

1 Einleitung: Nozizeption und Schmerz

Während akuter Schmerz eine Warnfunktion für den Organismus hat, werden die verschiedenen Arten chronischer Schmerzen als eigenständige Krankheitsbilder betrachtet, deren molekulare Grundlagen bisher wenig verstanden sind und deren Therapie schwierig ist.

Schmerz ist nach der Definition der IASP (International Association for the Study of Pain) „ein unangenehmes heftiges Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlichen oder möglichen Gewebeschäden verbunden ist oder in solchen Kategorien beschrieben wird“. Demgegenüber beschreibt der Begriff Nozizeption den Erhalt von Signalen im zentralen Nervensystem (ZNS), die von spezialisierten sensorischen zellulären Rezeptoren (Nozizeptoren) hervorgerufen werden und Informationen über Gewebeschäden vermitteln.

1.1 Mechanismen der Nozizeption

Nozizeptoren sind spezialisierte primäre afferente Nervenzellen, die ein breites Spektrum an Reizen aufnehmen können wie z.B. noxische Hitze, noxische mechanische Reize und chemische Signale, die bei Gewebeschäden ausgelöst werden. Die Nozizeptoren können infolge solcher Signale Aktionspotentiale auslösen, die die Information zum ZNS übertragen. Die Zellkörper der Primärafferenzen befinden sich im Hinterwurzelganglion (DRG, dorsal root ganglion) und senden zwei Ausläufer aus. Über die peripheren Enden werden mechanische, thermische oder chemische Signale aus der Umgebung aufgenommen. Die zentralen Enden werden mit spezifischen Projektneuronen im schichtartig (Lamina I-VI) organisierten Dorsalhorn (DH) des Rückenmarks verschaltet (siehe auch Abb. 1.3). Neurone, die nozizeptive Informationen aufnehmen und weiterleiten (A δ -, C-Fasern, siehe unten), enden überwiegend in den Schichten I, II und V (NS-Neurone, nozizeptorspezifisch). Die Schichten II und III werden zusammen als *Substantia gelatinosa* bezeichnet. Diese enthält kleine Interneurone und die Ausläufer von Dendriten der großen Neurone aus Schicht V. Nozizeptive Afferenzen aus der Haut enden in der obersten Schicht und bilden synaptische Kontakte mit Neuronen der Schicht II außen (C-Fasern) sowie I und V (A δ -Fasern), während

nicht-nozizeptive taktile Afferenzen aus der Haut (A β -Fasern) in den Schichten IV und V enden (WDR-Neurone, „wide dynamic range“). Nozizeptive Afferenzen aus den Muskeln, Sehnen und inneren Organen enden ebenfalls in der Schicht I und zusätzlich in einem seitlichen Bereich des Hinterhorns, der als lateraler Kern bezeichnet wird, sowie in einer Region um den Zentralkanal (Schicht X)^{1,2}.

Vom Hinterhorn aus gelangen die Signale entlang des Rückenmarks über verschiedene aufsteigende Trakte (spinothalamischer Trakt, spinoreticularer Trakt, spinomesencephalischer Trakt) zu höheren Zentren im Gehirn. In bestimmten Bereichen des somatosensorischen Cortex führt die Integration von sensorisch-diskriminativen und emotional-cognitiven Signalen zu einer bewussten Schmerzwahrnehmung. In Abbildung 1.1 ist exemplarisch der spinothalamische Trakt dargestellt.

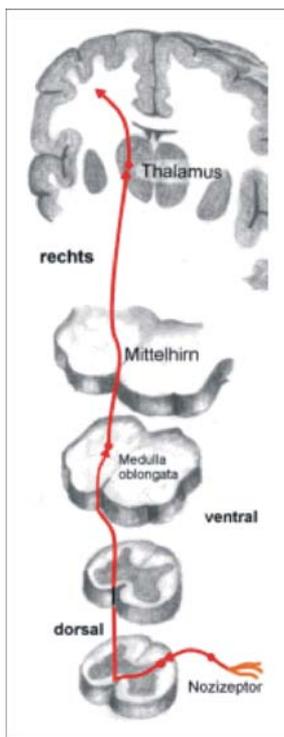


Abb. 1.1: Darstellung der aufsteigenden Schmerzbahn am Beispiel des spinothalamischen Traktes (STT). Nozizeptive primäre Afferenzen enden im Hinterhorn des Rückenmarkes. Dort bilden sie synaptische Verbindungen mit sekundären nozizeptiven Neuronen, deren Axone in aufsteigende Bahnen projizieren. Durch die Kreuzung der Mittellinie erfolgt die Verarbeitung der Signale contralateral. Ziel dieses Traktes ist der Thalamus, von dort aus gelangen die Signale zu bestimmten Bereichen im Cortex, wo sie verarbeitet werden.

Es lassen sich nach anatomischen und funktionellen Kriterien drei Arten von primären afferenten nozizeptiven Neuronen, die C-, A δ - und A β -Fasern unterscheiden. Die A α -Fasern dagegen nehmen nur nicht-noxische mechanische Stimuli wahr³ (Tabelle 1.1):

Aα-/Aβ-Fasern	<ul style="list-style-type: none"> • myelinisiert • großer Durchmesser • nicht nozizeptiv • leichte Berührung 	v = 40 - 80 m/s keine Temperaturschwelle
Aδ_{I/II}-Fasern	<ul style="list-style-type: none"> • leicht myelinisiert • mittlerer Durchmesser • nozizeptiv (thermisch, chemisch, mechanisch) 	v = 2,5 - 36 m/s Temperaturschwelle: Typ I > 52°C Typ II > 43°C
C-Fasern	<ul style="list-style-type: none"> • nicht myelinisiert • kleiner Durchmesser • nozizeptiv • polymodal 	v = 0,5 - 1,7 m/s Temperaturschwelle: > 43°C

Tab. 1.1: Arten und Charakteristika primärer afferenter Neurone. C- und A δ -Fasern sind spezialisierte sensorische Rezeptoren (Nozizeptoren), die verschiedene Schmerzarten wahrnehmen. A β -Fasern reagieren nur unter bestimmten Bedingungen auf noxische Stimuli. Primärafferenzen unterscheiden sich im Durchmesser, dem Grad der Myelinisierung und damit der Leitungsgeschwindigkeit (v in m/s).

C- und A δ -Fasern übermitteln noxische Reize mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. So wird das erste Schmerzempfinden nach einer Verletzung schnell und scharf über A δ -Fasern wahrgenommen, der sekundäre Schmerz hält länger an, ist brennend und wird über polymodale C-Fasern vermittelt (Abb. 1.2). A β -Fasern reagieren unter normalen Bedingungen nicht auf schmerzhafte Reize, diese werden als „schlafende Nozizeptoren“ bezeichnet und spielen bei der Chronifizierung von Schmerz eine Rolle³.

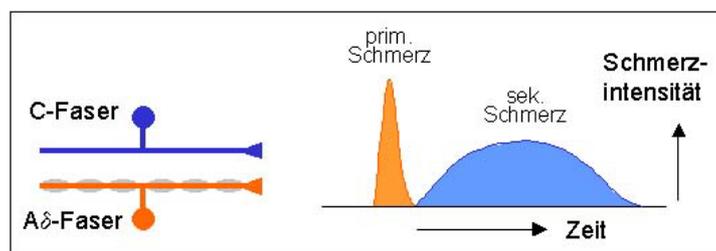


Abb. 1.2: Primärer und sekundärer Schmerz werden über verschiedene Primärafferenzen vermittelt. Als erste schnelle Antwort auf einen noxischen Stimulus wird ein intensiver Schmerz über myelinisierte A δ -Fasern vermittelt. Ein länger anhaltender dumpfer Schmerz wird kurz darauf durch unmyelinisierte C-Fasern generiert. Adaptiert nach ⁴.

1.1.1 Periphere und zentrale Mechanismen der Schmerzentstehung

Nach einer Verletzung werden von den Zellen des beschädigten Gewebes Substanzen (u.a. Protonen, Kaliumionen, ATP, Acetylcholin, Serotonin (5-HT), Bradykinin, Prostaglandine (PGs) und Leukotriene) entlassen und zusätzlich Histamine aus Mastzellen ausgeschüttet. Diese noxischen Stimuli führen zur Aktivierung von Primärafferenzen über spezifische Rezeptoren. Einer davon ist der Vanilloid-(Capsaicin-)Rezeptor 1, ein ligandengesteuerter, nicht-selektiver Kationenkanal in primären sensorischen Neuronen, der durch Protonen, Hitze ($> 43^{\circ}\text{C}$) und Capsaicin aktivierbar ist und durch Depolarisation der freien Nervenendigung ein Aktionspotential generieren kann (siehe 1.4.1). Die zentralen Enden der Primärafferenzen leiten das Signal weiter ins Hinterhorn des Rückenmarkes, wo es je nach Ausstattung und Herkunft der betroffenen Primärafferenzen zur Ausschüttung von exzitatorischen Aminosäuren (EAAs) wie Glutamat oder Aspartat, sowie Neuropeptiden (Substanz P, CGRP), ATP, NO und Neurotrophinen (NGF, $\text{TNF}\alpha$, GDNF, BDNF) kommt⁵.

Glutamat ist der vorherrschende exzitatorische Neurotransmitter in allen Nozizeptoren. Histochemischen Analysen an Hinterwurzelganglien zufolge lassen sich aber definierte Subpopulationen von unmyelinisierten C-Fasern unterscheiden^{6,7}: Die peptiderge Subpopulation exprimiert Substanz P, CGRP, BDNF und TrkA, den hochaffinen NGF-Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase. Die zweite Subpopulation enthält weder Substanz P noch TrkA, kann aber selektiv mit dem aus Samen von *Bandeiraea simplicifolia* stammenden Isolektin B4 (IB4), das spezifisch α -D-Galaktopyranosyl-Reste erkennt, markiert werden. Außerdem exprimiert sie den P2X₃-Rezeptor, einen Subtyp ATP-gesteuerter Ionenkanäle, sowie die Rezeptortyrosinkinase RET, die zusammen mit einem Co-Rezeptor der GDNF-Rezeptorfamilie (GFR α 1) für die nachgeschalteten Effekte von GDNF verantwortlich ist⁸. Eine schematische Darstellung der Schmerzrezeption ist in der Abb. 1.3 dargestellt.

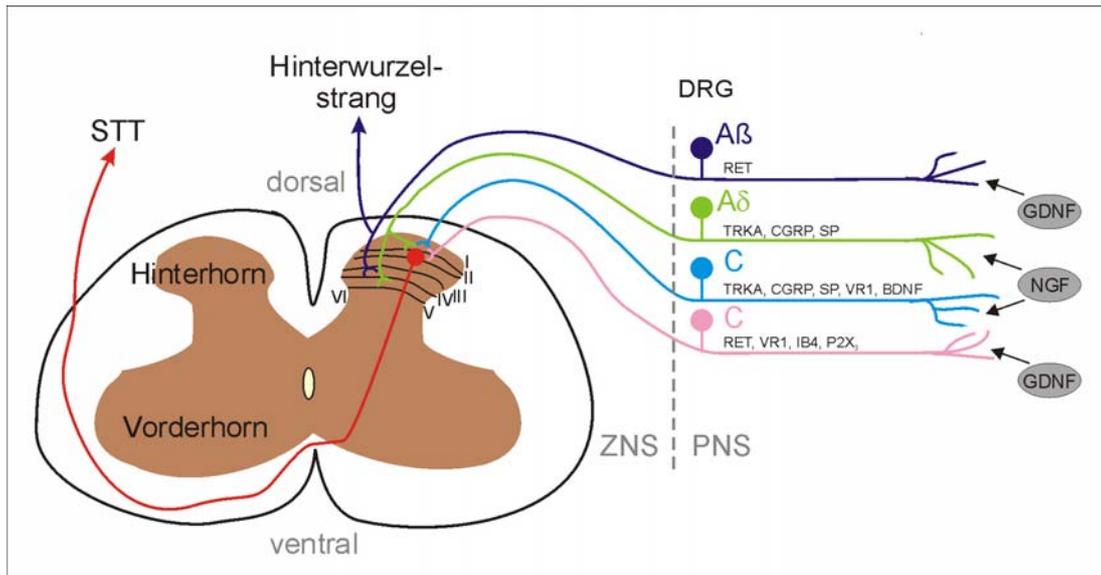


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks. Römische Zahlen bezeichnen die Schichten des Hinterhorns. Die zentralen Enden der C-Fasern enden an Projektneuronen vorwiegend in den Schichten I und II außen, A δ -Fasern projizieren in Schicht I, II außen und V, A β -Fasern enden in den Schichten III-VI. STT = spinothalamischer Trakt.

1.1.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Sensibilisierung bezeichnet eine erhöhte Schmerzempfindung, die u. a. durch länger anhaltende Applikationen eines noxischen Stimulus (Nichtbehandlung einer Wunde, Sonnenbrand) hervorgerufen werden kann. Die periphere Sensibilisierung äußert sich dadurch, dass benachbarte Nozizeptoren, die vorher nicht auf mechanische Reize reagiert haben, plötzlich antworten. Außerdem wird die Schwelle der Aktivierbarkeit der Nozizeptoren erniedrigt. Dies geschieht in geschädigten Zellen durch die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen aus Arachidonsäure (AA) mittels Cyclooxygenasen bzw. durch 5-Lipoxygenasen. Zusätzlich regulieren die Primärafferenzen ihre chemische Umgebung auch selbst: Mediatoren werden im Zellkörper synthetisiert und zum peripheren Ende transportiert, wo sie gespeichert werden. Durch Depolarisation werden Neuropeptide wie Substanz P und CGRP entlassen, was zur Erweiterung der Blutgefäße und Degranulierung von Mastzellen und einer weiteren Entlassung von Histaminen zur Reduzierung der Reizschwelle führt. Als Entzündungszeichen entstehen Hitze, Röte (Blutgefäßerweiterung) und Schwellung (ausgetretene Lympheflüssigkeit, Blutplasma). Die periphere Sensibilisierung führt somit zur primären Hyperalgesie

(verstärkte Antwort auf noxische Reize durch Reduzierung der Reizschwelle für die Nozizeption)⁹.

Eine zentrale Sensibilisierung manifestiert sich durch eine kumulative Depolarisation, dem „Wind-Up“ (bei schwerer oder nicht behandelter Verletzung feuern C-Fasern repetitiv, worauf die Hinterwurzel-Neuronen mit verstärkter Antwort reagieren = Wind-Up). Das Wind-Up ist von der Ausschüttung von Glutamat abhängig, das postsynaptisch an NMDA-Rezeptoren bindet. Ein anderer Mechanismus ist die Erzeugung von Langzeitänderungen in der synaptischen Transmission (LTP) und die Änderung der Genexpression (u.a. erhöhte Expression von *c-fos*), die nach gegenwärtiger Vorstellung zur Generierung eines Schmerzgedächtnisses führt^{3,10}.

1.1.3 Modulation durch Interneurone

Im Hinterhorn des Rückenmarks werden die ankommenden Signale durch inhibitorische (ININs) und exzitatorische (EXINs) Interneurone moduliert. Interneurone werden auch innerhalb endogener absteigender analgetischer Trakte z.B. vom periaquäductalem Grau (PAG) des Mittelhirns über den Nucleus Raphe Magnus zum Hinterhorn des Rückenmarks zur Schmerzmodulation verwendet.

Verschiedene ININs benutzen z.B. GABA (γ -Aminobuttersäure), Acetylcholin oder Endorphine (Enkephalin und/oder Dynorphin) als Neurotransmitter. EXINs benutzen dagegen exzitatorische Aminosäuretransmitter (EAAs), Neuropeptide wie Neurotensin, VIP (vasoactive intestinal peptide), Substanz P, Neuropeptid FF oder Cholecystokinin sowie ATP, NO oder Prostaglandine.

Ein möglicher Mechanismus zur Wirkung von Interneuronen, die „Gate-Control Theory“ wurde 1965 von Melzack und Wall¹¹ vorgestellt: Ein spinothalamisches Hinterwurzel-Neuron erhält über eine dicke Hinterwurzelfaser taktilen Input (A β) und über eine dünne Faser (C) nozizeptiven Input. Beide erregen das Hinterwurzel-Neuron. Außerdem beeinflussen sie ein kleines inhibitorisches Interneuron, das GATE-Neuron, welches das spinothalamische Neuron hemmt. Etwas anschaulicher: Man stößt sich und reibt an der Stelle, damit überflutet man die A β -Fasern mit taktilen Input, das GATE-Neuron wird aktiviert und lindert den Schmerz, indem es das spinothalamische Neuron hemmt.

Verschiedene Analgetika greifen z.B. entweder auf der Ebene der modulierenden Systeme an oder blockieren spezifisch die Generierung von Entzündungsmediatoren. Opioide wirken als spezifische Liganden der Opioid-Rezeptoren (μ -, κ -, δ -Rezeptoren oder ORL1). Diese werden nur bei starken Schmerzen (wie bei Schmerzen im Zuge einer Krebserkrankung) verwendet und bergen das Problem der Toleranzentwicklung, was eine immer höhere Dosierung erfordert. Für schwache bis moderate Schmerzen werden NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) wie Salizylate z.B. Aspirin, Paracetamol oder Ibuprofen verwendet. Diese hemmen die Cyclooxygenasen COX1 und COX2.

1.1.4 Rezeptortypen und rezeptorvermittelte Effekte

Die Sensibilisierung wie auch die Erregung von Nozizeptoren kommt durch verschiedene Typen von Membranrezeptoren zustande, die entweder direkt Ionenkanäle steuern (ionotrope Rezeptoren bzw. ligandengesteuerte Ionenkanäle) oder über heterotrimere G-Proteine second-messenger-Prozesse induzieren (metabotrope Rezeptoren bzw. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren; GPCR). Ionotrope Rezeptoren bestehen aus membranständigen Proteinuntereinheiten, die extrazelluläre Ligandenbindungsdomänen besitzen und einen Ionenkanal bilden. Ihre Aktivierung führt grundsätzlich zu einer sehr schnellen synaptischen Übertragung eines Stimulus (Bsp.: nikotinischer Acetylcholinrezeptor, ionotrope Glutamat- und GABA- und Glycin-Rezeptoren). Metabotrope Rezeptoren besitzen 7 Transmembrandomänen, eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne und eine intrazelluläre Bindungsstelle für G-Proteine, deren Aktivierung die Leitfähigkeit zellulärer Ionenkanäle direkt oder über zwischengeschaltete Proteine beeinflusst. Diese G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Die α -Untereinheit kann GTP oder GDP binden¹². Im inaktiven Zustand ist GDP gebunden, das durch eine Konformationsänderung nach Aktivierung des GPCR durch seinen Liganden gegen GTP ausgetauscht wird. Die aktive α -Untereinheit bindet an ein Effektor-Enzym auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Plasmamembran. Durch seine intrinsische Hydrolyseaktivität wird GTP zu GDP hydrolysiert und die α -Untereinheit wieder in ihre inaktive Form überführt. Die Mitglieder der G-Proteinfamilie werden aufgrund ihrer α -Untereinheiten in drei Kategorien eingeteilt¹³: 1) Stimulierende G-Proteine (G_s) aktivieren die Adenylatzyklase (AC), welche die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. cAMP aktiviert Proteinkinasen, insbesondere die Proteinkinase A (PKA), die wiederum Ionenkanäle phosphoryliert und deren Leitfähigkeit beeinflusst (Bsp.: nach Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors durch Adrenalin). 2) Inhibitorische G-Proteine (G_i) hemmen die AC (Bsp.: nach Aktivierung des $GABA_B$ -Rezeptors durch GABA oder des α -adrenergen Rezeptors durch Noradrenalin). 3) Andere G-Proteine (G_o) aktivieren Enzyme des Phospholipid-Stoffwechsels wie die Phospholipase C (siehe 1.2.1) oder die Phospholipase A_2 , welche durch Hydrolyse von Phosphoinositol in der Plasmamembran Arachidonsäure (AA) freisetzt. AA wird sehr verschieden metabolisiert. Cyclooxygenasen katalysieren die Bildung von

Prostaglandinen aus AA, 5-Lipoxygenasen bilden Leukotriene und durch 12-Lipoxygenasen werden weitere Eicosatriensäuren hergestellt. Einige AA-Metabolite aktivieren wiederum G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren².

Neurotransmitter können je nach Ausstattung der Nervenendigung oder der Synapse sowohl ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren aktivieren (Bsp.: Purine und 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin)). Eine Auflistung der für die Nozizeptoraktivierung und –sensibilisierung wichtigsten Transmitter sowie ihrer Rezeptoren enthält Tabelle 1.2.

Neurotransmitter	Ionotroper Rezeptor	Metabotroper Rezeptor	G-Prot.	Effekt auf Nozizeptoren
Kleine Moleküle				
Protonen	ASICs, TRPV1	-	-	Aktivierung und Sensibilisierung. ¹⁴
Acetylcholin	nikotinischer AChR	muskarinischer AChR	Gi	Aktivierung und z.T. auch Desensibilisierung. ¹⁵
ATP	P2X	P2Y	Gi	Sensibilisierung. ¹⁶
Biogene Amine und Aminosäuren				
Noradrenalin	-	$\alpha_{1,2}$	Go, Gi	Spontanaktivität nach Nervenschädigung.
Serotonin (5-HT)	5-HT ₃	5-HT _{1,2,4}	Gi, Go, Gs	Aktivierung.
Histamine	-	H _{1,2}	Go, Gs	Aktivierung.
GABA	GABA _{A,C}	GABA _B	Gi	Hemmung von Neuronen im Rückenmark und Gehirn.
Glutamat	AMPA, NMDA	Kainat, metabotroper GluR	Go, Gs	Aktivierung von Neuronen im Rückenmark und Gehirn. ¹⁷
Peptide				
Substanz P	-	NK1	Go	Plasmaextravasation; Sensibilisierung. ¹
Neurokinin A	-	NK2	Go	Sensibilisierung.
Bradykinin	-	BK1,2	Go	Aktivierung und Sensibilisierung. ¹⁸
CGRP	-	CRLR/RAMP1	Gs, Go	Vasodilatation; Sensibilisierung. ^{1,19}
Neuropeptid Y	-	NPY _{1-5}}	Gi, Go	Sensibilisierung. ²⁰
Endorphine	-	μ	Gi	Hemmung von Neuronen im Rückenmark und Gehirn.
Dynorphine	-	κ	Gi	Dynorphin kann die synaptische Sensibilisierung auch verstärken! ²¹
Enkephaline	-	δ, μ	Gi	
Arachidonsäure-Derivate				
Prostaglandine (PGE ₂)	-	EP1-4	Gs	Aktivierung und Sensibilisierung. ²²
Leukotriene (LTB ₄)	-	BLTR	Gs	Sensibilisierung.
Anandamid	TRPV1	CB _{1,2}	Gi	CGRP-Ausschüttung via TRPV1. ²³

Tab.1.2: Aktivierung und Sensibilisierung von Nozizeptoren durch die Wirkung von Neurotransmittern auf ionotrope und metabotrope Rezeptoren. ASICs = acid sensing ion channels; CRLR = calcitonin-receptor-like receptor; RAMP = receptor-activity-modifying protein; Gi, Go, Gs siehe Text.

1.2 Calciumkanäle und Schmerz

1.2.1 Calcium als Botenstoff

Calciumionen (Ca^{2+}) sind wichtige Botenstoffe im Innern aller Zellen des Organismus. Sie regulieren eine Vielfalt von zellulären Funktionen wie Befruchtung und Entwicklung, Proliferation, Sekretion, Stoffwechsel, Muskelkontraktion, Genexpression, Zellzyklus und vermitteln auch Apoptose. Im Cytoplasma ist die Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit $0,1 \mu\text{M}$ ungefähr 10000fach geringer als im Extrazellulärraum, dem Blut oder intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien). Bei einem transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ koppelt Ca^{2+} als zweiter Botenstoff (second messenger) die Rezeptoraktivierung an zelluläre Prozesse. Eukaryontische Zellen können die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über zwei Wege erhöhen:

- 1) durch Freisetzung von kompartimentiertem Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Dieser Mechanismus geht von einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (aktivieren $\text{PLC}\beta$) oder Rezeptortyrosinkinasen (aktivieren $\text{PLC}\gamma$) aus. PLC spaltet Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) in Inosit-1,4,5-Trisphosphat ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) und Diacylglycerol (DAG). $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induziert die Ca^{2+} -Freisetzung über den Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor ($\text{InsP}_3\text{-R}$)²⁴. Die Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern ist im allgemeinen transient und nach einigen Sekunden vollständig deaktiviert. Das DAG stimuliert diverse Isoenzyme der Proteinkinase C (PKC).
- 2) durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum über die Plasmamembran²⁵. Der Ca^{2+} -Einstrom entlang seines Konzentrationsgefälles in das Cytoplasma kann durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle oder durch spannungsunabhängige Kationenkanäle erfolgen.

1.2.2 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Den spannungsgesteuerten Calciumkanälen (VGCCs, voltage-gated Ca^{2+} channels) kommt im Zusammenhang mit Schmerz eine besondere Bedeutung zu. Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle werden von erregbaren Zellen wie Neuronen, Muskel- oder endokrinen Zellen exprimiert und übertragen ein Aktionspotential in einen Ca^{2+} -Puls^{26,27}. Sie werden aufgrund ihrer Spannungssensitivität, ihrer

Aktivierungskinetik und ihrem pharmakologischen Profil in verschiedene Kategorien eingeteilt: L-Typ („l“onglasting, langanhaltender Strom), T-Typ („t“ransient, geringer Strom), N-Typ („n“either L oder T, in „N“euronen), P/Q-Typ (in „P“urkinje-Zellen des Cerebellum) und R-Typ („r“emaining) VGCCs.

Die Aktivierung von L-, P-, Q- und N-Typ Calciumkanälen durch verschiedene Stimuli in Spinalneuronen ist an der Wahrnehmung von akutem Schmerz, der Hyperalgesie und der Allodynie beteiligt. Am besten untersucht sind N-Typ Calciumkanäle, die an präsynaptischen nozizeptiven Nervenendigungen lokalisiert sind und die Ausschüttung von Substanz P und Glutamat erhöhen²⁸. Sie können spezifisch u.a. durch ω -Conotoxine (GVIA oder MVIIA) blockiert werden²⁹.

Durch ω -Conotoxine können diese Kanäle eindeutig identifiziert und ihre physiologische Bedeutung bei der Freisetzung von Neurotransmittern aufgeklärt werden. In den vergangenen Jahren haben Untersuchungen der Schmerzwahrnehmung an Ratten die Theorie bestätigt, dass ω -Conotoxine das Potential haben, die Schmerzweiterleitung zu unterbrechen. Die Injektion von winzigen Mengen ω -Conotoxin in die Rückenmarksflüssigkeit von Versuchstieren bewirkt eine deutliche Reduktion der Schmerzempfindlichkeit, die auch bei kontinuierlicher Anwendung nicht nachlässt. ω -Conotoxin wird seit kurzem zur Schmerzlinderung bei Krebs- und Aids-Patienten, sowie bei Patienten mit Phantomschmerzen nach Amputationen und solchen mit Rückenmarksverletzungen eingesetzt. Dazu wird ein Infusionskatheter zwischen zwei Lendenwirbeln in den Subarachnoidalraum eingeführt (intrathekale Infusion). Durch Infusion von ω -Conotoxin in die Rückenmarksflüssigkeit werden die N-Typ Ca^{2+} -Kanäle in den Synapsen der Nozizeptoren blockiert, und die Schmerzweiterleitung wird unterbrochen. Die Ergebnisse klingen erfolgversprechend, da aufgrund der hohen Spezifität nur wenig Nebenwirkungen (leichter Blutdruckabfall) beobachtet werden^{30,31}. Das ω -Conotoxin MVIIA (Ziconotide) ist seit 2003 als Schmerzmedikament zugelassen^{32,33}.

Wie N-Typ Ca^{2+} -Kanäle kommen auch P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle präsynaptisch an glutamatergen Neuronen vor. P/Q-Typ-Blocker wie ω -Agatoxin IVA können Schmerzen inhibieren, die durch die Stimulation glutamaterger Fasern hervorgerufen

werden. Eine Ausnahme sind Schmerzen, die durch den Glutamat-Rezeptor-Agonisten NMDA²⁸ induziert werden.

L-Typ Ca^{2+} -Kanäle sind postsynaptisch lokalisiert, wo sie die durch Substanz P hervorgerufene Neurotransmission verstärken²⁸. L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten sind in der Lage, Schmerzlinderung durch κ -Opioid-Agonisten zu potenzieren und die Induktion von Opioidtoleranz zu unterbinden³⁴.

1.2.3 Spannungsunabhängige Calciumkanäle

Zu den spannungsunabhängigen Kationenkanälen gehören ligandengesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (LGCCs, ligand-gated Ca^{2+} channels), second messenger-gesteuerte (SMOCs, second messenger-operated channels) und Speicher-vermittelte regulierte (SOCs, store-operated channels) Ionenkanäle. LGCCs werden sowohl in erregbaren wie nicht-erregbaren Zellen exprimiert und durch Bindung eines extrazellulären Agonisten geöffnet³⁵⁻³⁷. Die SMOCs werden durch Bindung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe aktiviert. Hierzu gehören der Ryanodin- Rezeptor (RyR) und der InsP_3 -R, die die Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (sarcoplasmatischem und endoplasmatischem Retikulum) kontrollieren.

SOCs sind definiert als Kanäle, die nach einem Abfall der Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des ER geöffnet werden³⁸⁻⁴⁰. Eine Aktivierung durch entleerte Calcium-Speicher wird für die TRPC-Subfamilie der TRP-Kanäle diskutiert⁴¹.

Die Entdeckung der *transient receptor potential* (TRP-) Familie von Ionenkanalproteinen, einer neuen Klasse von Calcium-permeablen Kationenkanälen, führte zu einem erweiterten Verständnis von Signalübertragungsmechanismen auf molekularer Ebene, die in vielen verschiedenen Zellarten durch Ca^{2+} -Einstrom reguliert werden⁴²⁻⁴⁴. Auf der Suche nach neuen Medikamenten gegen Schmerzen, insbesondere gegen chronische Schmerzen, sind in den letzten Jahren die nicht-selektiven Calciumkanäle der TRP-Familie zunehmend in den Vordergrund gerückt. Als Zielproteine für die Entwicklung neuartiger und nebenwirkungsfreier Schmerzmedikamente sind innerhalb dieser Familie besonders die thermosensitiven TRP-Kanäle vielversprechende Kandidaten. Sie werden in den folgenden Kapiteln näher vorgestellt.

1.3 Die Familie der TRP-Kanäle

TRP-Kanäle werden in Vertebraten und Invertebraten sowohl in erregbaren wie nicht-erregbaren Zellen exprimiert. Sie üben eine wichtige Funktion in primären Signalwegen für den regulierten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle aus.

Der erste TRP-Kanal wurde 1969 im Zusammenhang mit der visuellen Wahrnehmung, einem PLC-abhängigem Vorgang, bei *Drosophila melanogaster* beschrieben⁴⁵ und 1989 identifiziert⁴⁶. Eine Mutation des *trp*-Gens im Signaltransduktionskomplex von Photorezeptoren führt nur zu einem transienten Rezeptorpotential als Antwort auf einen kontinuierlichen Lichtreiz, die Mutanten mit nicht-funktionellen TRP-Kanälen sind blind. Drei Gene (TRP, TRPL und TRP γ) codieren in *Drosophila* für TRP-Kanäle, die bei der visuellen Wahrnehmung und noch unbekannt Funktionen eine Rolle spielen⁴⁷.

Im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen wurden neue TRP-Kanäle generell über Sequenzhomologien identifiziert und nicht durch Liganden oder Selektivität, weil ihre Funktionen grundverschieden und oft unbekannt sind. Die TRP-Familie umfasst bei Säugetieren und *C. elegans* mittlerweile 22 Mitglieder, die in vier Subfamilien eingeteilt werden können: die klassischen TRP-Kanäle mit sieben Mitgliedern (TRPC, „classic“ oder „canonical-like“ TRP), die Vanilloid-Rezeptor-ähnlichen TRP-Kanäle mit sechs Mitgliedern (TRPV, „vanilloid“ TRP), die Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle (TRPM, „melastatin“ TRP) mit acht Mitgliedern und ANKTM1 (TRPA, „ankyrin-repeat“ TRP)⁴⁸. Bezieht man die Gene für polycystische Nierenerkrankungs-Proteine (PKD, TRPP; polycystic kidney disease proteins) und Mucolipine (TRPML) mit ein, erhöht sich die Zahl auf 6 Familien und über 30 Mitglieder (Abb. 1.4).

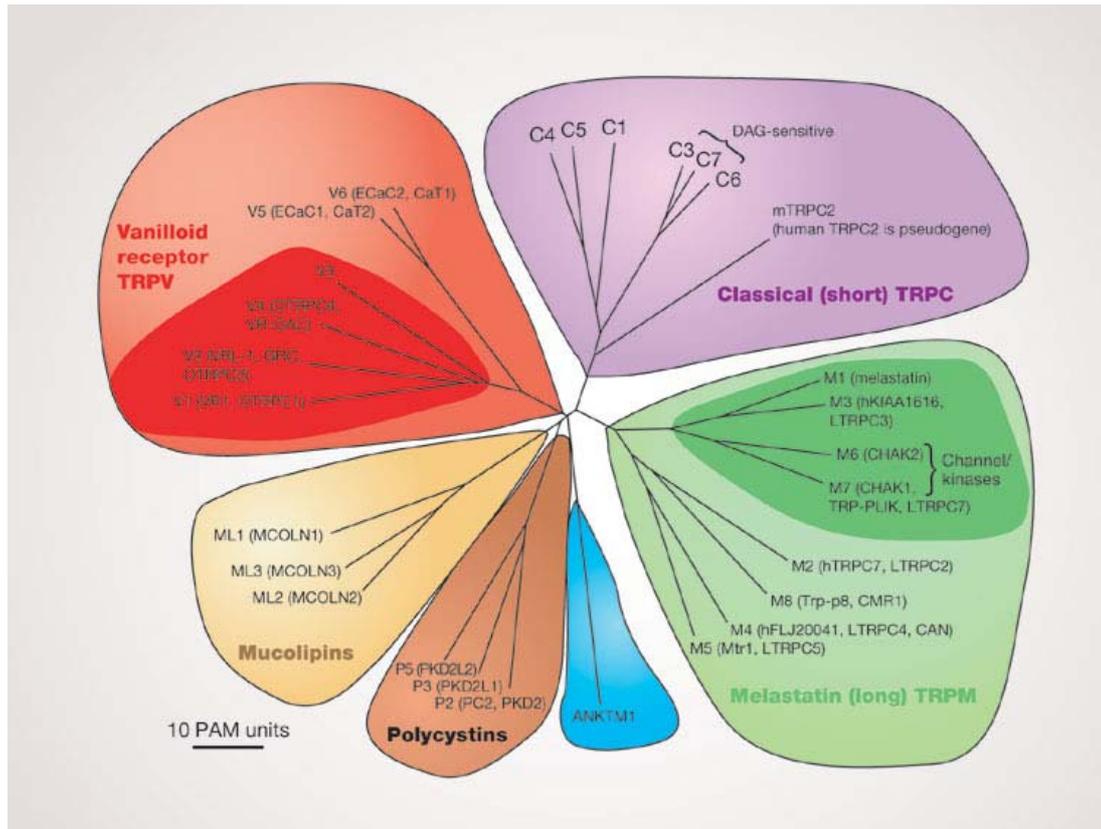


Abb. 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Familie⁴⁹. Die evolutionäre Distanz wird angegeben durch die Zweiglänge. Sie hat die Einheit „point accepted mutations“ (PAM) und wird bestimmt durch die durchschnittliche Anzahl von Substitutionen pro 100 Resten.

1.3.1 Struktur von TRP-Kanälen

Durch die Analyse der Primärstruktur von TRP-Kanälen lassen sich jeweils sechs Transmembransequenzen (6TM) mit einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6 und ein jeweils cytoplasmatisch lokalisierter C- und N-Terminus vorhersagen⁴⁶. Diese Topologie spiegelt die Architektur bekannter Ionenkanäle wider, wie die spannungsgesteuerter Kalium-, Natrium- und Calciumkanäle, durch Hyperpolarisation und/oder cyclische Nukleotide gesteuerter Kanäle (CNG, cyclic nucleotide gated channels; HCN, hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels) und der polycystischen Nierenerkrankungs-Proteine (PKD)^{41,50}.

Gemeinsamkeiten der Mitglieder der TRP-Familie bestehen hauptsächlich in Strukturähnlichkeiten der 6TMs, während die Gesamtsequenzidentität zwischen einzelnen Mitgliedern in einigen Fällen bei nur 20% liegt. Ein weiteres Merkmal ist

ein TRP-Motiv mit einer Länge von 25 Aminosäuren mit einer TRP-Box (EWKFAR) C-terminal zu TM6, die ausschließlich bei den TRPC-Kanälen vorkommt. Innerhalb des cytoplasmatischen N-Terminus von TRPA-, TRPC- und TRPV-Kanälen liegen Ankyrin-Wiederholungssequenzen, während TRPC- und TRPM-Kanäle Prolin-reiche Regionen direkt hinter TM6 aufweisen.

Von den Bakterien über die höheren Pflanzen bis zu den Säugetieren werden Ionenkanäle mit 6TM benutzt, um bestimmte Stimuli wahrzunehmen und auf sie zu reagieren. In Analogie zu den Kaliumkanälen⁵¹ wird angenommen, dass TRP-Kanäle Homo- oder Heterotetramere bilden, die eine zentrale Pore umgeben. Das „Gate“ und der Selektivitätsfilter werden vermutlich von der Region TM5-Porenschleife-TM6 im Innern des Kanals geformt⁴⁹. Eine Darstellung der Topologie ist in Abb. 1.5 enthalten.

1.3.2 Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle

Alle TRP-Kanäle sind durchlässig für monovalente Kationen und für Ca^{2+} und Mg^{2+} . Sie sind nicht-selektiv mit $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \leq 10$. Ausnahmen bilden TRPM4 und TRPM5, die ausschließlich selektiv für monovalente Kationen, und TRPV5 und TRPV6, die nur für Ca^{2+} mit $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ durchlässig sind⁴⁹.

Sie zeigen keine Spannungsabhängigkeit im Gegensatz zu spannungsabhängigen Calcium- oder Natriumkanälen, sondern depolarisieren die Zellen vom Ruhepotential (meistens -70 mV in Säugerzellen) auf 0 mV. Sie erhöhen somit die intrazelluläre Ca^{2+} - und/oder Na^+ -Konzentration. Eine Gemeinsamkeit der TRP-Kanäle ist ihre Aktivierung oder Modulation durch Substanzen des Phosphatidylinositol-Signaltransduktionsweges (siehe 1.2.1).

Eine Auflistung aller TRP-Kanäle mit ihren bekannten Funktionen, Interaktionspartnern und Aktivierungsmechanismen gibt Tabelle 1.3.:

TRP	Funktion	Interaktoren	Agonisten/Aktivierung	P_{Ca}/P_{Na}
A1 (ANKTM1)	Detektion noxischer Kälte		$T \leq 17^\circ\text{C}$, potenziert durch Icilin; DAG, AA	$1,4 P_{Ca} \approx P_{Mg}$
C1-7	vielfältig z.B. ZNS, Vasoregulation, Morphologie des Wachstumskegel, Atmungsregulation	bilden definierte Heteromere; Calmodulin; PLC β ; IP3-R; Calveolin-1; G $\alpha_{q/11}$; PMCA	GPCR; Speicher-reguliert und/oder DAG?	C1: < 10 C2: 1,6 C3, C4: ~ 1 C6: 5 C7: ~ 0,5
V1 (VR1)	Detektion von Hitze; Nozizeption; inflammatorische thermische Hyperalgesie; Ausdehnung der Blase	TRPV3; Calmodulin; β -Tubulin	$T \geq 42^\circ\text{C}$, Capsaicin; RTX, NADA, Anandamid, H ⁺ , Ethanol, PIP ₂ , PKC	10 ($P_{Mg}/P_{Ca} \approx 5$)
V2 (VRL-1;GRC)	Detektion noxischer Hitze; Nozizeption; Muskeldegeneration?		$T \geq 52^\circ\text{C}$, IGF-1 (Maus)	3
V3 (VRL-3)	Detektion moderater Wärme; Nozizeption?	TRPV1	$T > 33^\circ\text{C}$	~ 10
V4 (VR-OAC)	ZNS; Druck- und osmotische Detektion; Detektion moderater Wärme; Nozizeption	Calmodulin; Kinasen der Src-Familie	Hypo-Osmolarität, $T > 24^\circ\text{C}$, Phorbol ester, Anandamid, AA; Epoxyeicosatriensäure	6
V5 (CaT2)	Ca ²⁺ -Aufnahme Niere, Darm?	TRPV6; Annexin2	konstitutiv	> 100
V6 (CaT1)	Ca ²⁺ -Aufnahme Darm?	TRPV5; Annexin2	konstitutiv	> 100
M1 (MLSN)			Translokation?	
M2	Sensor für oxidativen Stress?		ADP-Ribose, NAD, H ₂ O ₂ ?	~ 0,3
M3	Ca ²⁺ -Aufnahme in Niere?			1,6
M4			[Ca ²⁺] _i	< 0,05
M5 (Mtr1)	Geschmack (süß, bitter, umami)		T1R, T2R-G _{gus} -PLC β 2, [Ca ²⁺] _i	< 0,05
M6 (CHAK2)	Mg ²⁺ -Aufnahme in Niere, Darm?			
M7 (TRP-PLIK)	zelluläres Mg ²⁺ -Gleichgewicht?	PLCB1-3; PLC γ	PIP ₂ , Mg ²⁺ -ATP	0,3
M8 (CMR1)	Detektion noxischer Kälte; Nozizeption; Krebs?		$T \leq 25^\circ\text{C}$, potenziert durch Menthol, Eukalyptol, Icilin	1-3

Tab. 1.3: Charakteristische Eigenschaften der TRP-Kanäle. Thermosensitive TRP-Kanäle sind farbig hervorgehoben (TRPV1-4, TRPA1 und TRPM8). P_{Ca}/P_{Na} : Verhältnis Ca²⁺- zu Na⁺-Permeabilität. Adaptiert^{49,52,53}.

1.4 Thermosensitive TRP-Kanäle

Sensorische Fasern zeigen verschiedene Antworten auf thermische Reize und wurden auf der Basis ihrer Temperaturschwelle klassifiziert. C- und A δ ₁-Fasern antworten bei einer Temperatur > 43°C, die seltenere Klasse der A δ ₂-Fasern erst bei > 52°C³. Ab einer Temperatur von > 42°C nehmen wir Hitze als schmerzhaft wahr. Ein chemischer Stoff, der zur Aktivierung von C- und A δ -Fasern führt und das Gefühl von brennendem Schmerz vermittelt, ist das Capsaicin. Das Vanilloid Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-6-noneamid) ist der scharf schmeckende Inhaltsstoff aus Chilischoten. Es verursacht eine Depolarisation der Neuronen durch den Einstrom von Natrium- und Calciumionen und wurde als Marker für nozizeptive Fasern verwendet⁵⁴⁻⁵⁶.

Die Entdeckung des Capsaicin-Rezeptors (Vanilloid-Rezeptor 1, VR1⁴⁸) als ersten thermosensitiven Kanal führte zu einem neuen Grundverständnis der molekularen Grundlagen der Detektion von thermischen und chemischen Reizen⁵⁷. Aufgrund hoher Sequenzhomologien zu den TRP-Kanälen wurde VR1 als erster Vertreter einer neuen Subfamilie als TRPV1 bezeichnet. Mittlerweile sind sechs thermosensitive TRP-Kanäle bekannt^{53,58} (Abb. 1.5). Die Wahrnehmung von schmerzhafter Hitze wird durch die beiden Hitzerezeptoren TRPV1 und TRPV2 vermittelt. Für das Überleben des Organismus ist aber auch die Wahrnehmung moderater, nicht-schmerzhafter Wärme (34-42°C) wichtig, die von spezialisierten sensorischen Fasern, die die Haut, Zunge und Nase innervieren, vermittelt wird⁵⁹⁻⁶¹. Hierfür sind die Wärmerezeptoren TRPV3 und TRPV4 verantwortlich. Kälte wird über die kürzlich identifizierten Kälterezeptoren TRPM8 (nicht-schmerzhaft Kälte < 25°C) und TRPA1 (schmerzhaft Kälte < 17°C) vermittelt.

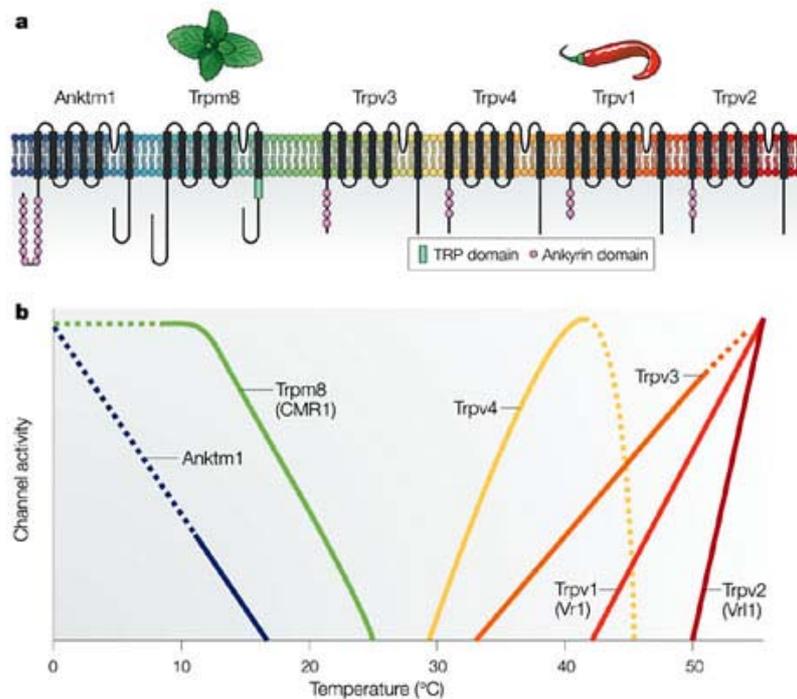


Abb. 1.5: Topologie und Temperaturschwellen thermosensitiver TRP-Kanäle⁵³. a) TRP-Kanäle besitzen sechs Transmembransequenzen und cytoplasmatisch lokalisierte C- und N-Termini. Einige TRP-Kanäle haben variable Ankyrin-ähnliche Wiederholungen oder eine konservierte TRP-Domäne. b) TRP-Kanäle detektieren Temperaturen von noxischer Kälte bis noxischer Hitze. Die kühlende Substanz Menthol und das scharf schmeckende Capsaicin agieren als nicht-thermische Aktivatoren von TRPM8 und TRPV1. Die Darstellung der Aktivierungsschwellen und die maximale Aktivierung basiert auf Daten in heterologen Expressionssystemen. Unsicherheiten werden durch die gestrichelte Linie dargestellt.

1.4.1 Hitzerezeptoren: Der Vanilloid-Rezeptor 1 (TRPV1) und das Vanilloid-Rezeptor-ähnliche Protein 1 (TRPV2)

TRPV1 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal und wird überwiegend in primären sensorischen Neuronen exprimiert, die an der Nozizeption beteiligt sind. Er wurde aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch das Vanilloid Capsaicin entdeckt und mittels einer cDNA-Bibliothek aus sensorischen Neuronen der Hinterwurzel- und Trigeminal-Ganglien der Ratte kloniert⁵⁷. Dazu wurden ein Expressionsklonierungsansatz und die Calcium-Imaging-Technik benutzt. Nach Expression der cDNA-Bibliothek in HEK293-Zellen und der Aktivierung durch Capsaicin führte die Detektion eines Calciumeinstromes in die Zellen zur Identifizierung einer funktionellen cDNA, die für den Capsaicin-Rezeptor codiert. TRPV1 wird auch durch noxische Hitze $\geq 42^{\circ}\text{C}$ und Protonen aktiviert^{57,62}. Capsaicin aktiviert den Kanal bei einer halbmaximalen effektiven Konzentration von $\text{EC}_{50} \approx 711 \text{ nM}$. Resiniferatoxin (RTX), ein Inhaltsstoff einiger Wolfsmilchgewächse (*Euphorbia resinifera*), aktiviert TRPV1 bei $\text{EC}_{50} \approx 40 \text{ nM}$ und ist somit ein noch stärkerer Agonist als Capsaicin⁵⁷. Dagegen wird TRPV1 durch die Antagonisten Capsazepin und Iodo-Resiniferatoxin sowie durch den Ionenkanalblocker Ruthenium Rot inhibiert.

Protonen können die Hitzeantwort von TRPV1 potenzieren, womit gezeigt wurde, dass der Kanal als molekularer Integrator schmerzhafter Stimuli funktioniert⁶³. In heterologen Expressionssystemen wird der Kanal bei wiederholten Hitze-Stimuli schon bei geringeren Temperaturen aktiviert⁶⁴. In funktionellen Studien mit *Trpv1*^{-/-} Mäusen wurde seine Rolle als Sensor chemischer und thermischer Stimuli bestätigt, da die in kultivierten Neuronen aus *Trpv1*^{-/-} Mäusen durch Hitze ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) und Capsaicin hervorgerufenen Ströme völlig fehlten, während die hochschwellige Hitzeantwort ($> 55^{\circ}\text{C}$) unverändert blieb^{65,66}. *In vivo*-Studien an *Trpv1*^{-/-} Mäusen zeigten jedoch nur geringe Unterschiede bei milden schmerzhaften Reizen ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) und eine reduzierte Schmerzsensitivität bei Temperaturen über 50°C , was für eine Kompensation durch andere Rezeptoren spricht. Andererseits könnte die zur Generierung eines Aktionspotentials notwendige Temperaturschwelle *in vitro* geringer sein als *in vivo*⁶⁷. Die durch Entzündung hervorgerufene thermische

Hyperalgesie war allerdings drastisch reduziert, womit die Beteiligung von TRPV1 am Schmerzgeschehen eindeutig bewiesen wurde.

Tatsächlich wird die Aktivität von TRPV1 durch eine Reihe von Substanzen beeinflusst, die bei der Entzündung eine Rolle spielen, wie z.B. durch einen milden Anstieg der Protonen-Konzentration, NGF, Bradykinin, Lipide, Prostaglandine, PKA und PKC und ATP^{18,63,68-76}. NGF und Bradykinin potenzieren die Aktivierung von TRPV1 durch die Modulation des intrazellulären PtdIns(4,5)P₂. PtdIns(4,5)P₂ inhibiert die Öffnung des Kanals durch die Interaktion mit einer C-terminalen Region von TRPV1⁷⁷. Als Antwort auf die Stimulation mit NGF wird der TRPV1-Gehalt in der Haut um 25% erhöht, während er in den zentralen Nervenendigungen konstant bleibt. Dies spricht dafür, dass die Expression von TRPV1 durch komplexe posttranskriptionale Signalwege reguliert wird.

TRPV1 wird auch im Gehirn exprimiert, was für das Vorhandensein eines endogenen Liganden des Kanals spricht. So kann TRPV1 durch das Endocannabinoid Anandamid aktiviert werden^{72,78}. Anandamid ist ein Ligand der beiden G-Protein-gekoppelten Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂, die in unbekannter Weise mit TRPV1 interagieren^{23,79,80}. Außer Anandamid wurden noch weitere endogene Liganden für TRPV1 im Gehirn gefunden, nämlich *N*-Arachidonyldopamin (NADA)⁸¹ und *N*-Oleoyldopamin (OLDA)⁸², sowie einige Lipoxygenase-Produkte der Arachidonsäure (12-HPETE und 15-HPETE, Hydroperoxyeicosatetraensäuren)⁷⁰, die den Kanal aktivieren. Die Strukturformeln der Agonisten sowie Antagonisten von TRPV1 sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

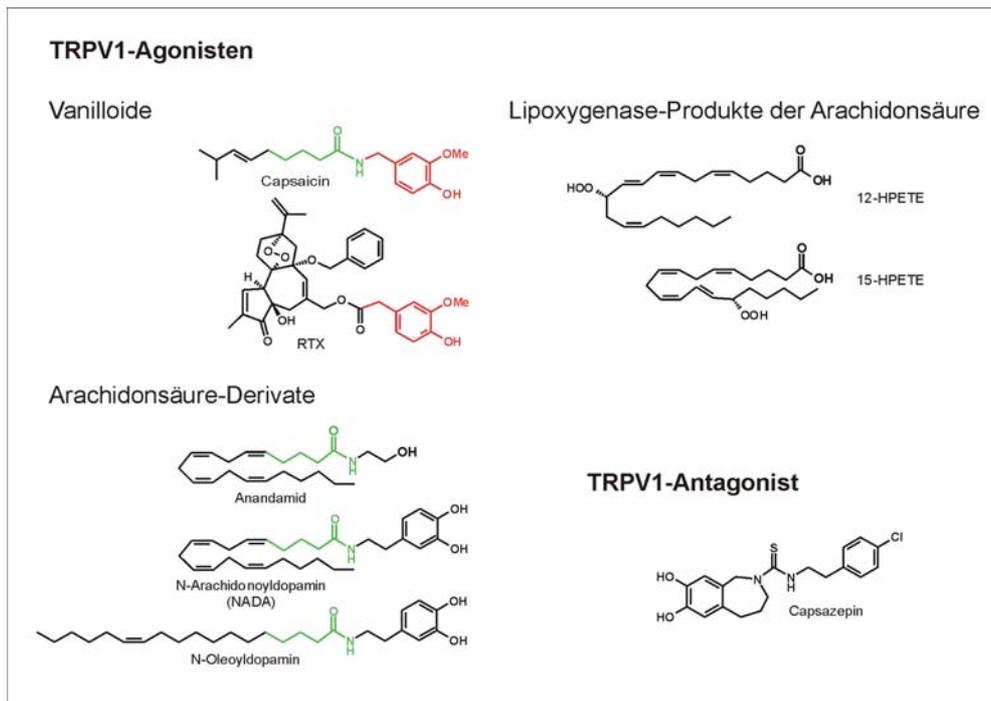


Abb. 1.6: Strukturformeln von TRPV1-Agonisten und des TRPV1-Antagonisten Capsazepin.

Die potentesten Agonisten von TRPV1 sind das Fettsäureamid Capsaicin und Resiniferatoxin (RTX). Beide tragen eine 3-Methoxy-4-hydroxy-benzylamin-gruppe (Vanillyl-Struktur, rot). Weniger potent sind endogene TRPV1-Agonisten wie Arachidonsäure (AA)-Derivate und Lipoxygenase-Produkte der AA, sie besitzen keine Vanillyl-Struktur. HPETE = Hydroperoxyeicosatetraensäure.

Weitere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass TRPV1 nicht nur als Thermosensor fungiert, sondern in diversen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt, die nicht unbedingt mit der Nozizeption als Antwort auf Gewebeschäden zusammenhängen. Für TRPV1 wird zunehmend neben der Expression in sensorischen Fasern⁸³ und distinkten Gehirnregionen^{83,84} die Expression in neuronalen Fasern, die bestimmte Organe innervieren (Blase⁸⁵, Prostata⁸⁶, Lunge⁸⁷, gastrointestinalem Trakt⁸⁸ und Zahnhals⁸⁹) sowie auch überraschenderweise die Expression in nicht-neuronalem Gewebe wie Keratinozyten der Epidermis⁹⁰, Blasenurothel- und glatten Muskelzellen⁹¹, Leber⁹², Granulozyten⁹³ und Makrophagen⁹⁴ gezeigt. *Trpv1*^{-/-} Mäuse zeigen deutliche Blasenfunktionsstörungen und die durch Dehnung hervorgerufene Purinausschüttung aus Urothelzellen ist unterbrochen⁹⁵.

Die cDNA des Vanilloid-Rezeptor-ähnlichen Proteins 1 (TRPV2) wurde durch die systematische EST-Datenbanksuche homologer Sequenzen zu TRPV1 isoliert⁹⁶. TRPV2 und TRPV1 besitzen eine Sequenzidentität von 50%. Funktionsanalysen zeigten, dass TRPV2 weder auf Capsaicin, niedrigen pH noch moderate Hitze reagiert, sondern erst bei Temperaturen über 52°C aktiviert wird⁹⁶. Wiederholte Hitzestimuli sensibilisieren den Kanal, was sich durch eine geringere Aktivierungstemperatur bemerkbar macht. Diese Sensibilisierung kann nicht durch Reize unterhalb des Schwellenwertes von 52°C erreicht werden⁹⁶. TRPV2 wird im Gegensatz zu TRPV1 in mittleren bis großen DRG-Neuronen, im Rückenmark, im Gehirn sowie in Motoneuronen und verschiedenen nicht-neuronalen Geweben exprimiert⁹⁶⁻⁹⁸. 14% der Zellkörper in den Trigeminal-Ganglien zeigen TRPV2-Immunreaktivität⁹⁹. Es wird angenommen, dass TRPV2 der molekulare Überträger der hochschwelligeren, leicht myelinisierten A δ -Fasern ist. Zusätzlich wurde TRPV2 in Zahnhals-innervierenden Neuronen und in Gingival-Neuronen gefunden¹⁰⁰. Coexpression mit TRPV1 wurde kaum gefunden. In Northern Blot Analysen wurde die Expression eines 2.5-kb *Trpv2*-Transkriptes in sensorischen Ganglien und im Rückenmark der Ratte sowie in Lunge, Milz, Eingeweiden und multiplen Gehirnregionen nachgewiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass TRPV2 in nicht-neuronalem Gewebe wahrscheinlich auf andere Stimuli als Hitze reagiert. Ein endogener Ligand für TRPV2 ist nicht bekannt.

Eine Eigenschaft des TRPV2 der Maus, welcher zuvor als ein Ca²⁺-permeabler Kanal in der Milz der Maus entdeckt wurde (GRC, growth-factor-regulated channel), ist die Regulation durch Insulin-Wachstumsfaktor 1 (IGF-1). IGF-1 bewirkt eine Translokation von intrazellulären Membranen zur Plasmamembran, wo GRC bei Raumtemperatur konstitutiv aktiv vorliegt⁹⁷. Die Beziehung zum TRPV2 von Ratte oder Mensch ist dabei unklar. Diese Daten konnten allerdings bei einer Studie zur vesikulären Translokation von TRP-Kanälen nicht reproduziert werden¹⁰¹.

1.4.2 Wärmerezeptoren: TRPV3 und TRPV4

TRPV3 wurde durch Sequenzähnlichkeiten zu Hitze-aktivierten TRP-Kanälen kloniert und ist zu 40% identisch mit TRPV1¹⁰²⁻¹⁰⁴. In heterologen Expressionssystemen zeigte TRPV3 eine Aktivierungstemperatur von ~34-38°C mit steigender Stromantwort bei höheren noxischen Temperaturen. Er wird also durch moderate Wärme und Hitze aktiviert. Bei wiederholten Hitze-Stimuli sensibilisiert der Kanal im Gegensatz zu TRPV1 merklich^{102,104}. Er könnte somit als Warnsignal gegen potentiell gewebeschädigende Reize für den Körper dienen. TRPV3 ist insensitive gegenüber Capsaicin und wurde neben TRPV1 in DRG-Neuronen gefunden. Werden beide heterolog coexprimiert, so ist der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Behandlung mit Capsaicin geringer als der durch TRPV1 allein verursachte Einstrom. Ergebnisse von Co-Immünpräzipitationen deuten darauf hin, dass TRPV1 und TRPV3 zur Bildung von Heteromeren fähig sind. Somit könnte TRPV3 die TRPV1-Antworten modulieren und als eine zusätzliche TRPV1-Untereinheit bei der Formation eines heteromeren Vanilloid-Rezeptor-Kanals involviert sein¹⁰³. Allerdings gibt es bezüglich des Expressionsprofils von TRPV3 in sensorischen Neuronen von Primaten und Nagetieren Differenzen, die eine Variabilität zwischen verschiedenen Spezies nahe legen⁵³.

Der zweite Wärmekanal, TRPV4, mit einer ~ 50%igen Sequenzidentität zu TRPV1 wurde zunächst als Osmolaritäts-Sensor identifiziert^{105,106}. Eine durch hypotones Medium induzierte Schwellung der Zelle führt zur Aktivierung des Kanals. Umgekehrt wird er durch steigende Osmolarität inhibiert. Eine plötzliche Temperaturänderung kann den Kanal auch unabhängig von der Osmolarität aktivieren^{107,108}. Hitze-aktivierte Ströme von heterolog exprimiertem TRPV4 wurden erst bei einer Temperatur von ~ 27-34°C detektiert. Eine anhaltende Temperatur von > 43° resultiert in einer abnehmenden Amplitude des Stromes auch bei steigender Temperatur. Im Gegensatz zu TRPV3 zeigt TRPV4 nach wiederholten Hitzestimuli keine erhöhte Stromantwort. Bisher konnte die Beteiligung von TRPV3 und TRPV4 an der Thermosensation *in vivo* physiologisch noch nicht nachgewiesen werden. Sensorische Neuronen, die spezifisch moderate Wärme unter 40°C detektieren können, wurden bisher ebenfalls noch nicht identifiziert. Unbestritten ist jedenfalls die Expression von TRPV3 und TRPV4 in Hautzellen^{102,104,107}. Zwar tragen

Keratinocyten zur Hyperalgesie durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren nach einer Verletzung bei, ihre direkte Rolle bei der Thermosensation ist jedoch unklar.

1.4.3 Kälterezeptoren: TRPM8 und TRPA1

Ähnlich wie bei den wärmespezifischen sensorischen Fasern, gibt es zwei Klassen kältesensitiver afferenter Fasern. Eine reagiert spezifisch auf moderat kalte, nicht-schmerzhaft Temperaturen, jedoch nicht bei Erwärmung oder starker mechanischer Deformation^{59,109,110}. Eine andere Klasse distinkter kältesensitiver Fasern sind polymodale Nozizeptoren, die auf noxische Kälte reagieren¹¹¹.

Wie bei der Klonierung von TRPV1 durch Capsaicin, das die Wahrnehmung von Hitze hervorruft, machte man sich die kühlende Eigenschaft von Menthol zunutze, um Rezeptoren für Kälte zu finden. Die Identifizierung des Kälte- und Menthol-Rezeptors TRPM8 (CMR1, cold menthol receptor) erfolgte ebenso wie bei TRPV1 mittels Expressionsklonierung und Calcium-Imaging^{112,113}. In heterologen Expressionssystemen wird TRPM8 durch Menthol und Temperaturen zwischen ~ 25 und 30°C aktiviert. Wie im Falle von nativen kältesensitiven Neuronen können unter schwellige Konzentrationen von Menthol die Aktivierungstemperatur zu wärmeren Temperaturen hin verschieben. Dieses Phänomen tritt auch bei TRPV1 unter milden sauren Bedingungen auf. Eine Absenkung des pH verschiebt die Aktivierungstemperatur in einen niedrigeren Bereich⁶³. Andere Aktivatoren von TRPM8 sind Icilin, ein synthetisches Kältemittel, und Eukalyptol. Exprimiert wird der Kanal in Hinterwurzel- und Trigeminalganglien mit kleinem Durchmesser (wahrscheinlich C-Fasern). TRPM8 kann mit keinem bekannten Marker für Nozizeptoren wie CGRP, Substanz P, TRPV1 oder IB4 colokalisiert werden¹¹². Er markiert spezifisch Kälte- und Menthol-sensitive Neurone und ist somit der endogene Mentholrezeptor¹¹⁴. TRPM8 wird auch in der Prostata exprimiert, wobei die Funktion in diesem Organ noch unbekannt ist¹¹⁵.

TRPA1 (ANKTM1: ankyrin-like protein with transmembrane domains 1) wurde zunächst als Teilsequenz in einer subtraktiven cDNA-Bibliothek mit mRNA von normalen menschlichen Fibroblasten und SV40-transformierten Fibroblasten (oncogene Transformation) identifiziert¹¹⁶. Nach Klonierung der vollständigen

cDNA aus Fibroblasten¹¹⁷ konnte die wahrscheinliche Struktur des Proteins eingeteilt werden in einen N-terminalen Bereich, der dem cytoskelettalen Protein Ankyrin ähnlich ist und in einen C-terminalen Bereich mit entfernter Ähnlichkeit zu den TRP-Kanälen. In der N-terminalen Region befinden sich 18 Wiederholungen von je 33 Aminosäuren, 15 davon mit bis zu 50% Homologie zur Consensussequenz der Wiederholungen von Ankyrin-ähnlichen Proteinen. Die C-terminale Region besitzt sechs potentielle TMs und eine Porenschleife. TRPA1 wird bei $\sim 17^{\circ}\text{C}$, einer Temperatur, die bereits als schmerzhaft empfunden wird, aktiviert. Der Kanal wird nicht durch Menthol, aber durch Icilin aktiviert. Die Expression wurde in einer Population von sensorischen Neuronen nachgewiesen, die auch CGRP und Substanz P exprimieren. Interessanterweise wird TRPA1 auch spezifisch in einer Subpopulation von Neuronen zusammen mit dem Hitzerezeptor TRPV1 exprimiert. Zusammen können sie die polymodalen Nozizeptoren ausmachen, die sowohl auf noxische Hitze als auch Kälte reagieren.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass TRPA1 durch eine Reihe natürlicher ‚scharfer‘ Inhaltsstoffe in Zimtöl, Wintergrünöl, Senföl und Ingwer aktiviert wird^{118,119}. Auch Bradykinin aktiviert TRPA1 über seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Gleichzeitig konnte die Beteiligung von Phospholipase C als wichtige Komponente im Signaltransduktionsweg der TRPA1-Aktivierung verifiziert werden^{118,119}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Eine der wichtigsten Herausforderungen der Medizin ist es, neue und wirkungsvolle Medikamente zur Schmerztherapie zu entwickeln. Dies gilt insbesondere für den chronischen Schmerz, dessen molekulare Mechanismen noch kaum verstanden sind. Neue Medikamente können nur entwickelt werden, wenn die Mechanismen der Schmerzwahrnehmung wie die Rezeption von schmerzhaften Reizen und ihre Weiterleitung von peripheren Rezeptoren zum ZNS (Nozizeption) einerseits und die bewusste Wahrnehmung von Schmerz im Gehirn andererseits besser verstanden sind. Bei der Chronifizierung finden wahrscheinlich plastische Veränderungen auf beiden Ebenen statt.

Das BMBF-Leitprojekt „Molekulare Schmerzforschung“ (koordiniert von der Firma Grünenthal), in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, hatte die Identifizierung, Validierung und biochemische Charakterisierung neuer pharmakologischer Zielproteine (Targets) zur Bekämpfung von chronischem Schmerz zum Ziel. Von der Firma Grünenthal wurden zuvor schmerzregulierte Genprodukte auf mRNA-Ebene bei Ratten innerhalb eines Differential Displays identifiziert. Als Vertreter der Proteinchemie in diesem Projektverbund sollte von mir zunächst folgendes Teilprojekt bearbeitet werden:

Proteom-Ansatz zur Identifizierung schmerzregulierter Proteine

Hierbei sollte ein Proteom-Ansatz als komplementäre Strategie zu den auf RNA basierenden Analysemethoden validiert werden. Der methodische Ansatz besteht in der Auftrennung von Rückenmarksproteinen der Ratte nach subzellulärer Fraktionierung (Kontrolltiere und schmerzinduzierte Tiere) mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE), bestehend aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) in der ersten und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in der zweiten Dimension. Kandidatenproteine für schmerzregulierte Genprodukte sollen als Differenzspots auf den Gelen erkennbar sein und mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laserdesorption/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert werden.

Im Laufe meiner Arbeit zeigten neueste Befunde anderer Gruppen deutlich, dass die differenzielle Proteomanalyse besonders von Membranproteinen unter Verwendung der 2DE problematisch ist und es wurden eine Reihe neuer Methoden entwickelt. Wegen des schnellen Methodenfortschrittes in diesem Bereich und da sich der Capsaicin-Rezeptor TRPV1 zu einem wichtigen schmerzrelevanten Target im BMBF-Leitprojekt entwickelte, konzentrierte sich meine Forschungsarbeit entsprechend auf die:

Targetcharakterisierung der thermosensitiven Ionenkanäle TRPV1 und TRPV2

Von der Biochemie der beiden thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1 und TRPV2 ist noch wenig bekannt. Ziele der biochemischen Analysen in dieser Arbeit hinsichtlich der molekularen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften von TRPV1 und TRPV2 waren:

- Klonierung der cDNA beider Ionenkanäle und Etablierung eines geeigneten Expressionssystems
- Aufklärung der subzellulären Lokalisation in einem geeigneten heterologen eukaryotischen Expressionssystem
- Ermittlung der Quartärstruktur im Hinblick auf einen postulierten Signal-Komplex
- Untersuchung posttranslationaler Modifikationen beider Kanäle
- Suche nach Bindungspartnern, die mehr Aufschluss über die funktionellen Eigenschaften und Signalwege von TRPV1 und TRPV2 geben.