotent, konzentrations- und benutzungsabhängig durch Crobenetin inhibiert. Die halbmaximalen Wirkungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) betragen  $17.4$   $\mu$ M für die tonische und  $0.74$   $\mu$ M für die phasische (benutzungsabhängige) Blockade. Für inaktivierte TTX-resistente Natriumkanäle lag die  $IC_{50}$  bei  $0.1$   $\mu$ M. Die entsprechenden Werte für das Lokalanästhetikum Lidocain liegen um den Faktor  $10 - 600$  höher. Bei Crobenetin handelt es sich um einen der potentesten Blocker TTX-resistenter Natriumkanäle, der mit der Lokalanästhetikabindungsstelle des Kanals interagiert.

- 9) Die benutzungsabhängige Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle durch Crobenetin ist abhängig vom Haltepotential. Eine maximale benutzungsabhängige Blockade wurde bei einem Haltepotential von  $-75$  mV und hoher Stimulationsfrequenz (10 Hz) gefunden. Folgte einer hochfrequenten Impulsserie die Stimulation mit niedrigerer Frequenz, kam es innerhalb weniger Impulse zur Erholung von der benutzungsabhängigen Blockade.
  
- 10) Die Dauer einzelner TTX-resistenter Aktionspotentiale nahm unter der Wirkung von Crobenetin bei allen untersuchten Neuronen konzentrationsabhängig zu. Hinsichtlich der Wirkung von Crobenetin auf die Aktionspotentialamplitude ließen sich 2 Gruppen von Neuronen unterscheiden. In der ersten Gruppe (41% der Neurone) führte Crobenetin zur Reduktion der Amplitude während eine zweite Gruppe von Neuronen (59%) mit dem Anstieg der Aktionspotentialamplitude reagierte.
  
- 11) Die Wirkung von Crobenetin auf Serien TTX-resistenter Aktionspotentiale war komplex. Neben der von einem Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle erwarteten Reduktion der Feuerrate kam es in einzelnen Neuronen nach Verringerung der Aktionspotentialfrequenz bei niedrigen Konzentrationen auch zu einer Zunahme der Feuerrate mit steigender Konzentration von Crobenetin. Die unterschiedlichen Effekte von Crobenetin auf einzelne Aktionspotentiale und Aktionspotentialserien könnten durch eine Beeinflussung anderer Ionenkanäle, insbesondere spannungsabhängiger Kaliumkanäle bedingt sein.
  
- 12) Wegen seiner hohen Potenz und ausgeprägten benutzungsabhängigen Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle könnte das als Neuroprotektivum synthetisierte Crobenetin auch als Analgetikum zur Therapie chronischer und entzündungsbedingter Schmerzen mit geringen Nebenwirkungen eingesetzt werden. Entsprechende Studien an einem Tiermodell zeigten die analgetische Potenz von Crobenetin mit geringen systemischen Nebenwirkungen.

## 6 Anhang

### 6.1 Literatur

Akins, P. T. & McCleskey, E. W. (1993). Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP. *Neuroscience* **56**, 759-769.

Akopian, A. N., Sivilotti, L., & Wood, J. N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* **379**, 257-262.

Akopian, A. N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., Smith, A., Kerr, B. J., McMahon, S. B., Boyce, S., Hill, R., Stanfa, L. C., Dickenson, A. H., & Wood, J. N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience* **2**, 541-548.

Allen, C. N., Brady, R., Swann, J., Hori, N., & Carpenter, D. O. (1988). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are inactivated by trypsin. *Brain Research* **458**, 147-150.

Armstrong, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiological Reviews*. **61**, 644-683.

Babes, A., Amuzescu, B., Krause, U., Scholz, A., Flonta, M. L., & Reid, G. (2002). Cooling inhibits capsaicin-induced currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neuroscience Letters* **317**, 131-134.

Baccaglioni, P. I. & Hogan, P. G. (1983). Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **80**, 594-598.

Baker, M. D. & Wood, J. N. (2001). Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*. **22**, 27-31.

Baumann, T. K. & Martenson, M. E. (2000). Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels. *Journal of Neuroscience* **20**, RC80-RU12.

Beneski, D. A. & Catterall, W. A. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **77**, 639-643.

Benham, C. D. & Tsien, R. W. (1987). A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* **238**, 275-278.

Benndorf, K. (1995). Low-noise recording. In *Single-Channel Recording*, eds. Sakmann, B. & Neher, E., pp. 129-145. Plenum Press, New York and London.

Benson, C. J., Eckert, S. P., McCleskey, E. W. (1999). Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circulation Research* **84**, 921-928.

Bernstein, J. (1902). Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme, Erster Theil. *Pflügers Archiv* **92**, 521-562.

- Bernstein, J. (1912). *Elektrobiologie*, pp. 215. Serie: Die Wissenschaft, Band 44; Vieweg, Braunschweig.
- Bevan, S. & Geppetti, P. (1994). Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends in Neurosciences* **17**, 509-512.
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S., & Yeats, J. C. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology* **107**, 544-552.
- Bräu, M. E. & Elliott, J. R. (1998). Local anaesthetic effects on tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurones. *European Journal of Anaesthesiology* **15**, 80-88.
- Bräu, M. E., Vogel, W., & Hempelmann, G. (1998). Fundamental properties of local anesthetics: Half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in peripheral nerve. *Anesthesia and Analgesia* **87**, 885-889.
- Brock, J. A., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *Journal of Physiology* **512**, 211-217.
- Butterworth, J. F. & Strichartz, G. R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* **72**, 711-734.
- Cantrell, A. R., Ma, J. Y., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* **16**, 1019-1026.
- Carter, A. J., Grauert, M., Pischorn, U., Bechtel, W. D., BartmannLindholm, C., Qu, Y. S., Scheuer, T., Catterall, W. A., & Weiser, T. (2000). Potent blockade of sodium channels and protection of brain tissue from ischemia by BIII890CL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 4944-4949.
- Caterina, M. J. & Julius, D. (2001). The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 487-517.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., PetersenZeit, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306-313.
- 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.
- Catterall, W. A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **20**, 15-43.
- Catterall, W. A. (1986). Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends in Neuroscience* **9**, 7-10.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.



- Cesare, P. & McNaughton, P. (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 15435-15439.
- Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* **21**, 919-931.
- Chard, P. S., Bleakman, D., Savidge, J. R., & Miller, R. J. (1995). Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* **65**, 1099-1108.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428-431.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 387-396.
- Cole, K. S. & Curtis, H. J. (1939). Electrical impedance of the squid giant axon during activity. *Journal of General Physiology* **22**, 649-670.
- Courtney, K. R. (1975). Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **195**, 225-236.
- Cummins, T. R., Black, J. A., DibHajj, S. D., & Waxman, S. G. (2000). Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and Na<sup>v</sup> sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* **20**, 8754-8761.
- Cummins, T. R., DibHajj, S. D., Black, J. A., Akopian, A. N., Wood, J. N., & Waxman, S. G. (1999). A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *Journal of Neuroscience* **19**, 1-6.
- Cummins, T. R. & Waxman, S. G. (1997). Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *Journal of Neuroscience* **17**, 3503-3514.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A., & Sheardown, S. A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183-187.
- Devor, M., Govrin-Lippmann, R., & Angelides, K. (1993). Na<sup>v</sup> channel immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *Journal of Neuroscience* **13**, 1976-1992.
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Felts, P., & Waxman, S. G. (1996). Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 14950-14954.

- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1998). Na<sub>v</sub>N, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 8963-8968.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S., & Boddeke, H. W. (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin- evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflügers Archiv* **431**, 828-837.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., & Piper, A. S. (1997). Capsazepine block of voltage activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *British Journal of Pharmacology* **121**, 1461-1467.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., & Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv* **414**, 600-612.
- Eglen, R. M., Hunter, J. C., & Dray, A. (1999). Ions in the fire: recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 337-342.
- Elliott, A. A. & Elliott, J. R. (1993). Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *Journal of Physiology* **463**, 39-56.
- England, S., Bevan, S., & Docherty, R. J. (1996). PGE<sub>2</sub> modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *Journal of Physiology* **495**, 429-440.
- Fjell, J., Cummins, T. R., Dib-Hajj, S., Fried, K., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1999a). Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Molecular Brain Research* **67**, 267-282.
- Fjell, J., Cummins, T. R., Fried, K., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1999b). In vivo NGF deprivation reduces SNS expression and TTX-R sodium currents in IB4-negative DRG neurons. *Journal of Neurophysiology* **81**, 803-810.
- Frazier, D. T., Narahashi, T., & Yamada, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics. II. Experiments with quaternary compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **171**, 45-51.
- Garcia-Guzman, M., Stühmer, W., & Soto, F. (1997). Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X<sub>3</sub> purinoceptor. *Molecular Brain Research* **47**, 59-66.
- Gold, M. S. (1999). Tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents and inflammatory hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7645-7649.
- Gold, M. S., Reichling, D. B., Shuster, M. J., & Levine, J. D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 1108-1112.
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annual Review of Physiology* **63**, 871-894.

Goldin, A. L., Snutch, T., Lubbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L. C., Lester, H. A., Dunn, R., & . (1986). Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**, 7503-7507.

Gould, H. J., III, Gould, T. N., England, J. D., Paul, D., Liu, Z. P., & Levinson, S. R. (2000). A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain. *Brain Research* **854**, 19-29.

Grosskreutz, J., Quasthoff, S., Kuhn, M., & Grafe, P. (1996). Capsaicin blocks tetrodotoxin-resistant sodium potentials and calcium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve in vitro. *Neuroscience Letters* **208**, 49-52.

Gruß, M. (1998). Eigenschaften und Funktionen von BK<sub>Ca</sub>-Kanälen in kleinen Hinterwurzelganglienzellen junger Ratten: Untersuchungen in einer dünnen Schnittpräparation. *Medizinische Dissertation*, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Gunthorpe, M. J., Harries, M. H., Prinjha, R. K., Davis, J. B., & Randall, A. (2000). Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (RVR1). *Journal of Physiology* **525**, 747-759.

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. *Pflügers Archiv* **391**, 85-100.

Harper, A. A. & Lawson, S. N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology* **359**, 31-46.

Hartshorne, R. P. & Catterall, W. A. (1981). Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **78**, 4620-4624.

Hartshorne, R. P., Keller, B. U., Talvenheimo, J. A., Catterall, W. A., & Montal, M. (1985). Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 240-244.

Hartshorne, R. P., Messner, D. J., Coppersmith, J. C., & Catterall, W. A. (1982). The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 13888-13891.

Helliwell, R. J., McLatchie, L. M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S., & McIntyre, P. (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neuroscience Letters* **250**, 177-180.

Herzog, R. I., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Persistent TTX-resistant Na<sup>+</sup> current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* **86**, 1351-1364.

Hilborn, M. D., Vaillancourt, R. R., & Rane, S. G. (1998). Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway. *Journal of Neuroscience* **18**, 590-600.

- Hille, B. (1966). Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature* **210**, 1220-1222.
- Hille, B. (1975). The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophysical Journal* **15**, 615-619.
- Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal* **22**, 283-294.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3. Edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* **144**, 710-711.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology* **117**, 500-544.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *Journal of Physiology* **116**, 449-472.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Archives des Sciences Physiologiques* **3**, 129-150.
- Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *Journal of Physiology* **108**, 37-77.
- Hodgkin, A. L. & Rushton, W. A. H. (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **133**, 444-479.
- Holzer, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* **43**, 143-201.
- Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y. G., Kim, D., & Oh, U. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 6155-6160.
- Ikeda, H., Tokita, Y., & Suda, H. (1997). Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp. *Journal of Dental Research* **76**, 1341-1349.
- Isom, L. L. (2000). I. Cellular and molecular biology of sodium channel beta-subunits: therapeutic implications for pain? I. Cellular and molecular biology of sodium channel beta-subunits: therapeutic implications for pain? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **278**, G349-G353.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **256**, 839-842.

- Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**, 433-442.
- Jancso, G., Kiraly, E., & Jancso-Gabor, A. (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* **270**, 741-743.
- Jancso, N. & Jancso, A. (1949). Desensitization of sensory nerve endings. *Kiserletes Orvostudomány* **2**, 15.
- Jordt, S. E., Tominaga, M., & Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 8134-8139.
- 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. *Journal of Neuroscience* **19**, 529-538.
- Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., & Irisawa, H. (1984). Intracellular Na<sup>+</sup> activates a K<sup>+</sup> channel in mammalian cardiac cells. *Nature* **309**, 354-356.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., & Blumberg, P. M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 28613-28619.
- Kirschstein, T., Greffrath, W., Busselberg, D., & Treede, R. D. (1999). Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *Journal of Neurophysiology* **82**, 2853-2860.
- Kontis, K. J., Rounaghi, A., & Goldin, A. L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *Journal of General Physiology* **110**, 391-401.
- Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., & Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* **17**, 3525-3537.
- Kostyuk, P. G., Veselovsky, N. S., & Tsyndrenko, A. Y. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience* **6**, 2423-2430.
- Kress, M., Fetzer, S., Reeh, P. W., & Vyklicky, L. (1996). Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat. *Neuroscience Letters* **211**, 5-8.
- Kruger, L., Perl, E. R., & Sedivec, M. J. (1981). Fine structure of myelinated mechanical nociceptor endings in cat hairy skin. *Journal of Comparative Neurology* **198**, 137-154.
- Kwak, J., Wang, M. H., Hwang, S. W., Kim, T. Y., Lee, S. Y., & Oh, U. (2000). Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains [In Process Citation]. *Journal of Neuroscience* **20**, 8298-8304.

- Laird, J. M., Carter, A. J., Grauert, M., & Cervero, F. (2001). Analgesic activity of a novel use-dependent sodium channel blocker, crobenetine, in mono-arthritic rats. *British Journal of Pharmacology* **134**, 1742-1748.
- Läuger, P. (1991). *Electrogenic Ion Pumps*, 1. Edition, Sinauer Associates, Sunderland, Mass..
- Lawson, S. N. (1981). Dorsal root ganglion neurones and dorsal roots: effects of neonatal capsaicin. In *Spinal Cord Sensation*, 57-58. Scottish Academic Press, Edinburgh.
- Lawson, S. N., Harper, A. A., Harper, E. I., Garson, J. A., & Anderton, B. H. (1984). A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *Journal of Comparative Neurology* **228**, 263-272.
- Lerche, H., Peter, W., Fleischhauer, R., Pika-Hartlaub, U., Malina, T., Mitrovic, N., & Lehmann-Horn, F. (1997). Role in fast inactivation of the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na<sup>+</sup> channel probed by cysteine mutagenesis. *Journal of Physiology* **505 ( Pt 2)**, 345-352.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, 432-435.
- Liu, L., Oortgiesen, M., Li, L., & Simon, S. A. (2001). Capsaicin Inhibits Activation of Voltage-Gated Sodium Currents in Capsaicin-Sensitive Trigeminal Ganglion Neurons. *Journal of Neurophysiology* **85**, 745-758.
- Liu, L. & Simon, S. A. (1994). A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 738-741.
- Liu, L. & Simon, S. A. (1996). Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca<sup>2+</sup> dependence in rat trigeminal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology* **75**, 1503-1514.
- Liu, L. & Simon, S. A. (1997). Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience Letters* **228**, 29-32.
- Liu, L. & Simon, S. A. (1998). The influence of removing extracellular Ca<sup>2+</sup> in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Research* **809**, 246-252.
- Liu, L., Szallasi, A., & Simon, S. A. (1998). A non-pungent resiniferatoxin analogue, phorbol 12-phenylacetate 13 acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* **84**, 569-581.
- Lopshire, J. C. & Nicol, G. D. (1998). The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E-2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: Whole-cell and single-channel studies. *Journal of Neuroscience* **18**, 6081-6092.
- Marsh, S. J., Stansfeld, C. E., Brown, D. A., Davey, R., & McCarthy, D. (1987). The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience* **23**, 275-289.

- McCleskey, E. W. & Gold, M. S. (1999). Ion channels of nociception. *Annual Review of Physiology* **61**, 835-856.
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12025-12034.
- Meyer, R. A., Campbell, J. N., & Raja, S. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. In *Textbook of Pain* pp. 13-44. Churchill Livingstone.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 3655-3660.
- Michael, G. J. & Priestley, J. V. (1999). Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *Journal of Neuroscience* **19**, 1844-1854.
- Morgan, K., Stevens, E. B., Shah, B., Cox, P. J., Dixon, A. K., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., Richardson, P. J., Mizuguchi, K., & Jackson, A. P. (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2308-2313.
- Mozhayeva, G. N., Naumov, A. P., Negulayev, Y. A., Nosyreva, E. D. (1977). The permeability of aconitine-modified sodium channels to univalent cations in myelinated nerve. *Biochimica et Biophysica Acta* **466**, 461-473.
- Murphy, B. J., Rossie, S., De Jongh, K. S., & Catterall, W. A. (1993). Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na<sup>+</sup> channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27355-27362.
- Nagy, I. & Rang, H. (1999a). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **88**, 995-997.
- Nagy, I. & Rang, H. P. (1999b). Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *Journal of Neuroscience* **19**, 10647-10655.
- Narahashi, T., Moore, J. W., & Scott, W. R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *Journal of General Physiology* **47**, 965-974.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., & . (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.

- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., & Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Letters* **259**, 213-216.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.
- Ogata, N. & Tatebayashi, H. (1993). Kinetic analysis of two types of Na<sup>+</sup> channels in rat dorsal root ganglia. *Journal of Physiology* **466**, 9-37.
- Oh, U., Hwang, S. W., & Kim, D. (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* **16**, 1659-1667.
- Olah, Z., Karai, L., & Iadarola, M. J. (2001). Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 31163-31170.
- Pallotta, B. S., Magleby, K. L., & Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**, 471-474.
- Petersen, M. & LaMotte, R. H. (1993). Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells. *Pain* **54**, 37-42.
- Piper, A. S., Yeats, J. C., Bevan, S., & Docherty, R. J. (1999). A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *Journal of Physiology* **518**, 721-733.
- Porreca, F., Lai, J., Bian, D., Wegert, S., Ossipov, M. H., Eglén, R. M., Kassotakis, L., Novakovic, S., Rabert, D. K., Sangameswaran, L., & Hunter, J. C. (1999). A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7640-7644.
- Premkumar, L. S. & Ahern, G. P. (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**, 985-990.
- Quasthoff, S., Grosskreutz, J., Schroder, J. M., Schneider, U., & Grafe, P. (1995). Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. *Neuroscience* **69**, 955-965.
- Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science* **265**, 1724-1728.
- Ratcliffe, C. F., Qu, Y., McCormick, K. A., Tibbs, V. C., Dixon, J. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2000). A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nature Neuroscience* **3**, 437-444.
- Reichling, D. B. & Levine, J. D. (1997). Heat transduction in rat sensory neurons by calcium-dependent activation of a cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**, 7006-7011.
- Reid, G. & Flonta, M. L. (2001). Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature* **413**, 480.



- Ritter, A. M. & Mendell, L. M. (1992). Somal membrane properties of physiologically identified sensory neurons in the rat: effects of nerve growth factor. *Journal of Neurophysiology* **68**, 2033-2041.
- Rogers, J. C., Qu, Y., Tanada, T. N., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 15950-15962.
- Roy, M. L. & Narahashi, T. (1994). Sodium Channels of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. In *Ion Channels of Excitable Cells*, ed. Ion Channels of Excitable Cells (Ed.), pp. 21-38.
- Roza, C., Bernardini, N., Kress, M., Messlinger, K., Miermeister, F., Reeh, P. W., & Sauer, S. VR1 involved in transduction of noxious stimuli? *Society of Neurosciences, Abstract* **27**, #926.4. 2001.
- Rush, A. M., Bräu, M. E., Elliott, A. A., & Elliott, J. R. (1998). Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *Journal of Physiology* **511**, 771-789.
- Safronov, B. V., Bischoff, U., & Vogel, W. (1996). Single voltage gated K<sup>+</sup> channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *Journal of Physiology* **493**, 393-408.
- Sangameswaran, L., Delgado, S. G., Fish, L. M., Koch, B. D., Jakeman, L. B., Stewart, G. R., Sze, P., Hunter, J. C., Eglen, R. M., & Herman, R. C. (1996). Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5953-5956.
- Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C., & Kuraishi, Y. (1998). Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**, 2045-2048.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., & Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* **409**, 1047-1051.
- Schaible, H. G. & Schmidt, R. F. (1988). Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *Journal of Neurophysiology* **60**, 2180-2195.
- Scharf, J. H. & Oster, K. (1957). Zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidbarkeit "heller" und "dunkler" pseudounipolarer Ganglienzellen im Ganglion semilunare des Rindes. *Acta Histochemica* **4**, 65-89.
- Schmidt, R. F. & Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*, 26. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Scholz, A., Appel, N., & Vogel, W. (1998a). Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *European Journal of Neuroscience* **10**, 2547-2556.
- Scholz, A., Größ, M., & Vogel, W. (1998b). Properties and functions of calcium-activated K<sup>+</sup> channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *Journal of Physiology* **513**, 55-69.

- Scholz, A., Kuboyama, N., Hempelmann, G., & Vogel, W. (1998c). Complex blockade of TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *Journal of Neurophysiology* **79**, 1746-1754.
- Scholz, A. & Vogel, W. (2000). Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain* **89**, 47-52.
- Schwarz, J.R., Ulbricht, W., Wagner, H.H. (1973). The rate of action of tetrodotoxin on myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis* and *Rana esculenta*. *Journal of Physiology* **233**, 167-194.
- Segond, V. B., Petersen, M., & Heppelmann, B. (1996). Bradykinin receptors in cultured rat dorsal root ganglion cells: influence of length of time in culture. *Neuroscience* **75**, 1211-1218.
- Sheets, M. F., Kyle, J. W., Kallen, R. G., & Hanck, D. A. (1999). The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charged residues of domain IV, S4. *Biophysical Journal* **77**, 747-757.
- Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A. N., Moss, S., & Wood, J. N. (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Letters*. **409**, 49-52.
- Sleeper, A. A., Cummins, T. R., Dib-Hajj, S. D., Hormuzdiar, W., Tyrrell, L., Waxman, S. G., & Black, J. A. (2000). Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy [In Process Citation]. *Journal of Neuroscience* **20**, 7279-7289.
- Smith, M. R. & Goldin, A. L. (1997). Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophysical Journal* **73**, 1885-1895.
- Smith, M. R., Smith, R. D., Plummer, N. W., Meisler, M. H., & Goldin, A. L. (1998). Functional analysis of the mouse Scn8a sodium channel. *Journal of Neuroscience* **18**, 6093-6102.
- Smith, R. D. & Goldin, A. L. (1996). Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neuroscience* **16**, 1965-1974.
- Spath, E. & Darling, S. F. (1930). Synthesis of Capsaicin. *Berliner Chemische Gesellschaft* **63B**, 737-740.
- Sperelakis, N. (1998). *Cell Physiology Source Book*, 2. Edition, Academic Press.
- Srinivasan, J., Schachner, M., & Catterall, W. A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 15753-15757.
- Stebbing, M. J., McLachlan, E. M., & Sah, P. (1998). Are there functional P2X receptors on cell bodies in intact dorsal root ganglia of rats? *Neuroscience* **86**, 1235-1244.
- Steen, K. H., Steen, A. E., & Reeh, P. W. (1995). A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *Journal of Neuroscience* **15**, 3982-3989.

- Strassman, A. M. & Raymond, S. A. (1999). Electrophysiological evidence for tetrodotoxin-resistant sodium channels in slowly conducting dural sensory fibers. *Journal of Neurophysiology* **81**, 413-424.
- Strichartz, G. R. (1973). The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *Journal of General Physiology* **62**, 37-57.
- Stucky, C. L., Abrahams, L. G., & Seybold, V. S. (1998). Bradykinin increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to capsaicin and protons. *Neuroscience* **84**, 1257-1265.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**, 597-603.
- Sugimoto, T., Xiao, C., & Ichikawa, H. (1998). Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves an apoptotic mechanism. *Brain Research* **807**, 147-154.
- Szallasi, A., Biro, T., Szabo, T., Modarres, S., Petersen, M., Klusch, A., Blumberg, P. M., Krause, J. E., & Sterner, O. (1999). A non-pungent triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *British Journal of Pharmacology* **126**, 1351-1358.
- Szallasi, A. & Blumberg, P. M. (1990). Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Research* **524**, 106-111.
- Szallasi, A. & Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews* **51**, 159-211.
- Szallasi, A., Jonassohn, M., Acs, G., Biro, T., Acs, P., Blumberg, P. M., & Sterner, O. (1996). The stimulation of capsaicin-sensitive neurones in a vanilloid receptor-mediated fashion by pungent terpenoids possessing an unsaturated 1,4-dialdehyde moiety. *British Journal of Pharmacology* **119**, 283-290.
- Szoke, E., Balla, Z., Csernoch, L., Czeh, G., & Szolcsanyi, J. (2000). Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport* **11**, 1949-1952.
- Szolcsanyi, J. (2000). Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. **21**, 203-204.
- Takahashi, T. (1990). Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *Journal of Physiology* **423**, 27-46.
- Talvenheimo, J. A., Tamkun, M. M., & Catterall, W. A. (1982). Reconstitution of neurotoxin-stimulated sodium transport by the voltage-sensitive sodium channel purified from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 11868-11871.
- Tanaka, M., Cummins, T. R., Ishikawa, K., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1998). SNS Na<sup>+</sup> channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *Neuroreport* **9**, 967-972.

Tate, S., Benn, S., Hick, C., Trezise, D., John, V., Mannion, R. J., Costigan, M., Plumptre, C., Grose, D., Gladwell, Z., Kendall, G., Dale, K., Bountra, C., & Woolf, C. J. (1998). Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature Neuroscience* **1**, 653-655.

Taylor, C. P. & Meldrum, B. S. (1995). Na<sup>+</sup> channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*. **16**, 309-316.

Taylor, D. C., Pierau, F. K., & Szolcsanyi, J. (1985). Capsaicin-induced inhibition of axoplasmic transport is prevented by nerve growth factor. *Cell and Tissue Research* **240**, 569-573.

Taylor, R. E. (1959). Effect of procaine on electrical properties of squid axon membrane. *American Journal of Physiology* **196**, 1071-1078.

Terlau, H., Heinemann, S. H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., & Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letters*. **293**, 93-96.

Tognetto, M., Amadesi, S., Harrison, S., Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M., Matera, M., Geppetti, P., & Bianchi, A. (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *Journal of Neuroscience* **21**, 1104-1109.

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.

Tominaga, M., Wada, M., & Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 6951-6956.

Treede, R. D. & Magerl, W. (1995). Modern concepts of pain and hyperalgesia: Beyond the polymodal C-nociceptor. *News in Physiological Sciences* **10**, 216-228.

Vassilev, P., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1989). Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**, 8147-8151.

Vassilev, P. M., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**, 1658-1661.

Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J. B., & McNaughton, P. A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *Journal of Physiology* **534**, 813-825.

Viana, F., De La, P. E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature Neuroscience* **5**, 254-260.

Viana, F., de la Pena, E., Pecson, B., Schmidt, R. F., & Belmonte, C. (2001). Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons. *European Journal of Neuroscience* **13**, 722-734.

- Villiere, V. & McLachlan, E. M. (1996). Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *Journal of Neurophysiology* **76**, 1924-1941.
- Vyklicky, L. & Knotkova-Urbancova, H. (1996). Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiological Research* **45**, 1-9.
- Vyklicky, L., Knotkova-Urbancova, H., Vitaskova, Z., Vlachova, V., Kress, M., & Reeh, P. W. (1998). Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *Journal of Neurophysiology* **79**, 670-676.
- Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., & Lazdunski, M. (1997a). Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na<sup>+</sup> channel specific for sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20975-20978.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., & Lazdunski, M. (1997b). A proton gated cation channel involved in acid sensing. *Nature* **386**, 173-177.
- Walpole, C. S., Bevan, S., Bloomfield, G., Breckenridge, R., James, I. F., Ritchie, T., Szallasi, A., Winter, J., & Wrigglesworth, R. (1996). Similarities and differences in the structure-activity relationships of capsaicin and resiniferatoxin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 2939-2952.
- Walpole, C. S., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Perkins, M. N., Reid, D. J., & Winter, J. (1993a). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 2362-2372.
- Walpole, C. S., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Masdin, K. J., Perkins, M. N., & Winter, J. (1993b). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 2373-2380.
- Walpole, C. S., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Masdin, K. J., Perkins, M. N., & Winter, J. (1993c). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 2381-2389.
- Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R., & Black, J. A. (1999). Sodium channels and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7635-7639.
- Waxman, S. G., Dibhajj, S., Cummins, T. R., & Black, J. A. (2000). Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states. *Brain Research* **886**, 5-14.
- Waxman, S. G., Kocsis, J. D., & Black, J. A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *Journal of Neurophysiology* **72**, 466-470.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 13889-13894.
- West, J. W., Numann, R., Murphy, B. J., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1991). A phosphorylation site in the Na<sup>+</sup> channel required for modulation by protein kinase C. *Science* **254**, 866-868.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)- channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**, 10910-10914.
- Winston, J., Toma, H., Shenoy, M., & Pasricha, P. J. (2001). Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain* **89**, 181-186.
- Winter, J. (1998). Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones. *Neuroscience Letters* **241**, 21-24.
- Wood, J. N. (1993). *Capsaicin in the study of pain* Academic Press, San Diego, CA.
- Wood, J. N., Winter, J., James, I. F., Rang, H. P., Yeats, J., & Bevan, S. (1988). Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *Journal of Neuroscience* **8**, 3208-3220.
- Xue, Q., Yu, Y., Trilk, S. L., Jong, B. E., & Schumacher, M. A. (2001). The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: Evidence for multiple splice variants. *Genomics* **76**, 14-20.
- Yang, N., George, A. L., Jr., & Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* **16**, 113-122.
- Yang, N. & Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**, 213-218.
- Zeilhofer, H. U., Kress, M., & Swandulla, D. (1997). Fractional Ca<sup>2+</sup> currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology* **503**, 67-78.
- Zenker, W. (1994). Feinbau von Rückenmark und Spinalganglien. In *Benninghoff, Anatomie*, 15. Auflage, pp. 434-469. Urban&Schwarzenberg, München.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. 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.

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1 Anatomische Lage des Spinalganglions	11
Abb. 2 Capsaicin	15
Abb. 3 Membrantopologie von VR1	20
Abb. 4 Inaktivierung des spannungsabhängigen Natriumstromes	28
Abb. 5 $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals	30
Abb. 6 Strukturformel von Crobenetin	40
Abb. 7 Schnitt eines Spinalganglions mit einem Biocytin-gefärbten Neuron	47
Abb. 8 <i>voltage-clamp</i> Anordnung mit Rückkopplungswiderstand	53
Abb. 9 <i>voltage-clamp</i> Anordnung mit Rückkopplungskondensator	53
Abb.10 Die vier möglichen <i>patch-clamp</i> Konfigurationen	56
Abb.11 Experimentierkammer	59
Abb.12 CAP-induzierte Einwärtsströme in der <i>whole-cell</i> Konfiguration	67
Abb.13 Amplituden-Histogramm für CAP-induzierte Einwärtsströme	68
Abb.14 Effekte von CAP auf das Membranpotential sensorischer Neurone	69
Abb.15 Einzelkanalaktivität des Capsaicinrezeptors in der <i>inside-out</i> Konfiguration	71
Abb.16 Einzelkanalaktivität des Capsaicinrezeptors in der <i>outside-out</i> Konfiguration	72
Abb.17 Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors	75
Abb.18 Einzelkanalamplitude des Capsaicinrezeptors	76
Abb.19 Der Capsaicinrezeptor hat auswärts gleichrichtende Eigenschaften	77
Abb.20 Verteilung der Leitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors	79
Abb.21 Offenwahrscheinlichkeiten und Leitfähigkeiten in verschiedenen Konfigurationen	80
Abb.22 Reversible Blockade CAP-aktivierter Einzelkanäle durch Capsazepin	82
Abb.23 Effekt von Capsazepin auf CAP-aktivierte Einzelkanäle	82
Abb.24 Spannungsabhängigkeit des CAP-induzierten Ganzzellstromes	84
Abb.25 Capsaicin reduziert die Aktionspotentialamplitude sensorischer Neurone	86
Abb.26 Wirkung von Crobenetin auf TTX-resistente Natriumströme	88
Abb.27 Verlauf der Blockade TTX-resistenter Natriumströme durch Crobenetin	90
Abb.28 Crobenetin bindet an inaktivierte TTX-resistente Natriumkanäle	92
Abb.29 Konzentrations-Wirkungs-Kurven	94
Abb.30 Reversibilität der benutzungsabhängigen Blockade durch Crobenetin bei verschiedenen Haltepotentialen	96
Abb.31 Crobenetin reduziert die Amplitude einzelner TTX-resistenter Aktionspotentiale	99
Abb.32 Crobenetin vergrößert die Amplitude einzelner TTX-resistenter Aktionspotentiale	99
Abb.33 Crobenetin verlängert die Dauer TTX-resistenter Aktionspotentiale	100
Abb.34 Crobenetin reduziert die Feuerrate sensorischer Neurone	101
Abb.35 Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz durch Crobenetin	102

**6.3 Verzeichnis der Tabellen**

Tab. 1	Unabhängigkeit der Stromamplitude von der Zeit nach der Präparation	66
Tab. 2	Offenwahrscheinlichkeit des Capsaicinrezeptors bei verschiedenen Haltepotentialen	73
Tab. 3	Einzelkanalamplituden und –leitfähigkeiten des Capsaicinrezeptors	78
Tab. 4	Offenwahrscheinlichkeiten in der <i>inside-out</i> und <i>outside-out</i> Konfiguration	80
Tab. 5	Leitfähigkeiten in der <i>inside-out</i> und <i>outside-out</i> Konfiguration	81
Tab. 6	Amplituden CAP-induzierter Ganzzellströme bei negativem und positivem Haltepotential	85
Tab. 7	Relative Stromamplitude TTX-resistenter Natriumströme in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Crobenetin	89
Tab. 8	Wirkung von Crobenetin auf vordepolarisierte TTX-resistente Natriumströme	91



## 6.4 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Ulrich Johannes Krause
<b>Geburtsdatum:</b>	27.09.1974
<b>Geburtsort:</b>	Frankfurt/Main
<b>Eltern:</b>	Prof. Dr. Ulrich Krause; Biochemiker, Apotheker Elisabeth Krause, geb. Ernst; Apothekerin
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schulbildung:</b>	1981 – 1985 Lindenschule in Kriftel (Grundschule)  1985 – 1991 Leibnizgymnasium, Frankfurt/M.  1991 – 1994 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt/M. Abitur 1994
<b>Zivildienst:</b>	Juli 1994 – September 1995 Universitätsklinikum Frankfurt/M.
<b>Studium:</b>	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität in Gießen seit dem Wintersemester 1995/96  Oktober 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<b>Auslandsaufenthalte:</b>	September 1999 Famulatur am St.Vincent Hospital, Indianapolis, USA Department of Anesthesiology  April 2000 Famulatur am St.Vincent Hospital, Indianapolis, USA Department of Cardiology  Juni 2001 – Oktober 2001 PJ-Tertial am Tulane University Medical Center, Department of Anesthesiology New Orleans, USA
<b>Wissenschaftliche Tätigkeit:</b>	November 1998 – Dezember 2001 Doktorand im Labor von Prof. Dr. W. Vogel in der AG PD Dr. A. Scholz am Physiologischen Institut der Justus – Liebig – Universität Gießen  Seit Januar 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung „Molekulare Biologie neuronaler Signale“ von Prof. Dr. W. Stühmer am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen

## 6.5 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Werner Vogel, der mich als Doktorand in seinem Labor aufgenommen und mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ebenfalls besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer PD Dr. Andreas Scholz, der für alle Fragen stets ein offenes Ohr hatte, mir bei Problemen immer zur Seite stand und mir an der Untersuchung von Ionenkanälen so viel Freude vermittelt hat. Ihm verdanke ich auch die Möglichkeit, Ergebnisse dieser Arbeit auf vielen nationalen und internationalen Kongressen präsentieren zu können und so nicht nur mit vielen Menschen ins Gespräch zu kommen sondern auch interessante Orte dieser Erde kennen zu lernen.

Frau Brigitte Agari, Frau Elke Sturfels und Herrn Otto Becker danke ich für die hervorragende technische und administrative Unterstützung.

Allen Kollegen danke ich für die freundliche Atmosphäre im Labor.

Für die Möglichkeit, die Crobenetinxperimente an TTXr Natriumkanälen durchführen zu können, bedanke ich mich bei Dr. A.J. Carter, Dr. M. Grauert und Dr. T. Weiser von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG.

Meiner Familie danke ich dafür, daß sie mir das Studium und dadurch auch diese Arbeit ermöglicht hat.

Meiner Freundin Jana Stehr danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis.