

Funktionelle Charakterisierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren an thorakalen und lumbalen, isolierten primärkultivierten Spinalganglienneuronen adulter Ratten

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**vorgelegt von Papadopoulou, Sophia
aus Solingen**

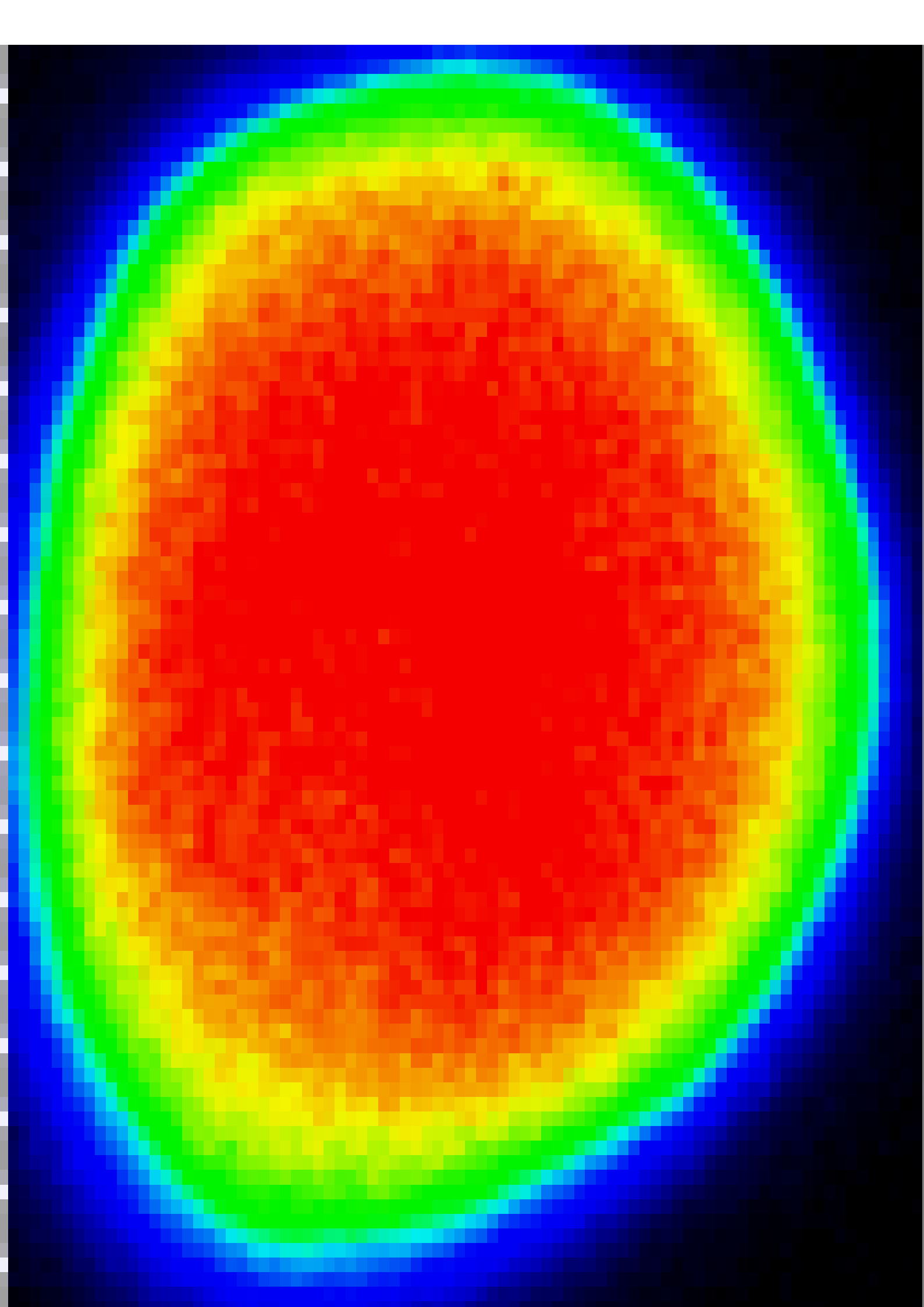
Giessen 2012

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer**

**Betreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer
PD Dr. rer. physiol. Rainer Viktor Haberberger**

**Gutachter I: Prof. Dr. med. W. Kummer
Gutachter II: Prof. Dr. med. R. Schulz
Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. med. H. Renz
Prüfungsmitglied: Prof. Dr. med. A. Bräuninger**

Tag der Disputation: 06. Dezember 2012



1.	EINLEITUNG	1
1.1	Spinalganglien	1
1.1.1	Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau von Spinalganglien	1
1.1.2	Subpopulationen und Funktionen von Spinalganglienneuronen	1
1.2	Periphere Nozizeption in nozizeptiven Spinalganglienneuronen	5
1.2.1	Schmerz	5
1.2.2	Nozizeptoren	6
1.2.3	Grundlagen und Mechanismen der peripheren Nozizeption	6
1.2.4	Transduktion	7
1.3	Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglienneuronen	9
1.3.1	Allgemeines	9
1.3.2	Klassifikation der Acetylcholinrezeptoren	9
1.3.3	Expression neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglien	10
1.3.4	Struktur neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	11
1.3.5	Aktivierungszustände nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	11
1.3.6	Funktion neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	12
1.3.7	Funktion neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglienneuronen	12
1.4	Stickstoffmonoxid und Expression der Stickstoffmonoxidsynthase- Isoformen in Spinalganglienneuronen	14
1.4.1	Allgemeines	14
1.4.2	Synthese des Stickstoffmonoxids und Wirkungsmechanismus der Stickstoffmonoxidsynthase	14
1.4.3	Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen und ihre Expression in Spinalganglien	15
1.4.4	Funktionen der Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen	16
1.5	Fragestellungen und Zielsetzung	18

2.	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Gebrauchsmedien für die Zellkultur	19
2.1.2	Enzymlösungen für die Zellkultur	19
2.1.3	Additive Substanzen zur Zellkultur	19
2.1.4	Einmalartikel	19
2.1.5	Vorbehandlung der Deckgläser	20
2.1.6	Vorbehandlung der Pasteurpipetten	20
2.1.7	Hepes-Ringer-Pufferlösungen	21
2.1.8	Pharmaka	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Gewebes	22
2.2.2	Präparation der Spinalganglien	22
2.2.3	Isolation und Dissoziation der Spinalganglienneurone	22
2.2.4	Primärkultur der dissoziierten Spinalganglienneurone	23
2.2.5	Stickstoffmonoxid-Imaging	24
2.2.6	Beladung isolierter Spinalganglienneurone mit 4,5-Diaminofluorescein-diacetat	25
2.2.7	Versuche an isolierten primärkultivierten 4,5-Diaminofluorescein-diacetat beladenen Spinalganglienneuronen	25
2.2.8	Auswertung	26
3.	ERGEBNISSE	28
3.1	Die Gabe von Nikotin führt in Spinalganglienneuronen zu einer raschen DAF-2-Signalzunahme	28
3.2	Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme ist partiell über nikotinsche Acetylcholinrezeptoren vom $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtyp vermittelt	32
3.3	Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme ist partiell über einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellarraum vermittelt	36
3.4	Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme in thorakalen DRG-Neuronen erfolgt partiell über einen Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ	41

3.5	Nikotin generiert in thorakalen Spinalganglienneuronen ein DAF-2-Signal partiell durch NOS-Aktivität	44
3.6	Der Vergleich der Nikotin-induzierten DAF-2-Signalzunahme in thorakalen mit lumbalen Spinalganglienneuronen	46
4.	DISKUSSION	47
4.1	Die Messung neuronaler NO-Generierung mit 4,5-Diaminofluorescein-diacetat	47
4.2	Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzieren eine rasche intrazelluläre NO-Generierung	50
4.3	Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren vom $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtyp sind partiell in die endogene NO-Generierung involviert	52
4.4	Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte NO-Generierung ist partiell über einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum vermittelt	56
4.5	Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte NO-Generierung ist partiell von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-Typs getragen	60
4.6	Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte DAF-2-Signalzunahme basiert partiell auf einer Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthase	62
4.7	Der Vergleich von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierter NO- Generierung in thorakalen mit lumbalen Spinalganglienneuronen	64
4.8	Medizinische Relevanz der gewonnenen Daten	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	SUMMARY	68
7.	ABKÜRZUNGEN	69
8.	ABBILDUNGEN UND TABELLEN	72
9.	LITERATUR	73
10.	PUBLIKATIONEN	90
11.	ERKLÄRUNG	91
12.	DANKSAGUNG	92

1. EINLEITUNG

1.1 Spinalganglien

1.1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau von Spinalganglien

Spinalganglien (Hinterwurzelganglien, dorsal root ganglia, DRGs) sind spindelförmige Auftreibungen der hinteren Rückenmarkswurzel, die in den Foramina intervertebralia der Wirbelsäule liegen. Sie bestehen aus Ansammlungen von Zellkörpern (Perikaryen) primär-afferenter Neurone des peripheren Nervensystems (PNS). Jedes DRG-Neuron wird von einem Stützgerüst aus zahlreichen Gliazellen unterschiedlichen Zelltyps (Schwannzellen und Satellitenzellen) umgeben. Zusammen sind sie in ein bindegewebiges Stroma eingebettet, das Blutgefäße zur Versorgung der Zellen führt. Die Neurone sind pseudounipolare Ganglienzellen mit annähernd kugelförmigem Nervenzellkörper. Sie besitzen nicht wie andere Neurone eine Vielzahl von Dendriten sondern nur einen Stammfortsatz. Dieser teilt sich in einiger Entfernung vom Perikaryon in die zwei Äste des Axons auf. Ein Ast zieht zentralwärts über die hintere Spinalnervenwurzel zum Hinterhorn des Rückenmarks. Über die Äste des Spinalnervs zieht der andere Ast zur Körperperipherie (Feirabend & Marani 2003). DRGs enthalten morphologisch und funktionell sehr heterogene Neuronenpopulationen, was die Etablierung von Klassifikationskriterien erschwert (Andres et al. 2010).

1.1.2 Subpopulationen und Funktionen von Spinalganglienneuronen

Diese Zellen übermitteln Informationen über Schmerz, Temperatur, Druck sowie andere mechanische Reize aus Haut, Eingeweiden, Muskulatur und Gelenken in das Rückenmarkshinterhorn. DRG-Neurone leiten die durch Reize an der peripheren Endigung ausgelösten Aktionspotenziale (AP) direkt an das zentrale Axon weiter. Hierbei wird die an der neuronalen Zellmembran ablaufende Erregung gegenüber der Umgebung durch die Gliazellen isoliert. Darüber hinaus erfüllen sie eine gewisse Abwehrfunktion für die von ihnen umgebenen Neurone. Ihnen unterliegt via Metabolisierung von Transmittern, Ionen und anderen Substanzen aus dem Interzellularraum die Kontrolle über dessen Zusammensetzung (Devor 1999). Funktionell unterscheiden sich die Nervenzellen in ihrer sensorischen Modalität, d.h. verschiedene Informationen werden dem zentralen Nervensystem (ZNS) über unterschiedliche Fasertypen zugetragen.

Im Detail können die folgenden Modalitäten unterschieden werden (Tab. 1).

somato-afferente Wahrnehmungen
Exterozeptionen (aus der Umwelt über Hautrezeptoren)
Mechanozeption (über A-Fasern) protopathische Sensibilität (Empfindung groben Druckes) epikritische Sensibilität (feinere Berührungsempfindung)
Thermorezeption (über A- und C-Fasern) kalt, warm
Nozizeption (über A- und C-Fasern) mechanisch, thermisch, chemisch, polymodal*
Propriozeptionen (Orientierung über die Lage des Körpers im Raum)
Muskelspannung und -dehnung (Ia- und II-Afferenzen von Muskelspindeln)
Sehndehnung (Ib-Afferenzen von Golgi-Sehnenorganen)
Mechanorezeption aus Gelenken (vermittelt durch Ruffini- und Vater-Pacini-Körperchen, Golgi-Sehnenorganen sowie freien Nervenendigungen von III- und IV-Fasern)
nozizeptive Wahrnehmungen aus tiefen Geweben wie Muskeln und Gelenken (vermittelt durch freie Nervenendigungen von schnellen III- und A δ -Schmerzfasern sowie langsamen C-Fasern), in Muskeln Wahrnehmung mechanischer, thermischer und chemischer Reize
viszero-afferente Wahrnehmungen
Interozeptionen (aus Eingeweiden, Serosa, Gefäßen, Drüsen) über A-, B- und C-Fasern
mechanisch (über A- und B-Fasern)
thermisch (über A- und C-Fasern)
chemisch (über B- und C-Fasern)

Tab. 1 Modalitäten sensibler Spinalganglienneurone (nach Lewis 1942, Lloyd 1948, Schaible & Grubb 1993, Messlinger 1997, Mense 1993 und 2009).

*Es existieren nozizeptive Neurone, welche sich durch mechanische, thermische sowie chemische Reize stimulieren lassen (Lewis 1942, Lloyd 1948, Mense 1993, Schaible & Grubb 1993, Benninghoff 1994).

Dieser funktionellen Heterogenität haben verschiedene Autoren morphologische Kriterien gegenübergestellt (Tab. 2).

Einteilungskriterien	DRG-Neurone	
	I. Gruppe	II. Gruppe
Perikaryondurchmesser	gross	mittelgross bis klein
Axonmyelinisierung	myelinisiert (A-Fasern)	unmyelinisiert (C-Fasern)
Funktionsmuster	homogen	heterogen
Funktionen	mechanorezeptiv	mechano-/thermorezeptiv, Juckreiz vermittelnd, polymodal

Tab. 2 Einteilung sensibler Spinalganglienneurone (anhand Snider & McMahon 1998, Caterina & Julius 1999).

Bei nur partieller Kongruenz ist eine sichere funktionelle Differenzierung über ihre Zellmorphologie ohne weitere Charakteristika unmöglich (Mense 1990, Andres et al. 2010). Nozizeptive Neurone sind sehr inhomogene Zellpopulationen (Baumgärtner 2010), was die Komplexität zugrunde liegender funktioneller Mechanismen anzeigt. Mehrere Autoren haben zu deren Einteilung nach verschiedenen Kriterien experimentell Funktionen wie folgt (Tab. 3 und 4) abgeleitet.

Einteilungskriterien	nozizeptive DRG-Neurone	
	I. Gruppe	II. Gruppe
Perikaryondurchmesser	mittel	klein
Axondurchmesser	A δ -Fasern (\varnothing 2-6 μ m)	C-Fasern (\varnothing 0,4-1,2 μ m)
Axonmyelinisierung	schwach myelinisiert	unmyelinisiert
Axonleitgeschwindigkeit	12-30 m/s	0,5-2 m/s
wahrgenommene Schmerzqualität	schnelles Gefühl, erste Schmerzphase (akut)	langsames Gefühl, zweite Schmerzphase
Funktionen	akute Abwehrreaktion (afferenter Schenkel spinaler Reflexe zur Auslösung schneller motorischer Reaktion)	langfristiger Schutzeffekt (bsp. Schonung nach Schädigung während der Reparation)

Tab. 3 Einteilung nozizeptiver Spinalganglienneurone I (anhand Lloyd & Chang 1948, Schmidt & Thews 1997, Snider & McMahon 1998, Vulchanova et al. 1998, Caterina & Julius 1999, Basbaum & Woolf 1999, Lawson 2002, Priestley et al. 2002, Almeida et al. 2004, Baumgärtner 2010).

Einteilungskriterien	II. Gruppe nozizeptiver DRG-Neurone	
	I. Untergruppe	II. Untergruppe
Tyrosinkinase A (trkA)-Expression	trkA-positiv	trkA-negativ
Nervenwachstumsregulation	Nerve growth factor (NGF)	Glial-cell-line-derived-neurotrophic factor (GDNF)
neurochemische Charakteristika	SP, CGRP, Neurokinin A	Fluorid-resistent Acid Phosphatase (FRAP), Isolektin-B4 (I-B4), P2X3 ATP-Rezeptor
Rückenmarksprojektion	Laminae I und II (oberflächlich)	Lamina II (tief)
spezielle Funktionen	Schmerzwahrnehmung bei entzündlichem Gewebeschaden, effektorische Funktion bei Vermittlung neurogener Entzündung*	Wahrnehmung nicht-entzündlich bedingter, chronischer Schmerzen

Tab. 4 Einteilung nozizeptiver Spinalganglienneurone II (nach Lloyd & Chang 1948, Schmidt & Thews 1997, Snider & McMahon 1998, Vulchanova et al. 1998, Caterina & Julius 1999, Basbaum & Woolf 1999, Lawson 2002, Priestley et al. 2002, Almeida et al. 2004, Hiura 2009).

*Bei Stimulation durch noxische Reize werden über die Freisetzung von Substanz P (SP) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Entzündung fördernde Gefäßreaktionen ausgelöst (Lloyd & Chang 1948, Schmidt & Thews 1997, Snider & McMahon 1998, Vulchanova et al. 1998, Caterina & Julius 1999, Basbaum & Woolf 1999, Lawson 2002, Priestley et al. 2002, Almeida et al. 2004).

1.2 Periphere Nozizeption in nozizeptiven Spinalganglienneuronen

1.2.1 Schmerz

Die Wahrnehmung von Schmerz alarmiert den Organismus vor schädlichen/noxischen Reizen und löst geeignete Schutzreaktionen aus (Julius & Basbaum 2001, Woolf & Ma 2007). Er kann in unterschiedlichen Qualitäten wahrgenommen werden (Lewis 1942, Schmidt & Thews 1997, Messlinger 1997, Dubin & Patapoutian 2010, Matre et al. 2010).

a) viszeraler Schmerz aus den Eingeweiden (z. B. Gallenkolik, Ulkusschmerz)

b) somatischer Schmerz

- Oberflächenschmerz aus der Haut (z. B. Nadelstich, Quetschung)
erste schnelle Komponente (spitz, scharf, gut lokalisierbar empfunden) über A δ -Fasern und zweite langsame Komponente (dumpf, schwer lokalisierbar wahrgenommen) über C-Fasern weitergeleitet
- Tiefenschmerz aus Muskeln, Knochen, Gelenken und Bindegewebe
(z.B. Muskelkrampf, Kopfschmerz)

Schmerz stellt eine komplexe Sinneswahrnehmung aus peripherer Reizaufnahme, Weiterleitung sowie zentraler Modulation, Bewertung und Interpretation dar, die zu neurovegetativen und psychomotorischen Antworten führt (Willis & Westlund 1997, Woolf & Ma 2007). Nozizeptive A δ - und C-Fasern ziehen ins Hinterhorn des Rückenmarkes, wo die Umschaltung auf das zweite Neuron erfolgt. Die meisten zentralen Axone kreuzen auf Segmenthöhe im Rückenmark über die Commissura alba in die Funiculi dorso- und anterolateralis, nur ein geringer Anteil hat ipsilateral-anziehenden Verlauf. Im Hirnstamm werden Kollaterale in die Formatio reticularis einschliesslich der Nuclei giganto- et parvocellularis sowie des periäquiduktalen Graus auf Ebene von Medulla oblongata, Pons und Mittelhirn abgegeben. Diese scheinen für neurovegetative Schmerzantworten verantwortlich zu sein. Im medialen und lateralen Thalamuskomplex erfolgt die Umschaltung auf das dritte Neuron. Hier liegt das Hauptintegrationszentrum der Schmerzwahrnehmung. Von hier projizieren die Fasern in verschiedene Kortexareale. Damit dringt der wahrgenommene Schmerz in das Bewusstsein, erhält seine emotionale Komponente (Bewertung) und psychomotorische Antworten werden generiert (Interpretation) (Willis & Westlung 1997, Millan 1999, Almeida et al. 2004, Schaible 2007).

1.2.2 Nozizeptoren

In der Körperperipherie erfolgt die Schmerzwahrnehmung über Nozizeptoren, eine A δ - und C-Faser Neurone enthaltende Subpopulation primär-afferenter DRG-Neurone. Ihre freien rezeptiven Nervenendigungen (d.h. histologisch existieren keine spezialisierten korpuskulären Strukturen) werden von adäquaten Stimuli oder Nervenfaserverletzung aktiviert. Nozizeptoren sind spezielle Sensoren mit einer Erregungsschwelle, dass sie physiologischer Weise von noxischen Reizen aktivierbar sind. Bei Erreichen dieser existierenden Schmerzschwelle wird die Information an das ZNS weitergeleitet (Mense 1993 und 2009, Schaible & Grubb 1993, Vyklicky & Knotkova-Urbancova 1996, Besson 1997, Schmidt & Thews 1997, Caterina & Julius 1999, Millan 1999, Szulczyk et al. 2002, Almeida et al. 2004, Rosenbaum & Simon 2007). Unterschiedliche Auslösungsschwellen differenzieren im gesunden Gewebe 2 Typen.

- Nozizeptoren mit hoher Schwelle (Aktivierung durch Reize höherer Intensität)
- mechanoinsensitive (stumme, „schlafende“) Nozizeptoren

Letztere werden im pathophysiologisch veränderten Gewebe durch eine Absenkung der Schwelle für thermische und/oder mechanische Reize sensibilisiert. Im Gesunden nicht-noxische Reize können diese „erweckten“ Nozizeptoren dann aktivieren. Diese ermöglichen bei einer Entzündung die Freisetzung durch Gewebsläsion (Bradykinin und Serotonin) oder vermehrte Mediatorsynthese (Prostaglandine und Leukotriene) (Melzack & Wall 1983, Krainick & Schmidt 1991, Schaible & Grubb 1993, Schmidt & Thews 1997, Messlinger 1997, Snider & McMahon 1998, Almeida et al. 2004). Die Schmerzwahrnehmung ist somit ein dynamischer/plastischer Prozess (Cervero 2000, Price & Gèranton 2009). Zahlreiche Mechanismen wie die Regulation von Mediatoren und Rezeptoren sind in die Wahrnehmung und Weiterleitung der Schmerzinformation involviert (Schaible 2007, Dubin & Patapoutian 2010).

1.2.3 Grundlagen und Mechanismen der peripheren Nozizeption

Die Schmerzwahrnehmung beginnt an der Zellmembran der freien peripheren Nervenendigung, wo die „Übersetzung des Schmerzreizes“ stattfindet, d.h. noxische Reizaufnahme und -verarbeitung zu einer lokalen Membranpotenzialänderung. Diesem Vorgang, der Transduktion, liegt die Öffnung direkt und indirekt Liganden-gesteuerter Ionenkanäle zugrunde. Ihre Verbindung mit spezifischen Reizstoffen (Agonisten, Liganden) führt im Rahmen einer Aktivierung zur Beeinflussung der Konformation des Molekülkomplexes. Via Erhöhung ihrer Kanalpermeabilität werden angetrieben von

Konzentrationsdifferenzen zwischen Intra- und Extrazellularraum Ionenströme zugelassen. Diese bedingen an der Zellmembran eine Ladungsumkehr, das Sensorpotenzial (Rezeptor-/Generatorpotenzial). Die für die Entstehung dieses Potenzials verantwortlichen Membrankanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, daher sind solche in der Regel depolarisierend (Loewensten 1971, Schmidt & Thews 1997, Treede 1999, Breitinger 2001, Krusek et al. 2004). Die Umwandlung dieses lokalen Potenzials in ein AP, welches zum Rückenmark weitergeleitet werden kann, ist die sog. Transformation. Da die Amplitude eines fortgeleiteten AP dem Alles-oder-nichts-Gesetz folgt, kann die Schmerzintensität nur als AP-Frequenzänderung kodiert werden. Genauer Ort und Mechanismus der Transformation bei Nozizeptoren ist bislang unbekannt (Loewensten 1971, Schmidt & Thews 1997, Treede 1999).

1.2.4 Transduktion

Die hierfür verantwortlichen nicht-selektiven Kationenkanäle in nozizeptiven DRG-Neuronen sind partiell bekannt. Ein Kandidat, der Transient receptor potential vanilloid-Receptor1 (TRPV1) wird von Resiniferatoxin, Wasserstoffionen (H^+) und thermisch ($>42\text{ }^\circ\text{C}$) stimuliert (Basbaum & Woolf 1999, Rosenbaum & Simon 2007). Dabei aktivieren genannte Stimuli den Kanal auch wechselseitig, d. h. ein niedriger pH-Wert mindert die Aktivierungsschwelle anderer Agonisten (Tominaga et al. 1998, Krusek et al. 2004).

Eine Hitzesensibilisierung, wie sie unter entzündlichen Bedingungen vorkommt, kann durch Adenosintriphosphat (ATP) und Mediatoren wie Bradykinin über die Vermittlung eines Calcium (Ca^{2+} -) einstromes (Kress et al. 1999) oder über Aktivierung IB4-positiver sensibler Neurone (Hiura 2009) erfolgen. Im Entzündungsgeschehen setzen Endothelzellen, Thrombozyten sowie chemotaktisch angelockte Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten inflammatorische Mediatoren wie Serotonin (5-HT), Bradykinin und Prostaglandine (PGE) frei. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, ATP und H^+ (dadurch Ansäuerung des Milieus). Die Agonisten dieses Mediatorengewitters können an ihren spezifischen Rezeptoren andocken. Bei den direkt Liganden-gesteuerten Kanälen, Acid-sensing ion channels (ASICs) und ATP-Rezeptoren (P2X) führt dies direkt zu neuronalem Kationeneinstrom. Nach Aktivierung über ProstaglandinE2 (PGE2) ist der Natrium (Na^+ -) einstrom mediiert über Voltage-gated sodium channels (VGSCs: TTXr, TTXs) und Proteinkinase A (PKA). Bradykininrezeptoren und TRPV1 bedienen sich der Proteinkinase C

(PKC). Für Serotoninrezeptoren ist der genaue Auslösemechanismus des Na⁺-Einstromes über VGSCs noch unbekannt (Satoh 1993, Basbaum & Woolf 1999, Mense 2001). Eine Übersicht der bislang identifizierten Rezeptoren auf DRG-Neuronen, ihrer Agonisten und Signaltransduktionswege zeigt die folgende Tab. 5.

Agonisten/ Stimuli	Rezeptoren/ Kationenkanäle	second messenger	Ionen	Enzym- aktivierung	zentraler Transmitter
Opioide	σ, μ	IP3	Ca ²⁺	PLC	SP
PGE2, PGI2	EP1	cAMP	Ca ²⁺	PKA/C, PLC	?
Bradykinin	B1, B2	cGMP	Ca ²⁺	MEK, ERK	SP
Serotonin	5-HT1A/1B/1D/1F	cAMP	Na ⁺	?	?
Glutamat	mGlu5	IP3	Ca ²⁺	PLC	?
Spannung	VGSCs: TTXs, TTXr	cAMP	Na ⁺	PKA/C	SP
Muskarin	mAChR	cGMP	Ca ²⁺	NO	?
Capsaicin	TRPV1	cGMP	Ca ²⁺	NO, PKA/C	SP
Glutamat	NMDA	-	Ca ²⁺ / Na ⁺	-	?
H ⁺	ASICs	-	Na ⁺	-	?
ATP	P2X (v.a. P2X3), P2Y	-	Ca ²⁺	-	Glutamat
Nikotin	nAChR	-	?	-	SP

Tab. 5 Rezeptoren, nicht-selektive Kationenkanäle und Signaltransduktion nozizeptiver Spinalganglienneurone (anhand Kantner et al. 1986, Bauer et al. 1993, 1994 & 1995, Cholewinski et al. 1993, Cardenas et al. 1997, Gu & MacDermott 1997, Puttfarcken et al. 1997, Seabrook et al. 1997, Waldmann et al. 1997, Gold et al. 1998, Tate et al. 1998, Snider & McMahon 1998, Tominaga et al. 1998, Caterina & Julius 1999 & 2001, Kress et al. 1999, Haberberger et al. 2000, Jane & Doherty 2000, Pauwels 2000, Tata et al. 2000, Ogata et al. 2001, Rowlands et al. 2001, Ueda et al. 2001, Walker et al. 2001, Wu et al. 2001 & 2004, Li et al. 2004, Nakayama et al. 2004, Rashid et al. 2004, Tang et al. 2006, Rosenbaum & Simon 2007, Chaban 2010).

Bei Gesamtbetrachtung der Befunde stellen sich die molekularen Mechanismen der Nozizeption komplex, mit unvollständig aufgeklärten Signaltransduktionskaskaden dar.

1.3 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglienneuronen

1.3.1 Allgemeines

Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sind eine Klasse von Acetylcholinrezeptoren (AChR), eine nach ihrem Agonisten benannte Gruppe Liganden-gesteuerter Kationenkanäle. Sie kommen in zahlreichen biologischen Systemen vor. Acetylcholin (ACh) ist ein synaptischer Überträgerstoff (Transmitter). Als sog. first messenger wirkt er als extrazellulärer Botenstoff auf die Plasmamembran diverser Zellen. Die nAChR sind in Steuerungsmechanismen unterschiedlicher Zellfunktionen involviert (Gotti & Clementi 2004).

1.3.2 Klassifikation der Acetylcholinrezeptoren

Einteilungskriterien	AChR	
	nikotinische	muskarinische
spezifische Agonisten	Nikotin	Muskarin, Pilocarpin
spezifische Antagonisten	d-Tubokurarin	Atropin
Ligandensteuerung	direkt	indirekt
Ionenkanalfunktion	im Molekülkomplex	G-Protein-gekoppelt*
Aufgabe	schnelle Synapsen	langsame Rezeptoren
Subtypen	muskulär, neuronal, non-neuronal	M1 bis M5

Tab. 6 Einteilung von Acetylcholinrezeptoren (anhand Siegel 1994, Schmidt & Thews 1997, Lukas et al. 1999, Swope et al. 1999, Elgoyhen et al. 2001).

* Die Agonistenbindung aktiviert ein G-Protein an der Zellmembraninnenseite, dessen Untereinheit selbst oder über zweites intrazelluläres Signalmolekül den Ionenkanal öffnet (Siegel 1994, Schmidt & Thews 1997, Swope et al. 1999).

Einteilungskriterien	nAChR	
	muskulärer Typ	neuronaler Typ
spezifische Agonisten	Phenyltrimethylammonium	Dimethylphenylpiperazin
spezifische Antagonisten	Elapid α -Toxin	Mecamylamin
Vorkommen	motorische Endplatte von Muskelzellen	PNS, ZNS, Lymphozyten, Makrophagen, Haut-, Lungen-, Plazenta-, Gefäßgewebe
Funktionen	neuro-muskuläre Erregungsübertragung	synaptische Übertragung, Proliferation, Adhäsion, Migration, Sekretion, Zellzyklussteuerung, Apoptose
Aufbau	Heteropentamer	Homo- und Heteropentamer
Untereinheiten	α , β , γ , δ und ϵ	α und β

Tab. 7 Einteilung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (anhand Siegel 1994, Sastry 1997, Lukas et al. 1999, Baker et al. 2004, Gotti & Clementi 2004, Krusek et al. 2004).

1.3.3 Expression neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglien

In DRG-Neuronen neonataler (Sucher et al. 1990, Genzen et al. 2001) und adulter Ratten (Lips et al. 2002, Haberberger et al. 2004, Rau et al. 2004, Dube et al. 2005) sind neuronale nAChR auf transkriptionaler und translationaler Ebene sowie funktionell nachgewiesen, insbesondere die Rezeptorsubtypen $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 10$ sowie $\beta 2$ - $\beta 4$ (Genzen et al. 2001, Khan et al. 2003, Haberberger et al. 2004, Rau et al. 2004, Fucile et al. 2005). Quantitativ dominieren die $\alpha 7$ -nAChR (Genzen et al. 2001, Fucile et al. 2005). Diese sensiblen Neurone sind somit durch Nikotin stimulierbar.

1.3.4 Struktur neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Aufgebaut sind nAChR aus fünf, einen selektiv kationenpermeablen Kanal bildenden Untereinheiten. Aminosäuresequenzunterschiede beteiligter Strukturproteine differenzieren α - und β -Subtypen. Es existieren acht α - ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, in Hühnern zusätzlich $\alpha 8$) sowie drei β -Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Sharples & Wonnacott 2001). Die Heterogenität hat funktionelle Relevanz. Die Komposition pentamerer Rezeptoren aus diversen Untereinheiten bedingt spezifische Ligandenaffinität und Ionenpermeabilität (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004, Krusek et al. 2004). Der Molekülkomplex ist so in die Zellmembran integriert, dass der grössere Anteil mit den Ligandenbindungsstellen zum Extrazellularraum hin exponiert ist. Nach Ligandenbindung steigert die folgende Konformationsänderung die Rezeptorpermeabilität. Die Kationenselektivität beruht auf der Verteilung negativer Ladungen an der Innenseite der Kanalwand und dem Porendurchmesser (Siegel 1994). Neuronale nAChR können sich als Homopentamere aus fünf gleichen α -Untereinheiten (Lindstrom et al. 1996, Le Novère et al. 2002, Gotti & Clementi 2004) oder als Heteropentamere aus 2 α - und 3 β -Kopien formieren (Siegel 1994, Baker et al. 2004, Gotti & Clementi 2004, Krusek et al. 2004). Die Bindungsstelle für Agonisten ist an der Grenze zwischen den Untereinheiten lokalisiert (Lukas et al. 1999, Le Novère et al. 2002, Krusek et al. 2004). Homopentamere besitzen fünf, Heteropentamere zwei Ligandenbindungsstellen (Gotti & Clementi 2004).

1.3.5 Aktivierungszustände nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Aktiviert sind die nAChR kationenpermeabel. In diesem Zustand verbleiben direkt Liganden-gesteuerte Membrankanäle nicht permanent. Es besteht ein zyklisches Reaktionsschema verschiedener Rezeptorzustände. In Anwesenheit von Nikotin treten schnelle Konformationsänderungen (Bursts) zwischen offenem und geschlossenem Zustand auf. Bei hohen Konzentrationen ist der Kanal deshalb fast immer offen. Die Öffnungswahrscheinlichkeit bei niedrigen Konzentrationen fällt mehr als proportional ab, da vor jeder Kanalöffnung mehrere Ligandenmoleküle binden. Dies hat funktionelle Bedeutung. Eine synaptische Erregungsübertragung wird so unempfindlich für geringe, in vivo vorkommende Ligandenkonzentrationen. Bei hoch frequenter Stimulation verlangsamen die Bursts, der Kanal schliesst, d.h. die nAChR desensitivieren. Dieser Sicherheitsmechanismus verhindert zu grosse und lang andauernde Erregung der Neurone (Siegel 1994, Schmidt & Thews 1997, Sharples & Wonnacott 2001).

1.3.6 Funktion neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Die Beteiligung von nAChR bei der synaptischen Erregungsübertragung dient der Neurotransmission und -modulation. Ihre Fähigkeit diverse neuronale Prozesse zu regulieren, beruht auf der Aktivierung nachgeschalteter intrazellulärer Signalkaskaden. Der nAChR-vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg kann diverse Enzyme aktivieren wie Adenylat-Cyclase (AC), PKA, PKC, Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) und Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Diese Enzyme aktivieren nachgeordnete Zielmoleküle wie Extracellular signal-regulated kinase (ERK) und Proteinkinase B (PKB). Eine ERK-Phosphorylierung vermittelt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) und die Genexpressionssteigerung für Rezeptoren von Tyrosinhydroxylase (TH) oder NGF. Eine PKB-Phosphorylierung wird für die Modulierung der relativen Aktivität von Neuroprotektions- und Apoptosefaktoren wie Bcl-2 und Caspasen verantwortlich gemacht. Über neuronale Signaltransduktionskaskaden modulieren nAChR Zellentwicklung, Neuroprotektion und Exozytose von Transmittern. Hierüber regulieren sie kognitive Prozesse sowie Vorgänge im Rahmen von Erinnerung und Sucht (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Es stellt sich die Frage nach der funktionellen Relevanz der nAChR in DRGs.

1.3.7 Funktion neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Spinalganglienneuronen

Das Vorkommen der nAChR ist in DRG-Neuronen nachgewiesen (Matsumoto 2007). Die Verteilung diverser nAChR-Subtypen erscheint abhängig von der DRG-Neuronengröße. Ca^{2+} -permeable $\alpha 7$ -nAChR sind funktionell mehr auf grossen als kleinen Zellen beschrieben, ebenso $\alpha 3/\beta 4$ -nAChR und $\alpha 4/\beta 2$ -nAChR. Damit ist eine Beteiligung an der Vermittlung unterschiedlicher sensorischer Modalitäten möglich (Genzen et al. 2001). Neu ist das Vorkommen von $\alpha 6/\beta 4$ -nAChR in DRG-Neuronen beschrieben (Hone et al. 2011). Die Beteiligung von nAChR an der Nozizeption ist experimentell auf diversen Ebenen untersucht. Die nAChR sind auf Capsaicin-sensitiven Neuronen (Roberts et al. 1995) sowie die mRNA-Expression von $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten in nozizeptiven IB4-bindenden präsynaptischen Fasern in den oberflächlichen Laminae des Rückenmarkhinterhornes nachgewiesen (Khan et al. 2003). Verschiedene Arbeiten haben für Nikotin Schmerz vermittelnden sowie hemmenden Effekt aufzeigen können.

Nikotin und Schmerz. Intrakutane, Schmerz auslösende Nikotininjektionen erregen sensorische Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten (Jinks & Carstens 1999). An isolierten Haut-Nervus-saphenus-Präparaten der Ratte hat Nikotin erregende Effekte auf nozizeptive C-Fasern (Steen & Reeh 1993) und induziert dosisabhängig eine Sensitivierung gegen Hitzestimulation (Bernardini et al. 2001). Am neuropathischen Schmerzmodell der Ratte werden funktionelle nAChR in DRG-Neuronen reduziert (Dube et al. 2005). Periphere Axotomie moduliert über nAChR-Subtypen und ihrer Zusammensetzung die Informationsweiterleitung (Young et al. 2008). Die nAChR-medierte Nozizeption ist als dynamischer Prozess vom pathologischen Geschehen beeinflusst.

Nikotin und Analgesie. Tierschmerzmodelle deckten analgetische Effekte von nAChR-Agonisten auf. Der nAChR-Agonist Epibatidin wirkt bei akutem Schmerz stärker analgetisch als ABT-594 (Kesingland et al. 2000). Eine $\alpha 7$ -nAChR-Aktivierung ruft analgetische Effekte sowohl im Rahmen eines Hitze-induzierten Schmerzmodelles (Damaj et al. 2000) als auch in einem inflammatorischen Schmerzmodell (Wang et al. 2005) hervor. Eine nAChR-Aktivierung primär-afferenter Neurone hemmt die Weiterleitung der Schmerzinformation zum Rückenmark (Matsumoto 2007). Analgetische und entzündungshemmende Effekte sind über eine $\alpha 7$ -nAChR-Aktivierung durch Epibatidin-induzierte Überexpression der Häm-Oxygenase-1 beschrieben (Egea et al. 2009). Über $\alpha 4/\beta 2$ -nAChR-Aktivierung wird im Rückenmarkshinterhorn die Hemmung der Schmerzinformationsweiterleitung durch präsynaptische Neurotransmission erleichtert (Rashid et al. 2006). Die Art der stimulierten Nozizeptoren bedingt scheinbar die Schmerzmodulation. Der unspezifische nAChR-Antagonist Mecamylamin übt dosisabhängig bei akutem Schmerz eine hyperalgesierende und bei länger andauerndem Schmerz analgetische Wirkung aus (Hama & Menzaghi 2001). Der analgetische Effekt des Nikotins führt, wahrscheinlich über direkte nAChR-Stimulation, zu peripherer SP-Ausschüttung, an Hautblasen von Nagetierpfoten zu deren beschleunigter Heilung. Mit der schnelleren Blasenheilung nach Nikotinbehandlung ist eine Reduktion der umgebenden Entzündungsreaktion verbunden (Westerman et al. 1993). SP wird nach nAChR-vermitteltem Ioneneinstrom von F11-Zellen ausgeschüttet (Puttfarcken et al. 1997). Die Gesamtbetrachtung dargestellter Befunde charakterisiert nAChR in DRG-Neuronen nur partiell. Über die Funktion der nAChR-Subtypen und Mechanismen ihrer Signaltransduktion in diversen Subpopulationen von DRG-Neuronen bestehen unzureichende Informationen.

1.4 Stickstoffmonoxid und Expression der Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen in Spinalganglienneuronen

1.4.1 Allgemeines

Das farblose Gas Stickstoffmonoxid (NO) ist phylogenetisch ein sehr altes auto- und parakrin wirkendes Signalmolekül. Es ist als Botenstoff in vielen unterschiedlichen biologischen Systemen mit regulatorischen Aufgaben betraut (Hirst & Robson 2011). NO kann nach Produktion in spezialisierten Zellen infolge seiner physiko-chemischen Eigenschaften frei innerhalb der Zelle, aber auch über Plasmamembranen hinaus durch den Extrazellularraum zu anderen Zellen diffundieren. Da es spontan zerfällt, ist seine Wirkung dabei maximal auf Zellgruppen in der nahen Umgebung begrenzt. Seine biologische Halbwertszeit ist sehr kurz, die Zeitkonstante des NO-Zerfalls im Extrazellularraum beträgt etwa 5 s (Lancaster 1997, Schmidt & Thews 1997, Singh & Evans 1997). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und Diffusionseigenschaften sind seine räumliche Verteilung und Einfluss auf neuronale Mechanismen schwierig zu untersuchen (von Bohlen und Halbach 2003).

1.4.2 Synthese des Stickstoffmonoxids und Wirkungsmechanismus der Stickstoffmonoxidsynthase

Der Botenstoff NO vermittelt die Aktivierung der Guanylat-Cyclase (GC) in seinen Effektorzellen. Die Enzymaktivierung wird dabei wie folgt umgesetzt. NO bindet an das Fe²⁺-Atom der Häm-Gruppe, einer GC-Untereinheit, was eine Konformationsänderung im benachbarten katalytischen Zentrum bewirkt. Diese führt eine Steigerung der Konversionsrate des Substrates herbei. Die GC katalysiert die Umwandlung des Energieträgers Guanosin triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Intrazellulär ist cGMP als second messenger in diverse Signalkaskaden involviert, wie die Öffnung/Schließung von Membrankanälen, Transmitterfreisetzung an Nervenendigungen und Proteinkinase-Aktivierung. Isoformen eines spezifischen Enzyms, der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) produzieren NO. In Anwesenheit von Sauerstoff (O₂) und Co-Substrat Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH) konvertiert die NOS aus einem Stickstoffatom der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin über eine Zwischenstufe (N-Hydroxyarginin) zu L-Citrullin und NO (Bredt & Snyder 1990, Schmidt & Thews 1997, Singh & Evans 1997, Bredt 1999, Stuehr 1999, Davis et al. 2001, Förstermann & Sessa 2011).

1.4.3 Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen und ihre Expression in Spinalganglien

Es existieren drei NOS-Isoformen, deren Unterschiede bezüglich molekularbiologischer Eigenschaften und Funktionen zeigt die folgende Übersicht (Tab. 8).

Einteilungskriterien	NOS-Isoformen		
	endotheliale NOS (eNOS)	neuronale NOS (nNOS)	induzierbare NOS (iNOS)
Synonyma	NOS III	NOS I	NOS II
erstbeschriebene Lokalisation	Plasmamembran von Endothelzellen	ZNS und PNS	Makrophagen, Mesangialzellen, glatte Muskelzellen
erstbeschriebene Wirkung	Vasodilatation	Neurotransmission, -modulation	Abwehrfunktion, Zytotoxizität*
Regulation ihrer Enzymexpression	konstitutiv	konstitutiv	induziert**
Regulation der NO-Synthese	Ca ²⁺ -Calmodulin	Ca ²⁺ -Calmodulin	Ca ²⁺ -unabhängig, Genexpression
NO-Produktion	einfach	einfach	1000-fach*

Tab. 8 Charakteristika der Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen (anhand Kroncke et al. 1997, Moncada et al. 1997, Singh & Evans 1997, Förstermann et al. 1998, Bredt 1999, Förstermann & Sessa 2011).

*In sehr hohen Konzentrationen entfaltet NO zytotoxische Wirkung, indem es Eisen-Schwefel-Verbindungen im aktiven Zentrum von Enzymen komplexiert, welche für den Energiehaushalt der Zellen essenziell sind (Kroncke et al. 1997, Singh & Evans 1997, Bredt 1999). **Eine Stimulation erfolgt durch Endotoxin, Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (γ -IF) (Kroncke et al. 1997, Moncada et al. 1997, Singh & Evans 1997, Förstermann et al. 1998, Bredt 1999).

Das Vorkommen der NOS ist in unterschiedlichen Zelltypen nicht auf eine Isoform limitiert. Ein Gewebe kann mehrere Isoformen gleichzeitig exprimieren (Moncada et al. 1997, Förstermann et al. 1998, Kumar et al. 2010). Mittels Detektion der NADPH-Diaphoraseaktivität ist in DRG-Neuronen der Ratte NOS mit segmentspezifisch quantitativ unterschiedlicher Verteilung nachgewiesen (Aimi et al. 1991, Vizzard et al.

1995). V.a. kleine Neurone sind in Kaninchen- (Rybarova et al. 1999) und Katzen-DRGs (Qin et al. 2004) NOS-positiv. In lumbalen DRGs adulter Ratten exprimieren nahezu alle Neurone eNOS, nNOS in <5 % und iNOS kaum (Henrich et al. 2002). Lumbale Katzen-DRGs sind nNOS-, hingegen nicht eNOS-immunreaktiv (Qin et al. 2004). Diese sensiblen Neurone können somit über NOS-Aktivierung NO produzieren. Nach Axotomie wird die NOS-Expression in Ratten- (Shi et al. 1998) und Gecko-DRGs (Cristino et al. 2000) sogar gesteigert, hiervon sind besonders kleine Neurone betroffen (Zhang et al. 1993, Vizzard et al. 1995).

1.4.4 Funktionen der Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen

In zahlreichen experimentellen Studien sind Beteiligungen an Neuritenwachstum und Regeneration, Kommunikation mit umgebender Glia, Neuroprotektion sowie Nozizeption und Entzündung aufgezeigt worden. In neuronalen Zellen vermittelt NO Neurotransmitterfreisetzung an Synapsen, Morphogenese, Regulation der Genexpression und inhibitorische Mechanismen (Dawson & Dawson 1996).

Neuritenwachstum und Regeneration. In allen DRG-Neuronen neonataler Ratten wird während der NGF-abhängigen Phase der Neuritenaussprossung nNOS stark exprimiert. In der weiteren Zellentwicklung wird die Expression <5 % reduziert (Thippeswamy & Morris 2002). In Geckos wird die NOS-Expression durch Axotomie gesteigert, was nach Axonregeneration persistiert (Cristino et al. 2000).

Kommunikation. In Subpopulationen nozizeptiver Neurone führt Axotomie zu einem Anstieg der mRNA-Synthese für die nNOS (Zhang et al. 1993). Parakrin initiiert NO dabei die cGMP-Synthese partieller umgebender Satellitenzellen (Morris et al. 1992, Magnusson et al. 2000). Nach Axotomie verläuft der Anstieg der NOS-Expression in DRG-Neuronen parallel mit der cGMP-Synthese in Satellitenzellen (Shi et al. 1998).

Neuroprotektion. Eine nNOS-Hemmung führt innerhalb von 6 bis 24 h zum Zelltod (Thippeswamy & Morris 2001). Unter hypoxischen Bedingungen ist die NO-Produktion eNOS-induziert. Der neuroprotektive Effekt könnte auf zellulären Abwehrmechanismen gegen hypoxische Schäden beruhen, zumal eNOS in juxta-mitochondrialen Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Henrich et al. 2002).

Nozizeption und Inflammation. Hinweisend sind die NOS-Expression überwiegend in kleinen, vermutlich nozizeptiven DRG-Neuronen (Vizzard et al. 1995, Rybarova et al. 1999, Qin et al. 2004) sowie die Co-Expression von nNOS und cGMP-abhängiger Proteinkinase I in kleinen und mittelgrossen SP- und CGRP-enthaltenden DRG-

Neuronen (Qiang et al. 1996) als auch in Neuronen des Trigeminalganglions von Ratten im Rahmen eines Migräneschmerzmodelles (Dieterle et al. 2011). Die intraartikuläre Injektion des unspezifischen NOS-Inhibitors N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) reduziert Schmerzreaktionen und unspezifische Entzündungszeichen in arthritiskranken Tieren (Lawand et al. 1997). Während Injektionen von NOS-Substrat, L-Arginin oder NO-Donatoren zu einer Hypersensitivität führen, die mit einem Anstieg der nNOS-Expression in kleinen bis mittelgrossen Neuronen korrespondierender DRGs einhergeht (Kim et al. 2011). Zahlreiche elektrophysiologische Untersuchungen haben eine Schmerzreduktion durch NOS-Inhibition aufgezeigt (Basbaum & Woolf 1999). PGE₂-induziert kann NO über die cGMP-Kaskade und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) Hyperalgesie vermitteln (Aley et al. 1998). Über multiple, den unterschiedlichen Schmerzstadien zugrunde liegende Mechanismen kann NO die Erregbarkeit spinaler und sensorischer Neurone modulieren (Luo & Cizkova 2000, Schmidtko et al. 2009). Schmerz auslösende intradermale Capsaicininjektion führen über die CREB-Phosphorylierung zur Erhöhung der nNOS- und iNOS-Expression in ipsilateralen Neuronen des Rückenmarkhinterhornes von Ratten (Wu et al. 2001 & 2002). Vermutlich CGRP-vermittelt ist die nNOS in die Sensibilisierung von DRG-Neuronen im Rahmen inflammatorischer Schmerzwahrnehmung involviert (Boettger et al. 2007). Schmerz auslösende als auch -hemmende Effekte sind NO-vermittelt (Miclescu & Gordh 2009).

Die auslösenden molekularen Mechanismen der endogenen NO-Generierung sowie die NO-vermittelten Signaltransduktionswege auf neuronaler Einzelzellebene sind unvollständig aufgeklärt. In DRG-Neuronen führt exogenes NO zur Ca²⁺-Kanalhemmung (Kim et al. 2000). NO inhibiert auch schnelle und langsame Na⁺-Kanäle infolge ihrer S-Nitrosylierung (Rengathan et al. 2002). Die Blockade des Kationeneinstroms in Neuronen verhindert eine Depolarisation, was für hemmende Effekte auf die Erregbarkeit nozizeptiver Neurone spricht. Eine Erregungsweiterleitung setzt jedoch depolarisierende Membranpotenzialänderungen voraus.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung

Die molekularen Mechanismen zur Stimulation der neuronalen NO-Generierung auf der Ebene einzelner DRG-Neurone sind bislang unvollständig bekannt. Einen sehr geeigneten Kandidaten hierfür stellen nAChR dar. Als direkt Liganden-gesteuerte, nicht selektive Kationenkanäle könnten sie an der Transduktion der Schmerzwahrnehmung in DRG-Neuronen beteiligt sein. Eine Aktivierung der in DRGs exprimierten NOS-Isoformen eNOS und nNOS erfolgt via intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieges. Die nAChR sind Subtypen-abhängig für Kationen permeabel. Homopentamere aus $\alpha 7$ -Untereinheiten ($\alpha 7$ -nAChR) oder Heteropentamere aus $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten ($\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR) sind hoch Ca^{2+} -permeabel. Die erforderliche Ca^{2+} -Mobilisierung könnte somit über $\alpha 7$ - und $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR vermittelt werden. Auch Voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCCs) kämen hierfür in Frage.

Somit ergibt sich die Hypothese, dass nAChR-Aktivierung über eine intrazelluläre Erhöhung des second messengers Ca^{2+} die NO-Generierung in DRG-Neuronen auslöst. In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine funktionelle Charakterisierung beteiligter nAChR sowie der ersten Schritte ihrer Signaltransduktion in primär-afferenten DRG-Neuronen auf der Ebene vitaler Einzelzellen. Dazu wurde an Primärkulturen lumbaler und thorakaler DRG-Neurone adulter Ratten mit Hilfe des NO-sensitiven Indikators 4,5-Diaminofluorescein-diacetat (DAF-2DA) indirekt eine nAChR-vermittelte NO-Freisetzung in Echtzeit untersucht. Dies sollte folgende Teilfragen beantworten.

- 1. Lässt sich die NO-Generierung in DRG-Neuronen durch die Aktivierung von nAChR stimulieren?*
- 2. Über welchen Zeitraum stimuliert eine Aktivierung von nAChR die endogene NO-Generierung?*
- 3. Welche nAChR-Subtypen sind an der Nikotin-abhängigen NO-Generierung beteiligt?*
- 4. Woher stammt das zur NO-Bildung notwendige Ca^{2+} ?*
- 5. Ist eine durch Nikotin stimulierte NO-Generierung auf eine unmittelbare NOS-Aktivität zurückzuführen?*
- 6. Bestehen Unterschiede zwischen nAChR-exprimierenden DRG-Neuronen thorakaler und lumbaler Segmenthöhen?*

Die Aufklärung der Signaltransduktionskaskade von nAChR primär-afferenter DRG-Neurone trägt zum grundlegenden Verständnis der Mechanismen zur Generierung des second messengers NO in DRGs bei.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Gebrauchsmedien für die Zellkultur

PBS (Phosphate Buffered Saline, Ca²⁺-, Mg²⁺-frei, PAA, Cölbe/Deutschland) (4 °C)

Gentamycin (*Sigma*, Deisenhofen/Deutschland) (4 °C)

DMEM: 500 ml DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) + 2,5 ml Gentamycin gemischt (4 °C)

Penicillin-Streptomycin (*Gibco*, Karlsruhe/Deutschland 100 ml/MW) à 2 ml (-20 °C)

L-Glutamin (*Gibco*, 200 mM) à 100 µl (-20 °C)

TNB-Waschmedium: 100 ml TNB 100 Basalmedium (*Biochrom*, Berlin/Deutschland) + 2 ml Protein-Lipid-Komplex + 2 ml Penicillin-Streptomycin + 100 µl L-Glutamin gemischt (4 °C)

TNB-Kulturmedium: 10 ml TNB-Waschmedium + 10 µl NGF (*Alomone*, Jerusalem/Israel) gemischt (nicht lagerfähig!)

2.1.2 Enzymlösungen für die Zellkultur

Liberase: 9 mg Liberase Blendzyme1 (*Roche*, Mannheim/Deutschland 9 mg/MW) + 100 ml DMEM gemischt, à 5 ml (-20 °C)

Trypsin (*Biochrom*, Aktivität 2,5 %): 1:10-Verdünnung mit PBS, à 5 ml (-20 °C)

2.1.3 Additive Substanzen zur Zellkultur

Protein-Lipid-Komplex (*Biochrom*): Lösen des Lyophilisates in 2,5 ml sterilem Milli-Q-Wasser (kurz vor Gebrauch)

NGF (*Alomone*): 10 µg in 100 µl TNB 100 Basalmedium gelöst, à 10 µl (-80 °C, 4-6 Wochen lagerfähig)

2.1.4 Einmalartikel

Petrischalen: 35 mm (*Falcon*, Obersulm/Deutschland)

Pasteurpipetten: Glas 150 mm (*Wu*, Mainz/Deutschland)

Deckgläschen: 12 mm Durchmesser (*Roth*, Karlsruhe/Deutschland)

Zentrifugenröhrchen: 120 x 17, 15 ml, steril, Schraubverschluss (*Falcon*)

Versuchsschälchen: Delta T Dish 0,17 mm, clear (*Olympus*, Hamburg/Deutschland)

2.1.5 Vorbehandlung der Deckgläser

Die gute Haftung der Neurone auf den Deckgläsern wurde durch eine Zwischenschicht aus dem polykationischen Substrat Poly-L-Lysin (PLL, *Sigma*), gewährleistet.

Ansetzen von PLL (200 µg/ml):

5 mg PLL in 25 ml Milli-Q-Wasser gelöst, à 900 µl (-20 °C)

Die Deckgläser wurden zunächst in folgenden Schritten gereinigt.

- kurzes Waschen in Aceton (ca. 1 min)
- Abwaschen des Acetons mit Leitungswasser
- über 1 h Waschen mit Milli-Q-Wasser (dabei 3-facher Wasserwechsel)
- kurzes Waschen in 96 %-igem Ethanol

Zum Trocknen wurden sie auf autoklaviertes Filterpapier unter einer sterilen Zellkulturbank gelegt. Hier erfolgte die Beschichtung mit je 50 µl PLL für 4 h bei Raumtemperatur. Danach wurde das PLL abpipettiert und jedes Deckglas 4-fach mit je 70 µl sterilem Milli-Q-Wasser gespült. Übrig gebliebenes PLL schädigt die Neurone. Beschichtete Deckgläser wurden in sterilen Glasschalen bis zur Zellaussaat aufbewahrt.

2.1.6 Vorbehandlung der Pasteurpipetten

Um bei der mechanischen Dissoziation der DRG-Neurone dem Anhaften der Zellen an der Glaswand und dem damit verbundenem hohen Ausbeuteverlust vorzubeugen, wurden die Pasteurpipetten silikonisiert. In einem Becherglas stehend wurden sie mit Silikonlösung (Silikonlösung in Isopropanol, *Serva*, Heidelberg/Deutschland) luftblasenfrei gefüllt, bis die innere Pipettenwand vollständig bedeckt war. Mit Milli-Q-Wasser wurde im Becherglas mehrfach gewaschen. Das Trocknen erfolgte im Sterilisator. Je 5 in Alufolie verpackte Pipetten wurden für 2 h bei 200 °C im Backofen sterilisiert. Hierdurch wurde das Silikon eingebrannt. Silikonrückstände sind zelltoxisch. Die Öffnung der silikonisierten Pasteurpipetten wurde erst unmittelbar vor Gebrauch in der Bunsenbrennerflamme unter der sterilen Zellkulturbank abgerundet.

2.1.7 Hepes-Ringer-Pufferlösungen

Substanz	Firma	Molekulargewicht (g/M)	Konzentration (mM)
NaCl	<i>Roth</i>	58,44	145
KCl	<i>Roth</i>	74,56	5,6
CaCl ₂ x2 H ₂ O	<i>Merck, Darmstadt/BRD</i>	147	2,2
MgCl ₂ x2H ₂ O	<i>Merck</i>	203,3	1
D-Glukose	<i>Sigma</i>	198,17	11
Hepes	<i>Sigma</i>	238,3	10

Tab. 9 Zusammensetzung der Ca²⁺-haltigen Hepes-Ringer-Pufferlösung (HRP).

Mit 1M NaOH (4,6 ml/l) erfolgte die Einstellung auf pH 7,4 und Sterilfiltration an der Zellkulturbank (4 °C). Die Pufferlösung wurde maximal 2 Wochen verwendet, da die Versuche mit älterer misslangen.

Zusammensetzung der Ca²⁺-freien HRP:

analog HRP ohne CaCl₂-Zugabe und anschliessende pH-Einstellung.

2.1.8 Pharmaka

Die eingesetzten Pharmaka werden nachfolgend jeweils mit ihrer in den durchgeführten Versuchen eingesetzte Konzentration aufgezählt.

4,5-Diaminofluorescein-diacetat (DAF-2DA) (*Alexis, Lausen/Schweiz*) 5 x 10⁻³ M

Methyllycaconitin (MLA) (*Sigma*) 10⁻⁶ M

N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) (*Alexis*) 10⁻⁴ M

Verapamil-Hydrochlorid (*Sigma*) 10⁻⁵ M

Nikotin-Tartrat (*Sigma*) 10⁻⁴ M so gewählt, dass die nAChR nicht desensitivieren. Im Voltage clamp bewirkt Nikotin in nozizeptiven DRG-Neuronen konzentrationsabhängig einen Ladungseinstrom mit EC50 =30 µM (Bernardini et al. 2001).

(Lagerungstemperatur aller o.g. Pharmaka -20 °C, jeweils in HRP gelöst.)

2.2 Methoden

2.2.1 Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Gewebes

Die DRGs wurden aus adulten Wistar-Ratten gewonnen (Tierstall des Physiologischen Institutes, Justus-Liebig-Universität Giessen). Weiblichen und männlichen Tieren (Alter 5-9 Wochen, Körpergewicht 140-160 g) wurde das Inhalationsnarkotikum Sevofluran (*Abbott*, Illinois/USA) verabreicht. Mit Hilfe eines sterilisierten Präparierbestecks (1 grosse Schere, je 1 grosse anatomische und chirurgische Pinzette) wurden der lumbale sowie thorakale Wirbelsäulenabschnitt entnommen und in je eine mittelgrosse Petrischale mit 15-20 ml PBS-Medium bei Raumtemperatur überführt.

2.2.2 Präparation der Spinalganglien

Alle weiteren Präparations- und Isolierschritte erfolgten bei Raumtemperatur unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Zellkulturbank. Lumbale und thorakale DRGs wurden am Mikroskop aus den entnommenen Wirbelsäulenabschnitten präpariert und jeweils getrennt in einer mit 3-4 ml DMEM-Medium gefüllten Petrischale gesammelt. Die DRG-Feinpräparation erfolgte mit Hilfe von Uhrmacherpinzette und gebogener Federschere. Hierzu wurden die DRGs möglichst vollständig von Spinalnervanteilen und Bindegewebskapsel befreit und in einer zweiten mit 3-4 ml DMEM-Medium gefüllten Petrischale gesammelt.

2.2.3 Isolation und Dissoziation der Spinalganglienneurone

Mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette wurden die präparierten lumbalen und thorakalen DRGs getrennt in ein Spitzröhrchen (*Falcon*, bei Verwendung anderer Kunststoffspitzröhrchen misslang die Zellisolierung) überführt und nach ihrem Absinken überschüssiges DMEM-Medium entfernt. Die Isolation der Neurone erfolgte enzymatisch und mechanisch. Alle Zellen wurden stets unter normoxischen Bedingungen mit 5 % CO₂-/95 %-Luftgemisch inkubiert. Es wurden je 5 ml Liberase hinzugegeben und beide Röhrchen für 1 h 15 min bei 37 °C inkubiert. Um die Kollagenase möglichst vollständig zu entfernen, wurden die DRGs nach Abpipettieren der Liberase 2-fach mit 8 ml PBS-Medium gewaschen. Es folgte eine enzymatische Dissoziation mit Trypsin. Hiervon wurden je 5 ml hinzugegeben und 12 min bei 37 °C inkubiert. Auch dieses Enzym wurde nicht chemisch inaktiviert. Die DRGs wurden 3-fach mit 8 ml DMEM-Medium gewaschen. Zur ersten mechanischen Zelldissoziation

wurde das DMEM-Medium letztlich auf 1,5 ml abpipettiert. Mit Hilfe einer abgerundeten silikonisierten Pasteurpipette wurde so lange möglichst luftblasenfrei trituiert (etwa 30- bis 40-fach insgesamt), bis makroskopisch nur noch ein einheitlich trübes Medium sichtbar war. Die so dissoziierten Neurone wurden nach Zugabe von 6,5 ml frischem DMEM-Medium durch Zentrifugation (5 min bei 2000 rpm) als Pellet gesammelt. Um möglichst vollständige Enzymbefreiung zu erreichen, wurde mit 8 ml DMEM-Medium gewaschen und anschliessend zentrifugiert (5 min bei 2000 rpm). Nach Abnahme des Überstandes wurde ein abschliessender Waschlurchgang mit 8 ml TNB-Waschmedium durchgeführt. Die Neurone wurden erneut zentrifugiert (5 min bei 2000 rpm) und der Überstand konnte verworfen werden. Nach Zellaufnahme in TNB-Kulturmedium wurde wie oben beschrieben mechanisch dissoziiert.

2.2.4 Primärkultur der dissoziierten Spinalganglienneurone

Isoliert und gereinigte DRG-Neurone wurden ausgesät. Hierzu wurden je 3 PLL-beschichtete Deckgläschen in eine kleine Petrischale überführt. Mehrere dieser wurden in einer grösseren sterilen Glasschale aufbewahrt. Letztere enthielt zusätzlich ein mit 3-4 ml PBS-Medium gefülltes, offenes Petrischälchen. Jedes Deckgläschen wurde mit 50 µl Zellsuspension bestückt und die kleinen Petrischalen vor Verschluss der Glasschale abgedeckt. Nach mikroskopischer Begutachtung der Aussaat wurden die Neurone für etwa 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen sollten an der Oberfläche der Deckgläschen fest anheften. Abschliessend erhielt jede Petrischale 2 ml TNB-Kulturmedium vor weiterer Inkubation über Nacht. Die DRG-Neurone standen für Versuche am darauffolgenden Tag zur Verfügung.

2.2.5 Stickstoffmonoxid-Imaging

Die extrem kurze NO-Halbwertszeit limitiert seine direkte Messung in vivo. Zur indirekten Messung an isolierten DRG-Neuronen in Echtzeit wurde der spezifische Fluoreszenzindikator DAF-2DA eingesetzt.

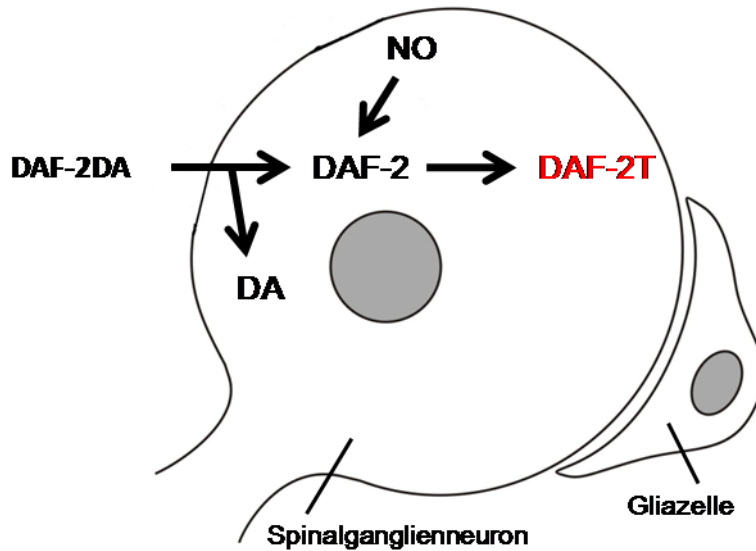


Abb. 1 Der intrazelluläre DAF-2DA-Aktivierungsmechanismus im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle.

Zellpermeables DAF-2DA diffundiert ins Zytosol der Neurone, wo es Esterasen zum DAF-2 hydrolysieren. DAF-2 ist nicht membranpermeabel und fluoresziert bei physiologischem pH-Wert kaum. Erst bei Anwesenheit von NO und O₂ im Zytosol konvertiert DAF-2 zu seinem stark fluoreszierenden Triazolderivat DAF-2T. Im Wellenlängenbereich von 492-515 nm ist die Fluoreszenz des DAF-2T um das >180-fache gegenüber der des DAF-2 gesteigert. Da DAF-2T ebenfalls nicht zellpermeabel ist, akkumuliert der Fluoreszenzindikator bei Anwesenheit von NO (bzw. N₂O₃) (Sugimoto et al. 2000, Qiu et al. 2001, Rodriguez et al. 2005, Ye et al. 2010). DAF-2DA ist ein geeigneter Marker für NO-bildende/NOS-positive Zellen, der in der Literatur bereits zur Detektion endogener NO-Produktion in mesenzephalischen Zellkulturen (Kasim et al. 2001), humanen PBMC-Zellen mit hoher Spezifität und Sensitivität (Tiscornia et al. 2009) sowie anderen Neuronen (Ye et al. 2010) beschrieben ist. NO-Imaging ermöglicht die Untersuchung an vitalen Zellen (Hong et al. 2009).

2.2.6 Beladung isolierter Spinalganglienneurone mit 4,5-Diaminofluorescein-diacetat

Nach lichtmikroskopischer Begutachtung der Zellkultur wurden die Deckgläschen mit den nun fest anhaftenden Neuronen in eine Versuchsschale überführt. Zur Entfernung nicht anhaftender Zellen und Faserreste wurde mit 500 µl HRP (37 °C) gewaschen. Zur Beladung wurden 500 µl HRP und 0,5 µl DAF-2DA-Lösung (5×10^{-3} M, entsprach etwa 1:1000-Verdünnung) hinzu gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Ein erneuter Waschdurchgang mit 500 µl HRP entfernte überschüssiges DAF-2DA aus dem Zellüberstand weitgehend. Nach Zugabe von 500 µl frischer HRP wurden die DAF-2DA-beladenen Zellen erneut 5 min bei 37 °C inkubiert. Hierdurch sollte nicht aufgenommenes DAF-2DA möglichst vollständig aus dem Zellüberstand entfernt werden. Nach einem letzten Waschschrift mit 500 µl HRP waren die beladenen Neurone für Stimulationsversuche einsetzbar.

2.2.7 Versuche an isolierten primärkultivierten 4,5-Diaminofluorescein-diacetat beladenen Spinalganglienneuronen

Der Einfluss folgender Pharmaka auf die neuronale DAF-2-Fluoreszenz in Echtzeit wurde untersucht.

- **Nikotin** (nAChR-Agonist) im Ca^{2+} -haltigen sowie Ca^{2+} -freien Medium
- **MLA** ($\alpha 7, \alpha 9 / \alpha 10$ -nAChR-Antagonist)
- **Verapamil** (Antagonist von VOCCs des L-Typs)
- **L-NAME** (unselektiver NOS-Inhibitor)

Dazu wurden die Neurone am Fluoreszenzmikroskop mit einen Monochromator (*TILL Photonics GmbH*, Gräfelfing/Deutschland) angeregt und die DAF-2-Fluoreszenz computerunterstützt detektiert. Die genaue Beschreibung der einzelnen Versuchsabläufe entfällt hier. Sie wird aus Gründen der direkten Bezugnahme zu den einleitend formulierten Fragestellungen den graphischen Darstellungen der jeweiligen Versuchsblöcke im Ergebnisteil vorangestellt.

2.2.8 Auswertung

Computerunterstützt (TILLvisION v3.3, *TILL Photonics GmbH*) wurde die DAF-2-Fluoreszenz der Neurone eines fokussierten Ausschnittes (Region of interest, ROI) bei 40-facher Vergrößerung in vorgegebenen Zeitabständen (1 Bild/min) detektiert und in Bildform dokumentiert. Die Bildabfolge der ROIs konnte als Film angeschaut und die Veränderungen der DAF-2-Fluoreszenz erfasst werden. Die Auswahl der ROIs wurde nach dem Gesichtspunkt maximaler Zelldichte/Fläche bei erfolgreicher Aussaat in einzelner Zellschicht sowie Fehlen der folgenden Zeichen für Nekrose oder programmierten Zelltod (Apoptose) durchgeführt (Böcker et al. 2001).

- Kernwandhyperchromasie
- Karyopyknose (Kernschrumpfung)
- Karyorrhexis, nukleäre Fragmentierung (Kernzerfall)
- Karyolyse (Kernauflösung)
- Bildung von Cytoplasmablasen und Zellfragmenten mit eingeschlossenen Kernfragmenten (Apoptose-Körper)

Dies sollte die Messung an vitalen, zuvor gleich behandelten Einzelneuronen sicherstellen. Unterschiedliche Zellgrösse und dadurch bedingte unterschiedliche Ausgangsfluoreszenz (infolge unterschiedlich starker DAF-2DA-Beladung) beeinflusste die ROI-Auswahl nicht. Zwecks Vergleichbarkeit der unterschiedlich mit DAF-2DA beladenen Neurone wurde die DAF-2-Fluoreszenz nicht in absoluten Zahlenwerten, sondern prozentual beurteilt. Dadurch war die repräsentative Beurteilung der neuronalen DAF-2-Fluoreszenz gewährleistet. Die weitere Zuteilung der Neurone zu den Versuchsgruppen erfolgte zufällig (Randomisierung). Die Einzelwerte der DAF-2-Fluoreszenz jedes detektierten Neurons wurden erfasst und graphisch die durchschnittliche (\pm s.e.m.) DAF-2-Fluoreszenz detektierter Neurone in % im Zeitverlauf zusammengefasst (Excel, *Microsoft*, Abb. 2 bis 9). Neurone, welche auf vorangestellte HRP-Applikation mit einer Änderung ihrer DAF-2-Fluoreszenz >1 % reagierten, konnten als zusätzlich mechano-/thermosensitiv reagierende Neurone identifiziert werden, ohne von der weiteren Auswertung ausgeschlossen zu werden. Dies sind solche Neurone, die unabhängig von spezifischen Agonisten oder Antagonisten auf mechanische/thermische Stimuli reagieren. Allein durch den Vorgang des Pipettierens bei der Verabreichung von Substanzen können derartige Reize entstehen. Temperaturunterschiede beeinflussen die Funktion aller Ionenkanäle

bezüglich Aktivitätszustand, Permeabilität und Affinität zu Liganden (Krusek et al. 2004), so dass dieser Faktor in den vorliegenden Untersuchungen auszuschliessen war. Dies gewährleistete die Validität des Detektionssystems für Änderungen der DAF-2-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Einflusses zu untersuchender Pharmaka.

Die gewonnenen Messergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Hierbei wurden diejenigen DRG-Neurone als „reagierende“/„stimulierbare“ gezählt, die eine Zunahme von mindestens 1 % DAF-2-Fluoreszenzintensität nach Pharmakonapplikation zeigten. Getestet wurde die Intensität der DAF-2-Fluoreszenz reagierender thorakaler und lumbaler Zellen in der Versuchsminute jeweils vor gegenüber der derselben Zellen 1 min nach Applikation des jeweiligen Pharmakons (Abb. 2 bis 9) mittels Wilcoxon-Tests für abhängige Paardifferenzen.

Zur Überprüfung eines Unterschiedes der detektierten durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzintensität zwischen untersuchten thorakalen und lumbalen Neuronen wurde die DAF-2-Fluoreszenz der reagierenden thorakalen Zellen 1 min nach Applikation des jeweiligen Pharmakons mit der DAF-2-Fluoreszenz reagierender lumbaler Zellen ebenfalls 1 min nach Applikation desselben Pharmakons (Abb. 2 bis 9) mittels Mann-Whitney-Tests für unabhängige Paardifferenzen verglichen.

Für den Vergleich der Häufigkeiten von reagierenden Neuronen nach Applikation des jeweiligen Pharmakons wurde zur statistischen Auswertung der Vierfelder- oder Chi-Quadrat-Test eingesetzt, wobei die Anzahl reagierender thorakaler Neurone 1 min nach Applikation des jeweiligen Pharmakons gegen die Anzahl reagierender lumbaler Neurone in derselben Versuchsminute nach Verabreichung desselben Pharmakons getestet wurde (Abb. 2 bis 9). Bei $p \leq 0,05$ wurde jeweils die Nullhypothese abgelehnt und der Unterschied als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Gabe von Nikotin führt in Spinalganglienneuronen zu einer raschen DAF-2-Signalzunahme

Nach DAF-2DA-Beladung konnte in allen vitalen Neuronen in unstimuliertem Zustand eine basale Fluoreszenz beobachtet werden. Zu thorakalen und lumbalen DRG-Neuronen wurde nach 10 min HRP appliziert, um mechano-/thermosensitiv reagierende Neurone zu erkennen. Nikotin wurde 5 min später zugegeben und nach weiteren 3 min über 5 min lang ausgewaschen. Abschliessend wurde die DAF-2-Fluoreszenz für weitere 10 min detektiert, um eventuelle Langzeiteffekte aufzeigen zu können. Die folgenden Abbildungen fassen die Ergebnisse für reagierende thorakale (Abb. 2A, B, C) und reagierende lumbale (Abb. 3A, B, C) Neurone zusammen. Die Fehlfarbdarstellungen (Abb. 2B und C, Abb. 3B und C) zeigen zur einfacheren visuellen Demonstration der DAF-2-Signalzunahme beispielhaft je ein thorakales und lumbales ausgewähltes Neuron, deren Fluoreszenzzunahme oberhalb der durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme für beide Neuronenpopulationen lag.

Die Nikotinapplikation führte bereits in der ersten Minute zu einem Anstieg der DAF-2-Fluoreszenzintensität von mindestens 1 % in Neuronen beider untersuchten Zellpopulationen. Von allen detektierten Neuronen waren bei 63 % der thorakalen ($n=96/152$ Neurone aus 4 Tieren) und 37 % der lumbalen Neurone ($n=26/70$ Neurone aus 3 Tieren) durch Nikotin rasche DAF-2-Signale stimulierbar (Abb. 2A und 3A). Der Häufigkeitsunterschied zwischen reagierenden thorakalen und lumbalen Zellen war signifikant ($p<0,001$). Die reagierenden thorakalen Neurone zeigten eine durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme von $4 \pm 0,93$ % ($p<0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 2A), während die reagierenden lumbalen Zellen eine durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme von $1 \pm 0,82$ % ($p<0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 3A) aufwiesen. Bezüglich der durchschnittlich detektierten Nikotin-stimulierten DAF-2-Signalhöhe zeigte sich kein Unterschied zwischen reagierenden thorakalen und lumbalen Neuronen ($p=0,070$, Vergleich jeweils 16. Versuchsminute, Abb. 2A und 3A). Auf Einzelzellebene variierte die beobachtbare Signalzunahme bei thorakalen Neuronen individuell von 1-71 % und bei lumbalen Zellen von 1-4 %.

Thorakale Neurone. Die durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzintensität persistierte bei den reagierenden thorakalen Neuronen nach dem initialen Anstieg in den 3 min Anwesenheit von Nikotin auf konstantem Niveau ($p=0,592$, Vergleich 16. mit 18. Versuchsminute, Abb. 2A). Während des Waschvorganges zeigten alle untersuchten Neurone individuell sehr unterschiedliche Zellreaktionen auf Einzelzellebene, von DAF-Signalabfall über unverändertes Fluoreszenzniveau bis DAF-2-Fluoreszenzzunahme. Bei einzelnen Neuronen variierte die Signaländerung von 27 % Abnahme bis 6 % Zunahme. Nach Abschluss der Waschphase zeigten die Nikotin-stimulierbaren Neurone eine auf durchschnittlich $3 \pm 1,12$ % über dem Ausgangswert reduzierte DAF-2-Fluoreszenzintensität ($p<0,001$, Vergleich 16. mit 23. Versuchsminute, Abb. 2A). Nach dem Auswaschen von Nikotin war im weiteren Beobachtungsverlauf bei weiterer Belichtung der reagierenden Neurone keine DAF-2-Fluoreszenzänderung detektierbar ($p=0,325$, Vergleich 16. mit 33. Versuchsminute, Abb. 2A).

Lumbale Neurone. Auch bei den reagierenden lumbalen Zellen blieb bei fortwährender Anwesenheit von Nikotin die DAF-2-Fluoreszenzintensität konstant ($p=0,268$, Vergleich 16. mit 18. Versuchsminute, Abb. 3A). Die individuelle DAF-2-Signaländerung der Einzelneurone variierte von 17 % Abnahme bis 3 % Zunahme. Am Ende des Waschvorgangs zeigte die reagierende Zellpopulation einen durchschnittlichen DAF-Signalabfall auf $3 \pm 1,62$ % über dem Ausgangswert ($p=0,004$, Vergleich 16. mit 23. Versuchsminute, Abb. 3A). Zum Ende des Beobachtungsverlaufes war auch bei den reagierenden Neuronen nach weiterer Belichtung in Abwesenheit von Nikotin keine weitere Änderung der DAF-2-Fluoreszenzintensität zu detektieren ($p=0,878$, Vergleich 16. mit 33. Versuchsminute, Abb. 3A).

Das rasche von Nikotin vermittelte DAF-Signal war bei reagierenden thorakalen sowie lumbalen Neuronen persistent in Anwesenheit des Agonisten und in beiden Populationen auswaschbar. Hierbei war die durchschnittliche detektierbare DAF-2-Fluoreszenz nach Beenden des Waschens bei reagierenden thorakalen und lumbalen Zellen nicht signifikant verschieden ($p=0,069$, Vergleich jeweils 23. Versuchsminute, Abb. 2A und 3A). Nach dem Auswaschen von Nikotin war im weiteren Beobachtungsverlauf bei Belichtung reagierender thorakaler sowie lumbaler Neurone keine DAF-2-Fluoreszenzänderung detektierbar. Langzeiteffekte nach Nikotinstimulation waren bei thorakalen und lumbalen Zellen somit nicht detektierbar. Das Nikotin-induzierte DAF-2-Signal ist transient.

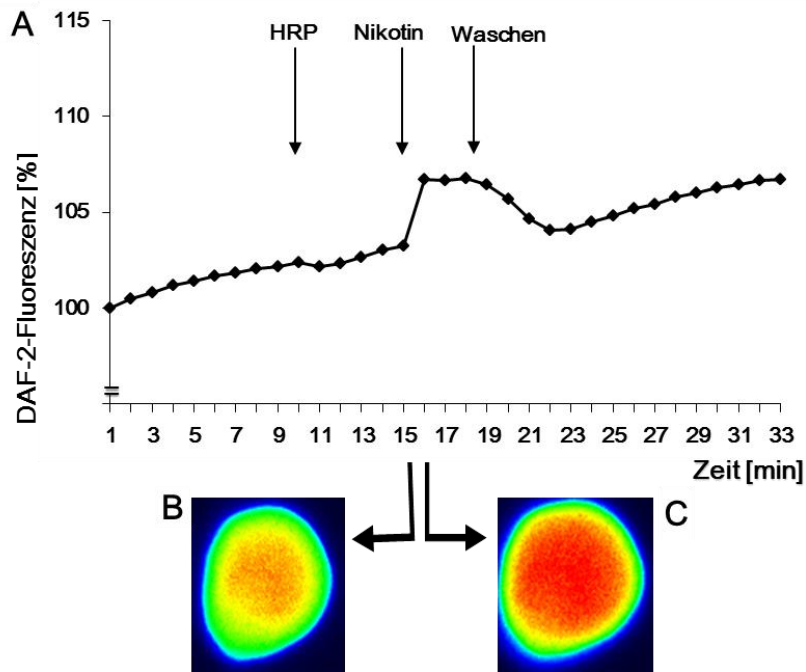


Abb. 2 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg reagierender thorakaler Neurone.

A Durchschnittlich $4 \pm 0,93$ % ($p < 0,001$) Nikotin-abhängiger Anstieg ($n=96/152$ Neurone aus 4 Tieren). B Fehlfarbandarstellung thorakalen Neurons vor Nikotingabe. C Fehlfarbandarstellung derselben Zelle mit 18 % Signalzunahme 1 min später.

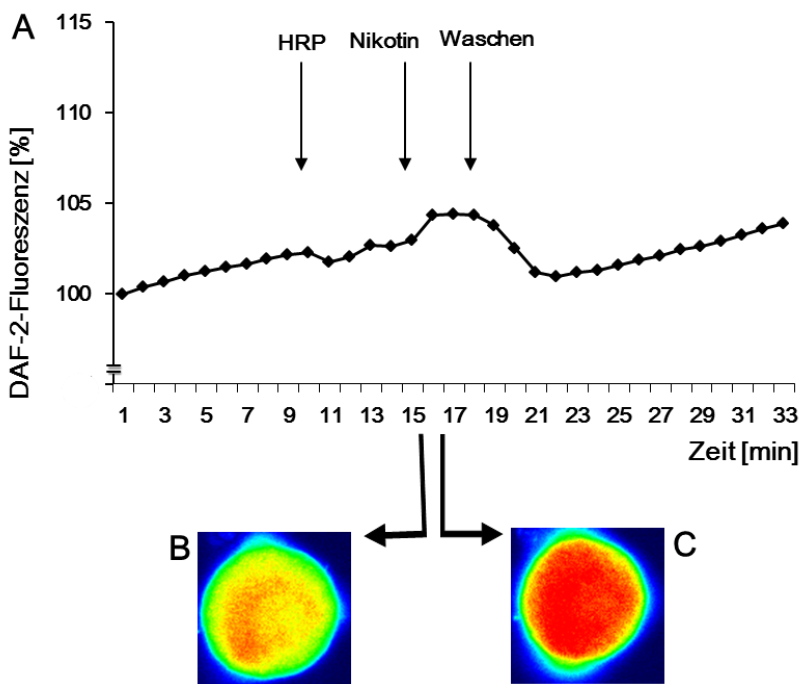


Abb. 3 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg reagierender lumbaler Neurone.

A Durchschnittlich $1 \pm 0,82$ % ($p < 0,001$) Nikotin-abhängiger Anstieg ($n=26/70$ Neurone aus 3 Tieren). B Fehlfarbandarstellung lumbalen Neurons vor Nikotingabe. C Fehlfarbandarstellung derselben Zelle mit 17 % Signalzunahme 1 min später.

Auffällig war in allen untersuchten thorakalen (n=152 Neurone aus 4 Tieren) sowie lumbalen Neuronen (n=70 Neurone aus 3 Tieren) eine detektierte basale DAF-2-Fluoreszenz, welche unter Belichtung innerhalb der ersten 10 Versuchsminuten durchschnittlich bei den thorakalen Zellen um $2 \pm 0,18$ % ($p < 0,001$, Vergleich 1. mit 10. Versuchsminute) sowie bei den lumbalen Zellen um $1 \pm 0,21$ % ($p < 0,001$, Vergleich 1. mit 10. Versuchsminute) zunahm. Der Belichtungseinfluss auf die durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme war dabei in allen thorakalen und lumbalen Zellen gleich ($p = 0,124$ Vergleich jeweils 10. Versuchsminute), jedoch bei einer grösseren Anzahl ($p < 0,001$) thorakaler (78 %, n=119/152 Neurone aus 4 Tieren) als lumbaler Zellen (76 %, n=53/70 Neurone aus 3 Tieren) detektierbar.

Die vor zu untersuchender Nikotinwirkung durchgeführte isolierte HRP-Applikation zeigte in der Gesamtpopulation der untersuchten thorakalen Nervenzellen (n=152 Neurone aus 4 Tieren) durchschnittlich keinen Einfluss ($p = 0,122$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute) auf das DAF-Signal. Die untersuchten lumbalen Nervenzellen (n=70 Neurone aus 3 Tieren) hingegen reagierten mit einem minimalen durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzintensitätsabfall von $0 \pm 0,24$ % ($p = 0,005$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute).

Auch während des abschliessenden Detektionszeitraumes nach Beendigung des Waschvorgangs zeigten alle thorakalen Neurone (n=152 Neurone aus 4 Tieren) durchschnittlich $3 \pm 0,86$ % ($p < 0,001$, Vergleich 23. mit 33. Versuchsminute) und alle lumbalen Neurone (n=70 Neurone aus 3 Tieren) durchschnittlich $1 \pm 0,96$ % ($p = 0,002$, Vergleich 23. mit 33. Versuchsminute) DAF-Signalzunahme unter Belichtung. Der Belichtungseinfluss auf die durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme war bei thorakalen Neuronen grösser ($p = 0,026$, Vergleich jeweils 33. Versuchsminute) als bei lumbalen. Auch die Anzahl auf Belichtung mit >1 % Fluoreszenzintensitätszunahme reagierender Neurone war in der thorakalen Population mit 78 % (n=118/152 Neurone aus 4 Tieren) gegenüber der lumbalen mit 59 % (n=41/70 Neurone aus 3 Tieren) grösser ($p < 0,001$).

Die durchgeführte Belichtung über mehrere Minuten führte somit in thorakalen mehr als in lumbalen Neuronen zu einer langsamen Zunahme der DAF-2-Fluoreszenzintensität. In den folgenden Versuchen wurde daher zur Gewährleistung der Validität bei thorakalen und lumbalen Neuronen die gleiche Belichtungsdauer vor und nach Applikation der weiteren zu untersuchenden Pharmaka in den Versuchsgruppen durchgeführt.

3.2 Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme ist partiell über nikotinische Acetylcholinrezeptoren vom $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtyp vermittelt

Thorakale und lumbale Neurone wurden hinsichtlich der Beteiligung der hoch Ca^{2+} -permeablen $\alpha 7$ - und $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Subtypen an der DAF-2-Fluoreszenzintensitätsänderung untersucht. Dazu erfolgte nach 10 min die Applikation des $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -selektiven nAChR-Antagonisten MLA und 5 min später Nikotin. In Kontrollgruppen wurden entsprechend isolierte HRP-, Nikotin- bzw. MLA-Gaben durchgeführt. Dies sollte mechano-/thermosensitiv reagierende Neurone sowie isolierte MLA-Effekte aufdecken. Die Ergebnisse sind für beide untersuchte Zellpopulationen in den folgenden Abb. 4 und 5 wiedergegeben. Die Fehlfarbandarstellungen in den Abb. 4C und 5C zeigen zur einfacheren visuellen Demonstration der DAF-2-Signalzunahme beispielhaft je 2 thorakale und lumbale ausgewählte Neurone, deren Fluoreszenzintensitätszunahme unter Inhibition teils oberhalb der durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzzunahme für beide Neuronenpopulationen lag.

Der durchschnittliche Nikotin-induzierte DAF-2-Anstieg war unter $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Inhibition in thorakalen ($p < 0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 4C) und lumbalen DRG-Neuronen ($p = 0,022$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 5C) reduziert.

Thorakale Neurone. Insgesamt 82 % aller thorakalen Zellen ($n = 90/110$ Neurone aus 11 Tieren) waren nach isolierter Nikotinapplikation stimulierbar. Die Anzahl stimulierbarer Neurone nach Gabe von Nikotin in Anwesenheit von MLA war mit 68 % ($n = 49/72$ Neurone aus 4 Tieren) geringer ($p < 0,001$). Die signifikante durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme aller untersuchten thorakalen Neurone von $4 \pm 0,58$ % nach Nikotingabe (Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 4A) war nach Applikation von Nikotin in Anwesenheit des Inhibitors (Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 4C) mit einer durchschnittlichen DAF-Signalzunahme von $2 \pm 0,75$ % reduziert ($p < 0,001$, Vergleich 11. mit 16. Versuchsminute, Abb. 4A und 4C).

Auffällig war der durchschnittliche Signalabfall in thorakalen Neuronen ($n = 101$ Neurone aus 10 Tieren) um $1 \pm 0,57$ % ($p < 0,001$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 4B) nach isolierter Puffergabe, wobei 61 % der detektierten Neurone ($n = 62/101$ Neurone aus 10 Tieren) reagierten.

Lumbale Neurone. Auch die Anzahl stimulierbarer lumbaler Neurone war mit 67 % ($n = 12/18$ Neurone aus 3 Tieren) nach Gabe von Nikotin und MLA gegenüber 84 %

(n=78/93 Neurone aus 12 Tieren) nach isolierter Nikotinapplikation gemindert ($p < 0,001$). Bezüglich der Höhe des durch Nikotin hervorgerufenen DAF-2-Signalanstieges mit durchschnittlicher DAF-2-Fluoreszenzzunahme von $3 \pm 0,67$ % nach isolierter Nikotinapplikation (Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 5A) gegenüber $1 \pm 1,00$ % nach Gabe von Nikotin in Anwesenheit des Inhibitors (Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 5C) bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,691$, Vergleich 11. mit 16. Versuchsminute, Abb. 5A und 5C).

Das durchschnittliche DAF-2-Signal aller untersuchten lumbalen Neurone (n=72 Neurone aus 11 Tieren) war unbeeinflusst von isolierter HRP-Applikation ($p = 0,081$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 5B).

Bei thorakalen (n=72 Neurone aus 4 Tieren) und lumbalen (n=18 Neurone aus 3 Tieren) Neuronen war der Einfluss der MLA-Inhibition auf die durchschnittliche Nikotin-induzierbare DAF-2-Signalhöhe gleich ($p = 0,114$, Vergleich jeweils 16. Versuchsminute, Abb. 4C und 5C). Unter MLA-Hemmung war die Anzahl Nikotin-stimulierbarer Neurone in der thorakalen Population mit 68 % (n=49/72 Neurone aus 4 Tieren) gleich ($p = 0,896$) wie in der lumbalen Gruppe mit 67 % (n=12/18 Neurone aus 3 Tieren). Damit sind die $\alpha 7$ - und $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtypen partiell in den Nikotin-induzierten DAF-2-Fluoreszenzanstieg thorakaler gleichermassen wie lumbaler DRG-Neurone involviert.

Die isolierte Applikation von MLA hatte keinen Einfluss auf die durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenz der thorakalen ($p = 0,210$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 4D) sowie lumbalen Neurone ($p = 0,089$, Vergleich 10. mit 11. Versuchsminute, Abb. 5D). Isolierte Effekte des nAChR-Antagonisten MLA waren somit weder bei untersuchten thorakalen als auch lumbalen DRG-Neuronen detektierbar.

Die isolierte HRP-Applikation hingegen hatte bei den thorakalen im Gegensatz zu den lumbalen untersuchten Neuronen sowohl auf die stimulierbare durchschnittliche DAF-2-Signalhöhe ($p < 0,001$, Vergleich jeweils 11. Versuchsminute, Abb. 4B und 5B) als auch auf die Anzahl stimulierbarer Neurone ($p < 0,001$) Einfluss. Bei gegebener signifikanter durchschnittlicher DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme aller untersuchten thorakalen Zellen nach Nikotinverabreichung ($4 \pm 0,58$ %, $p < 0,001$, Abb. 4A) ist die einwandfreie funktionelle nAChR-Integrität bewiesen und die Versuchsergebnisse sind verwertbar.

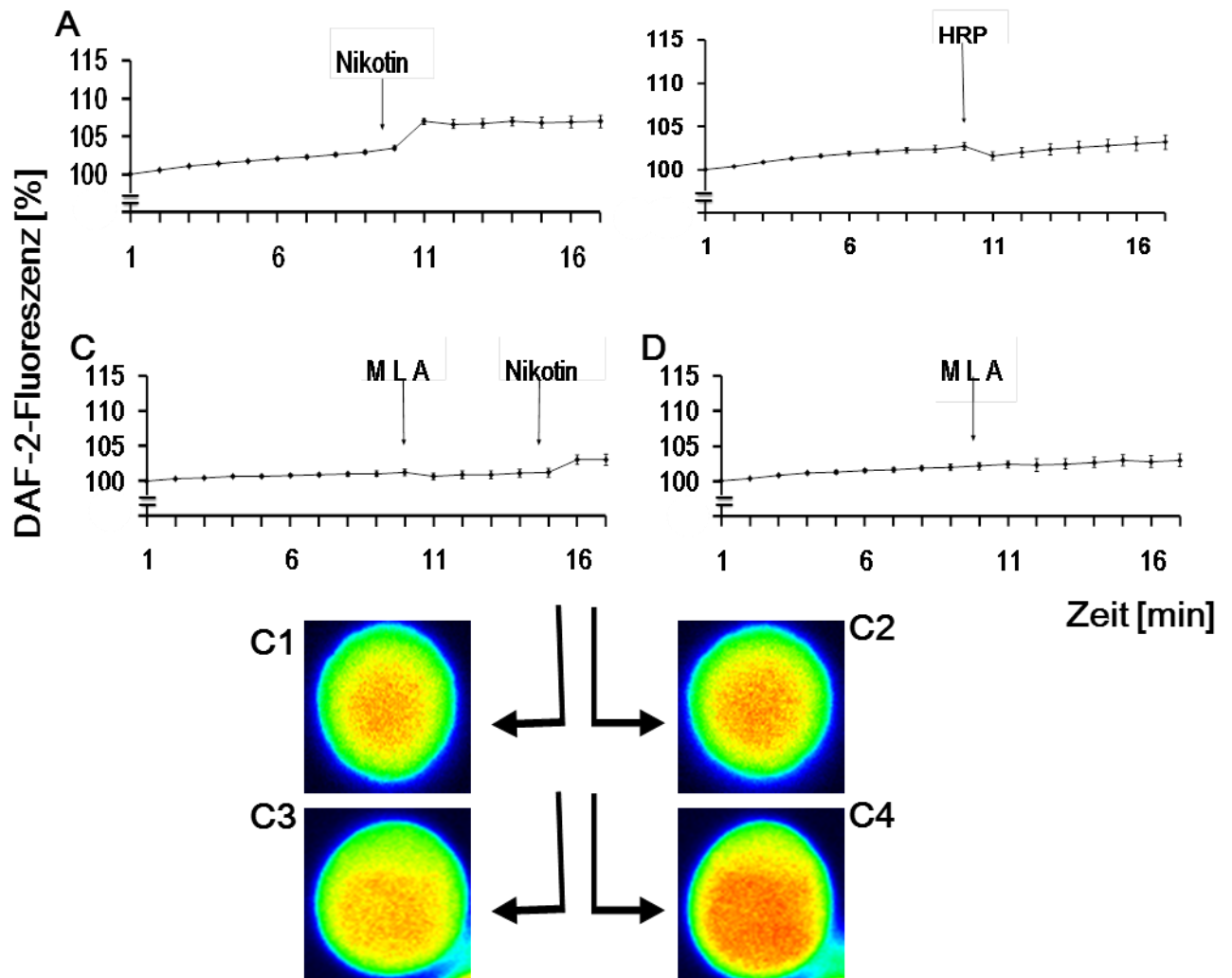


Abb. 4 Reduktion des Nikotin-induzierten DAF-2-Anstieges thorakaler Neurone unter $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Inhibition.

A Nikotin-abhängiger Signalanstieg in Abwesenheit von MLA (n=110 Neurone aus 11 Tieren) durchschnittlich $4 \pm 0,58$ % ($p < 0,001$). B Kontrollgruppe mit isolierter HRP-Applikation (n=101 Neurone aus 10 Tieren) durchschnittlich $1 \pm 0,57$ % Signalabfall ($p < 0,001$). C Durchschnittlich $2 \pm 0,75$ % ($p < 0,001$) Nikotin-induzierter Signalanstieg in Anwesenheit von MLA (n=72 Neurone aus 4 Tieren). C1 Fehlfarbendarstellung eines thorakalen Neurons in MLA-haltigem Puffer vor Nikotिंगabe. C2 Fehlfarbendarstellung derselben Zelle mit 1 % Fluoreszenzzunahme 1 min später. C3 Fehlfarbendarstellung eines weiteren thorakalen Neurons in Anwesenheit von MLA vor Nikotinverabreichung. C4 Fehlfarbendarstellung derselben Zelle mit 7 % Signalanstieg 1 min später. D Kontrollgruppe mit isolierter MLA-Applikation (n=75 Neurone aus 7 Tieren) ohne Signaländerung ($p = 0,210$).

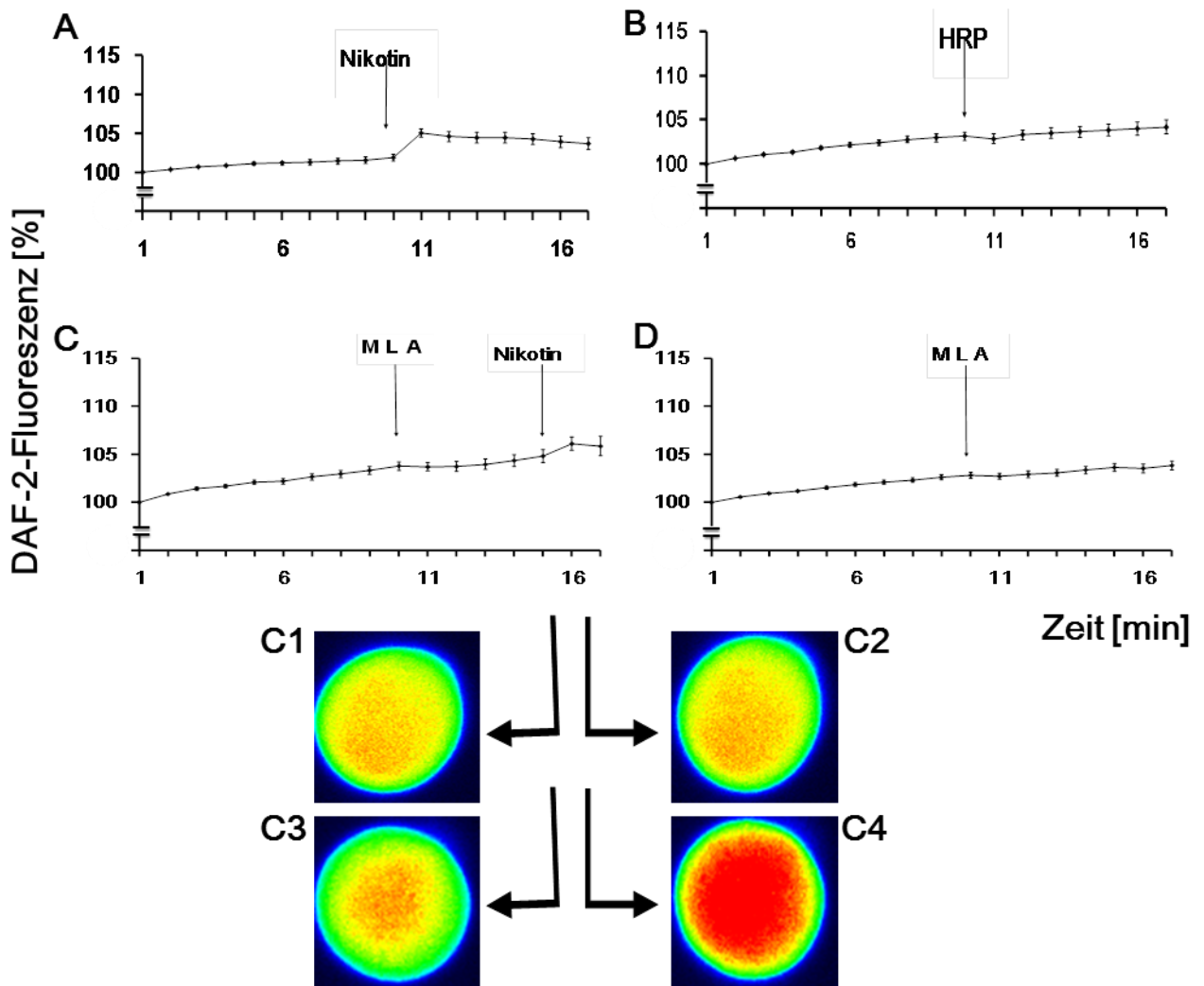


Abb. 5 Reduktion des Nikotin-induzierten DAF-2-Anstieges lumbaler Neurone unter $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Inhibition.

A Nikotin-anhängiger Signalanstieg in Abwesenheit von MLA (n=93 Neurone aus 12 Tieren) durchschnittlich $3 \pm 0,67$ % ($p < 0,001$). B Kontrollgruppe mit isolierter HRP-Applikation (n=72 Neurone aus 11 Tieren) ohne Signaländerung ($p = 0,081$). C Nikotin-induzierter Signalanstieg in Anwesenheit von MLA (n=18 Neurone aus 3 Tieren) durchschnittlich $1 \pm 1,00$ % ($p = 0,022$). C1 Fehlfarbandarstellung eines lumbalen Neurons in MLA-haltigem Puffer vor Nikotingabe. C2 Fehlfarbandarstellung derselben Zelle mit 2 % Fluoreszenzzunahme 1 min später. C3 Fehlfarbandarstellung eines weiteren lumbalen Neurons in Anwesenheit von MLA vor Nikotinverabreichung. C4 Fehlfarbandarstellung derselben Zelle mit 22 % Signalanstieg 1 min später. D Kontrollgruppe mit isolierter MLA-Applikation (n=42 Neurone aus 5 Tieren) ohne Signaländerung ($p = 0,089$).

3.3 Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme ist partiell über einen Calciueinstrom aus dem Extrazellularraum vermittelt

Das Medium wurde nach 10 min Belichtung durch 5-minütiges Waschen durch Ca^{2+} -freie HRP ersetzt, anschliessend Nikotin appliziert und 3 min detektiert. Die Nikotingabe wurde nach erneuter Waschphase von 5 min in Ca^{2+} -haltiger HRP wiederholt. Analoge 2-fache Nikotin- bzw. HRP-Applikationen in 2 Kontrollgruppen sollten die funktionelle Integrität der nAChR nach erfolgter Primärkultivierung überprüfen und mechano-/thermosensitive Zellen identifizieren. Die Untersuchungsergebnisse der Beteiligung extrazellulären Ca^{2+} am Nikotin-abhängigen DAF-2-Signal zeigen die nachfolgenden Abb. 6 und 7.

Es war durchschnittlich bei thorakalen DRG-Neuronen im Ca^{2+} -freien Puffer eine Nikotin-abhängige DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme um $0 \pm 0,43$ % ($p < 0,001$, Vergleich 16. mit 17. Versuchsminute, Abb. 6A) und bei lumbalen Neuronen um $0 \pm 0,42$ % ($p < 0,001$, Vergleich 16. mit 17. Versuchsminute, Abb. 7A) detektierbar. Die anschliessende Ca^{2+} -Zufuhr induzierte bei thorakalen Neuronen eine durchschnittliche Nikotin-stimulierbare DAF-2-Fluoreszenzintensitätssteigerung um $1 \pm 0,54$ % ($p = 0,001$, Vergleich 17. mit 26. Versuchsminute, Abb. 6A), welche bei lumbalen Neuronen $1 \pm 0,55$ % ($p = 0,001$, Vergleich 17. mit 26. Versuchsminute, Abb. 7A) betrug.

Thorakale Neurone. Insgesamt 46 % aller thorakalen Zellen ($n = 27/59$ Neurone aus 3 Tieren) waren durch Nikotin im Ca^{2+} -freien Medium stimulierbar. In derselben Gesamtpopulation ($n = 59$ Neurone aus 3 Tieren) induzierte eine zweite Nikotinapplikation nach Ca^{2+} -Ergänzung in das Zellmedium bei 59 % ($n = 35/59$ Neurone aus 3 Tieren) der thorakalen DRG-Neurone eine DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme. In der Kontrollgruppe ($n = 54$ Neurone aus 3 Tieren, Abb. 6B) waren 52 % der Neurone ($n = 28/54$ Neurone aus 3 Tieren) bei erster Gabe von Nikotin und 72 % ($n = 39/54$ Neurone aus 3 Tieren) bei zweiter Gabe stimulierbar. Der Häufigkeitsunterschied zwischen der Gruppe im Ca^{2+} -freien Medium und der Kontrollgruppe war jeweils bei erster ($p < 0,001$, Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 6A und 6B) und zweiter Nikotinapplikation ($p < 0,001$, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 6A und 6B) signifikant. Bezüglich der durchschnittlichen DAF-2-Signalhöhe in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} gegenüber Ca^{2+} -haltigen Medium bei erster Nikotinapplikation bestand kein Unterschied ($p = 0,234$, Vergleich jeweils 17.

Versuchsminute, Abb. 6A und 6B). Die zweite Nikotingabe stimulierte bei konstanter Ca^{2+} -Anwesenheit durchschnittlich eine Zunahme der DAF-2-Signalerhöhung um $3 \pm 1,07$ % ($p=0,029$, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 6A und 6B) über den Ausgangswert. Folglich ist die DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme in thorakalen DRG-Neuronen bei konstanter Anwesenheit extrazellulären Ca^{2+} durch repetitive Nikotinapplikationen bezüglich der Anzahl stimulierbarer Neurone sowie der durchschnittlichen Signalerhöhung intensivierbar. Ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum ist partiell in die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme einer kleinen Subpopulation thorakaler DRG-Neurone involviert, da Ca^{2+} -Depletion zur Reduktion der relativen Anzahl Nikotin-stimulierbarer Zellen, nicht aber zur Abnahme des durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzsignalanstiegs bei Erstnikotingabe führte (Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 6A und 6B).

Auffällig war in der thorakalen Neuronenpopulation bei isolierter HRP-Erstapplikation eine minimale, aber signifikante DAF-Signalabnahme von weniger als 1 % ($p=0,005$, Vergleich 16. mit 17. Versuchsminute, Abb. 6C). Von diesen untersuchten thorakalen Zellen waren bei 27 % ($n=22/81$ Neurone aus 3 Tieren) eine DAF-2-Fluoreszenzintensitätsabnahme registrierbar, was die Vorbefunde im Ergebnisteil 3.2. (Abb. 4B) bestätigt. Diese thorakalen Neurone waren damit als mechano-/thermosensitive Zellen identifiziert.

Lumbale Neurone. Bei 70 % der lumbalen Zellen ($n=35/50$ Neurone aus 3 Tieren) waren durch Nikotin im Ca^{2+} -freien Medium DAF-2-Signalzunahmen stimulierbar. In derselben Gesamtpopulation ($n=50$ Neurone aus 3 Tieren) induzierte eine zweite Nikotinapplikation nach Ca^{2+} -Ergänzung in das Zellmedium bei 58 % ($n=29/50$ Neurone aus 3 Tieren) der lumbalen DRG-Neurone eine DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme. Die Kontrollgruppe ($n=27$ Neurone aus 3 Tieren, Abb. 7B) mit konstantem Ca^{2+} -Gehalt zeigte nach erster Nikotingabe bei 63 % der lumbalen Zellen ($n=17/27$ Neurone aus 3 Tieren) und 70 % ($n=19/27$ Neurone aus 3 Tieren) nach Zweitapplikation Stimulierbarkeit. Auch hier war der Häufigkeitsunterschied zwischen untersuchter lumbaler Population und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,001$ bei Erstgabe, Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 7A und 7B; $p=0,001$ bei Zweitstimulation, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 7A und 7B). Bezüglich der durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzintensitätsänderung in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} gegenüber Ca^{2+} -haltigem Medium bei erster Nikotinapplikation ($p=0,636$, Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 7A und 7B) sowie im Ca^{2+} -

haltigen Medium bei Zweitgabe ($p=0,573$, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 7A und 7B) war jeweils kein Unterschied detektierbar. Hier hatte der Ca^{2+} -Gehalt des Mediums keinen Einfluss auf die durchschnittliche Nikotin-stimulierbare DAF-2-Signalhöhe. Damit erfolgt der Nikotin-induzierte DAF-2-Fluoreszenzanstieg bei lumbalen Neuronen unabhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellarraum. Die isolierten HRP-Verabreichungen beeinflussten die DAF-2-Fluoreszenzintensität lumbaler Nervenzellen nicht ($p=0,791$, Vergleich 16. mit 17. Versuchsminute sowie $p=0,405$, Vergleich 25. mit 26. Versuchsminute, Abb. 7C), so dass in dieser Neuronenpopulation mechano-/thermosensitive Zellen nicht identifizierbar waren. Hinsichtlich der durchschnittlichen Nikotin-induzierbaren DAF-2-Signalhöhenzunahme im Ca^{2+} -freien Puffer bestand zwischen thorakalen und lumbalen Neuronen kein Unterschied ($p=0,135$, Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 6A und 7A). Es waren jedoch in Ca^{2+} -freier HRP mehr lumbale Neurone (70 %, $n=35/50$ Neurone aus 3 Tieren) als thorakale (46 %, $n=27/59$ Neurone aus 3 Tieren) Nikotin-stimulierbar ($p<0,001$). Nach Ca^{2+} -Ergänzung des Zellmediums bestand bezüglich der Nikotin-stimulierbaren durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzzunahme keine Differenz zwischen untersuchten thorakalen und lumbalen Nervenzellen ($p=0,334$, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 6A und 7A), jedoch ein signifikanter Häufigkeitsunterschied ($p<0,001$). Mehr thorakale DRG-Neurone (59 %, $n=35/59$ Neurone aus 3 Tieren) als lumbale (58 %, $n=29/50$ Neurone aus 3 Tieren) waren Nikotin-stimulierbar. Bei lumbalen DRG-Neuronen ist das Nikotin-stimulierbare DAF-2-Signal damit unabhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom. Bei Nikotinstimulation im konstanten Ca^{2+} -Milieu der Kontrollgruppen bestand bei erster Nikotingabe zwischen thorakalen und lumbalen Neuronen hinsichtlich durchschnittlich induzierbarer DAF-2-Signalhöhe kein Unterschied ($p=0,744$, Vergleich jeweils 17. Versuchsminute, Abb. 6B und 7B). Es waren in diesen Kontrollgruppen mit 63 % mehr lumbale Neurone ($n=17/27$ Neurone aus 3 Tieren) als thorakale mit 52 % ($n=28/54$ Neurone aus 3 Tieren) nach erster Nikotingabe stimulierbar ($p<0,001$). Verglichen mit den Befunden im vorangegangenen Ergebnisteil 3.1 (Abb. 4A und 5A) stellt dies eine Häufigkeitsumkehr zwischen thorakalen und lumbalen Neuronen in Bezug auf die Nikotin-Stimulierbarkeit dar. Auch die Zweitapplikation induzierte in den thorakalen und lumbalen Kontrollgruppen ein durchschnittlich gleich hohes DAF-2-Signal ($p=0,136$, Vergleich jeweils 26. Versuchsminute, Abb. 6B und 7B), allerdings waren hierbei mit 72 % ($n=39/54$ Neurone aus 3 Tieren) wieder mehr thorakale als lumbale Zellen mit 70 %

(n=19/27 Neurone aus 3 Tieren, p=0,009) nach Zweitgabe Nikotin-stimulierbar. Die funktionelle Integrität der nAChR der untersuchten thorakalen und lumbalen DRG-Neurone war damit gesichert, so dass die Versuchsergebnisse verwertbar sind.

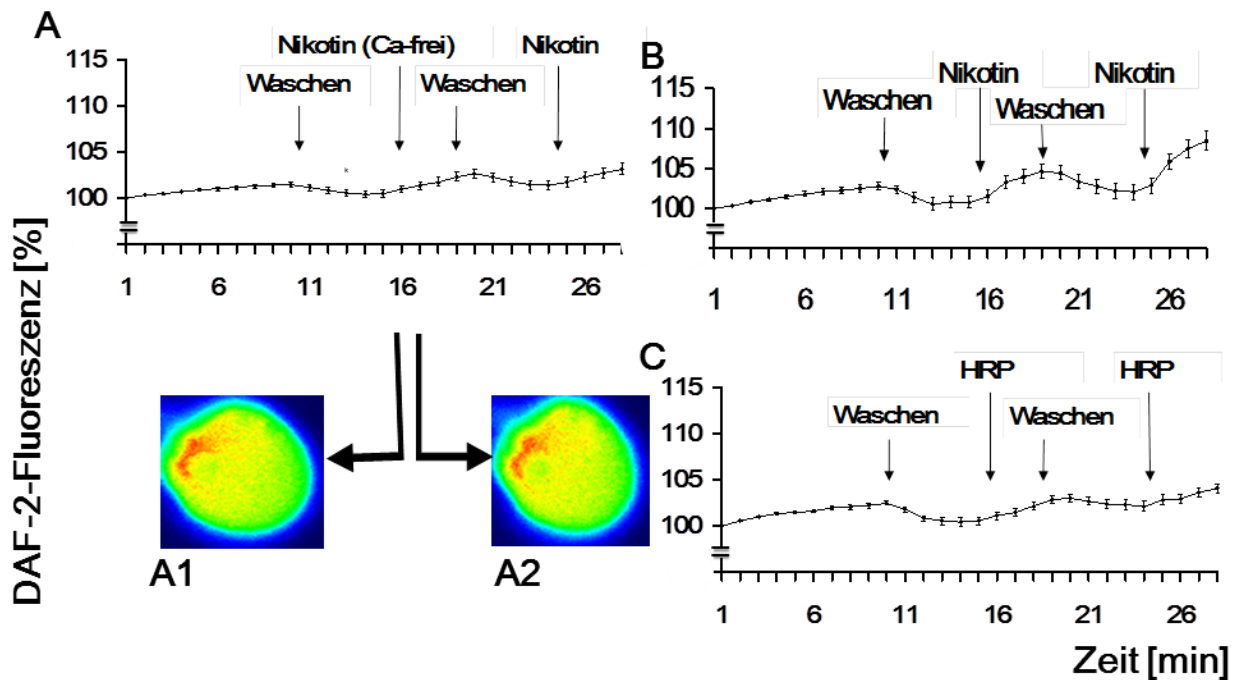


Abb. 6 Reduktion des Nikotin-induzierten DAF-2-Anstieges thorakaler Neurone in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} .

A Nikotin-abhängige durchschnittliche DAF-Signale im Ca^{2+} -freien Medium um $0 \pm 0,43$ % (p<0,001) in der 17. Versuchsminute sowie nach Ca^{2+} -Ergänzung um $0 \pm 0,54$ % (p<0,001) in der 26. Versuchsminute (n=59 Neurone aus 3 Tieren).

A1 Fehlfarbandarstellung eines thorakalen Neurons vor Ca^{2+} -freier Nikotingabe.

A2 Fehlfarbandarstellung derselben Zelle ohne DAF-Signaländerung 1 min später.

B Kontrollgruppe im konstant Ca^{2+} -haltigen Medium mit durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzzunahmen um $2 \pm 0,82$ % (p<0,001) bei erster Nikotingabe in der 17. Versuchsminute sowie um $3 \pm 1,07$ % (p<0,001) bei Zweitapplikation in der 26. Versuchsminute (n=54 Neurone aus 3 Tieren). C Kontrollgruppe im konstant Ca^{2+} -haltigen Medium mit durchschnittlich $0 \pm 0,44$ % (p=0,005) DAF-2-Fluoreszenzabnahme nach erster HRP-Gabe in der 17. Versuchsminute sowie ohne weitere Signaländerung (p=0,323) nach Zweitgabe in der 26. Versuchsminute (n=81 Neurone aus 3 Tieren).

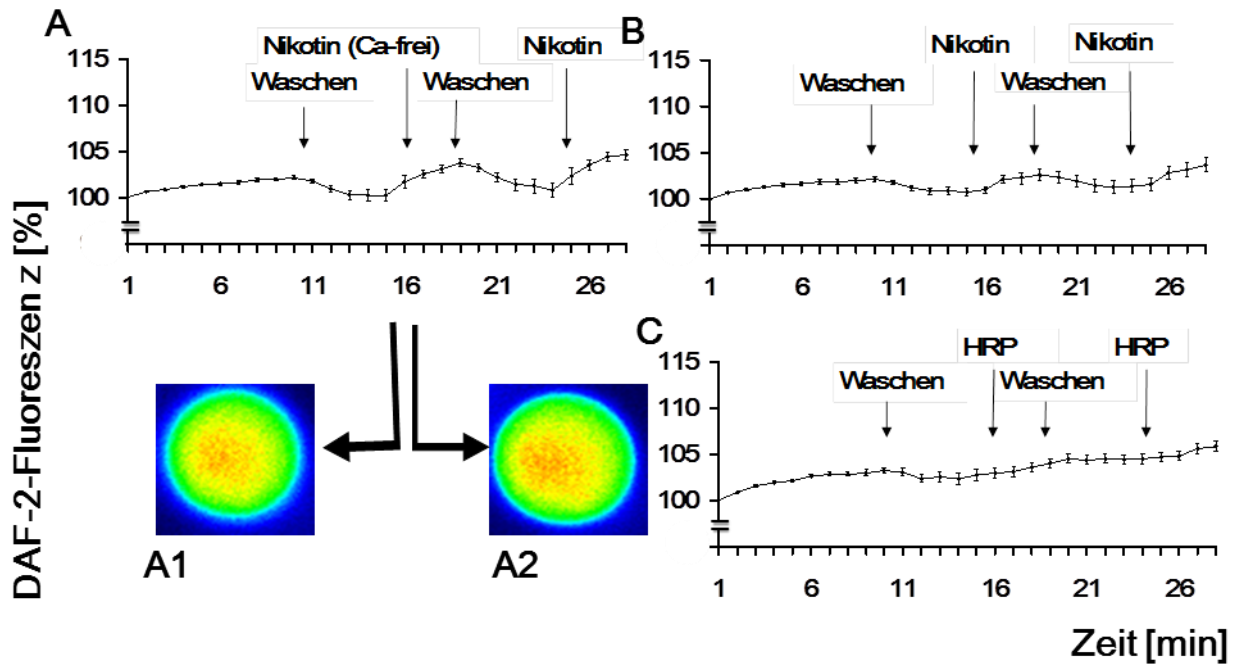


Abb. 7 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg lumbaler Neurone in Abwesenheit extrazellulären Ca²⁺.

A Nikotin-abhängige durchschnittliche DAF-Signale im Ca²⁺-freien Medium um $0 \pm 0,42$ % ($p < 0,001$) in der 17. Versuchsminute sowie nach Ca²⁺-Ergänzung um $1 \pm 0,55$ % ($p < 0,001$) in der 26. Versuchsminute ($n = 50$ Neurone aus 3 Tieren).

A1 Fehlfarbandarstellung eines lumbalen Neurons vor Ca²⁺-freier Nikotingabe.

A2 Fehlfarbandarstellung derselben Zelle ohne DAF-Signaländerung 1 min später.

B Kontrollgruppe im konstant Ca²⁺-haltigen Medium mit durchschnittlichen DAF-2-Fluoreszenzzunahmen um $1 \pm 0,59$ % ($p = 0,001$) bei erster Nikotingabe in der 17. Versuchsminute sowie um $1 \pm 0,77$ % ($p < 0,001$) bei Zweitapplikation in der 26. Versuchsminute ($n = 27$ Neurone aus 3 Tieren). C Kontrollgruppe im konstant Ca²⁺-haltigen Medium ohne durchschnittliche DAF-Signaländerungen nach beiden HRP-Gaben in 17. Versuchsminute ($p = 0,791$) und 26. ($p = 0,405$) ($n = 26$ Neurone aus 2 Tieren).

3.4 Die Nikotin-induzierte DAF-2-Signalzunahme in thorakalen DRG-Neuronen erfolgt partiell über einen Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ

In einer kleinen Subpopulation thorakaler Spinalganglienneurone war die nAChR-abhängige DAF-2-Fluoreszenzzunahme partiell von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig. Zur Überprüfung eines nAChR-aktivierten VOCC-vermittelten Ca^{2+} -Einstromes wurde der L-Typ-Kanal-Antagonist Verapamil eingesetzt. Den Neuronen wurde nach 10 min Verapamil und 5 min später Nikotin appliziert. Drei Minuten danach wurde mit HRP 10 min lang gewaschen und über weitere 5 min die DAF-2-Fluoreszenz registriert. Analog wurde 2-fach Verapamil sowie HRP vor Nikotingabe verabreicht. Ein eventueller isolierter Einfluss des Antagonisten sowie mechano-/thermosensitive Zellen sollten identifiziert werden und gleichzeitig die funktionelle Integrität der nAChR nach Primärkultivierung der untersuchten DRG-Neurone überprüft werden. Die Aufklärung der Beteiligung von VOCCs des L-Typs in thorakalen Zellen zeigt Abb. 8. Die Ergebnisse des zuletzt genannten Kontrollversuches werden erst im nächsten Abschnitt 3.5. (Abb. 9B) graphisch aufgeführt, da sie bei selbem Versuchsablauf auch dort als Kontrolle dienten.

Unter VOCC-Inhibition war in den untersuchten thorakalen DRG-Neuronen (n=54 Neurone aus 3 Tieren) eine durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzintensitätszunahme um $1 \pm 0,53$ % Nikotin-induziert ($p < 0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 8A). Hierbei waren 50 % der Neurone (n=27/54 Neurone aus 3 Tieren) stimulierbar. Bei etwas längerer Anwesenheit des Antagonisten mit Nikotin im Medium war keine weitere Signaländerung feststellbar ($p = 0,369$, Vergleich 15. mit 18. Versuchsminute, Abb. 8A). Nikotin induzierte unter VOCC-Inhibition damit ein bei Agonistenanwesenheit persistierendes DAF-2-Signal. Dieser Effekt war auswaschbar mit durchschnittlich reduzierter DAF-2-Fluoreszenzintensität um $3 \pm 0,76$ % ($p < 0,001$, Vergleich 16. mit 28. Versuchsminute, Abb. 8A). Hierbei reagierten 83 % der Neurone (n=45/54 Neurone aus 3 Tieren). Zum Ende des Beobachtungszeitraumes war ein weiterer Signalabfall um durchschnittlich $1 \pm 0,74$ % detektierbar ($p = 0,04$, Vergleich 16. mit 33. Versuchsminute, Abb. 8A), wobei 52 % der Zellen (n=28/54 Neurone aus 3 Tieren) reagierten. Somit war unter VOCC-Hemmung ein transients, auswaschbarer DAF-2-Signalanstieg durch Nikotin stimulierbar.

Die isolierte Nikotingabe in der Kontrollgruppe (n=140 Neurone aus 6 Tieren) stimulierte eine durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme um $0 \pm 0,39$ % ($p < 0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 9B), wobei 54 % der Zellen (n=78/140 Neurone aus 6 Tieren) reagierten. Reproduzierbar war dieser Nikotin-stimulierte Effekt auswaschbar, diese Neurone zeigten eine durchschnittliche Signalminderung um $1 \pm 0,61$ % ($p < 0,001$, Vergleich 16. mit 28. Versuchsminute, Abb. 9B), wobei 63 % der Zellen (n=88/140 Neurone aus 6 Tieren) reagierten. In Abwesenheit von Nikotin war bei weiterer Belichtung keine DAF-2-Fluoreszenzänderung detektierbar ($p = 0,269$, Vergleich 16. mit 33. Versuchsminute, Abb. 9B), so dass der reproduzierbar transiente Nikotin-induzierte DAF-2-Signalanstieg kein Langzeiteffekt war. Somit war die funktionelle Integrität der neuronalen nAChR nach Primärkultivierung gesichert und erzielte Versuchsergebnisse verwertbar.

Der L-Typ-Kanal-Antagonist Verapamil hatte keinen Einfluss auf die Nikotin-induzierte durchschnittliche Signalhöhe ($p = 0,919$, Vergleich jeweils 16. Versuchsminute, Abb. 8A und 9B). Die Anzahl Nikotin-stimulierbarer thorakaler Neurone war unter VOCC-Blockade signifikant reduziert, jedoch mit einem Häufigkeitsunterschied von 50 % stimulierbaren Zellen unter VOCC-Inhibition (n=27/54 Neurone aus 3 Tieren) gegenüber 54 % ohne Verapamil (n=78/140 Neurone aus 6 Tieren) nur zu einem geringen Prozentsatz ($p < 0,001$). Auch das Waschen ($p = 0,727$, Vergleich jeweils 28. Versuchsminute, Abb. 8A und 9B) und die weitere Belichtung ($p = 0,527$, Vergleich jeweils 33. Versuchsminute, Abb. 8A und 9B) hatten nach Verapamilgabe keinen Einfluss auf die durchschnittliche DAF-2-Signalhöhe, aber gleich geringen reduktiven Einfluss auf die stimulierbare Zellanzahl ($p < 0,001$, Vergleich jeweils der 28. und 33. Versuchsminuten, Abb. 8A und 9B). Der Nikotin-induzierte DAF-2-Signalanstieg war unter VOCC-Inhibition damit partiell nicht nur transient, sondern auch langfristig reduziert.

Nach 2-facher Verapamilapplikation in der Kontrollgruppe (n=27 Neurone aus 2 Tieren) zeigte sich eine DAF-2-Fluoreszenzzunahme ($p = 0,030$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 8B), wobei 48 % der Zellen (n=13/27 Neurone aus 2 Tieren) reagierten. Dies weist auf einen isolierten Einfluss des VOCC-Antagonisten oder mechano-/thermosensitive Neurone hin.

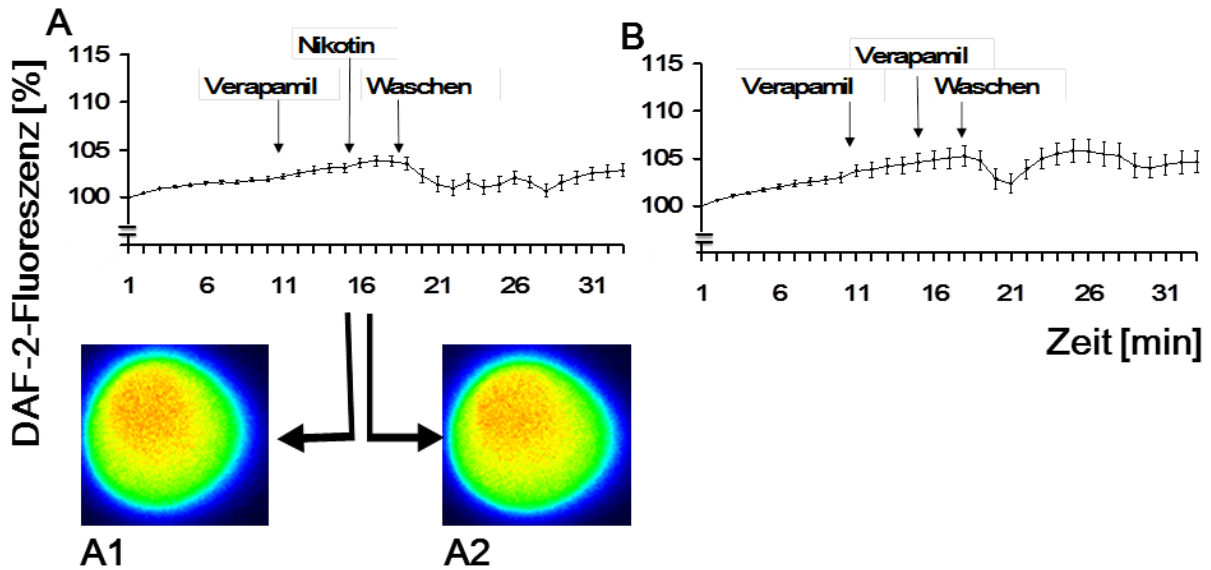


Abb. 8 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg thorakaler Neurone unter VOCC-Inhibition. A Nikotin-abhängige DAF-2-Fluoreszenzzunahme in Anwesenheit von Verapamil durchschnittlich $1 \pm 0,53$ % ($p < 0,001$) in der 16. Versuchsminute; hierzu unverändertes Nikotin-abhängiges Signal ($p = 0,369$) in der 18. Versuchsminute bei fortwährender Anwesenheit von Verapamil und Nikotin; nach Auswaschen durchschnittlich $1 \pm 0,74$ % ($p = 0,040$) DAF-2-Fluoreszenzabnahme in der 33. Versuchsminute ($n = 54$ Neurone aus 3 Tieren). A1 Fehlfarbendarstellung eines thorakalen Neurons in Verapamilhaltigem Puffer vor Nikotingabe. A2 Fehlfarbendarstellung derselben Zelle ohne Signaländerung 1 min später. B Kontrollgruppe ($n = 27$ Neurone aus 2 Tieren) mit isolierter Verapamilgabe durchschnittlich $0 \pm 1,06$ % DAF-2-Fluoreszenzzunahme ($p = 0,030$) in der 16. Versuchsminute.

3.5 Nikotin generiert in thorakalen Spinalganglienneuronen ein DAF-2-Signal partiell durch NOS-Aktivität

Zur Überprüfung einer Nikotin-induzierten DAF-2-Fluoreszenzzunahme durch eine NOS-Aktivierung mit folgender NO-Generierung in thorakalen DRG-Neuronen wurde das Enzym mit dem unselektiven Inhibitor L-NAME blockiert. Bereits die Beladung der DRG-Neurone mit DAF-2DA erfolgte in L-NAME-haltiger HRP. Nach 10 min wurde erneut L-NAME appliziert und 5 min später mit Nikotin stimuliert. Dies sollte eine möglichst vollständige Enzymhemmung vor Nikotinapplikation gewährleisten. Nach 3 min wurde mit L-NAME-freier HRP für 10 min gewaschen und 5 min im Anschluss die DAF-2-Fluoreszenz der Neurone weiter detektiert. Dies ermöglichte die Erfassung langfristiger Auswirkungen der Enzyminhibition. Ohne NOS-Hemmung wurde der Nikotin-abhängige Signalanstieg zwecks Überprüfung der funktionellen Integrität der nAChR nach Primärkultivierung der DRG-Neurone kontrolliert. Die erzielten Versuchsergebnisse sind in Abb. 9 demonstriert.

Nach DAF-2DA-Beladung des Mediums konnte in allen vitalen Neuronen bereits in unstimuliertem Zustand eine basale Fluoreszenz beobachtet werden.

Bei L-NAME-Gabe war eine durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenzzunahme um $1 \pm 0,43$ % Nikotin-stimulierbar ($p=0,001$, Vergleich 15. mit 16. Versuchsminute, Abb. 9A), wobei 40 % der Zellen ($n=32/81$ Neurone aus 3 Tieren) reagierten. Unter NOS-Inhibition war das Nikotin-vermittelte DAF-2-Signal zunehmend ($p<0,001$, Vergleich 16. mit 18. Versuchsminute, Abb. 9A), wobei 48 % der DRG-Neurone ($n=39/81$ Neurone aus 3 Tieren) stimulierbar waren. Weiterhin reproduzierbar war die Auswaschbarkeit des Nikotineffektes mit durchschnittlicher DAF-2-Signalminderung um $3 \pm 0,86$ % ($p<0,001$, Vergleich 16. mit 28. Versuchsminute, Abb. 9A), wobei 69 % der Zellen ($n=56/81$ Neurone aus 3 Tieren) reagierten. Bei weiterer Belichtung blieb die DAF-2-Fluoreszenz unbeeinflusst ($p=0,364$, Vergleich 16. mit 33. Versuchsminute, Abb. 9A). Der unter L-NAME-Gabe Nikotin-stimulierte DAF-2-Signalanstieg war somit ein transienter Effekt ohne Langzeitwirkung.

Die in thorakalen Neuronen unter Inhibition der NOS Nikotin-induzierte DAF-2-Fluoreszenz war bezüglich der durchschnittlichen Signalzunahme unverändert ($p=0,912$, Vergleich jeweils 16. Versuchsminute, Abb. 9A und 9B). Die Anzahl Nikotin-stimulierbarer DRG-Neurone war jedoch reduziert mit 40 % ($n=32/81$ Neurone aus 3 Tieren) unter NOS-Hemmung gegenüber 54 % ($n=78/140$ Neurone aus 6 Tieren)

ohne L-NAME ($p < 0,001$). Die Nikotin-vermittelte DAF-2-Fluoreszenzzunahme war damit partiell auf die NOS-Aktivität zurückzuführen und der detektierte Anstieg ein NO-Synthese-Signal. Nach Beendigung der Waschphase zeigten die Neurone beider Populationen unabhängig von L-NAME durchschnittlich gleiche DAF-2-Signalhöhe ($p = 0,529$, Vergleich jeweils 28. Versuchsminute, Abb. 9A und 9B). Bei weiterer Belichtung war die durchschnittliche DAF-2-Fluoreszenz unbeeinflusst von vorangegangener Enzyminhibition ($p = 0,687$, Vergleich jeweils 33. Versuchsminute, Abb. 9A und 9B). Die unter NOS-Inhibition detektierte nAChR-induzierte NO-Generierung war damit gesichert transient.

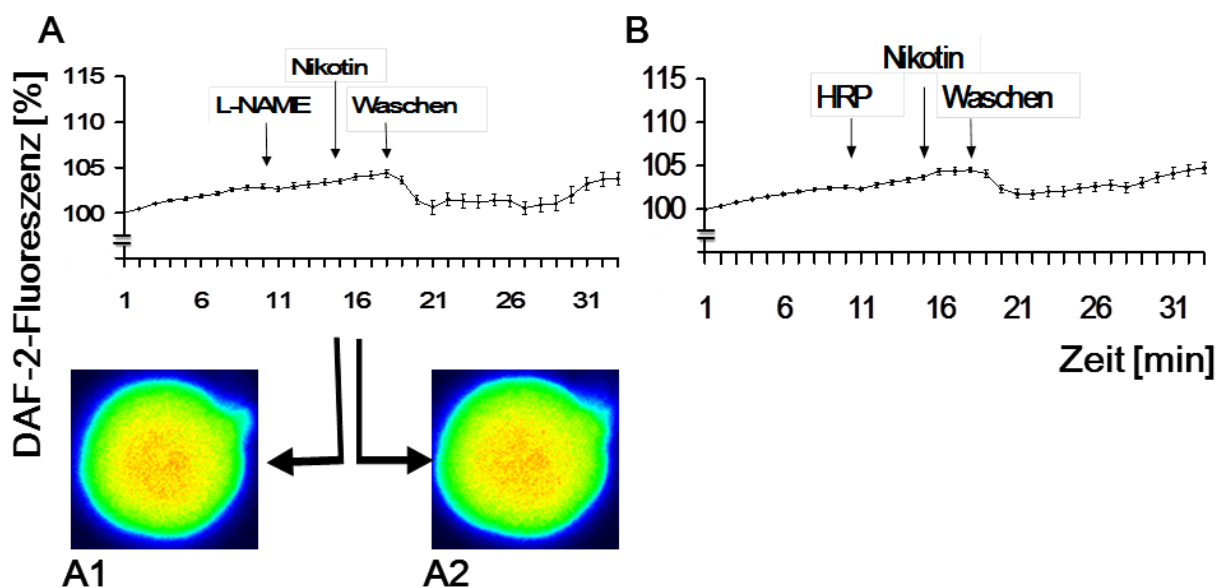


Abb. 9 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg thorakaler Neurone unter NOS-Inhibition.

A Nikotin-abhängiger Signalanstieg in Anwesenheit von L-NAME durchschnittlich $1 \pm 0,43$ % ($p = 0,001$) in der 16. Versuchsminute sowie $0 \pm 0,46$ % ($p < 0,001$) in der 18. Versuchsminute ($n = 81$ Neurone aus 3 Tieren bis 28. Versuchsminute, $n = 77$ aus 3 Tieren in 29. bis 33. Versuchsminute). A1 Fehlfarbandarstellung eines thorakalen Neurons in L-NAME-haltigem Puffer vor Nikotingabe. A2 Fehlfarbandarstellung derselben Zelle ohne DAF-Signaländerung 1 min später. B Kontrollgruppe ($n = 140$ Neurone aus 6 Tieren) mit Nikotin-induzierten Signalanstiegen in L-NAME-freiem Medium durchschnittlich $0 \pm 0,39$ % ($p < 0,001$) in der 16. Versuchsminute sowie $1 \pm 0,39$ % ($p = 0,007$) in der 18. Versuchsminute.

3.6 Der Vergleich der Nikotin-induzierten DAF-2-Signalzunahme in thorakalen mit lumbalen Spinalganglienneuronen

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des Nikotin-induzierten DAF-2-Signales von der DRG-Segmenthöhe wurden in den vorangegangenen Abschnitten 3.1 bis 3.5 die Ergebnisse der Teilversuche thorakaler mit lumbalen Neurone verglichen. Nachfolgend ist jeweils die Anzahl der stimulierbaren thorakalen und lumbalen DRG-Neurone 1 min nach Applikation des jeweils untersuchten Pharmakons zur besseren Übersicht zusammengefasst (Tab. 10 sowie Abb. 10).

verabreichtes Pharmakon	stimulierbare thorakale Neurone		stimulierbare lumbale Neurone		Häufigkeitsunterschied
	%	absolut	%	absolut	
Nikotin	63 %	96/152 aus 4 Tieren	37 %	26/70 aus 3 Tieren	p<0,001
MLA + Nikotin	68 %	49/72 aus 4 Tieren	67 %	12/18 aus 3 Tieren	p=0,896
Nikotin Ca ²⁺ -frei	46 %	27/59 aus 3 Tieren	70 %	35/50 aus 3 Tieren	p<0,001

Tab. 10 Anzahl stimulierbarer thorakaler und lumbaler DRG-Neurone (% und absolut) 1 min nach Verabreichung untersuchter Pharmaka aus den Ergebnisteilen 3.1 bis 3.5.

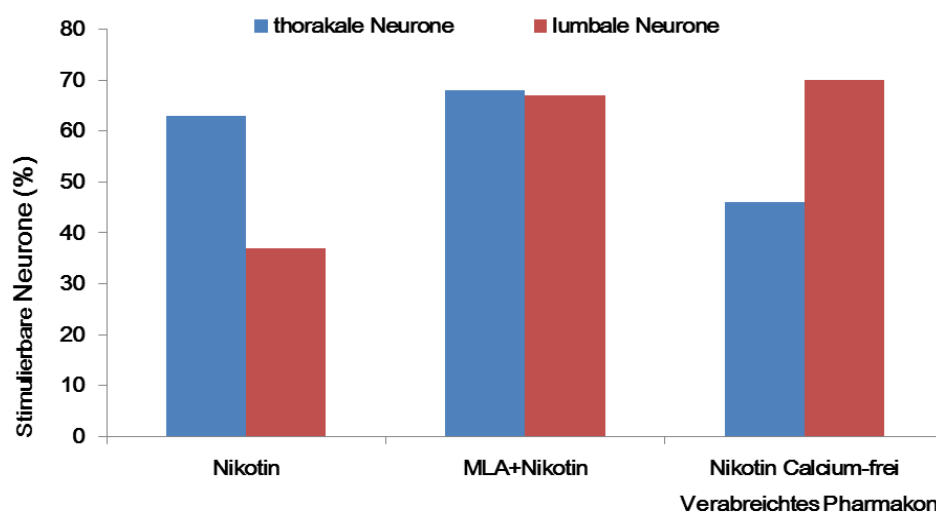


Abb. 10 Anzahl stimulierbarer thorakaler und lumbaler DRG-Neurone (%) 1 min nach Verabreichung der untersuchten Pharmaka aus den Ergebnisteilen 3.1 bis 3.5.

4. DISKUSSION

4.1 Die Messung neuronaler NO-Generierung mit 4,5-Diaminofluorescein-diacetat

In vorliegender Arbeit erfolgte die funktionelle Rezeptorcharakterisierung von nAChR sowie der ersten Schritte ihrer Signaltransduktion an thorakalen und lumbalen, isolierten primärkultivierten DRG-Neuronen adulter Ratten. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die Aktivierung von nAChR eine Generierung des second messengers NO in DRG-Neuronen auslöst. Durch Einsatz des NO-spezifischen Fluoreszenzindikators DAF-2DA konnte die endogene NO-Freisetzung wie folgt detektiert werden. Bei Konversion des Indikators zu seinem Triazolderivat DAF-2T wird ein zellulärer Fluoreszenzanstieg erst bei gleichzeitiger Anwesenheit zytosolischen NOs messbar (Abb. 1) (Sugimoto et al. 2000, Qiu et al. 2001). Die im Rahmen der Primärkultur durchgeführte Dissoziation und Isolation der Neurone gewährleistete die Untersuchung der zellulären NO-Generierung unabhängig von einer möglichen Interaktion mit umgebenden Satellitenzellen. Solche Primärkulturen primär-afferenter DRG-Neurone waren zur Untersuchung der postulierten Hypothese sehr geeignet. Die nAChR der primär-afferenten Neurone sind sowohl in der freien Nervenendigungen als auch in der Zellmembran der Perikaryen zu finden (Boyd et al. 1991). Hier sind sie der weiteren Charakterisierung zugänglich. Auf dieser Basis allein zwischen nozizeptiven Neuronen und solchen anderer Modalität zu differenzieren, ist jedoch nicht möglich (Vyklícky & Knotkova-Urbancova 1996). Ein Vorteil der Experimente an isolierten primärkultivierten DRG-Neuronen besteht in der von einer Interaktion durch direkt umgebende Gliazellen weitestgehend unabhängigen Untersuchbarkeit, da die durchgeführte Dissoziation eine gute Separation der Neurone erreichte. Bei In-Situ-Untersuchungen an vitalen DRG-Schnittpräparationen ist eine Interaktion mit umgebenden Satellitenzellen nicht auszuschliessen. Gleichzeitig werden Probleme bei der Detektion der genauen Lokalisation des Fluoreszenzsignals umgangen, die bei Untersuchungen an Geweben mit einer Schichtdicke ≥ 2 Zellschichten auftreten können (Sugimoto et al. 2000). Die Detektion NOS-positiver Strukturen beispielsweise mittels histochemischen Nachweises der NADPH-Diaphoraseaktivität wird bezüglich der Spezifität in der Literatur kontrovers diskutiert (Vizzard et al. 1995).

Die Untersuchung der endogenen NO-Generierung an vitalen DRG-Neuronen in Echtzeit wurde gegenüber Endpunktmessungen am Versuchsende mit Paraformaldehyd- oder Glutaraldehyd-fixierten Zellen vorgezogen. Ein Vorteil stellt die hier mögliche Messbarkeit zeitabhängiger Veränderungen dar. Ausserdem ist die Möglichkeit einer Komplexbildung des DAF-2DA über die Ausbildung von Brückenbindungen seiner Aminogruppen mit den Aldehydgruppen dieser Fixierungsmittel (oder auch Sulfhydrylgruppen anderer Fixantien) beschrieben, welche einer messbaren Intensivierung des Fluoreszenzsignales wahrscheinlich zugrunde liegen (Sugimoto et al. 2000). Zellfixationen haben in anderen Zelllinien die subzelluläre Verteilung des NO-Fluoreszenzsignal beeinflusst (López-Figueroa et al. 2001). Reaktionen des DAF-2 mit verschiedenen Reagenzien behindern durch die Ausbildung spektraler Veränderungen die Echtzeitmessung sowie korrekte Angaben über den Zeitverlauf des neuronalen NO-Signals (Rodriguez et al. 2005). Diese wird erst durch den hier erfolgten Einsatz des NO-Imaging auf Einzelzellebene vitaler DRG-Neurone ermöglicht.

Die detektierte basale Fluoreszenz der Neurone ohne vorangegangene Stimulation wird durch die Beobachtung einer basalen neuronalen NO-Generierung an lumbalen vitalen DRG-Schnittpräparationen (Haberberger et al. 2003) unterstützt. Ein basales NO-Signal konnte auch an anderen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (N2A-Zellen aus Neuroblastom-Gewebe abstammend, cholinerge SN56-Zellen und nicht-neuronale COS-1-Zellen) (López-Figueroa et al. 2001) sowie an Zellen aus der Aorta von Ratten detektiert werden (Rodriguez et al. 2005). In den Zelllinien N2A, SN56 und COS-1 korrelierte dies mit der Nachweisbarkeit der NADPH-Diaphorase-Aktivität und der NOS-Verteilung auf subzellulärer Ebene (López-Figueroa et al. 2001). In Zellen aus der Aorta von Ratten beruhte das basale NO-Signal auf einer Eigenfluoreszenz des inaktiven DAF-2, die auch unter Inhibition der NO-Produktion noch auftrat (Rodriguez et al. 2005). Diese Ursache könnte auch dem basalen DAF-2-Signal untersuchter Nervenzellen zugrunde liegen. Eine uneingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse kann hier jedoch nicht vorgenommen werden. Eine denkbare Ursache ist eine basale NO-Synthese in untersuchten Zellen. Bereits in o.g. N2A-, SN56- und COS-1-Zelllinien wurde NADPH-Diaphorase-Aktivität als zellulärer Marker für die NO-Synthese gezeigt (López-Figueroa et al. 2001). Hinweise auf eine basale NO-Synthese liefert desweiteren die in der Literatur mehrfach beschriebene Steigerung der NOS-Expression (Vizzard et al. 1995, Shi et al. 1998, Cristino et al. 2000), insbesondere von nNOS und iNOS nach Axotomie von DRG-Neuronen (Fiallos-Estrada et al. 1993, Zhang et al. 1993, Qin et al.

2004, Kim et al. 2011). Die durchgeführten DRG-Präparationen zur Neuronengewinnung für die Primärkultur sind funktionell mit Axotomien gleichzusetzen. Eine weitere denkbare Ursache könnte auch in der Beeinflussung des detektierten DAF-2-Signals durch andere Faktoren als die intrazelluläre NO-Konzentration liegen, was in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Broillet et al. beschrieben 2001 eine Abhängigkeit der DAF-2-Signalzunahme von der Kationenkonzentration, teilweise der Ca^{2+} -Konzentration des Zellmediums sowie von der durchgeführten Belichtung. In Untersuchungen mit gasförmigem NO konnte ein DAF-2-Signal vollständig unabhängig von physiologischen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen detektiert werden und die Ca^{2+} -abhängige DAF-2-Signalsteigerung durch unmittelbare NO-Freisetzung von NO-Donatoren aufgezeigt werden (Suzuki et al. 2002). Mit nachgewiesenen DAF-2-Fluoreszenzänderungen durch Anoxie sowie Inhibition des mitochondrialen Elektronentransportes stellt ein detektierbares DAF-2-Signal einen Zellmarker für NO-Produktion, aber auch NO-Oxidation und/oder Produktion anderer DAF-reaktiver Komponenten dar (Planchet & Kaiser 2006).

In vorliegender Arbeit wurde daher vor nAChR-Stimulation der Belichtungseinfluss in thorakalen und lumbalen Neuronen überprüft, wobei eine DAF-2-Signalzunahme in beiden Nervenzellpopulationen detektierbar war. Hinweise auf belichtungsabhängige Änderungen gemessener DAF-2-Fluoreszenz fanden Qiu et al. (2001) bei ihren Untersuchungen zur durch Scherkraft stimulierten NO-Synthese an Endothelzellen als Reduktion der DAF-2-Fluoreszenz bei länger anhaltender Lichtexposition. Rodriguez et al. (2005) wiesen einen belichtungsabhängigen Anstieg der DAF-2-Fluoreszenz an Zellen der Aorta von Ratten nach.

Die Diskussion der Untersuchung der NOS-Beteiligung am detektierten intrazellulären NO-Signal in vorliegender Arbeit erfolgt in Anlehnung an die Darstellungsabfolge der vorangegangenen Ergebnisse im später folgenden Abschnitt 4.6.

4.2 Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzieren eine rasche intrazelluläre NO-Generierung

Die Applikation von Nikotin führte in thorakalen und lumbalen DRG-Neuronen während der ersten Minute zur intrazellulären NO-Bildung. In untersuchten thorakalen Neuronen liess sich die NO-Generierung in gleichem durchschnittlichen Ausmass, aber höherer Zellanzahl stimulieren (Abb. 2 und 3). Diese Daten zeigen, dass grössere Subpopulationen thorakaler als lumbaler DRG-Neurone funktionelle nAChR besitzen, deren Aktivierung eine rasche intrazelluläre Bildung des Botenstoffes NO stimulieren (Abb. 11).

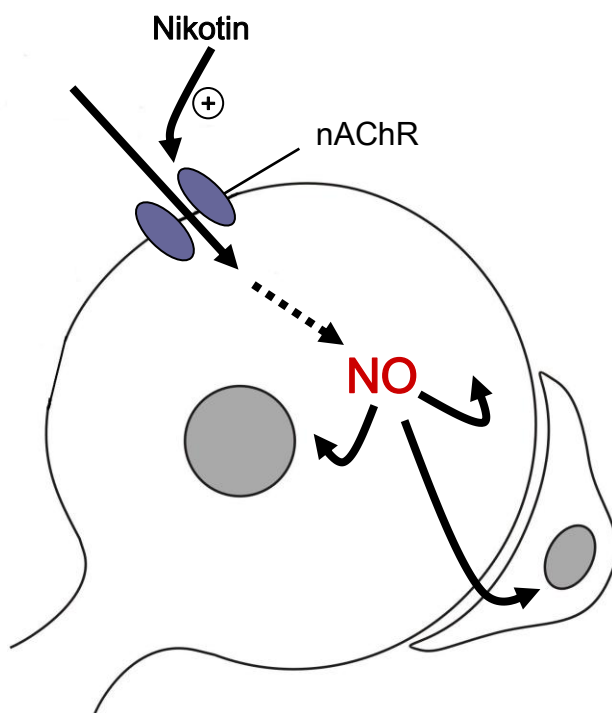


Abb. 11 Die nAChR-abhängige NO-Generierung im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle.

Eine Nikotin-induzierte neuronale NO-Produktion konnte bereits an DRG-Schnittpräparationen nachgewiesen werden (Haberberger et al. 2003). In DRGs ist eine unterschiedliche Expression von nAChR-Subtypen auf grossen und kleinen Neuronen nachgewiesen (Genzen et al. 2001). Weitere Hinweise auf eine funktionelle Präsenz von nAChR in DRG-Neuronen liefern die Nachweise von nAChR auf Capsaicin-sensitiven (Haberberger et al. 2004, Rau et al. 2004) und nicht Capsaicin-sensitiven sowie

teilweise auch auf unmyelinisierten DRG-Neuronen (Rau et al. 2004). Rau et al. identifizierten nAChR-Subtypen an Nozizeptoren in behaarter Haut von Versuchstieren (Rau et al. 2004). Dies weist auf eine Modulation der Schmerzwahrnehmung über eine Aktivierung von nAChR hin.

Bezüglich des Zeitraumes, über welchen eine erfolgte nAChR-Aktivierung die endogene NO-Generierung stimuliert, zeigten thorakale und lumbale Zellen gleiches Verhalten. In beiden Populationen vermittelte die nAChR-Aktivierung eine rasche, bei Anwesenheit des Agonisten persistente NO-Bildung ohne weitere Signaländerung, wobei dieser rasche Effekt auswaschbar war. In Abwesenheit von Nikotin war nach erfolgter Stimulation thorakaler sowie lumbaler Nervenzellen zuletzt keine Signaländerung detektierbar. Die endogene nAChR-induzierte NO-Generierung war transient und damit ohne Langzeiteffekt bei Abwesenheit des Agonisten. Da DAF-2T nicht membranpermeabel ist (Sugimoto et al. 2000, Qiu et al. 2001), war zu erwarten, dass es nach erfolgter Bildung in Anwesenheit von NO intrazellulär akkumuliert. Ein erreichtes Fluoreszenzniveau sollte damit nach Abwesenheit von Nikotin konstant bleiben. Der nAChR-Stimulation thorakaler sowie lumbaler DRG-Neurone folgt eine transiente Steigerung der endogenen NO-Generierung. Diese Beobachtung könnte einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung nAChR an der Vermittlung des schnellen, ersten Gefühls bei akutem Schmerz liefern (Almeida et al. 2004, Matre et al. 2010). Mögliche mechanosensitive Zellreaktionen auf das Waschen können hierbei nicht sicher ausgeschlossen werden. Die durchgeführte isolierte HRP-Applikation verifizierte nur bei lumbalen Nervenzellen einen durchschnittlichen NO-Signalabfall, während thorakale Zellen nicht durch isolierte Puffergabe beeinflussbar waren. Auch wenn die der nAChR-Aktivierung vorangestellte Pufferapplikation mechano-/thermosensitive Zellen identifiziert, stellt die mechanische Stimulation durch die länger anhaltende Strömung des Mediums beim Waschen einen repetitiven Reiz dar. Dieser könnte auch in nicht mechano-/thermosensitiven Neuronen eine aktive Freisetzung von DAF-2T oder eine Abgabe durch Leckage der Zellmembran verursachen und damit der beobachteten Auswaschbarkeit zugrunde liegen. Neuronale Reaktionen auf mechanische Stimuli stellen sich insgesamt sehr komplex dar. In Capsaicin-sensitiven sowie nicht-sensitiven DRG-Neuronen konnten mechanosensitive Wirkungen nachgewiesen werden, welche abhängig von der DRG-Subpopulation unterschiedlichen Einfluss auf Ionenströme zur Folge hatten (Drew et al. 2002). Die hier erfolgten Beobachtungen könnten dadurch erklärbar sein.

4.3 Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren vom $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtyp sind partiell in die endogene NO-Generierung involviert

Nach Identifikation der nAChR-stimulierten neuronalen NO-Generierung in DRGs wurde die mögliche Beteiligung der $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten untersucht. Von den 3 NOS-Isoformen werden in DRGs adulter Ratten hauptsächlich eNOS und nur 5-10 % der Neurone nNOS, kaum iNOS exprimiert (Aimi et al. 1991, Henrich et al. 2002). Erstgenannte NOS-Isoformen sind konstitutiv exprimiert und im Gegensatz zur induzierbaren iNOS in ihrer Enzymaktivität abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Moncada et al. 1997, Andrew & Mayer 1999). Im Rückschluss erschien damit eine Ca^{2+} -unabhängige NO-Generierung über eine iNOS-Aktivierung unwahrscheinlich.

Es existieren mehrere Möglichkeiten des intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieges (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Ca^{2+} kann direkt über nAChR-Kanäle (Fucile et al. 2005) sowie über VOCCs einströmen (Rathouz & Berg 1994, Michelmore et al. 2002, Dajas-Bailador & Wonnacott 2004, Gotti & Clementi 2004). Bei den nAChR beruhen Ionenselektivität und Ligandenspezifität auf der Zusammensetzung aus den Untereinheiten (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Für Ca^{2+} hoch permeable nAChR sind $\alpha 7$ -nAChR (Chen & Patrick 1997, Gotti & Clementi 2004, Fucile et al. 2005) und $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR (Elgoyhen et al. 2001). Dabei ist die Ca^{2+} -Permeabilität der $\alpha 7$ -nAChR unabhängig von vorangehender Depolarisation der neuronalen Zellmembran (Gotti & Clementi 2004), während nicht- $\alpha 7$ -nAChR eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration grösstenteils über VOCCs vermitteln (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Relevante Subtypenzusammensetzungen sind $\alpha 7$ -Homopentamere (Lukas et al. 1999, Sharples & Wonnacott 2001, Fucile et al. 2005) oder Heteropentamere aufgebaut aus der $\alpha 7$ -Untereinheit in Assoziation mit anderen Untereinheiten (Chen & Patrick 1997, Lukas et al. 1999, Gotti & Clementi 2004, Fucile et al. 2005). Auch $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 3\beta 4$ -nAChR ermöglichen direkt Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Einströme (Michelmore et al. 2002). Die quantitativ höchste Ca^{2+} -Permeabilität ist jedoch für $\alpha 7$ -homomere nAChR beschrieben (Fucile et al. 2003, Gotti & Clementi 2004, Fucile 2004). Immunhistochemisch (Haberberger et al. 2003 und 2004) und funktionell sind $\alpha 7$ -nAChR in DRG-Neuronen beschrieben (Genzen & McGehee 2003, Haberberger et al. 2003 und 2004, Papadopoulou et al. 2003). In DRG-Neuronen der Ratte ist die Coexpression von $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR bewiesen (Lips et al. 2002). Zusätzliche Wege der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung sind die Ca^{2+} -induzierte Freisetzung aus endogenen Speichern über eine Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren (RY) und Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (Ins(1,4,5)P3-Rezeptoren/IP3-Rezeptoren), wobei die IP3-Aktivierung über Ca^{2+} -abhängige Phospholipase C (PLC) und spezifische Ca^{2+} -Sensorproteine (CaBPs) vermittelt werden kann (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung ist in DRG-Neuronen der Ratte auch über den Calmodulin- und Phosphokinase C-Signalweg beschrieben (Werth et al. 1996). In DRG-Neuronen ist die Freisetzung von Ca^{2+} aus endogenen/intrazellulären Speichern nach Axotomie in kompensatorischer Funktion durch Nervenverletzung aufgezeigt (Gemes et al. 2011).

Zur Untersuchung der Beteiligung der nAChR-Subtypen an der NO-Generierung wurde der Antagonist MLA ausgewählt. Dieser ist neben α -Bungarotoxin ein selektiver Antagonist von nAChR, vermag aber additiv zwischen $\alpha 7$ -nAChR und nAChR vom muskulären Typ zu diskriminieren (Chen & Patrick 1997, Verbitsky et al. 2000, Sharples & Wonnacott 2001). MLA zeigt eine höhere Affinität für $\alpha 7$ -nAChR gegenüber $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR (Baker et al. 2004). Im Vergleich von homomeren $\alpha 9$ -nAChR mit heteromeren $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR besteht eine höhere Affinität für die heteromeren $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR (Baker et al. 2004). Die Affinität des MLA zum AChR beruht auf seinem kationischen Zentrum und einer hydrophoben Seitengruppe des Moleküls (Arias et al. 2010).

Eine Reduktion der nAChR-induzierten NO-Generierung konnte unter Inhibition der $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtypen in thorakalen sowie lumbalen DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 4 und 5). Bei thorakalen verglichen mit lumbalen Neuronen war der Einfluss der $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Blockade auf die durchschnittliche nAChR-aktivierbare NO-Generierung sowie auch auf die Anzahl Nikotin-stimulierbarer Neurone gleich. Diese Ergebnisse zeigen die Partizipation der $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtypen an der NO-Generierung auf neuronaler Einzelzellebene in thorakalen und lumbalen DRGs auf, wobei die Subpopulationen unabhängig von der Segmenthöhe der DRGs funktionell $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-positiv sind. Weitere nAChR-Subtypen müssen daher involviert sein (Abb. 12).

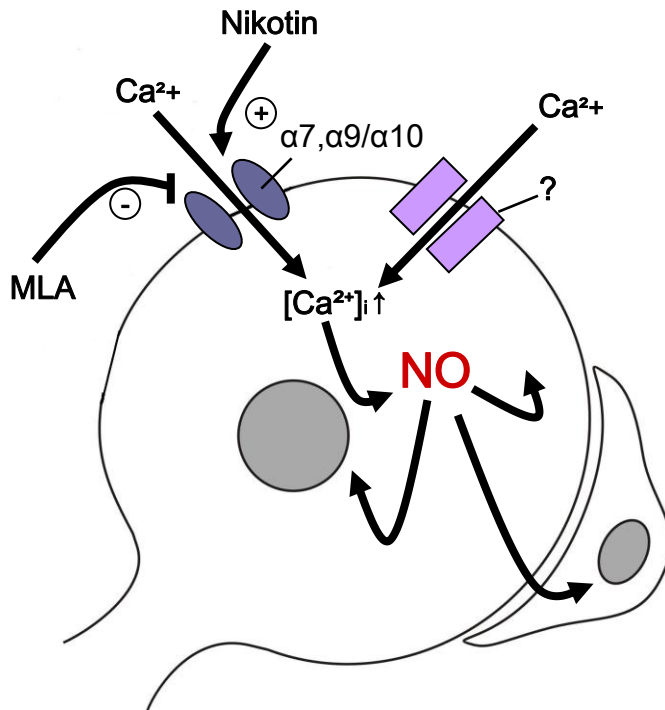


Abb. 12 Die nAChR-induzierte NO-Generierung erfolgt partiell über hoch Ca^{2+} -permeable $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR im Spinalganglien-Neuron mit benachbarter Gliazelle.

Das zur NO-Generierung notwendige Ca^{2+} scheint über die $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Aktivierung direkt ins Zytosol einzuströmen. Diese Untereinheiten sowie noch mindestens ein weiterer bislang unbekannter Subtyp sind bei lumbalen mehr als thorakalen Nikotin-sensitiven DRG-Neuronen funktionell vorhanden (Abb. 12). Als weitere potenziell involvierte nAChR-Subtypen sind $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, $\alpha 4\beta 2$ -nAChR sowie $\alpha 6\beta 4$ -nAChR denkbar, deren Expression in DRG-Neuronen transkriptionell sowie elektrophysiologisch nachgewiesen ist (Hone et al. 2011).

Bereits an DRG-Schnittpräparationen konnte eine Beteiligung von $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR an der NO-Bildung in nozizeptiven DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Haberberger et al. 2003). Die Untersuchung des quantitativen Ausmaßes dieser $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Involvierung war erst durch die hier durchgeführten Einzelzelluntersuchungen möglich (Papadopoulou et al. 2003).

Funktionell kann die Bedeutung des $\alpha 7$ -Subtyps in der Modulation der Nozizeption liegen, da $\alpha 7$ -homomere sowie $\alpha 7$ -heteromere nAChR in Capsaicin-sensitiven Nozizeptoren in der behaarten Haut von Versuchstieren identifiziert sind (Rau et al. 2004). Somit ist ihr Vorkommen nicht nur in den Perikaryen, sondern auch in den Fasern nachgewiesen. Gestützt werden diese Beobachtungen zusätzlich durch den

Nachweis $\alpha 7$ -nAChR auf nozizeptiven TRPV1-positiven DRG-Neuronen auf transkriptioneller, translationaler sowie funktioneller Ebene (Haberberger et al. 2003 und 2004). An DRG-Neuronen ist eine Modifizierung Capsaicin-induzierter, TRPV1-vermittelter Ionenströme infolge $\alpha 7$ -nAChR-stimulierten Ca^{2+} -Einstroms nachgewiesen (Fucile et al. 2005). Bezüglich der Schmerzwahrnehmung können nAChR sowohl analgetische als auch hyperalgetische Effekte vermitteln (Genzen & McGehee 2003). Einen bekannten Mechanismus der Hyperalgesie stellt die präsynaptische, durch $\alpha 7$ -nAChR-vermittelte Modulation der glutamatergen Transmission im Hinterhorn des Rückenmarkes dar, welche an Rückenmarkquerschnittspräparaten von Ratten untersucht ist (Genzen & McGehee 2003). Die isolierte Verabreichung des Antagonisten führte weder bei thorakalen Zellen noch bei lumbalen Neuronen zu einer Beeinflussung der NO-Generierung. Diese Ergebnisse schliessen damit unspezifische MLA-Effekte aus. Auffällig war bei untersuchten thorakalen DRG-Zellen die Reduktion der endogenen NO-Bildung nach isolierter HRP-Verabreichung, während das Signal lumbaler Neurone unbeeinflusst war. Diese bleibt allerdings ungeklärt. Eine Reduktion der NO-Generierung war im vorab durchgeführten Versuchsteil durch isolierte HRP-Applikation bei lumbalen, nicht bei thorakalen Nervenzellen detektierbar. Weitere zu prüfende Möglichkeiten der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung sind ein Ca^{2+} -Einstrom durch VOCCs nach nAChR-vermittelter Depolarisation der Zellen sowie eine durch Einstrom extrazellulären Ca^{2+} oder anderer Kationen vermittelte Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

4.4 Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte NO-Generierung ist partiell über einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum vermittelt

Der Nachweis einer nur partiell direkt durch $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-vermittelten NO-Generierung in thorakalen und lumbalen DRG-Neuronen warf die Frage nach dem Mechanismus der nAChR-stimulierten endogenen NO-Bildung in Abwesenheit eines Ca^{2+} -Einstromes über $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR auf. Eine nAChR-abhängige NO-Generierung in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} war nur bei einer kleinen Subpopulation thorakaler, nicht bei lumbalen Zellen detektierbar. Bei anschließender Ca^{2+} -Zufuhr war bei thorakalen Neuronen ein nAChR-induzierter NO-Generierungsanstieg beobachtbar. Es zeigte sich bei Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} keine Reduktion bezüglich durchschnittlicher nAChR-aktivierter NO-Signalhöhe, jedoch ein Häufigkeitsunterschied nAChR-stimulierbarer Zellen in der thorakalen Neuronenpopulation. Durch die Zweitnikotinstimulation thorakaler und lumbaler Neurone im Ca^{2+} -haltigen Medium nach vorangehender Ca^{2+} -freier Nikotinstimulation war das durchschnittliche NO-Signal durch die Folgestimulation noch verringert gesteigert. Damit war eine nAChR-aktivierte NO-Generierung in der Mehrzahl der thorakalen Zellen und allen lumbalen Zellen unabhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum vermittelbar, wohingegen der Extrazellularraum für eine kleine Subpopulation thorakaler DRG-Neurone eine Ca^{2+} -Quelle zur Einleitung der nAChR-induzierten endogenen NO-Bildung darstellt.

Einen weiteren Hinweis hierauf lieferte die posttraumatisch nachweisbare Zunahme der nNOS-Immunreaktivität in lumbalen DRG-Neuronen (Fiallos-Estrada et al. 1993, Ciskova et al. 2002), wobei die nNOS und eNOS in ihrer Regulation Ca^{2+} -abhängig sind (Moncada et al. 1997, Andrew & Mayer 1999). Eine endogene NOS-Aktivität, wie sie von Henrich et al. (2002) an lumbalen DRG-Gewebeschnitten unter normoxischen Kulturbedingungen zur NO-Generierung nachgewiesen werden konnte, trägt ebenso bei. Diese war insbesondere auf eine endogene Aktivität der eNOS zurückzuführen, welche in DRG-Neuronen nachweisbar war (Henrich et al. 2002 und 2004, Haberberger et al. 2003). Eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, welche Ca^{2+} -induziert arbeitet, ist in sensorischen Neuronen bekannt (Ouyang et al. 2005). Ein Teil der hier beobachteten NO-Generierung könnte so auf nNOS- oder eNOS-Leistung basieren.

Die erhobenen Befunde zeigten für eine grössere Subpopulation thorakaler DRG-Neurone und die lumbale Gesamtpopulation die Möglichkeit nAChR-aktivierter NO-Generierung unabhängig von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum auf. Die nAChR-induzierte NO-Generierung könnte in diesen Neuronen durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung oder über Ca^{2+} -unabhängige Signalwege vermittelt sein. Dabei könnte die Stimulation von nAChR, welche nicht-selektive Kationenkanäle sind, zu einem Einstrom weiterer positiver Ladungen führen. Unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} ist eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus neuronalen Speicherorganellen denkbar (Abb. 13).

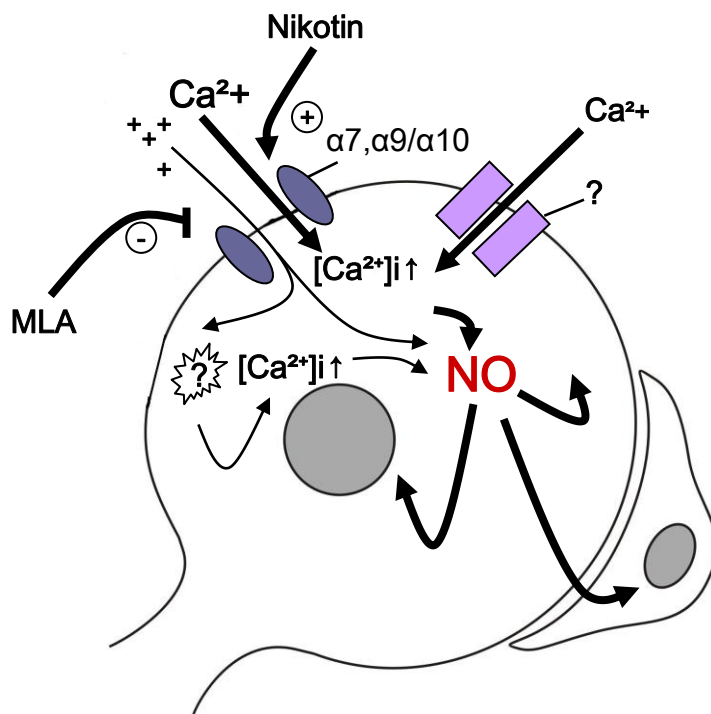


Abb. 13 Die nAChR-induzierte NO-Generierung wird partiell über Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle vermittelt. Weitere denkbare Signalwege sind andere Ca^{2+} -Kanäle, eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder ein Ca^{2+} -unabhängiger Einstrom anderer positiver Ladungen (+).

Eine nAChR-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern ist über die Vermittlung des second messengers IP₃ (Giovanelli et al. 1992) sowie aus Ryanodinsensitiven Speichern (Grassi et al. 1993) für Muskelzellen der Maus bekannt. Aus intrazellulären Ryanodin-sensitiven Speichern ist eine Ca^{2+} -Freisetzung auch in neuronalen Zellen beschrieben (Usachev et al. 1995). Desweiteren sind intrazelluläre

Ca²⁺-Mobilisierungen über mitochondriale Na⁺/Ca²⁺-Austauschermechanismen in DRG-Neuronen der Maus (Svichar et al. 1999) und DRG-Neuronen der Ratte (Werth & Thayer 1994, Verdru et al. 1997) beschrieben. Anoxie- und Aglykämie-induzierte Ca²⁺-Freisetzungen aus intrazellulären Speichern sind in DRG-Neuronen der Ratte untersucht, welche einerseits sensitiv für Karbonyl-Zyanid-p-(Trifluoromethoxy)-Phenylhydrazon (FCCP), sowie andererseits sensitiv für Caffein, Cyclopiazonsäure (CPA) und Ryanodin sind (Henrich & Buckler 2008). Die Beteiligung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher am $\alpha 7$ -nAChR-stimulierten Ca²⁺-Strom wurde auch in ZNS-Neuronen beschrieben. Alternativ können IP₃-Rezeptoren hierbei auch über CaBPs aktiviert werden. Hoch Ca²⁺-permeable $\alpha 7$ -nAChR scheinen funktionell an eine direkte Aktivierung von Ryanodin-Rezeptor-abhängigen Speichern gebunden zu sein (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Eine Verstärkung des $\alpha 7$ -nAChR-vermittelten Ca²⁺-Stromes über die Beteiligung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher konnte in ZNS-Neuronen der Maus nachgewiesen werden (Tsuneki et al. 2000). In hippocampalen Astrocyten neugeborener Ratten erfolgte die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ebenfalls über $\alpha 7$ -nAChR. Diese führte Ca²⁺-induziert zu einer weiteren Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Sharma & Vijayaraghavan 2001). Für DRG-Neurone sind die in vorliegender Arbeit gewonnenen Hinweise auf eine nAChR-vermittelte Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speicherorganellen völlig neu.

Eine Ca²⁺-unabhängige nAChR-medierte NO-Synthese ist bei iNOS-Aktivität möglich. Dieses Isoenzym ist immunhistochemisch nach Schnittpräparationen in DRGs kaum nachweisbar (Aimi et al. 1991, Henrich et al. 2002). Eine Induktion der iNOS ist jedoch durch immunologische und inflammatorische Stimuli (Moncada et al. 1997, Zochodne et al. 2000, Heneka & Feinstein 2001) sowie posttraumatisch in DRG-Neuronen möglich (Heneka & Feinstein 2001, Abe et al. 2003, Mizusawa et al. 2003). Methodisch existieren durch den Isolations- und Dissoziationsprozess bedingte inflammatorische und traumatische Reize. Bei Präparation der DRGs erfolgte die Durchtrennung der Axone der Neurone, die bei anschliessend erhaltener Vitalität der DRG-Neurone durch Primärkultivierung über Nacht auf den gesetzten schädigenden Stimulus reagieren können. Adulte DRG-Neurone synthetisieren *in vitro* auch nach Stunden Neurotransmitter und setzen solche frei. Dabei unterliegen sie einer ausgeprägten Neurotransmitterplastizität, welche durch Axotomie oder inflammatorische Reize ausgelöst werden kann (Delree et al. 1993, Senba & Kashiba 1996). Anstiege der NOS-Immunreaktivität sind in DRGs von Ratten Tage nach peripherer Axotomie

nachgewiesen (Fiallos-Estrada et al. 1993, Zhang et al. 1993) und gehen partiell mit einer Co-Lokalisation der Neuropeptide CGRP und SP einher (Zhang et al. 1993). Eine NOS-Überexpression assoziiert mit Mediatoren der Entzündung wie Interleukin-1 β und Interleukin-6 ist nach peripherer Axonverletzung im Rahmen eines neuropathischen Schmerzmodelles an DRG-Neuronen der Maus beschrieben (Martucci et al. 2008). Eine nAChR-medierte NO-Synthese durch die iNOS ist Ca²⁺-unabhängig (Moncada et al. 1997, Andrew & Mayer 1999). Auch die beobachteten nAChR-induzierten Effekte in DRG-Neuronen waren partiell durch extrazellulär Ca²⁺-unabhängige Prozesse vermittelt. In Patch-Clamp-Untersuchungen an DRG-Neuronen der Ratte konnte nach Depolarisation der Zellen eine Erhöhung der Membrankapazität festgestellt werden, die unabhängig von extra- und intrazellulärem Ca²⁺ war (Zhang & Zhou 2002). In DRG-Neuronen der Ratte ist eine zusätzliche Ca²⁺-unabhängige, aber spannungsabhängige Exozytose von Neurotransmittern beschrieben (Zheng et al. 2009). Es wird angenommen, dass in der sehr heterogenen Population von DRG-Neuronen elektrophysiologische Zelleigenschaften von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration unbeeinflusst bleiben, weil einige DRG-Neurone keine Ca²⁺-aktivierbare Ionenkanäle exprimieren (Ayar et al. 1999). Diese Befunde weisen auf einen möglichen Kationeneinstrom in DRG-Neuronen hin, welcher Ca²⁺ ausschliesst. Die neu gewonnenen Daten stützen diese Hinweise insofern, als dass eine partielle nAChR-stimulierte NO-Generierung durch extrazelluläres Ca²⁺ nur in wenigen thorakalen DRG-Neuronen nachweisbar war.

Auffällig war bei thorakalen Neuronen bei isolierter Erstapplikation von HRP die Reduktion des durchschnittlichen NO-Signals, während lumbale Zellen bei isolierter HRP-Verabreichung nicht beeinflusst waren. Eine solche bislang ungeklärte Puffer-induzierte NO-Signalminderung war bereits im vorangehenden Versuch bei den untersuchten thorakalen Zellen detektierbar. Denkbar ist ein grösserer Anteil mechano-/thermosensitiver Zellen in der untersuchten thorakalen Population. Auch thermosensitive Ca²⁺-Konzentrationsänderungen über Hitze-stimulierte Öffnung nicht-selektiver Kationenkanäle sind in der Literatur für DRG-Neurone neugeborener Ratten beschrieben (Gotoh et al. 1998).

4.5 Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte NO-Generierung ist partiell von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-Typs getragen

In vorliegender Arbeit wurde der Extrazellularraum als eine Quelle der zur nAChR-aktivierten NO-Generierung notwendigen intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung nur einer kleinen Subpopulation thorakaler DRG-Neurone identifiziert. Der Ca^{2+} -Einstrom für das detektierte DAF-2-Signal wurde partiell von $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR getragen. Zugrunde liegende Mechanismen des weiteren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieges waren aufzudecken.

Als Liganden-gesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle vermitteln nAChR einen Einstrom positiver Ladungsträger ins Cytosol, welche die neuronale Zellmembran depolarisieren (Michelmore et al. 2002, Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Nahe liegend war folglich eine VOCC-Aktivierung, deren Beteiligung bei der Schmerzwahrnehmung beschrieben ist (Park & Luo 2010, Todorovic & Jevtovic-Todorovic 2011). Die Überprüfung dieser Annahme erfolgte durch Einsatz von Verapamil, einem spezifischen Antagonisten der VOCCs vom L-Typ. Funktionell sind VOCCs vom L-Typ in DRGs existent (Haberberger et al. 2003, Murakami et al. 2004). Eine über Opioidrezeptoren vermittelte VOCC-Beteiligung an der Schmerzwahrnehmung ist in DRGs beschrieben (Barro et al. 1995). Bislang ist für VOCCs vom N- und P/Q-Typ (Su et al. 1998, Wu et al. 2004) sowie vom T-Typ (Altier & Zamponi 2004, Jevtovic-Todorovic & Todorovic 2006 und 2011) eine entscheidende Beteiligung an der Nozizeption aufgezeigt. Die Adressierung von VOCCs als Zielmoleküle der analgetischen Therapie ist bislang insuffizient (Todorovic & Jevtovic-Todorovic 2011).

Unter VOCC-Inhibition war ein endogenes gleich hohes nAChR-aktiviertes NO-Signal bei reagierenden thorakalen DRG-Neuronen detektierbar (Abb. 8), aber die Anzahl nAChR-stimulierbarer thorakaler Neurone war durch den L-Typ-Kanal-Antagonisten reduziert. Diese Daten unterstützen die Integration von VOCCs des L-Typs an dem zur nAChR-vermittelten NO-Generierung erforderlichen Ca^{2+} -Einstrom (Abb. 14). Somit strömt bei einer kleinen Subpopulation thorakaler DRG-Neurone das zur intrazellulären Bildung von NO benötigte Ca^{2+} über VOCCs vom L-Typ sowie über $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR aus dem Extrazellularraum ein, während andere Subpopulationen hierzu benötigtes Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzen. Unspezifische Einflüsse des VOCC-Antagonisten sind hierbei nicht sicher ausgeschlossen, da die repetitive

Verapamilapplikation in der Kontrollgruppe zu einer geringen Zunahme des detektierten DAF-2-Signals führte. In der Literatur sind unspezifische Verapamileffekte bislang für DRG-Neurone nicht vorbeschrieben.

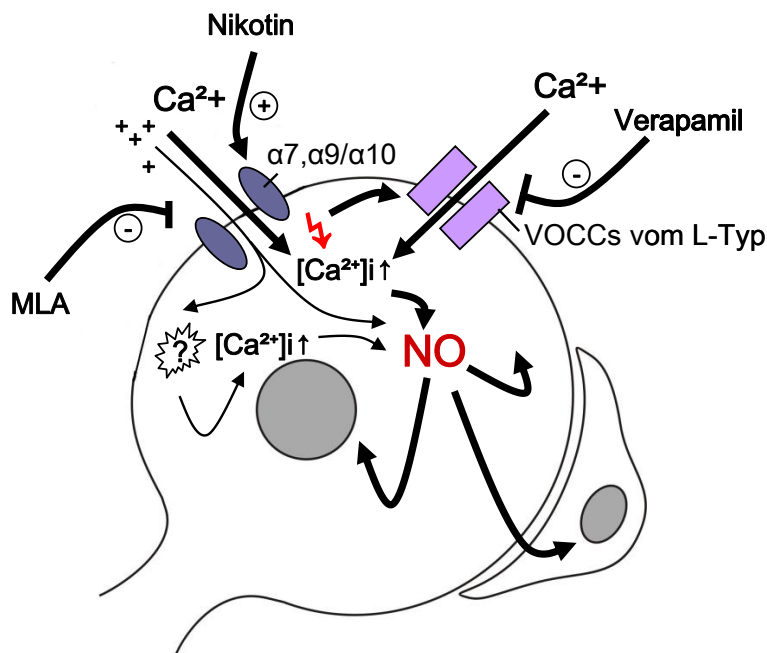


Abb. 14 Die nAChR-induzierte NO-Generierung wird im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle partiell über einen Ca²⁺-Einstrom durch VOCCs vom L-Typ vermittelt (⚡=Depolarisation) sowie partiell über α7-, α9/α10-nAChR.

Ein VOCC-vermittelter Ca²⁺-Einstrom nach nAChR-Aktivierung ist in Neuronen des Ganglion ciliare (Rathouz & Berg 1994) und des Hippocampus (Barrantes et al. 1995) nachgewiesen. An DRG-Schnittpräparaten führte Verapamil zur NO-Synthesereduktion unter norm- (Haberberger et al. 2003) sowie hypoxischen Kulturbedingungen (Henrich et al. 2004). Die aufgezeigte VOCC-Beteiligung der nAChR-induzierten NO-Generierung auf thorakaler Einzelzellebene untermauert dies. Eine Erklärung für eine VOCC-unabhängige NO-Generierung besteht in möglicher endogener ACh-Synthese. Die präsynaptische α7-nAChR-vermittelte Modulation der glutamatergen Transmission im Rückenmarkshinterhorn der Ratte kann endogen ACh-stimuliert werden, was Blockade neuronaler ACh-Esterase indirekt zeigte (Genzen & McGehee 2003). Hier ist ein ähnlicher Mechanismus unter Umgehung des direkten nAChR-Signalweges denkbar. Spontan und K⁺-induziert sind ACh-Freisetzung in Hühnerembryonen-DRGs beschrieben (Bernardini et al. 2004). Die gewonnenen Ergebnisse an untersuchten DRG-Neuronen der Ratte liefern zusätzliche Hinweise für diese weitere Hypothese.

4.6 Die von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierte DAF-2-Signalzunahme basiert partiell auf einer Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthase

Die erzielten Daten weisen eine über nAChR-vermittelte endogene NO-Generierung in DRG-Neuronen in Form einer messbaren Zunahme der DAF-2-Fluoreszenz nach. Zur Untersuchung der NOS-Beteiligung am detektierten intrazellulären NO-Signal diente L-NAME, ein unselektiver NOS-Inhibitor. Der Vorteil der unselektiven Enzymhemmung besteht hierbei in der von der unterschiedlichen Expression der NOS-Isoformen unabhängigen Untersuchung des nAChR-/NO-Signalweges.

Unter Blockade des Enzyms zeigte sich nach nAChR-Stimulation eine detektierbare NO-Generierung der thorakalen Neurone (Abb. 9). Die durchschnittliche nAChR-aktivierbare Signalhöhe war gleich, jedoch die Anzahl nAChR-stimulierbarer DRG-Neurone unter NOS-Inhibition reduziert. Die nAChR-vermittelte endogene Generierung von NO erfolgt somit nur partiell aus unmittelbarer Synthese des Botenstoffes durch die in den thorakalen Nervenzellen exprimierten NOS-Isoformen (Abb. 15).

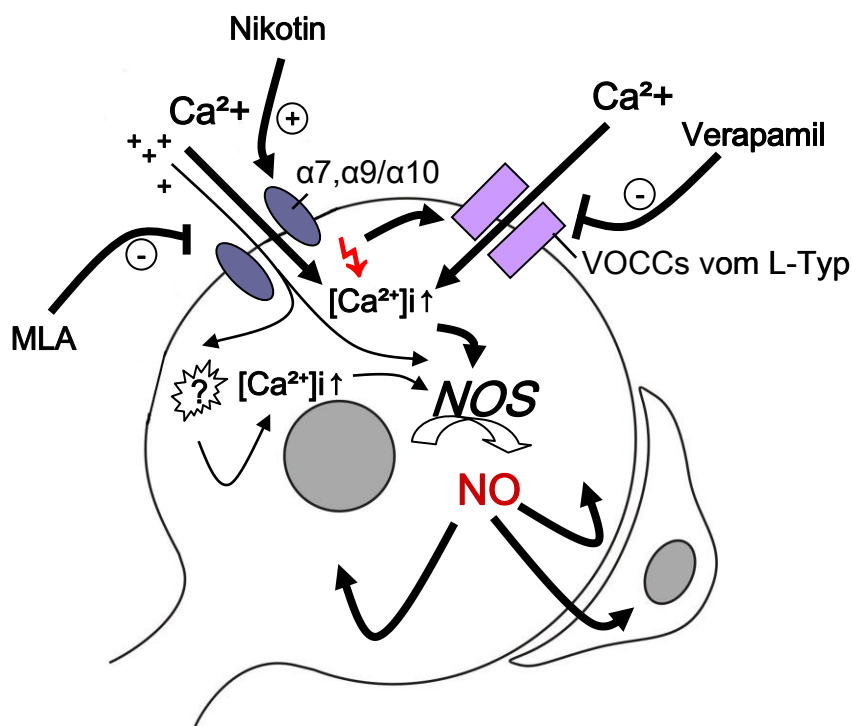


Abb. 15 Die nAChR-induzierte endogene NO-Generierung infolge $\alpha 7$ -, $\alpha 9 / \alpha 10$ -nAChR- und L-Typ- VOCCs-vermittelten Ca^{2+} -Einstromes basiert partiell auf unmittelbarer Synthese durch die NOS im Spinalganglionneuron mit benachbarter Gliazelle.

Diese Befunde werden durch weitere in der Literatur vorbeschriebene Daten unterstützt. Nach NOS-Inhibition durch L-NMMA und L-NAME war an lumbalen DRG-Schnittpräparationen die nAChR-vermittelte NO-Synthese gemindert (Haberberger et al. 2003). Konzentrationsabhängig waren unter Einfluss von NOS-Inhibitoren messbare NO-Signale in neuronalen (Ye et al. 2010) und nicht-neuronalen Zellen reduziert (López-Figueroa et al. 2001).

Die detektierte DAF-2-Fluoreszenzintensitätsänderung in Subpopulationen der untersuchten thorakalen DRG-Neurone war partiell nicht auf unmittelbare NOS-Aktivität zurückzuführen. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Eine bekannte Eigenfluoreszenz von inaktivem DAF-2 (Broillet et al. 2001), welche auch unter Hemmung der zellulären NO-Produktion messbar war (Rodriguez et al. 2005), könnte zugrunde liegen. Ein messbares DAF-2-Signal ist als Marker für NO-Produktion, aber auch für NO-Oxidation und/oder Produktion anderer DAF-reaktiver Komponenten identifiziert (Planchet & Kaiser 2006). Folglich ist vorliegend auch eine Detektion endogener NO-Oxidation und/oder anderer DAF-reaktiver Komponenten in beobachteter thorakaler Subpopulation von DRG-Neuronen annehmbar. Eine andere denkbare Ursache stellt eine NO-Quelle aus neuronalen NO-Speicherformen dar. Auf intrazelluläre NO-Speicherformen weisen die folgenden publizierten Befunde hin. Als hoch reaktiver Botenstoff reagiert NO intrazellulär rasch mit zahlreichen anderen Zielmolekülen, welche dadurch reversibel oxidiert werden, so dass diese Zielmoleküle umgekehrt auch als NO-Donatoren oder intrazelluläre NO-Reservoirie fungieren können und damit dynamisch in zelluläre Signalmechanismen involviert sind (Heck 2001). Hierauf könnte auch die beobachtete Auswaschbarkeit des detektierten NO-Signals beruhen. In Nierengewebe von Ratten wird bei Ischämie eine NO-Bildung induziert, welche partiell, unabhängig von NOS, durch S-Nitrosothiole vermittelt ist (Salom et al. 2005). Für DRG-Neurone sind die gewonnenen Hinweise auf nAChR-aktivierte NOS-Aktivität-unabhängige NO-Generierung aus intrazellulären NO-Quellen neu. Letztlich kann theoretisch noch eine bislang unbekannte, nicht durch L-NAME inhibierbare NOS-Aktivität in DRG-Neuronen als Quelle intrazellulärer NO-Generierung bedacht werden, wozu aktuell in der Literatur jedoch keine Hinweise existieren.

4.7 Der Vergleich der von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren induzierten NO-Generierung in thorakalen mit lumbalen Spinalganglienneuronen

Der Vergleich thorakaler mit lumbalen Nervenzellen zeigt quantitative Differenzen bezüglich des untersuchten nAChR-/NO-Signalweges auf (Tab. 10 und Abb. 10). Die rasche transiente nAChR-aktivierte endogene NO-Generierung existiert in grösseren Subpopulationen thorakaler als lumbaler Neurone. Funktionell sind die $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtypen hierbei quantitativ in lumbalen und thorakalen Zellen gleich beteiligt. Das zur endogenen NO-Generierung erforderliche Ca^{2+} wird nur bei einer kleinen thorakalen Subpopulation über einen Einstrom aus dem Extrazellularraum aquiriert. Bei thorakalen nAChR-positiven DRG-Neuronen wird der Ca^{2+} -Einstrom partiell von VOCCs des L-Typs sowie partiell von $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR vermittelt. Hingegen ist der nAChR-/NO-Signalweg in lumbalen Neuronen ohne extrazelluläres Ca^{2+} beschreibbar. Zusätzlich bestehen hier oben aufgeführte Hinweise für additive Wege einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung über mögliche Ca^{2+} -Mobilisierungen aus anderen Kaskaden, intrazellulären Speicherorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder via Ca^{2+} -unabhängiger Wege der neuronalen NO-Freisetzung über andere Kationen und/oder iNOS-Aktivität.

Die nAChR-aktivierte NO-Generierung ist in thorakalen Zellen partiell aus unmittelbarer Synthese gesichert, was in Einklang steht mit einer stärkeren NOS-Expression in thorakalen als tief lumbalen DRGs (Vizzard et al. 1995).

In Bezug auf die erhobenen Nebenfunde in den einzelnen Arbeitsabschnitten zeigten sich Unterschiede zwischen den untersuchten thorakalen und lumbalen DRG-Neuronen. Der sichtbare Belichtungseinfluss auf die endogene basale DAF-2-Fluoreszenz der DRG-Neurone betraf in stärkerem Ausmass thorakale als lumbale Zellpopulationen. Die Identifikation mechano-/thermosensitiv reagierender Neurone war häufiger in thorakalen Subpopulationen beobachtbar, was auf die Existenz grösserer Subpopulationen mit Integration in die Mechano- und Thermorezeption in thorakalen DRGs hinweist.

Die in vorliegender Arbeit aufgezeigten quantitativen Unterschiede funktionell nAChR-exprimierender DRG-Neurone thorakaler und lumbaler Segmenthöhen sind neu. Sensible Neurone innervieren unterschiedliche Zielgebiete mit verschiedenem Funktionsspektrum, so dass bei DRG-Untersuchungen die Kenntnis der Segmenthöhe zum Erkenntnisfortschritt beiträgt.

4.8 Medizinische Relevanz der gewonnenen Daten

Die nAChR-Aktivierung führt partiell Ca^{2+} -abhängig zu einer transienten NO-Generierung in DRG-Neuronen. NO-abhängig können sowohl Mechanosensitivität (Chaban et al. 2001) als auch Schmerzwahrnehmung (Decker et al. 2001, Haberberger et al. 2003 und 2004, Rau et al. 2004) moduliert werden. Der Nachweis der NO-vermittelten Modulation der Schmerzwahrnehmung erfolgte mit Hilfe von pharmakologischen (Aley et al. 1998) sowie elektrophysiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen (Luo & Cizkova 2000). Funktionell bestehen Hinweise auf eine Beteiligung von NO an der Nozizeption, da in Capsaicin-sensitiven und damit Schmerz vermittelnden DRG-Neuronen der Ratte die endogene Stimulation des cGMP-Signalweges über ein NO-Zwischenprodukt nachgewiesen wurde (Bauer et al. 1993 und 1995). Im Rahmen eines neuropathischen Schmerzmodells war ein Anstieg der nNOS-Expression in DRGs durch periphere Axotomie an der Auslösung mechanischer Hypersensitivität beteiligt (Kim et al. 2011). Eine Relevanz der NO-Bildung für die Mechanozeption konnte dadurch ermittelt werden, dass eine Reduktion der neuronalen Mechanosensitivität endogen über eine NO-vermittelte Inhibition von VGSCs sowie VOCCs erfolgt (Chaban et al. 2001). In DRG-Neuronen wird der Einstrom von Kationen über VOCCs (Kim et al. 2000) sowie VGSCs (Renganathan et al. 2002) durch NO inhibiert.

Diese Befunde führen gemeinsam mit den erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit zu der Schlussfolgerung, dass die NO-Generierung in sensiblen Neuronen in die Signalkaskade von nAChR integriert ist und damit auf Transduktions- und Transformationsprozesse im Rahmen nozizeptiver und mechano-/thermozeptiver Mechanismen des PNS Einfluss nehmen kann. Hinsichtlich der medizinischen Bedeutung werden damit neue Ansatzmöglichkeiten zur peripheren Pharmakotherapie von Schmerzen sowie zur Anästhesie aufgezeigt. Als Beispiele für potenzielle Analgetika sind bereits die nAChR-Agonisten Epibatidin und ABT-594 (Donnelly-Roberts et al. 1998, Decker et al. 2001) sowie A-85380, Tebanicline, ABT-894, ABT-366833, ABT-202 und SIB-1663 (Jain 2004) bekannt. Auch TRV1-, Zytokin-, Neuropeptid-, Glutamat- sowie Na^+ -Rezeptoren dienen bereits als Zielmoleküle (Schaible 2009). Volatile Anästhetika tragen über eine Inhibition neuronaler nAChR zur Analgesie bei (Tassonyi et al. 2002, Xu & Yu 2003). Die Effektivität der nAChR-Agonisten scheint nicht nur über zentralnervöse Mechanismen, sondern auch auf ihrer

Wirkung auf periphere Nozizeptoren zu beruhen. Eine noch bessere Effektivität kann durch die Adressierung spezifischer nAChR-Subtypen erfolgen. Dabei ist insbesondere die Kenntnis der auf nozizeptiven Neuronen vorhandenen nAChR-Subtypen bedeutsam, da in vivo Subtypen-spezifisch über nAChR sowohl analgetische als auch hyperalgetische Effekte vermittelt werden können (Genzen & McGehee 2003). Neben den nAChR stehen als weitere Zielmoleküle hiermit VOCCs vom L-Typ und NO-Synthasen als Ausgangspunkt pharmakologischer Intervention der peripheren Schmerztherapie und Anästhesie zur Verfügung (Abb. 16), worin der Beitrag zum wissenschaftlichen Erkenntnisfortschritt vorliegender Arbeit liegt.

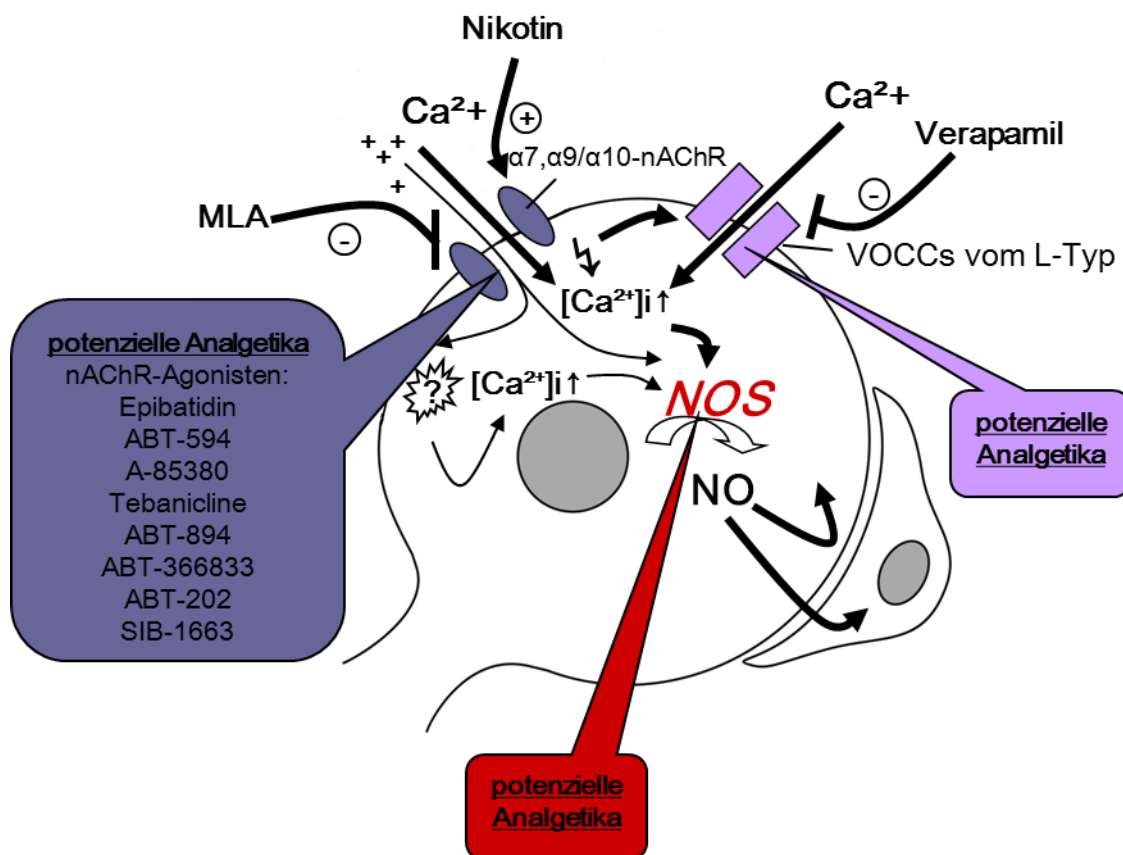


Abb. 16 Zielmoleküle der Pharmakotherapie peripherer Schmerzen im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine wichtige Modalität, die inhomogene Populationen pseudounipolarer sensibler Neurone über A δ - und C-Fasern in das Hinterhorn des Rückenmarks übermitteln, ist die Schmerz Wahrnehmung. Hierbei sind in der Zellmembran freier, peripherer Nervenendigungen lokalisierte Liganden-gesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle involviert. Ein geeigneter Kandidat sind auf Capsaicin-sensitiven Neuronen und in IB4-bindenden präsynaptischen Fasern im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesene neuronale nAChR. Injektionen des NOS-Inhibitors L-NAME lindern Schmerzreaktionen bei arthritiskranken Tieren. DRG-Neurone enthalten NOS, so dass sie Ca²⁺-vermittelt NO produzieren können. Es ergibt sich aus dieser Gesamtschau die Hypothese, dass nAChR Ca²⁺-vermittelt eine intrazelluläre Erhöhung des second messengers NO in DRG-Neuronen aktivieren. Hier erfolgte die funktionelle Charakterisierung nAChR und erster Schritte ihrer Signaltransduktionskette an thorakalen und lumbalen isolierten, primärkultivierten DRG-Neuronen adulter Ratten. Mit Hilfe des spezifischen Fluoreszenzindikators DAF-2DA wurde hierzu die endogene NO-Generierung an vitalen Einzelneuronen in Echtzeit detektiert. Subpopulationen thorakaler und lumbaler DRG-Neurone besitzen nAChR, deren Aktivierung rasch zu einer neuronalen NO-Generierung führt. Das nAChR-aktivierte NO-Signal ist transient und lässt sich ohne Langzeiteffekte auswaschen. Der aufgedeckte nAChR-/NO-Signalweg in DRG-Neuronen kommt quantitativ in thorakalen Zellen stärker als in lumbalen vor. Die nAChR $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -Subtypen sind partiell bei thorakalen gleichermaßen wie lumbalen DRG-Neuronen involviert. Das nAChR-aktivierte NO-Signal ist nur bei einer kleinen thorakalen Neuronensubpopulation partiell über einen Ca²⁺-Einstrom vermittelt. In einer kleinen Subpopulation thorakaler DRG-Neurone wird das NO-Signal über einen Ca²⁺-Einstrom jeweils partiell von $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR und VOCCs des L-Typs getragen. Die nAChR-stimulierte NO-Bildung basiert in thorakalen Zellen nur partiell auf unmittelbarer Produktion durch die NOS. Die erhobenen Befunde führen zu der Schlussfolgerung, dass die NO-Generierung in DRG-Neuronen in die nAChR-Signalkaskade integriert ist. Darüber kann auf mechano-/thermozeptive sowie nozizeptive Transduktions- und Transformationsprozesse Einfluss genommen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nAChR, VOCCs vom L-Typ und NOS als relevante periphere Zielmoleküle zur Pharmakotherapie von Schmerzen sowie zur Anästhesie auf.

6. SUMMARY

Nociception which is an important sensory modality, is transmitted by A δ - and C-type fibres of inhomogenous populations of pseudounipolar sensory neurons to the dorsal horn of the spinal cord. Ligand-gated, non-selective ion channels located in the cell membrane of peripheral nerve endings are involved in initiation and modulation of pain. Neuronal nAChR are one interesting receptor population which is demonstrated on nociceptive DRG neurons. Consequently, sensory neurons, which are stimulated by nicotine, may mediate peripheral nociception via nAChR activation. Also, the NO/NOS system is localised in nociceptive neurons, involved in nociception and activated by increase in intracellular Ca²⁺ levels. This results in the hypothesis that nAChR activate the production of the second messenger NO in DRG neurons via intracellular [Ca²⁺]-increase. The present study aimed to characterize nAChR and parts of the downstream signal transduction events in thoracic and lumbar isolated primary cultured DRG neurons of adult rats. Using the NO-specific fluorescent indicator DAF-2DA, the endogenous NO generation of single vital neurons was detected in real-time. Subpopulations of thoracic and lumbar DRG neurons could be demonstrated to contain functionally active nAChR, whose activation lead to rapid and transient neuronal generation of NO. This effect was reversible. This nAChR/NO pathway is more prevalent in thoracic than lumbar sensory neurons. The nAChR α 7-, α 9/ α 10-subtypes are partially involved in the nAChR/NO pathway regularly in thoracic and lumbar DRG neurons, whose stimulation permit the NO generation via an intracellular rise in Ca²⁺-concentration. The experiments showed furthermore that the required Ca²⁺ to activate NOS is partly of extracellular origin, particularly in thoracic but not in lumbar cells. In a small subpopulation of thoracic neurons, the Ca²⁺ influx depended partially on α 7-, α 9/ α 10-nAChR and VOCCs of the L-type. The endogenous NO increase is based partially on immediate synthesis by NOS in thoracic cells. These leads to the conclusion that NO generation of DRG neurons is integrated in the signal cascade activated by nAChR stimulation and possibly influences mechano-/thermoreceptive and nociceptive processes of transduction and transformation. The data point to NO-dependent modulation of mechano-/thermosensitivity and nociception by activation of nAChR. The results of the present study suggest nAChR, VOCCs of the L-type and NOS as being relevant target molecules of peripheral pharmacotherapy of pain and anesthesia.

7. ABKÜRZUNGEN

5-HT	5-Hydroxytryptamin=Serotonin
AC	Adenylat-Cyclase
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptoren
AP	Aktionspotenzial
ASIC	Acid-sensing ion channel
ATP	Adenosintriphosphat
B1/ B2	Bradykinin-Rezeptoren
Bcl-2	Apoptosefaktor
Ca²⁺	Calciumionen
CaBPs	Ca ²⁺ -sensor binding proteins
CaCl₂	Calciumchlorid
CaCl₂x2 H₂O	Calciumchlorid-Dihydrat
CaMK	Ca ²⁺ -calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CO₂	Kohlendioxid
CPA	Cyclopiazonsäure
CREB	Cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2DA	4,5-Diaminofluorescein-diacetat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DRGs	dorsal root ganglia=Spinalganglien
eNOS=NOSIII	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EP	ProstaglandinE-Rezeptoren
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fa	Firma
FCCP	Karboxyl-Zyanid-p-(Trifluoromethoxy)-Phenylhydrazon
FRAP	Fluorid-resistent Acid Phosphatase
GC	Guanylat-Cyclase
GDNF	Glial-cell-line-derived-neurotrophic factor

GTP	Guanosintriphosphat
H⁺	Wasserstoffprotonen
HRP	Hepes-Ringer-Puffer
I-B4	Isolektin-B4=Pflanzenlektin, bindet α -D-Glukose-Reste
IL-1	Interleukin-1
iNOS=NOSII	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
JAK2	Janus-activated kinase
K⁺	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
mAChR	muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren
MEK	Mitogen-activated protein kinase
Mg²⁺	Magnesiumionen
MgCl₂x2H₂O	Magnesiumchlorid-Dihydrat
MgCl₂x6H₂O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
mGlu5	metabotrober Glutamat-Rezeptor Subtyp 5
MLA	Methyllycaconitine
N₂O₃	Stickstofftrioxid
Na⁺	Natriumionen
nAChR	nikotinische Acetylcholinrezeptoren
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaOH	Natronlauge
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartat
nNOS=NOSI	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O₂	Sauerstoff
P2X-/P2X3-/P2Y	ATP-Rezeptoren
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE2/PGI2	ProstaglandinE2/ProstaglandinI2

PGI2	Prostazyklin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	peripheres Nervensystem
RY	Ryanodin-Rezeptoren
SP	Substanz P
TH	thyrosine hydroxylase
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
trkA	Tyrosinkinase A=Nervenwachstumsfaktorrezeptor
TRPV1	Transient receptor potential Vanilloid-Rezeptor1
TTXr	Tetrodotoxin-resistant
TTXs	Tetrodotoxin-sensitive
VGSCs	Voltage-gated sodium channels
VOCCs	Voltage-operated Ca ²⁺ channels
ZNS	zentrales Nervensystem
γ-IF	Interferon- γ

8. ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abb. 1 Der intrazelluläre DAF-2DA-Aktivierungsmechanismus*.

Abb. 2 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg reagierender thorakaler Neurone.

Abb. 3 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg reagierender lumbaler Neurone.

Abb. 4 Reduktion $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -inhibierten DAF-2-Anstieges thorakaler Neurone.

Abb. 5 Reduktion $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -inhibierten DAF-2-Anstieges lumbaler Neurone.

Abb. 6 Reduktion Ca^{2+} -freien Nikotin-induzierten DAF-2-Anstieges thorakaler Neurone.

Abb. 7 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg lumbaler Neurone ohne extrazelluläres Ca^{2+} .

Abb. 8 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg thorakaler Neurone unter VOCC-Inhibition.

Abb. 9 Nikotin-induzierter DAF-2-Anstieg thorakaler Neurone unter NOS-Inhibition.

Abb. 10 Anzahl stimulierbarer thorakaler und lumbaler DRG-Neurone (% und absolut) 1 min nach Verabreichung der untersuchten Pharmaka aus den Ergebnisteilen 3.1-3.5.

Abb. 11 Die nAChR-abhängige NO-Generierung*.

Abb. 12 Die nAChR-induzierte NO-Generierung erfolgt partiell über hoch Ca^{2+} -permeable $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR*.

Abb. 13 Die nAChR-induzierte NO-Generierung ist partiell Ca^{2+} -Einstrom vermittelt*.

Abb. 14 Die nAChR-induzierte Ca^{2+} -vermittelte NO-Generierung partiell über VOCCs vom L-Typ und $\alpha 7$ -, $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR*.

Abb. 15 Die nAChR-induzierte NO-Generierung partiell durch NOS-Aktivität*.

Abb. 16 Zielmoleküle der Pharmakotherapie peripherer Schmerzen*.

Tab. 1 Modalitäten sensibler Spinalganglienneurone.

Tab. 2 Einteilung sensibler Spinalganglienneurone.

Tab. 3 Einteilung nozizeptiver Spinalganglienneurone I.

Tab. 4 Einteilung nozizeptiver Spinalganglienneurone II.

Tab. 5 Rezeptoren, nicht-selektive Kationenkanäle und Signaltransduktion nozizeptiver DRG-Neurone.

Tab. 6 Einteilung von Acetylcholinrezeptoren.

Tab. 7 Einteilung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren.

Tab. 8 Charakteristika der Stickstoffmonoxidsynthase-Isoformen.

Tab. 9 Zusammensetzung der Ca^{2+} -haltigen HEPES-Ringer-Pufferlösung.

Tab. 10 Anzahl stimulierbarer thorakaler und lumbaler DRG-Neurone (%) 1 min nach Verabreichung untersuchter Pharmaka aus den Ergebnisteilen 3.1-3.5.

(*Abb. 1, 11-16 dargestellt je im Spinalganglienneuron mit benachbarter Gliazelle)

9. LITERATUR

- Abe S, Mizusawa I, Kanno K, Yabashi A, Suto M, Kuraya M, Honda T, Hiraiwa K.** Nitric oxide synthase expressions in rat dorsal root ganglion after a hind limb tourniquet. *Neuroreport*. 2003;14(17):2267-70.
- Aimi Y, Fujimura M, Vincent SR, Kimura H.** Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J Comp Neurol*. 1991;306(3):382-92.
- Aley KO, McCarter G, Levine JD.** Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci*. 1998;18(17):7008-14.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S.** Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research* 2004;1000:4-56.
- Altier C, Zamponi GW.** Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(9):465-70.
- Andres C, Meyer S, Dina OA, Levine JD, Hucho T.** Quantitative automated microscopy (QuAM) elucidates growth factor specific signalling in pain sensitization. *Mol Pain*. 2010;6:98.
- Andrew PJ, Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):521-31.
- Arias HR, Gu RX, Feuerbach D, Wei DQ.** Different interaction between the agonist JN403 and the competitive antagonist methyllycaconitine with the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*. 2010;49(19):4169-80.
- Ayar A, Storer C, Tatham EL, Scott RL.** The effects of changing intracellular Ca²⁺ buffering on the excitability of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*. 1999;27(13):171-4.
- Baker ER, Zwart R, Sher E, Millar NS.** Pharmacological properties of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol. Pharmacol*. 2004;65(2):453-60.
- Barrantes GE, Murphy CT, Westwick J, Wonnacott S.** Nicotine increases intracellular calcium in rat hippocampal neurons via voltage-gated calcium channels. *Neurosci Lett*. 1995;196(1-2):101-4.
- Barro M, Ruiz F, Hurlle MA.** Kappa-opioid receptor mediated antinociception in rats is dependent on the functional state of dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Brain Res*. 1995;672(1-2):148-52.
- Basbaum AI, Woolf CJ.** Pain. *Curr Biol*. 1999;9(12):R429-31.

- Bauer MB, Murphy S, Gebhart GF.** Muscarinic cholinergic stimulation of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system in cultured rat sensory neurons. *Neurosci.* 1994;62(2):351-9.
- Bauer MB, Murphy S, Gebhart GF.** Stimulation of cyclic GMP production via a nitrosyl factor in sensory neuronal cultures by algescic or inflammatory agents. *J Neurochem.* 1995;65(1):363-72.
- Bauer MB, Simmons ML, Murphy S, Gebhart GF.** Bradykinin and capsaicin stimulate cyclic GMP production in cultured rat dorsal root ganglion neurons via a nitrosyl intermediate. *J Neurosci Res.* 1993;36(3):280-9.
- Baumgärtner U.** Nociceptive system: nociceptors, fiber types, spinal pathways, and projection areas. *Schmerz.* 2010;24(2):105-13.
- Benninghoff A, Drenckhahn D.** Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15. Auflage. Band 2 Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 1994;Urban & Schwarzenberg:434-440.
- Bernardini N, Sauer SK, Haberberger R, Fischer MJ, Reeh PW.** Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *J Neurosci* 2001;21(9):3295-302.
- Bernardini N, Tommassy GS, Tata AM, Augusti-Tocco G, Biagioni S.** Detection of basal and potassium-evoked acetylcholine release from embryonic DRG explants. *J Neurochem* 2004;88(6):1533.
- Besson JM.** The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs.* 1997;53 Suppl 2:1-9.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU.** Pathologie. 2. Auflage. 2001; Urban & Fischer:54-56.
- Boettger MK, Uceyler N, Zelenka M, Schmitt A, Reif A, Chen Y, Sommer C.** Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain.* 2007;11(7):810-8.
- Bortz J, Lienert GA.** Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. 1998;Springer:75-80,139-149.
- Boyd RT, Jacob MH, McEachern AE, Caron S, Berg DK.** Nicotinic acetylcholine receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons. *J Neurobiol.* 1991;22(1):1-14.
- Bredt DS, Snyder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:682-85.
- Bredt DS.** Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31(6):577-96.

- Breitinger HG.** Fast kinetic analysis of ligand-gated ion channels. *Neuroscientist*. 2001;7(2):95-103.
- Broillet M, Randin O, Chatton J.** Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett*. 2001;491(3):227-32.
- Cardenas CG, Del Mar LP, Cooper BY, Scroggs RS.** 5HT₄ receptors couple positively to tetrodotoxin insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons. *J Neurosci*. 1997;17(19):7181-9.
- Caterina MJ, Julius D.** Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(5):525-30.
- Caterina MJ, Julius D.** The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:487-517.
- Cervero F.** Neurobiology of pain. *Rev Neurol* 2000;30(6):551-5.
- Chaban VV, McRoberts JA, Ennes HS, Mayer EA.** Nitric oxide synthase inhibitors enhance mechanosensitive calcium influx in cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 2001;903(1-2):74-85.
- Chaban VV.** Peripheral sensitization of sensory neurons. *Ethn Dis*. 2010;20(1Suppl 1):S1-3-6.
- Chen DN, Patrick JW.** The α -bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the α 7 subunit. *JBC*. 1997;272(38):24024-29.
- Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S.** The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1993;55(4):1015-23.
- Cizkova D, Lukacova N, Marsala M, Marsala J.** Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull*. 2002;58(2):161-71.
- Cristino L, Pica A, Della Corte F, Bentivoglio M.** Plastic changes and nitric oxide synthase induction in neurons which innervate the regenerated tail of the lizard gecko. II. The response of dorsal root ganglion cells to tail amputation and regeneration. *Brain Res*. 2000;871(1):83-93.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S.** Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacol Sci*. 2004;25(6):317-324.
- Damaj MI, Meyer EM, Martin BR.** The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology*. 2000;39(13):2785-91.

Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:203-36.

Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int.* 1996;29(2):97-110.

Decker MW, Meyer MD, Sullivan JP. The therapeutic potential of nicotinic acetylcholine receptor agonists for pain control. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10(10):1819-30.

Delree P, Ribbens C, Martin D, Rogister B, Lefebvre PP, Rigo JM, Leprince P, Schoenen J, Moonen G. Plasticity of developing and adult dorsal root ganglion neurons as revealed in vitro. *Brain Res Bull.* 1993;30(3-4):231-7.

Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain.* 1999;6:27-35.

Dieterle A, Fischer MJ, Link AS, Neuhuber WL, Messlinger K. Increase in CGRP- and nNOS-immunoreactive neurons in the rat trigeminal ganglion after infusion of an NO donor. *Cephalgia.* 2011;31(1):31-42.

Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Kuntzweiler TA, Briggs CA, Anderson DJ, Campbell JE, Piattoni-Kaplan M, McKenna DG, Wasicak JT, Holladay MW, Williams M, Arneric SP. ABT-594 [(R)-5-(2-Azetidinylmethoxy)-2-Chloropyridine]: A novel, orally effective analgesic acting via neuronal nicotinic acetylcholine receptors: I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285(2):777-86.

Drew LJ, Wood JN, Cesare P. Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and insensitive sensory neurons. *J Neurosci.* 2002;22(12):228.

Dube GR, Kohlhaas KL, Rueter LE, Surowy CS, Meyer MD, Briggs CA. Loss of functional neuronal nicotinic receptors in dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 2005;376(1):29-34.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3760-72. doi: 10.1172/JCI42843. Epub 2010 Nov 1.

Egea J, Rosa AO, Lorrio S, del Barrio L, Cuadrado A, López MG. Haeme oxygenase-1 overexpression via nAChRs and the transcription factor Nrf2 has antinociceptive effects in the formalin test. *Pain.* 2009;146(1-2):75-83.

Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. Alpha 10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(6):3501-06.

Feirabend HKP, Marani E. Dorsal root ganglion. *Encyclopedia of the Neurological Sciences.* 2003.Elsevier Science.28-33.

Fiallos-Estrada CE, Kummer W, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M, Herdegen T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci Lett.* 1993;150(2):169-73.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the `constitutive` isoforms of nitric oxide synthase (NOSI and NOSIII). *FASEB Journal.* 1998;12:773-90.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2011.

Fucile S, Renzi M, Lax P, Eusebi F. Fractional Ca^{2+} current through human neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2003;34(2):205-9.

Fucile S, Sucapane A, Eusebi F. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors from rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol.* 2005;565(1):219-28.

Fucile S. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2004;35(1):1-8.

Gemes G, Bangaru MLY, Wu HE, Tang Q, Weihrauch D, Koopmeiners AS, Cruikshank JM, Kwok WM, Hogan QH. Store-operated Ca^{2+} entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *J Neurosci.* 2011;31(10):3536-49.

Genzen JR, McGehee DS. Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(11):6807-12.

Genzen JR, Van Cleve W, McGehee DS. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol.* 2001;86:1773-82.

Giovanelli A, Grassi F, Mattei E, Mileo AM, Eusebi F, Giovanelli A. Acetylcholine induces voltage-independent increase of cytosolic calcium in mouse myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(6):2509.

Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci.* 1998;18(24):10345-55.

Gotoh H, Akatsuka H, Suto K. Warm cells revealed by microfluorimetry of Ca^{2+} in cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1998;796(1-2):319-22.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74(6):363-96.

Grassi F, Giovannelli A, Fucile S, Eusebi F. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor mobilizes calcium from caffeine-insensitive stores in C2C12 mouse myotubes. *Pflugers Arch.* 1993;422.

Gu JG, MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature.* 1997;389(6652):749-53.

Haberberger R, Scholz A, Kummer W, Kress M. M2-receptor subtype does not mediate muscarine-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in nociceptive neurons of rat dorsal root ganglia. *J Neurophysiol.* 2000;84(4):1934-41.

Haberberger RV, Bernardini N, Kress M, Hartmann P, Lips KS, Kummer W. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci.* 2004;113(1-2):32-42.

Haberberger RV, Henrich M, Lips KS, Kummer W. Nicotinic receptor alpha7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol.* 2003;120(3):173-81.

Hama A, Menzaghi F. Antagonists of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. *Brain Res.* 2001;888(1):102-6.

Heck DE. NO, RSNO, ONOO-, NO+, NOO, NOx--dynamic regulation of oxidant scavenging, nitric oxide stores, and cyclic GMP-independent cell signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3(2):249-60. Review.

Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol.* 2001;114(1-2):8-18.

Henrich M, Buckler KJ. Effects of anoxia and aglycemia on cytosolic calcium regulation in rat sensory neurons. *J Neurophysiol.* 2008;100(1):456-73.

Henrich M, Hoffmann K, König P, Groß M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W. Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Mol Cell Neurosci.* 2002;20(2):307-22.

Henrich M, Paddenberg R, Haberberger RV, Scholz A, Gruss M, Hempelmann G, Kummer W. Hypoxic increase in nitric oxide generation of rat sensory neurons requires activation of mitochondrial complex II and voltage-gated calcium channels. *Neurosci.* 2004;128(2):337-45.

Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol.* 2011;704:1-13.

Hiura A. Is thermal nociception only sensed by the capsaicin receptor, TRPV1? *Anat Sci Int.* 2009;84(3):122-8.

Hone AJ, Meyer EL, McIntyre M, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors in dorsal root ganglion neurons include the (alpha)6(beta)4* subtype. *FASEB J.* 2011.

Hong H, Sun J, Cai W. Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(6):684-98.

Jain KK. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004;5(1):76-81.

Jane D, Doherty A. Mudding through the mGlu maze? *Tocris Reviews.* 2000;13.

Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium.* 2006;40(2):197-203.

Jinks SL, Carstens E. Activation of spinal wide dynamic range neurons by intracutaneous microinjection of nicotine. *J Neurophysiol.* 1999;82(6):3046-55.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413(6852):203-10.

Kantner RM, Goldstein BD, Kirby ML. Regulatory mechanisms for substance P in the dorsal horn during a nociceptive stimulus: axoplasmic transport vs electrical activity. *Brain Res.* 1986;385(2):283-90.

Kasim N, Branton RL, Clarke DJ. Neuronal nitric oxide synthase immunohistochemistry and 4,5-diaminofluorescein diacetate: tools for nitric oxide research. *J Neurosci Methods.* 2001;112(1):1-8.

Kesingland AC, Gentry CT, Panesar MS, Bowes MA, Vernier JM, Cube R, Walker K, Urban L. Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2000;86(1-2):113-8.

Khan I, Osaka H, Stanislaus S, Calvo RM, Deerinck T, Yaksh TL, Taylor P. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in relation to spinal neurotransmission pathways. *J Comp Neurol.* 2003;467(1):44-59.

Kim KH, Kim JI, Han JA, Choe MA, Ahn JH. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Neurosci.* 2011;190:367-78.

Kim SJ, Song SK, Kim J. Inhibitory effect of nitric oxide on voltage-dependent calcium currents in rat dorsal root ganglion cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(2):509-14.

- Krainick U, Schmidt RF.** Nozizeption und Schmerz. 1991;In:Schmidt RF, Hierholzer K (Hrsg.) *Pathophysiologie des Menschen*. VCH, Weinheim
- Kress M, Guenther S.** Role of $[Ca^{2+}]_i$ in the ATP-induced heat sensitization process of rat nociceptive neurons. *J Neurophysiol.* 1999;81:2612-19.
- Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V.** Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? *Nitric Oxide.* 1997;1(2):107-20.
- Krůsek J, Dittert I, Hendrych T, Hník P, Horák M, Petrovic M, Sedláček M, Susánková K, Svobodová L, Tousová K, Ujec E, Vlachová V, Vyklický L, Vyskocil F, Vyklický L Jr.** Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res.* 2004;53(1):103-113.
- Kumar S, Jyoti A, Keshari RS, Singh M, Barthwal MK, Dikshit M.** Functional and molecular characterization of NOS isoforms in rat neutrophil precursor cells. *Cytometry A.* 2010;77(5):467-77.
- Lancaster JR Jr.** A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1997;1(1):18-30.
- Lawand NB, Willis WD, Westlund KN.** Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroreport.* 1997;8(4):895-9.
- Lawson SN.** Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol.* 2002;87(2):239-44.
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP.** The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol.* 2002;53:447-56.
- Lewis TH.** Pain. 1942;Macmillan, London. Nachdruck 1981
- Li J, McRoberts JA, Nie J, Ennes HS, Mayer EA.** Electrophysiological characterization of N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Pain.* 2004;109(3):443-52.
- Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G.** Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res.* 1996;109:125-37.
- Lips KS, Pfeil U, Kummer W.** Coexpression of alpha9 and alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci.* 2002;115(1):1-5.
- Lloyd DPC, Chang HT.** Afferent fibres in muscle nerves. *J Neurophysiol.* 1948;11:199.

Loewensten WR. Principles of receptor physiology. 1971; *In Handbook of sensory physiology, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York.*

López-Figueroa MO, Caamaño C, Marin R, Guerra B, Alonso R, Morano MI, Akil H, Watson SJ. Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1540(3):253-64.

Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dan Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor P, Wonnacott S. International union of pharmacology. XX. Current status of nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 1999;51(2):397-401.

Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain.* 2000;4(6):459-66.

Magnusson S, Alm P, Kanje M. CGMP increases in satellite cells of nitric oxide synthase-containing sensory ganglia. *Neuroreport.* 2000;11(15):3389-95.

Martucci C, Trovato AE, Costa B, Borsani E, Franchi S, Magnaghi V, Panerai AE, Rodella LF, Valsecchi AE, Sacerdote P, Colleoni M. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain.* 2008;137(1):81-95.

Matre DA, Hernandez-Garcia L, Tran TD, Casey KL. `First pain` in humans: convergent and specific forebrain responses. *Mol Pain.* 2010;6:81.

Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary efferents. *Mol Pain.* 2007;3:41.

Melzack R, Wall PD. The Challenge of pain. 1983; *Basic Books, New York.*

Mense S. Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res.* 2009;196(1):89-100.

Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain.* 1993;54(3):241-89.

Mense S. Pathophysiology of low back pain and the transition to the chronic state – experimental data and new concepts. *Schmerz.* 2001;15(6):413-7.

Mense S. Structure-function relationships in identified afferent neurones. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181(1):1-17.

Messlinger K. What is a nociceptor? *Anaesthesist.* 1997;46(2):142-53.

Michelmore S, Croskery K, Nozulak J, Hoyer D, Longato R, Weber A, Bouhelal R, Feuerbach D. Study of the calcium dynamics of the human $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$ nicotinic acetylcholine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002;366:235-45.

Miclescu A, Gordh T. Nitric oxide and pain: `something old, something new`. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(9):1107-20.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57(1):1-164.

Mizusawa I, Abe S, Kanno K, Yabashi A, Honda T, Suto M, Hiraiwa K. Expression of cytokines, neurotrophins, neurotrophin receptors and NOS mRNA in dorsal root ganglion of a rat tourniquet model. *Leg Med (Tokyo)*. 2003;5(1):271-4.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev*. 1997;49(2):137-42.

Morris R, Southam E, Braid DJ, Garthwaite J. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurons and their satellite cells. *Neurosci Lett*. 1992;137(1):29-32.

Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh I, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel $\alpha 1$ subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res*. 2004;1024(1-2):122-29.

Nakayama Y, Omote K, Kawamata T, Namiki A. Role of prostaglandin receptor subtype EP1 in prostaglandin E2-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res*. 2004;1010(1-2):62-8.

Ogata N, Yamamoto M, Maruyama H. The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels in pain sensation studied on sns-knockout mice. *Nippon Rinsho*. 2001;59(9):1688-97.

Ouyang K, Wu C, Cheng H. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release in sensory neurons: low gain amplification confers intrinsic stability. *J Biol Chem*. 2005;280(16):15898-902.

Papadopoulou S, Hartmann P, Lips KS, Kummer W, Haberberger RV. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):32-5.

Park J, Luo ZD. Calcium channel functions in pain processing. *Channels (Austin)*. 2010;4(6):510-7.

Pauwels PJ. Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(12):1743-50.

Planchet E, Kaiser WM. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot.* 2006;57(12):3043-55.

Price TJ, Gèranton SM. Translating nociceptor sensitivity: the role of axonal protein synthesis in nociceptor physiology. *Eur J Neurosci.* 2009;29(12):2253-63.

Priestley JV, Michael GJ, Averill S, Liu M, Willmott N. Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(5):495-505.

Puttfarcken PS, Manelli AM, Arneric SP, Donnelly-Roberts DL. Evidence for nicotinic receptors potentially modulating nociceptive transmission at the level of the primary sensory neuron: studies with F11 cells. *J Neurochem.* 1997;69(3):930-8.

Qian Y, Chao DS, Santillano DR, Cornwell TL, Nairn AC, Greengard P, Lincoln TM, Brecht DS. cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci.* 1996;16(10):3130-8.

Qin HL, Zhou X, Zhang W, Chen SX. Expressional change of nitric oxide synthases in dorsal root ganglia of cats after selective dorsal rhizotomy. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004;35(1):29-31.

Qiu W, Kass DA, Hu Q, Ziegelstein RC. Determinants of shear stress-stimulated endothelial nitric oxide production assessed in real-time by 4,5-diaminofluorecein fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:328-35.

Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H. Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord of mice. *Pain.* 2006;125(1-2):125-135.

Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M, Ueda H. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):1158-64.

Rathouz MM, Berg DK. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci.* 1994;14:6935-45.

Rau KK, Johnson RD, Cooper BY. Nicotinic AChR in subclassified capsaicin sensitive and insensitive nociceptors of the rat DRG. *J Neurophysiol.* 2005;93(3):1358-71.

- Rengathan M, Cummins TR, Waxman SG.** Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na⁺ channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation. *J Neurophysiol.* 2002;87(2):761-75.
- Roberts RG, Stevenson JE, Westerman RA, Pennefather J.** Nicotinic acetylcholine receptors on capsaicin-sensitive nerves. *Neuroreport.* 1995;6(11):1578-82.
- Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourdeuil D, Feelisch M.** Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(3):356-68.
- Rosenbaum T, Simon SA.** TRPV1 Receptors and signal transduction. In: *Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 5. Frontiers in Neuroscience.*
- Rowlans DK, Kao C, Wise H.** Regulation of prostacyclin and prostaglandin E2 receptor mediated responses in adult rat dorsal root ganglion cells, in vitro. *Br J Pharmacol.* 2001;133(1):13-22.
- Rybarova S, Kluchova D, Schmidtova K, Lovasova K.** Nitrergic structures in the spinal ganglia in rabbits. *Bratisl Lek Listy.* 1999;100(10):537-40.
- Salom MG, Arregui B, Carbonell LF, Ruiz F, González-Mora JL, Fenoy FJ.** Renal ischemia induces an increase in nitric oxide levels from tissue stores. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(5):R1459-66.
- Sastry BV.** Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(11):1577-86.
- Sato M.** Transmission and modulation of nociceptive information in the spinal dorsal horn. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1993;101(5):289-98.
- Schaible HG, Grubb BD.** Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 1993;55(1):5-54.
- Schaible HG.** Epidemiology and pathophysiology of pain--new targets for pain therapy. *Med Monatsschr Pharm.* 2009;32(5):164-71; quiz 173-4.
- Schaible HG.** Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(177):3-28.
- Schmidt RF, Thews G.** Physiologie des Menschen. 27. Auflage. 1997;Springer:16-19,29-32,37,58-63,199-203,236-242,345,530-532.
- Schmidt A, Tegeder I, Geisslinger G.** No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci.* 2009;32(6):339-46.

Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghi DJ, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG. Expression of B1 and B2 bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurons from wild-type and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 1997;36(7):1009-17.

Senba E, Kashiba H. Sensory afferent processing in multi-responsive DRG neurons. *Prog Brain Res*. 1996;113:387-410.

Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):4148-53.

Sharples CGV, Wonnacott S. Neuronal nicotinic receptors. *Toxic Reviews*. 2001;19.

Shi TJ, Holmberg K, Xu ZQ, Steinbusch H, de Vente J, Hokfelt T. Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistence. *Pain*. 1998;78(3):171-80.

Siegel GJ. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Fifth Edition. 1994;Raven Press:231-60.

Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J*. 1997;10(3):699-707.

Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*. 1998;20(4):629-32.

Steen KH, Reeh PW. Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro. *J Neurophysiol*. 1993;70(1):397-405.

Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):217-30.

Su X, Wachtel RE, Gebhart GF. Inhibition of calcium currents in rat colon sensory neurons by K- but not mu- or delta-opioids. *J Neurophysiol*. 1998;80(6):3112-9.

Sucher NJ, Cheng TP, Lipton SA. Neural nicotinic acetylcholine responses in sensory neurons from postnatal rat. *Brain Res*. 1990;533(2):248-54.

Sugimoto K, Fujii S, Takemasa T, Yamashita K. Detection of intracellular nitric oxide using a combination of aldehyde fixatives with 4,5-diaminofluorescein diacetate. *Histochem Cell Biol*. 2000;113(5):341-7.

Suzuki N, Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Hirata Y, Nagano T. Orthogonality of calcium concentration and ability of 4,5-diaminofluorescein to detect NO. *J Biol Chem*. 2002;277(1):47-9.

Svichar N, Shishkin V, Kostyuk P. Mitochondrial participation in modulation of calcium transients in DRG neurons. *Neuroreport*. 1999;10(6):1257-61.

Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Haganir RL. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1999;33:49-78.

Szulczyk P, Rola R, Szulczyk B, Witkowski G. Nociceptive neurons. *Postepy Hig Med Dosw*. 2002;56(3):361-75.

Tang HB, Inoue A, Iwasa M, Hide I, Nakata Y. Substance P release evoked by capsaicin or potassium from rat cultured dorsal root ganglion neurons is conversely modulated with bradykinin. *J Neurochem*. 2006;97(5):1412-8.

Tassonyi E, Charpantier R, Muller D, Dumont L, Bertrand D. The role of acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res Bull*. 2002;57(2):133-50.

Tata AM, Tripiciano A, Filippini A, Biagioni S, Augusti-Tocco G. Muscarinic receptors modulate intracellular calcium level in chick sensory neurons. *Brain Res*. 2000;866(1-2):65-72.

Tata AM, Vilaro MT, Mengod G. Muscarinic receptor subtypes expression in rat and chick dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;82(1-2):1-10.

Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannion RJ, Costigan M, Plumpton C, Grose D, Gladwell Z, Kendall G, Dale K, Bountra C, Woolf CJ. Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nat Neurosci*. 1998;1(8):653-5.

Thippeswamy T, Jain RK, Mumtaz N, Morris R. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase results in neurodegenerative changes in the axotomised dorsal root ganglion neurons: evidence for a neuroprotective role of nitric oxide in vivo. *Neurosci Res*. 2001;40(1):37-44.

Thippeswamy T, Morris R. The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:103-10.

Tiscornia A, Cairoli E, Marquez M, Denicola A, Pritsch O, Cayota A. Use of diamino fluoresceins to detect and measure nitric oxide in low level generating human immune cells. *J Immunol Methods*. 2009;342(1-2):49-57.

Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br J Pharmacol*. 2011;163(3):484-95.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531-43.

Treede RD. Transduction and transmission properties of primary nociceptive afferents. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 1999;85(1):205-11.

Tsuneki H, Klink R, Léna C, Korn H, Changeux JP. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci*. 2000;12(7):2475-85.

Ueda H, Inoue M, Yoshida A, Mizuno K, Yamamoto H, Maruo J, Matsuno K, Mita S. Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;29(2): 703-10.

Usachev Y, Verkhratsky A. IBMX induces calcium release from intracellular stores in rat sensory neurons. *Cell Calcium*. 1995;17(3):197-206.

Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*. 2000;39(13):2515-24.

Verdru P, De Greef C, Mertens L, Carmeliet E, Callewaert G. Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol*. 1997;77(1):484-90.

Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci*. 1995;15(5):4033-45.

Von Bohlen und Halbach O. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide*. 2003;9(4):217-28.

Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci*. 1998;10(11):3470-8.

Vyklicky L, Knotkova-Urvancova H. Can sensory neurons in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res*. 1996;45(1):1-9.

Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ Channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*. 1997;272(34):20975-8.

Walker K, Reeve A, Bowes M, Winter J, Wotherspoon G, Davis A, Schmid P, Gasparini F, Kuhn R, Urban L. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5

receptors functionally expressed on peripheral sensory neurons mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2001;40(1):10-9.

Wang Y, Su DM, Wang RH, Liu Y, Wang H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience*. 2005;132(1):49-56.

Werth JL, Thayer SA. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1994;14(1):348-56.

Werth JL, Usachev YM, Thayer SA. Modulation of calcium efflux from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1996;16(3):1008-15.

Westerman RA, Carr RW, Delaney CA, Morris MJ, Roberts RG. The role of skin nociceptive afferent nerves in blister healing. *Clin Exp Neurol*. 1993;30:39-60.

Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*. 1997;14(1):2-31.

Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007;55(3):353-64.

Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain*. 2001;94(1):47-58.

Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. The role of nitric oxide in the phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein in the spinal cord after intradermal injection of capsaicin. *J Pain*. 2002;3(3):190-8.

Wu S, Zhu M, Wang W, Wang Y, Li Y, Yew DT. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett*. 2001;307(3):13-6.

Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca²⁺ channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(3):939-47.

Xue QS, Yu BW. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of general anesthesia. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2003;34(1):37-41.

Ye X, Xie F, Romanova EV, Rubakhin SS, Sweedler JV. Production of nitric oxide within the aplysia californica nervous system. *ACS Chem Neurosci*. 2010;1(3):182-193.

Young T, Wittenauer S, Parker R, Vincler M. Peripheral nerve injury alters spinal nicotinic acetylcholine receptor pharmacology. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):163-9.

Zhang C, Zhou Z. Ca²⁺-independent but voltage-dependent secretion in mammalian dorsal root ganglion neurons. *Nature Neurosci*. 2002;5(5):425-30.

Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Snyder SH, Hökfelt T. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol.* 1993;335(4):563-75.

Zheng H, Fan J, Xiong W, Zhang C, Wang XB, Liu T, Liu HJ, Sun L, Wang YS, Zheng LH, Wang BR, Zhang CX, Zhou Z. Action potential modulates Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent secretion in sensory neuron. *Biophys J.* 2009;96(6):2449-2456.

Zochodne DW, Verge VM, Cheng C, Hoke A, Jolley C, Thomsen K, Rubin I, Lauritzen M. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(9):798-807.

10. PUBLIKATIONEN

Papadopoulou S, Haberberger RV, Bernardini N, Hartmann P, Kress M, Kummer W. Nikotinsche Rezeptorstimulation führt in nozizeptiven Neuronen zum Einstrom von Kationen und einer schnellen Synthese von Stickstoffmonoxid. *19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. 2002 Oct (Poster).*

Papadopoulou S, Lips KS, Hartmann P, Heinrich M, Haberberger RV, Kummer W. The nitric oxide synthase of nociceptive neurons is activated by nicotinic receptor-dependent calcium influx via voltage-gated calcium channels. *98. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Dresden. 2003 Mar (Poster).*

Papadopoulou S, Hartmann P, Lips KS, Kummer W, Haberberger RV. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci Lett. 2004 May;361(1-3):32-5.*

11. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

12. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Das Team der Anatomie ist hiermit insbesondere adressiert. « Der Laden, in dem ich weitere Farbe für den Halb-gott-in-weiß Auftritt erwerben wollte » (Haberberger RV. 2002 Sep. In: Bär S. Forschen auf Deutsch: Der Machiavelli für Forscher – und solche die es noch werden wollen. 3. Aufl. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun, 1996), hat mich auf's herzlichste willkommen geheißen und freundschaftlich in seine familiäre Mitte aufgenommen.

Für die Überlassung des Themas, der Mittel zur Durchführung sowie seine tatkräftige Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und produktiv/konstruktiver Anmerkungen danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer ganz besonders. Meinem zweiten Betreuer Herrn PD Dr. rer. physiol. Rainer Viktor Haberberger gilt ganz besonderer Dank für seine unermüdliche fachliche Hilfe bei der Ausarbeitung. Meine « verbesserungsfähigen Formatierungen und Graphiken » werden ihn beim Korrekturlesen wohl so manchmal in den wissenschaftlichen Wahnsinn getrieben haben. (...Er flüchtete mit Kind und Kegel bis ins entfernte Down Under, entkam, aber doch nicht!) Letztlich habe ich mich um eine « kernige » Umsetzung bemüht. Diese, so hoffe ich, belohnt meine Betreuer zufriedenstellend für ihren Einsatz in mich Formatierungs- und SPSS-legasthenische, humanmedizinische Nachwuchsforscherinnen und motiviert im Weiteren für alle, die noch kommen mögen (...mit hoffentlich mehr Formatierungs-/Statistik- und graphischem Talent). Ich danke meinen Betreuern für die wissenschaftlichen Publikationen.

Meiner « Perle » Petra Hartmann ist diese Arbeit gewidmet. Damit möchte ich mich bei ihr nicht nur für die Einarbeitung in Labor, Methoden und Auswertung als viel mehr für ihre moralische Unterstützung und Motivation bedanken, wenn die Neuröhen mal nicht für mich geleuchtet haben. Auch « Silki » Wiegand möchte ich an dieser Stelle für ihre liebe Unterstützung in meinem Kampf mit Excel, Word, SPSS und Power Point bedanken.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für den aufbauenden Rückhalt, ohne den ich sicherlich nicht die Kraft und Beharrlichkeit aufgebracht hätte, diese wissenschaftliche Arbeit zu beginnen und fertig zu stellen. DANKE EUCH ALLEN!