Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Campus Benjamin Franklin, der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

Modulation von Schmerz-assoziierten Ionenkanälen durch intrazelluläre Protein-Protein Interaktionen

> zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jessica Peter

aus Hamburg

Datum der Promotion: 02.03.2018

# INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 ABSTRACT	2
3 EINLEITUNG	3
3.1 Nozizeption und Schmerz	3
3.2 Das periphere sensorische Nervensystem	4
3.2.1 Der Nozizeptor	4
3.2.2 Anatomische Kategorisierung	5
3.2.3 Molekulare Kategorisierung	5
3.3 Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)	6
3.3.1 TRPV1-Kanal Aktivatoren und Hemmer	8
3.3.2 Funktionsweise des TRPV1-Kanals	9
3.3.3 TRPV1-Signalwege und ihre Regulation	10
3.4 Ankyrin rich membrane spanning protein (ARMS)	11
3.4.1 Das Adaptorprotein ARMS	11
3.4.2 ARMS-Signalwege	13
3.5 Fragestellung	14
4 MATERIAL UND METHODEN	16
4.1 Material	16
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien	16
4.1.2 Puffer und Lösungen	17
4.1.3 Antikörper und Labeling-Kits	17
4.1.4 Verbrauchsmaterial	18
4.1.5 Software	18
4.1.6 Technische Geräte	18
4.2 Methoden	18
4.2.1 Versuchstiere	18

	4.2.2 Operationsverfahren zur Induktion einer peripheren Neuropathie	19
	4.2.3 Gewebegewinnung und Herstellung der Gefrierschnitte	19
	4.2.4 Dorsal root ganglion (DRG)-Kulturen	20
	4.2.5 Immunhistochemie	20
	4.2.6 Mikroskopie, Bildauswertung und Datenanalyse	22
	4.2.7 Kombination aus Kalziumimaging und Immunzytochemie	24
	4.2.8 Statistische Auswertung	26
5	ERGEBNISSE	27
5	.1 Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen	27
	5.1.1 Hauptpopulationen	27
	TRPV1-Expression in DRG-Neuronen	27
	ARMS-Expression in DRG-Neuronen	27
	Ko-Expression von TRPV1 und ARMS	28
	5.1.2 Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen	30
	TRPV1-Expression in DRG-Neuronen	31
	ARMS-Expression in DRG-Neuronen	32
	Ko-Expression von TRPV1 und ARMS	33
	5.1.3 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit CGRP, IB4 und NF 200	37
	5.1.4 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit AKAP 150	38
5	.2 Funktionelle Bedeutung der Ko-Expression von TRPV1 und ARMS	43
5	.3 Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS nach Nervenläsion	46
	5.3.1 Die DRG-Hauptpopulationen kontra- und ipsilateral nach Nervenläsion	46
	5.3.2 Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen kontra- und ipsilatera	l
	nach Nervenläsion	47
6	DISKUSSION	51
6	.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	51
	6.1.1 TRPV1-Expression	51
	6.1.2 ARMS-Expression	52
	6.1.3 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS	53
	6.1.4 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit neuronalen Markern	54

6.2	: Fu	nktionelle Bedeutung der Ko-Expression von TRPV1 und ARMS	56
(	5.2.1	TRPV1 und seine Adaptorproteine	56
(	5.2.2	ARMS als Interaktionspartner des TRPV1-Kanals	57
(	5.2.3	TRPV1-Signalkomplexe und ihre Wirkmechanismen	58
(	6.2.4	Auf den Spuren des TRPV1/ARMS-Signalosoms	60
6.3	Ve	ränderte Expressionsmuster nach Nervenläsion	61
(	5.3.1	Tiermodelle für neuropathischen Schmerz	61
(	6.3.2	Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS nach Nervenläsion	62
6.4	Kr	itische Betrachtung und Limitationen immunhistochemischer und	
zellexperimenteller Ansätze 65			65
6.5 Schlusswort und Ausblick 66			66
7	LITE	ERATURVERZEICHNIS	68
8	ABł	(ÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
9	EID	ESSTATTLICHE VERSICHERUNG	88
10	LEB	ENSLAUF	89
11	DAN	IKSAGUNG	90

### 1 Zusammenfassung

Der Ionenkanal TRPV1 ist an der Entstehung einer Vielzahl verschiedener Schmerzarten beteiligt. TRPV1 wird in kleinen DRG-Neuronen exprimiert, die ebenso an der Wahrnehmung akuter noxischer Stimuli beteiligt sind wie auch am komplexen (neuropathischer) Entstehungsmuster chronischer Schmerzen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und werden unter anderem auf der Basis von Adaptorproteinen vermittelt. In dieser Arbeit wurde das multifunktionale Adaptorprotein ARMS als möglicher Interaktionspartner und Modulator der TRPV1-Kanal-Sensitivität und Funktion untersucht. Mittels immunhistochemischer Detektion wurden Ko-Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen der Maus klassifiziert. Zur weiteren Differenzierung erfolgte die Detektion von Subpopulationen mit Hilfe molekularer Marker. Zur Untersuchung einer möglichem funktionellen Bedeutung der Ko-Expression von TRPV1 und ARMS wurde die Capsaicin-Antwort in kultivierten DRG-Neuronen subpopulations-spezifisch untersucht. Um die Bedeutung eines möglichen TRPV1-ARMS-Signalkomplexes unter pathologischen Bedingungen zu evaluieren wurden die definierten TRPV1- und ARMS-Subpopulationen in einem neuropathischen Schmerzmodell der Maus, der chronic constriction injury (CCI) des N. ischiadicus, mittels immunhistochemischer Methoden betrachtet. Als Ergebnis dieser Studie konnte eine hohe Ko-Expressionsrate des Ionenkanals und des Adaptorproteins in DRG-Neuronen der Maus nachgewiesen werden. Mittels einer Kombination von Kalziumimaging und Immunzytochemie konnte für diese TRPV1 und ARMS ko-exprimierende Subpopulation eine erhöhte Sensitivität gegenüber Capsaicin gezeigt werden, was als erster Hinweis für eine ARMS Rolle des Adaptorproteins in Capsaicin-induzierte TRPV1-Sensitivierungsprozesse interpretiert werden kann. In einem Tiermodell für neuropathischen Schmerz wurden darüber hinaus veränderte Zusammensetzungen der klassifizierten TRPV1- und ARMS-spezifischen Subpopulationen beobachtet. Möglicherweise spielt die Interaktion beider Proteine eine wesentliche Rolle im Kontext der Nozizeptor-Sensitivierung und macht sie als potentielle Ziele für neue Analgetika interessant.

## 2 Abstract

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is an ion channel that contributes to the generation and transmission of pain. TRPV1 is mainly expressed in small diameter dorsal root ganglion (DRG) neurons, which are involved in the sensation of acute noxious stimuli and in the development of chronic (neuropathic) pain. In this thesis the intracellular multifunctional adapter protein ankyrin repeat-rich membrane spanning (ARMS) was analyzed as a potential interaction partner and modulator of TRPV1 sensitivity and function. Co-expression of TRPV1 and ARMS in DRG neurons of mice was detected and classified using immunohistochemistry. For further differentiation of subpopulations, molecular markers were used. Capsaicin responses in cultured DRG neurons were measured to investigate the functional relevance of TRPV1 and ARMS co-expression. Additionally, TRPV1/ARMS co-expression was evaluated under pathological conditions (chronic constriction injury model) to identify possible injury-related changes in the TRPV1/ARMS signaling complex. Results of immunohistochemistry showed high co-expression of TRPV1 and ARMS in healthy DRG neurons. Using a combination of calcium imaging and immunocytochemistry, increased capsaicin-induced activity of TRPV1 in neurons co-expressing TRPV1 and ARMS was detected. Furthermore, TRPV1- and ARMS-specific subpopulations were altered in an animal model of neuropathic pain. These data identify ARMS as an important component of the TRPV1 signaling complex. TRPV1/ARMS interaction might play a crucial role in the context of nociceptor sensitization. The modulation of the activity of both proteins may constitute a novel approach for future pain management.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Nozizeption und Schmerz

Nozizeption ist der neuronale Prozess zur Identifikation eines Stimulus, der gewebsschädigend und somit potentiell schmerzhaft ist (Loeser & Treede 2008). Nozizeptoren sind periphere sensorische Neurone, die durch ihre molekulare Ausstattung zur Detektion solcher Reize fähig sind. Der Ioneneinstrom durch geöffnete Kanäle der Nozizeptor-Membran führt über eine Membrandepolarisation zur Generation eines Aktionspotentials im Nozizeptor (Transduktion). Diese Information wird über Interneurone auf Rückenmarksebene ins Gehirn weitergeleitet (Transmission). Die bewusste Wahrnehmung von nozizeptiven Reizen erfolgt im Kortex des Gehirns und führt zu Schmerzempfinden (Perzeption). Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz als "ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird" (Loeser & Treede 2008). Schmerz ist immer ein subjektives Empfinden, das in komplexer Weise von somatischen, psychischen und sozialen Einflussfaktoren abhängt (Sharifnaeini & Basbaum 2011). Es kann zwischen nozizeptivem, inflammatorischem und neuropathischem Schmerz unterschieden werden (Patapoutian et al. 2009). Costigan et al. fügen noch die vierte Kategorie des dysfunktionalen Schmerzes hinzu (Costigan et al. 2009). Zusätzlich existiert eine zeitliche Einteilung in akuten und chronischen Schmerz.

Akuter oder nozizeptiver Schmerz ist die häufigste physiologische Art von Schmerz, die nach Detektion und Perzeption noxischer Stimuli durch Nozizeptoren auftritt und dient der schnellstmöglichen Beendigung eines potentiell gewebsschädigenden Reizes.

Auch inflammatorischer (entzündlicher) Schmerz erfüllt eine Schutzfunktion für den Körper und soll zur Ruhigstellung verletzter Strukturen und zur Verbesserung der Heilung z. B. nach Knochenbruch führen. Diese Art von Schmerz kann für einen Zeitraum von Stunden, Tagen, Wochen oder länger auftreten. Allodynie und Hyperalgesie sind Phänomene des inflammatorischen Schmerzes. Allodynie bedeutet, dass unschädliche Stimuli als schmerzhaft wahrgenommen werden (Loeser & Treede 2008). Die intensivierte Empfindung von schmerzhaften Reizen wird als Hyperalgesie bezeichnet (Kidd & Urban 2001; Loeser & Treede 2008). Diesen hypersensitiven Phänomenen liegt eine molekulare Aktivierung und/oder Sensitivierung von zentralen Neuronen und/oder Nozizeptoren durch inflammatorische Mediatoren zugrunde (Ballou et al. 2000; Oprée & Kress 2000; Wood 2010; Liu et al. 2011).

Neuropathischer Schmerz entsteht, wenn zentrale, periphere oder autonome neuronale Strukturen verletzt werden und kann nach deren Genesung fortbestehen (Backonja 2003). Am häufigsten entwickelt sich neuropathischer Schmerz nach Schädigung des peripheren Nervensystems durch eine Läsion oder nach Verlust neuronaler Strukturen (Baron 2006; Magrinelli et al. 2013). Phantomschmerz nach Amputation ist das klassische Beispiel. Diese Schmerzart ist assoziiert mit abnormen Empfindungen wie spontanem Schmerz, Hyperalgesie, Allodynie, Hyp- und Parästhesien und verändertem Temperaturerleben. Seine Behandlung ist kompliziert und durch Analgetika alleine oft nur unzureichend therapierbar. Im Rahmen der neurogenen Begleitinflammation werden zusätzlich proinflammatorische Substanzen ausgeschüttet und tragen ihrerseits zur Aufrechterhaltung von Schmerzen bei (Lin et al. 2007; Kim & Moalem-Taylor 2011; Ellis & Bennett 2013).

### 3.2 Das periphere sensorische Nervensystem

### 3.2.1 Der Nozizeptor

Das periphere Nervensystem ist der Apparat, mit dem wir unsere Umwelt und uns selbst wahrnehmen können. Nozizeptoren sind sensorische Neurone, die in der Lage sind, schmerzhafte Reize zu detektieren. Sie wurden 1906 zuerst von Sir Charles Sherrington beschrieben und von Burgess und Perl weiter spezifiziert (Burgess & 1967). Perl Als Detektoren bilden die Nozizeptoren den Anfang der Schmerzwahrnehmungskette. Ihre Zellkörper liegen zusammen mit denen aller weiteren sensorischen Neurone in den Hinterwurzelganglien, im Folgenden als dorsal root ganglia (DRGs) bezeichnet. Sensorische Neurone lassen sich anhand verschiedener Systeme klassifizieren.

#### 3.2.2 Anatomische Kategorisierung

Sensorische Neurone der DRGs lassen sich anatomisch in drei verschiedene Kategorien einordnen. Diese Klassifikation erfolgt anhand der Größe von Axon und Zellkörper und ihrem Myelinisierungsgrad (Julius & Basbaum 2001). Die erste Kategorie bilden die A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$ , und A $\delta$ -Faser-Neurone mit dem höchsten Grad an Myelinisierung und dem größten Axondurchmesser (2-20 µm). Diese Gruppe ist für Propriozeption, mechanische Stimuli und akuten (scharfen) Primär-Schmerz (A $\delta$ ) verantwortlich. B-Faser-Neurone bilden die zweite Kategorie. Sie sind mittelmäßig myelinisiert, weisen einen mittleren Axondurchmesser (1-3 µm) auf und beeinflussen viszerale und autonome Funktionen. Die dritte Gruppe beinhaltet die C-Faser-Neurone. Sie sind nicht myelinisiert und haben den kleinsten Axondurchmesser (0,5-1,5 µm). Die Nozizeptoren zählen größtenteils zu den C-Faser-Neuronen und vermitteln hier den länger anhaltenden Sekundär-Schmerz (Julius & Basbaum 2001; Basbaum et al. 2009).

#### 3.2.3 Molekulare Kategorisierung

Die spezifische neuronale Funktion und das Wahrnehmungsspektrum von Reizen wird durch die molekulare Ausstattung der Zelle bestimmt (Lewin & Moshourab 2004). Diese molekulare Ausstattung definiert die Funktion und die Zugehörigkeit einer Zelle zu einer spezifischen Subpopulation. Nozizeptoren bestehen aus mehreren heterogenen Subpopulationen. Eine detaillierte Klassifikation erscheint schwierig, da es die Komplexität verschiedener Aspekte zu berücksichtigten gilt. Dies wären z. B. die inhomogene Expression von Einzel-Proteinen sowie spezifische Ko-Expressionsmuster sämtlicher Einzel-Proteine. Dennoch ist es gerade vor dem Hintergrund dieser Komplexität für das Verständnis ihrer Funktion wesentlich, neuronale Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden. Für diese Arbeit ist die Klassifikation von Nozizeptoren mittels molekularer Marker von besonderer Bedeutung. Nozizeptoren werden in eine peptiderge und eine non-peptiderge Subpopulation eingeordnet. Als Marker für peptiderge Neurone werden die Peptidtransmitter calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Substanz P (SP) verwendet. Non-peptiderge Neurone sind zum einen durch eine Abwesenheit der Peptide gekennzeichnet, zum anderen durch die Expression eines Glykoproteins der Versican Familie, das Isolektin B4 (IB4) von Bandeira simplifolia bindet (Bogen et al. 2005). Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich nicht nur in ihrem Repertoire

der intrazellulären Proteine, sondern auch in ihren Funktionen und ihrer Abhängigheit von Wachstumsfaktoren (Stucky & Lewin 1999; Hucho et al. 2005). Als Myelinisierungsmarker dient Neurofilament 200 (NF 200). Ein wichtiger nozizeptiver molekularer Marker ist der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) lonenkanal, der sowohl in peptidergen als auch in non-peptidergen Neuronen exprimiert wird.

#### 3.3 Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

Schmerzwahrnehmung beginnt häufig mit der Aktivierung peripherer sensorischer Nozizeptoren. Die dort exprimierten Mitglieder der transient-receptor-potential-(TRP-) Kanal-Familie detektieren noxische Stimuli und sind in der Lage eine Reihe verschiedener physikalischer und chemischer Reize in Aktionspotentiale zu transduzieren (Julius & Basbaum 2001; Clapham 2003). Innerhalb der TRP-Kanal-Familie sind bei den Säugetieren 6 Subfamilien bekannt, deren Aufbau sich grundsätzlich ähnelt: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP und TRPML (Montell 2005). Ein Kanal besteht aus 4 Untereinheiten. Es existieren Homo- und Heterotetramere. Eine Kanal-Untereinheit besteht aus 6 Transmembrandomänen, einem intrazellulären C- und N-Terminus, sowie einer Porenschleife zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. Mitglieder der TRP-Kanal-Familie sind in der Lage multiplen sensorischen Input zu detektieren und auf molekularer Ebene zu integrieren (Venkatachalam & Montell 2007). Der erste TRP-Kanal wurde 1969 an einer Mutante der Fruchtfliege Drosophila melanogaster im Zusammenhang mit ihrer visuellen Wahrnehmung beschrieben (Cosens & Manning 1969) und 1989 identifiziert und kloniert (Montell & Rubin 1989). Eine Mutation des trp-Gens im Signaltransduktionskomplex von Photorezeptoren führte bei der Mutante nur zu einem transienten Rezeptorpotential als Antwort auf einen kontinuierlichen Lichtreiz, die Mutanten waren unter solchen Lichtreizen blind (siehe auch den Review zur ausführlichen Geschichte: Minke 2010). 1992 wurde die Klasse der trp-Proteine erstmals in Zusammenhang mit ihrer Bedeutung für den Kalziumeinstrom in Drosophila-Photorezeptoren untersucht (Hardie & Minke 1992). Der erste TRP-Kanal bei Säugetieren wurde 1995 entdeckt: TRPC1 (Wes et al. 1995).

TRPV1 ist der erste beschriebene temperatur-sensitive Vertreter der TRP-Familie in Säugetieren und wurde initial vor allem in kleinen und mittelgroßen nozizeptiven Neuronen mit C-Faser-Axonen gefunden (Tominaga et al. 1998). Die Nozizeptor-Subpopulation, die TRPV1 exprimiert, ist an der Detektion diverser noxischer Stimuli beteiligt (siehe 1.3.1 TRPV1-Kanal Aktivatoren und Hemmer) und im Entzündungsprozess für die Entstehung thermaler Hyperalgesie und der neurogenen Inflammation mitverantwortlich (Julius 2013). Der funktionsfähige Kanal besteht aus 4 Einheiten und formt eine nicht-selektive Kation-durchlässige Pore (Kedei et al. 2001; Voets et al. 2005), die bevorzugt Kalzium transportiert. Neben seiner Expression im peripheren Nervensystem wurde TRPV1 auch im zentralen Nervensystem (Mezey et al. 2000; Roberts et al. 2004) sowie in diversen nichtneuronalen Geweben, wie epidermalen Keratinozyten (Southall et al. 2000), epithelialen Zellen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (Birder et al. 2002; Kato et al. 2003) oder Endothelzellen (Yang et al. 2010), gefunden, wo er eine Reihe unterschiedlicher Funktionen erfüllt: TRPV1 ist eingebunden in den Entzündungsprozess in Keratinozyten, zytoprotektiv im Gastrointestinaltrakt, wesentlich für die Entleerungsfunktion der Blase und in der Lage blutdrucksenkende Vasorelaxation zu vermitteln.



**Bild 1**: A) Darstellung der tetrameren Struktur des TRPV1-Kanals in der Plasmamembran (Tominaga & Tominaga 2005). B) Transmembrandomänen mit Cund N-Terminus sowie Porenschleife zwischen 5. und 6. Transmembrandomäne. Exemplarische Darstellung von Aktivatoren und deren Bindungsstellen: Capsaicin (Chilischote) bindet intrazellulär zwischen 2. und 3. Domäne, Protonen (saurer pH, Zitrone) und einzelne Spinnen-Toxine am extrazellulären Loop zwischen 5. und 6. Domäne. ATP und Calmodulin entfalten ihre Wirkung über Interaktion mit den Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus, mit dem C-Terminus interagieren u.a. Proteinkinase A und C (Julius 2013).

#### 3.3.1 TRPV1-Kanal Aktivatoren und Hemmer

In Nozizeptoren detektiert TRPV1 noxische Stimuli wie sauren pH (Tominaga et al. 1998), Hitze >43°C (Caterina et al. 1997) und chemische Reize wie Capsaicin, den scharfen Bestandteil von Chilischoten (Caterina et al. 1997). Endocannabinoide wie Anandamide und Oleoylethanolamide aktivieren ebenfalls den TRPV1-Kanal (Zygmunt et al. 1999; Ahern 2003). Neben Capsaicin gibt es eine Reihe weiterer Komponenten aus Gewürzen, die den Kanal aktivieren können: Gingerol aus Ingwer (Iwasaki et al. 2006), Allicin aus Knoblauch und Zwiebeln (Macpherson et al. 2005), Piperin aus schwarzem Pfeffer (McNamara et al. 2005), Alkylamide des Szechuanpfeffers (Menozzi et al. 2009), Eugenol aus Gewürznelken (Yang et al. 2003) und Kampfer (Xu et al. 2005). Eine weitere Gruppe von TRPV1-Aktivatoren umfasst diverse Insektengifte und Schadstoffe aus dem Tierreich, z. B. von Quallen, Schlangen, Spinnen, Skorpionen (Min et al. 2013). Resiniferatoxin (RTX) ist ein hochpotenter Agonist, der aus dem marokkanischen Wolfsmilchgewächs Euphorbia resiniferia extrahiert wird. Seine Affinität und Potenz am TRPV1-Kanal ist 4000-mal höher als Capsaicin (Chou et al. 2004). Im Rahmen der neurogenen Inflammation wird TRPV1 durch pro-inflammatorische Substanzen wie Prostaglandine, Bradykinin, Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin. nerve growth factor (NGF) und Tumornekrose-Faktor (TNF) moduliert (Szallasi et al. 2007).

Neben den Aktivatoren gibt es eine Reihe von Substanzen, für die ein hemmender Einfluss auf die Aktivierbarkeit und Aktivität des TRPV1-Kanals gezeigt werden kann. Dabei können Agonisten und Antagonisten auch desensitivierend wirken. Beispiele sind der synthetische Capsaicin-Antagonist Capsazepin (Dickenson & Dray 1991), die wiederholte Stimulation mit niedrigen Dosen des Agonisten Capsaicin (Mohapatra & Nau 2003), Kampfer als topisches Analgetikum (Xu et al. 2005) oder ein kürzlich identifizierter Interaktionsmechanismus zwischen TRPV1 und dem  $\gamma$ amino-butyric-acid-(GABA-)B1-Rezeptor (Hanack et al. 2015). Im peripheren Nervensystem können Opioide die Capsaicin- und hitzeinduzierte TRPV1-Aktivität über inhibierende G-Proteine insbesondere hemmen. unter Entzündungsbedingungen (Endres-Becker et al. 2007). Zentral wurde eine GABAvermittelte Hemmung des TRPV1-Kanals durch Opioide beschrieben (Maione et al.

8

2009). Die Möglichkeit, über eine Hemmung des TRPV1-Kanals in die Schmerzentstehung einzugreifen, macht ihn zu einem vielversprechenden Ziel für die Entwicklung von neuen Analgetika.

#### 3.3.2 Funktionsweise des TRPV1-Kanals

TRPV1 fungiert als Detektor und darüber hinaus als polymodaler Integrator thermaler und chemischer Signale. Er ist wesentlich an der Modulation der Erregbarkeit von Nozizeptoren beteiligt und reguliert deren Antwort auf Veränderungen ihrer direkten zellulären Umgebung (Tominaga 1998; Huang et al. 2006). TRPV1-defiziente Mäuse zeigen kein schmerzassoziiertes Verhalten mehr nach lokaler Applikation von Capsaicin, eine eingeschränkte Wahrnehmungsfähigkeit schmerzhafter Hitze und eine verminderte thermale Hyperalgesie bei Inflammation (Caterina et al. 2000). Der Nozizeptor kann via TRPV1 auf verschiedene Arten sensitiviert werden: 1.) vermehrte Expression des Ionenkanals 2.) vermehrte Membraninsertion von gespeichertem TRPV1 3.) Steigerung intrazellulär der Sensitivität von membranständigem TRPV1 v.a. durch posttranslationale Modifikationen. Es kann zwischen einer direkten Aktivierung des Kanals und einer Sensitivierung unterschieden werden, wobei die Sensitivierung als erhöhte Aktivierbarkeit interpretiert werden kann. Noxen können aktivieren und/oder sensitivieren. Capsaicin wirkt auch sensitivierend, in dem es die Schwelle für "schmerzhaft heiß" reduziert (Vriens J. et al. 2009). Capsaicin bindet intrazellulär an der zytoplasmatischen Schleife ("Loop") zwischen der 2. und 3. Transmembrandomäne des Kanals (Jordt & Julius 2002). Strukturähnliche lipophile Substanzen wie Anandamide und inflammatorische Membranderivate, die man zur Gruppe der Endovanilloide zusammenfassen kann, binden sehr wahrscheinlich ebenfalls an dieser Stelle.

Trauma, Inflammation und Ischämie sind Ursachen für einen erniedrigten pH im Gewebe. Protonen können einen Nozizeptor erregen oder sensitivieren, indem sie u.a. über den TRPV1-Kanal wirken (Holzer 2009). Sie binden extrazellulär zwischen der 5. und 6. Transmembrandömane an TRPV1 (Tominaga 1998; Jordt et al. 2000) und können je nach pH den Kanal aktivieren oder gegenüber anderen Reizen sensitivieren. So sorgt z. B. ein für entzündetes Gewebe typischer pH  $\leq$  5,9 für eine Herabsetzung des Schwellenwertes "schmerzhaft heiß" von 43° auf 20°C (Montell 2005).

Bestandteile des inflammatorischen Milieus wie Bradykinin, ATP, NGF wirken über eigene Rezeptoren und eine Aktivierung zugehöriger Signalwege. NGF sorgt z. B. über die Tropomyosin Rezeptor Kinase A (TrkA) und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) für eine Phosphorylierung des TRPV1-Kanals und seine vermehrte Membraninsertion (Ji et al. 2002; Zhang et al. 2005; Stein et al. 2006). Diese proinflammatorischen Mediatoren können direkte oder indirekte allosterische Änderungen des Kanals induzieren, so dass sich die Sensitivität gegenüber Aktivatoren wie Hitze, Protonen und Capsaicin erhöht (Szallasi et al. 2007), und sie können eine vermehrte Expression sowie Membraninsertion von TRPV1 bewirken. Die Aktivierung von TRPV1 bewirkt zusätzlich eine Freisetzung der in sensorischen Neuronen intrazellulär gespeicherten inflammatorischen Neuropeptide SP und CGRP, die wesentlich am Entstehungsprozess der neurogenen Entzündung beteiligt sind (Tominaga 2007).

#### 3.3.3 TRPV1-Signalwege und ihre Regulation

Die Aktivität des TRPV1-Kanals ist zum großen Teil von posttranslationalen Modifikationen abhängig. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Kanals. Dephosphoryliert weist TRPV1 eine geringere Aktivität auf. Die Protein Phosphatase 2B (PP2B), die auch als Calcineurin bezeichnet wird, ist an der Dephosphorylierung von TRPV1 beteiligt (Mohapatra & Nau 2005). Eine erhöhte Sensitivität des Kanals zeigt sich in phosphoryliertem Zustand. Dabei sind unter anderem Protein Kinase A (PKA), Protein Kinase C (PKC) und Calcium-Calmodulin Kinase II (CaMKII) involviert, die TRPV1 an jeweils unterschiedlichen Aminosäuren phosphorylieren (Bhave et al. 2002; Mohapatra & Nau 2003; Vellani et al. 2001; Numazaki et al. 2002; Srinivasan et al. 2008; Li et al. 2014; Jung et al. 2004). Die durch Prostaglandine verursachte Sensitivierung von TRPV1 ist ebenfalls PKA- und PKC-vermittelt (Moriyama et al. 2005). TRPV1 wird auch über den intrazellulären Signalweg der extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) sensitiviert (Dai et al. 2002; Obata et al. 2004; Zhuang et al. 2004; Hucho & Levine 2007; Zhang et al. 2011). In diesem Kontext zeigt sich auch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-KB) (Reichardt 2006; Zampieri & Chao 2006). Dieser Signalweg kann durch verschiedene Aktivatoren wie NGF/TrkA, Capsaicin oder inflammatorische Substanzen aktiviert werden.

Interessanterweise sind jedoch nicht für alle Interaktionspartner Bindungsdömanen bekannt, so dass es denkbar ist, dass auch Strukturproteine eine vermittelnde Rolle einnehmen. Für die Phosphorylierung des Kanals durch PKA und PKC wurde bereits ein Interaktionspartner identifiziert: Das *A-Kinase anchoring protein* (AKAP) ist ein Gerüstprotein, das in verschieden Spezies in verschiedenen Isoformen vorkommt und dort als Mediator in Signal- und Phosphorylierungskaskaden agiert (Wong & Scott 2004). Von Interesse im Zusammenhang mit dem TRPV1-Kanal ist beim Menschen die membranständige Isoform AKAP 150, die AKAP 79 in Nagetieren entspricht (DellAcqua et al. 1998). AKAP ist an der PKA- und PKC-abhängigen Phosphorylierung von TRPV1 beteiligt (Jeske et al. 2008; Jeske et al. 2009). Auch an der Prostaglandin-induzierten Sensitivierung ist AKAP beteiligt (Schnizler et al. 2008; Zhang et al. 2008). Bei der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung von TRPV1 scheint AKAP keine Rolle zu spielen (Por et al. 2010).

Bei der Vielzahl von "Mitspielern" im TRPV1-Kontext ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass neben AKAP auch andere Gerüstproteine in die zugehörigen Signalkaskaden involviert sind. Im Folgenden wird das *ankyrin-rich-membrane-spanning-*(ARMS-)Protein als weiterer Interaktionspartner vorgestellt.

### 3.4 Ankyrin rich membrane spanning protein (ARMS)

### 3.4.1 Das Adaptorprotein ARMS

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner des TRPV1-Kanals ist das ARMS-Protein, das auch als *kinase D interacting substrate* (Kidins220) bezeichnet wird. ARMS wurde als großes Adaptorprotein mit vielfältigen Interaktionsdomänen in neuronalen Zellen identifiziert (Iglesias et al. 2000; Kong et al. 2001). ARMS interagiert mit den TrkA- und p75-Rezeptoren, die die Wirkung des Neurotrophins NGF vermitteln (Kong et al. 2001) und ist das erste entdeckte Substrat der Protein Kinase D (PKD), einer Serin/Threoninkinase, die im Diacylglycerol-Signalweg angesiedelt ist (Iglesias et al. 2000). Dieses Adaptorprotein wird nach NGF- und *brain-derived-neurotrophic-factor*-(BDNF-) Stimulation durch Tyrosinkinase phosphoryliert. Die Aminosäuresequenz von ARMS ist hochkonserviert und besteht aus 1715 Aminosäuren mit 4 Transmembrandomänen, multiplen *ankyrin-repeats*, einer *sterile-alpha-motif*-(SAM-)Domäne und einer PDZ-Bindings-Domäne.



**Bild 2**: Struktur des intrazellulären membranständigen Adaptor- und Strukturproteins ARMS mit diversen Interaktionspartnern (Neubrand et al. 2012).

Die Expression von ARMS-mRNA wurde initial in neuronalem Gewebe nachgewiesen. Im zentralen Nervensystem wird ARMS besonders in synaptisch aktiven, neuronal-plastischen Regionen exprimiert, wie dem Hippocampus, Motorneuronen im Rückenmark, Purkinje-Zellen im Cerebellum sowie Zellen des Riechkolbens. Das Adaptorprotein erfüllt eine Reihe verschiedener Aufgaben, u.a. Neurotrophin-abhängige Signalvermittlung, neuronale Entwicklung, synaptische Transmission, und interagiert mit dem Zytoskelett (Neubrand et al. 2012). Seine mRNA konnte auch in sensorischen peripheren DRG-Neuronen detektiert werden (Kong et al. 2001). Zur Funktion des Gerüstproteins in DRGs gibt es bisher allerdings kaum Untersuchungen. ARMS ist essentiell für die embryonale Entwicklung. Knockout Mäuse zeigen Entwicklungsdefizite im Nerven- und kardiovaskulären System. ARMS -/- Mäuse sterben im späten Gestationsstadium mit massivem Zelltod im zentralen und peripheren Nervensystem. ARMS +/- Knockout Mäuse zeigen ein Absterben neuronaler Zellen im entorhinalen und frontalen Kortex (Duffy et al. 2011). Sensorische periphere Neurone verlieren ihre Fähigkeit auf Neurotrophine zu reagieren. Es entstehen kardivaskuläre Abnormalitäten weil sich die Wirkungen von vascular endothelial growth factor (VEGF) auf Zellen ohne ARMS nicht entfalten können (Cesca et al. 2011; Cesca et al. 2012). ARMS wird ebenfalls in Zellen des Immunsystems exprimiert. Dort reguliert es die Motilität von T-Zellen (Jean-mairet et al. 2011) und dendritischen Zellen (Riol-blanco et al. 2004). Auch in die Genese maligner Erkrankungen ist ARMS involviert (Liao et al. 2007; Liao et al. 2011; Rogers & Schor 2013; Jung et al. 2014). Eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese von Alzheimer wird diskutiert (Lo 2013).

#### 3.4.2 ARMS-Signalwege

ARMS und andere Adaptorproteine sind wesentlich für die Wirkungsvermittlung von Neurotrophinen (Zampieri & Chao 2006). ARMS ist z. B. essentiell für den Signalweg der andauernden ERK/MAPK-Aktivierung nach NGF-Stimulation (Arévalo et al. 2004; Arévalo et al. 2006). Zwischen ARMS, TrkA und p75 bildet sich dabei ein Signalkomplex (Chang et al. 2004). Durch eine Aktivierung von TrkA werden Phospholipase C und ARMS phosphoryliert. ARMS spielt in primären kortikalen Neuronen eine Rolle im NF-kB-Signalweg (nuklearer Transkriptionsfaktor), der für die Signaltransduktion von Neurotrophinen genutzt wird (Sniderhan et al. 2008). ARMS wirkt neuroprotektiv und schützt vor Zelltod nach exzitotoxischen Ereignissen, die mit einer Überstimulation von Glutamatrezeptoren einhergehen (López-Menéndez et al. 2009). Die Ausbildung charakteristischer polaritätsgebender morphologischer Eigenschaften von Nervenzellen wird ebenfalls ARMS-abhängig reguliert. ARMS spielt hier eine Rolle im axonalen Wachstum und in der Entwicklung und Stabilisierung des Dendritenbaums in kultivierten hippokampalen Neuronen (Wu et al. 2009; Higuero et al. 2010). In den Spitzen wachsender Dendriten zeigt sich eine Akkumulation von ARMS als Hinweis für seine Schlüsselrolle in der neuronalen Morphogenese (Bracale et al. 2007; Andreazzoli et al. 2012).

Zusammenfassend ist ARMS an einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege beteiligt. Seine Rolle im Nervensystem wurde bisher hauptsächlich in zentralen Neuronen oder in heterologen Zellsystemen und hier insbesondere im Kontext von Neurotrophinen untersucht. Ursprünglich wurde das Adaptorprotein auch in peripheren neuronalen Zellen, den DRG-Neuronen, nachgewiesen (Kong et al. 2001). Hier zeigte sich ein Expressionsmuster vorzugsweise in den Nozizeptoren. Eine Expression von ARMS-mRNA in TRPV1-positiven Neuronen konnte bereits detektiert werden (Isensee et al. 2014b). Die Funktion von ARMS in DRG-Neuronen im Kontext peripherer Nozizeption wurde allerdings noch nie untersucht, obwohl gemeinsam genutzte intrazelluläre Signalkaskaden von ARMS und TRPV1 eine Interaktion der beiden Proteine nahelegen.

### 3.5 Fragestellung

TRPV1 ist wesentlich für die Nozizeption und an der Entstehung einer Vielzahl verschiedener Schmerzarten beteiligt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und werden unter anderem auf der Basis von Adaptorproteinen vermittelt. Eine weitere Plattform zur TRPV1-Sensitivierung könnte das multifunktionale Gerüstprotein ARMS sein, das in DRG-Neuronen exprimiert wird und eine Reihe von Signalkaskaden mit TRPV1 teilt. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen adressiert werden:

- 1. Existiert ein TRPV1-ARMS-Signalkomplex in Nozizeptoren?
- 2. Hat dieser potentielle Signalkomplex einen Einfluss auf die TRPV1-Sensitivierung oder Aktivität?

Da die Expression von ARMS in peripheren Neuronen noch nie quantifiziert wurde, wurden zunächst immunhistochemisch Subpopulationen in gesunden DRG-Neuronen der Maus untersucht. Von besonderem Interesse ist die Ko-Expressionsrate von TRPV1 und ARMS. Zur weiteren Differenzierung erfolgte die Detektion von Subpopulationen mit Hilfe molekularer Marker.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung einer Ko-Expression von TRPV1 und ARMS wurde die Capsaicin-Antwort in kultivierten DRG-Neuronen subpopulationsspezifisch untersucht.

Um mögliche Interaktionen auch unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen wurden die definierten TRPV1- und ARMS-Subpopulationen in einem neuropathischen Schmerzmodell der Maus, der *chronic constriction injury* (CCI) des N. ischiadicus, mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ändert sich die Anzahl der Neurone, die zu einer Subpopulation gehören unter neuropathischen Schmerzbedingungen?

2. Ändert sich das Expressionsmuster der Neurone hinsichtlich ihrer anatomischen Größenklassifikation?

# 4 Material und Methoden

#### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Capsaicin Dinatriumhydrogenphosphat  $(Na_2HPO_4)$ Forene (Isofluran) Fura-2-AM Glycerin Kaliumchlorid (KCI) Kollagenase IV Mowiol 4-88 Natriumchlorid (NaCl 0,9 %) Natriumdihydrogenphosphat  $(NaH_2PO_4)$ Neg 50 Neurobasal A Normales Eselserum Normales Kalbserum Normales Ziegenserum Paraformaldehyd (4 %) Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Tabletten Rinderserumalbumin (BSA) Saccharose (30 %) Salzsäure (HCI) Tris-(hydroxymethyl)-amino methane (TRIS) Triton X 100 Trypsin (0,25 %)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Abbott, Wiesbaden, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Thermo Scientific, Massachusetts, USA Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Biochrom AG, Berlin, Deutschland Biochrom AG, Berlin, Deutschland Biochrom AG, Berlin, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

GIBCO Invitrogen, Paisley, Großbritannien Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Biochrom AG, Berlin, Deutschland

# 4.1.2 Puffer und Lösungen

Blockpuffer	
-------------	--

Blockpuffer	2 % Esel- oder Ziegenserum, 1% BSA, 0,1%
	Triton X 100 in PBS
Fixierungslösung	4% PFA in 0,1 M PB, pH 7,4
PB	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBS (aus Tabletten)	0,14 M NaCl, 0,01 M PO <sub>4</sub> Puffer, 0,003 M
	KCI
PBT	1x PBS, 0,2 % Triton X 100
Mowiol-Lösung	12 g Glycerin und 4,8 g Mowiol 4-88 in 24 ml
	0,2 M Tris/HCl Lösung (pH 8,5), bei 50°C für
	30-40 Minuten gerührt, zentrifugiert mit
	4000-5000 rpm für 20 min und den
	Überstand bis zur Verwendung bei 4°C
	aufbewahrt

### 4.1.3 Antikörper und Labeling-Kits

Anti-AKAP 150 (Ziege)	Santa Cruz	1:100
Anti-ARMS (Kaninchen)	Abcam	1:1000
Anti-ARMS (Maus)	GenWay Biotech	1:1000
Anti-CGRP (Kaninchen)	Enzo life sciences	1:1000
Anti-NF 200 (Huhn)	Merck Millipore	1:1000
Anti-PGP 9.5 (Huhn)	Novus	1:500
Anti-TRPV1 (Kaninchen)	Alomone	1:1000
Alexa 488	Invitrogen	1:1000
(anti-Kaninchen aus dem Esel)		
Alexa 488	Invitrogen	1:1000
(anti-Ziege aus dem Esel)		
Alexa 555	Invitrogen	1:1000
(anti-Kaninchen aus dem Esel)		
Alexa 633	Invitrogen	1:1000
(anti-Kaninchen aus dem Esel)		
FITC	Abcam	1:100
(anti-Huhn aus dem Esel)		

IB4	Sigma-Aldrich	1:1000
Zenon Alexa 555 Labeling Kit	Molecular Probes	1:50 (6:1)
Zenon Alexa 647 Labeling Kit	Molecular Probes	1:100 (7:1)

### 4.1.4 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polylysin-beschichtete Glasplättchen	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
384-well-Platten	Greiner, Solingen, Deutschland

### 4.1.5 Software

Graphpad Prism 5+6	San Diego, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
Intuos Graphik Tablet	Wacom, Vancouver, Kanada
LSM Software	Carl-Zeiss, Deutschland
Microsoft Office Mac 2011	Redmond, USA

### 4.1.6 Technische Geräte

Cellomics ArrayScan VTI	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
mit X1 Kamera (14-bit <i>dynamic</i>	
range, 2208 x 2208 pixel array,	
4,54 micron pixel size)	
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
LSM 510meta	Carl-Zeiss, Deutschland
Microm HM560 Kryostat	Microm, Deutschland
Multifuge K4	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Zentrifuge Avanti TM J-25	Beckmann, München, Deutschland

### 4.2 Methoden

### 4.2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an insgesamt 12 Wildtyp c57/BL6-J Mäusen durchgeführt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Züchtung wurde im Auftrag der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charite Campus Benjamin Franklin durch die Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) Berlin durchgeführt. Dort erfolgte die Tierhaltung und -versorgung durch geschultes Tierpflegepersonal. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 22 °C bei einem 12/12 h Licht-Dunkel-Rhythmus in Gruppenkäfigen gehalten. Sie erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (T0132/07) genehmigt. 6 der Tiere wurden zur Gewinnung von DRG-Gefrierschnitten ohne weitere Intervention getötet. Bei 3 Tieren wurde vor der Gewebeentnahme ein neuropathisches Schmerzsyndrom durch CCI induziert. 3 Versuchstiere wurden zur Herstellung von DRG-Kulturen getötet.

#### 4.2.2 Operationsverfahren zur Induktion einer peripheren Neuropathie

Die chronische Nervenkonstriktion (CCI) wurde von Frau Dr. rer. nat. Dominika Labuz durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Isofluran in eine tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde der *Nervus Ischiadicus* der rechten Seite auf Höhe des mittleren Oberschenkels freigelegt. 3 lose Seidenligaturen (4/0) wurden im Abstand von 1 mm um den Nerven platziert und genau zu dem Punkt festgezogen, an dem ein kurzes Zucken der zugehörigen Hinterpfote als Zeichen der korrekten Lage auftrat. Der Wundverschluss erfolgte schichtweise mittels Seidennaht (Labuz et al., 2009; Labuz and Machalska, 2013). Am Tag 2 und Tag 14 erfolgte die Bestimmung der mechanischen und thermalen Allodynie zur Bestätigung der erfolgreichen Induktion des neuropathischen Schmerzsyndroms. Im Anschluss erfolgte am Tag 14 die Gewebeentnahme der ipsi- und kontralateralen zugehörigen DRG-Neurone (L3-L5) zur immunhistochemischen Untersuchung.

#### 4.2.3 Gewebegewinnung und Herstellung der Gefrierschnitte

Für die Herstellung der Gefrierschnitte zur immunhistochemischen Färbung wurden die Versuchstiere in eine sehr tiefe Isofluran-Narkose versetzt und mit 0,1 M *phosphate buffer* (PB) transkardial perfundiert bis sich der Kreislauf blutleer zeigte. Zur Fixierung des Gewebes wurde anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PB/Fixierungslösung perfundiert. Bei den Versuchstieren ohne Intervention wurden alle lumbalen (L) und thorakalen (Th) Spinalganglien entnommen. Bei den Tieren mit neuropathischem Schmerzsyndrom wurden nur die DRGs der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt, die den *Nervus Ischiadicus* versorgen (L3-L5). Alle präparierten DRGs wurden für 20 min in Fixierungslösung postfixiert, über Nacht in 30%iger Suchrose zur Kryoprotektion aufbewahrt und am Folgetag in Gefrierschnittmedium (Neg 50) eingebettet. Am Kryostat erfolgte die Anfertigung 12 µm dicker Gefrierschnitte, die auf Poly-I-lysin beschichtete Glasplättchen transferiert wurden. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.2.4 Dorsal root ganglion (DRG)-Kulturen

Für die Herstellung von DRG-Kulturen für die kombinierte Durchführung von Kalziumimaging und immunzytochemischer Analyse wurden die Versuchstiere mittels Isofluran-Überdosierung getötet. Anschließend wurden alle lumbalen und thorakalen DRGs herauspräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in eiskalter isotoner Kochsalzlösung aufbewahrt. Die entnommenen DRG-Neurone wurden mit Kollagenase IV für 30 min und Trypsin (0,25 %) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung von Protease-Resten wurden die DRGs dreimalig vorsichtig in *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte ihre Dissoziation, indem die Zellsuspension vorsichtig durch immer kleiner werdende Nadeln (18G, 22G, 25G) hindurchgedrückt wurde. Zur Trennung der Zellen von toten Zellbestandteilen wurde über einen 15%igen *bovine-serum-albumin*-(BSA-)Gradienten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspensiert und in 384-well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden folgte die Durchführung der Experimente wie unter **4.2.7** beschrieben.

#### 4.2.5 Immunhistochemie

Zur Quantifizierung der zu untersuchenden Subpopulationen wurden immunhistochemische Doppel- und Dreifachfärbungen angefertigt. Bei der immunhistochemischen Methode werden die zu untersuchenden Proteine bzw. Antigene durch einen Primärantikörper identifiziert. Bei der Fluoreszenz-Immunhistochemie erfolgt die Visualisierung mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs, der entweder direkt oder indirekt an den primären Antikörper gebunden werden kann. Fluoreszierende Farbmoleküle können mit Hilfe einer Lichtquelle angeregt werden und fallen nach Abgabe der hinzugefügten Energie unter Aussendung eines längerwelligen Emissionslichts zurück auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Dieses emittierte Licht kann nun detektiert werden und liefert das des Präparates. Bei der indirekten Methode wird zunächst der Abbild Primärantikörper und im Anschluss der fluoreszierende Zweitantikörper appliziert. Dieser ist nicht spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet, er markiert alle Immunglobuline des Tieres, in dem der Primärantikörper hergestellt wurde. Doppeloder Dreifachfärbungen mit z. B. mehreren Kaninchen-Primärantikörpern sind demzufolge wegen Kreuzreaktionen nicht möglich. Bei der direkten Methode werden Primärantikörper und Fluoreszenz-Farbstoff vor der Anwendung aneinander gekoppelt.

Da zur Durchführung der im Folgenden beschriebenen Experimente mehrere Primärantikörper aus dem Kaninchen stammen, wurde sowohl direkte als auch indirekte Fluoreszenz-Immunhistochemie angewandt.

Die DRG-Gefrierschnitte wurden aufgetaut, in PBS rehydriert, für 10 min in *phosphate buffer with triton X 100* (PBT) permeabilisiert und für eine Stunde mit Blockpuffer bei RT geblockt. Anschließend wurden die Primärantikörper zur Detektion von TRPV1, ARMS, AKAP 150, CGRP, IB4 oder NF 200 zur direkten Methode (siehe **4.1.3** für Hersteller und Konzentrationen) in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C aufgetragen, dann für 45 min in PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach erneuten Waschschritten in PBS (4 x 10 min) folgte die Applikation der direkt gekoppelten Primärantikörper für eine Stunde bei RT. Zur Fixierung der Färbungen wurden die Schnitte nach erfolgter Waschung (3 x 10 min in PBT, 2 x 5 min in PBS) 15 min in Fixierlösung inkubiert, erneut gewaschen und mit Mowiol versiegelt. Die Spezifität der Antikörper wurde routinemäßig in unserem Labor durch Herrn Dr. Marian Brackmann mittels Western-Blot-Analyse getestet. Dafür wurden TRPV1- und/oder ARMS-exprimierende *human-embryonic-kidney*-(HEK-)Zellen und DRG-Neurone untersucht.

#### 4.2.6 Mikroskopie, Bildauswertung und Datenanalyse

Die gefärbten DRG-Schnitte wurden mit dem konfokalen laser scanning microscope (LSM) 510 meta von Carl Zeiss ausgewertet. Die Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe der LSM-Software. Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird Laserlicht punktgenau durch eine Lochblende auf die Fluoreszenz-Moleküle geleitet. Das von den Farbstoffen emittierte Licht wird durch eine zweite Lochblende (Pinhole) gesammelt und gibt "konfokal" exakt den angeregten Bereich wieder. Licht, das nicht aus dem konfokalen Bereich kommt, wird geblockt. Die sonst durch dieses Randlicht bedingte laterale Unschärfe wird demzufolge reduziert und eine bessere Auflösung des Bildes wird ermöglicht. Dabei ist die Größe des Lichtpunktes auf dem Präparat beugungsbedingt endlich klein. Diese Grenze wird als 1 array unit bezeichnet und stellt eine wichtige Orientierung zur Festlegung der passenden Lochblende dar, um die richtige Menge an Licht durchzulassen. Jeder Punkt (konfokaler Bereich) wird einzeln bearbeitet, das gesamte Abbild des Präparates wird schlussendlich am Computer zusammengefügt. Durch verschiedene Laser mit verschieden Anregungsspektren und die Nutzung von dichroitischen Strahlteilern zur Aufteilung des emittierten Lichts können verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe mit unterschiedlichen Wellenlängen optimal detektiert werden.

Wenn emittiertes Licht gemessen wird, wird dies als Fluoreszenz oder Immunoreaktivität (IR) bezeichnet und korreliert mit der Proteinexpression. Im resultierenden Bild kann schließlich die Pixelintensität ermittelt werden und als Ausdruck von IR und somit als indirektes Maß für die Proteinexpression interpretiert werden.

Für die Auswertung der angefertigten Dreifachfärbungen wurden ein Argon-Ion-Laser (488 nm) und ein Helium-Neon-Ion-Laser (543 nm, 633 nm) als Lichtquelle genutzt.

Den drei resultierenden Kanälen (entsprechend den drei genutzten Fluoreszenz-Farbstoffen) im entstandenen Bild wurden für die Auswertung Pseudofarben zugeordnet. Zur Vereinfachung wurde stets die gleiche Zuordnung gewählt: für Alexa 488 immer grün, für Alexa 555 immer rot und für Alexa 633 immer blau. Alle Bilder wurden mit einem 20 x Objektiv und den gleichen Parametern für Laserstärke, Helligkeit (*gain*), *offset* und Lochblende aufgenommen. Die Bilder wurden im 1024 x 1024 TIFF-Format exportiert, wobei jedes Bild die drei oben erwähnten Kanäle und einen zusätzlichen Durchlicht-Kanal für die Zählung der Gesamtzellzahl enthielt. Die weiterführende Auswertung der Bilder hinsichtlich der Proteinexpressionsmuster erfolgte anhand eines standardisierten Arbeitsprozesses mit ImageJ: Zunächst wurde anhand des Durchlicht-Kanals eine Maske der Zellkörper erstellt. Hierzu wurde jedes einzelne Neuron manuell mit Hilfe eines Intuos-Graph-Tablets und dem ImageJ-Freihandtool umfahren und als *region of interest* (ROI) definiert. Die dadurch entstandene Maske enthielt alle DRG-Neurone und konnte auf die Farb-Kanäle übertragen werden. Mit Hilfe der ImageJ-Funktion set measurements konnten die gewünschten zu messenden Parameter Zellanzahl, Zellgröße (Fläche in  $\mu m^2$ ) und Pixelintensität eingestellt werden und schließlich über die Funktion analyze particles gemessen werden. Zur Differenzierung zwischen positiver und negativer IR als Maß für die Proteinexpression erfolgte die Ermittlung eines Schwellenwertes (cut off). Dieser wurde für jedes einzelne Bild und jeden Farb-Kanal individuell festgelegt: 15 ROIs, repräsentativ für das Hintergrundsignal, wurden gemittelt und dieser Mittelwert (MW) zur 3-fachen Standardabweichung (standard deviation; SD) hinzuaddiert. Das Ergebnis wurde als *cut-off*-Wert zur Differenzierung in positiv (+) und negativ (-) verwendet. Nur Zellen mit Pixelintensitäten oberhalb dieses Wertes wurden als immunoreaktiv (ir) und somit positiv gezählt. Es erfolgte eine weitere Differenzierung in positiv (+) und hochpositiv (++). Die Proteinexpression in den Neuronen wurde als hochpositiv bewertet, wenn sie den Mittelwert des Hintergrundsignals plus 15-fache Standardabweichung überschritt.

Für den weiteren Auswertungsprozess ist folgende Unterscheidung von Bedeutung: Erfolgte die Auswertung der Proteinexpression nur im Hinblick auf positiv (+) und negativ (-) sind in den positiven (+) Zellen auch die hochpositiven (++) Zellen enthalten (**Hauptpopulationen**). Für eine selektive Betrachtung der positiven (+) und hochpositiven (++) Subpopulationen ist die weitere Differenzierung erforderlich (**Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen**). Positive Neurone wurden als Prozent der Gesamtzellzahl (% = positive Zellen/Gesamtzellzahl x 100) und als Prozent der spezifischen Subpopulationen (% = positive Zellen/Subpopulation x 100) beschrieben. Zellgrößen wurden als MW ± Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) aufgeführt. Die Auswertung der ipsi- und kontralateralen DRG-Neurone nach CCI erfolgte verblindet. Der Auswertungsprozess wurde mit Excel (Microsoft Office Mac 2011, Redmond, USA) durchgeführt.



**Bild 3**: Schematische Darstellung eines konfokalen Lasermikroskops. Mittels Laserlicht werden die Fluoreszenz-Farbstoffe im Präparat angeregt. Das daraufhin emittierte Licht gelangt nach Filterung zum Detektor. Der dichroitische Strahlenteiler ermöglicht eine Aufteilung des emittierten Lichts nach unterschiedlichen Wellenlängen. Mit Hilfe des Pinholes wird nur Licht aus dem konfokalen Bereich durchgelassen. Dies verbessert die Auflösung des Bildes, welches am Computer aus den Einzelbereichen berechnet wird (modifiziert nach Schuchmann & Roesner).

### 4.2.7 Kombination aus Kalziumimaging und Immunzytochemie

Die unter **4.2.4** gewonnenen DRG-Zellkulturen wurden im Folgenden zunächst mit Capsaicin stimuliert um den korrespondierenden Kalziumeinstrom über den TRPV1-Kanal zu messen. Anschließend wurden TRPV1- und ARMS-Expression immunzytochemisch bestimmt. Somit war eine gekoppelte Aussage zur Capsaicin-Sensitivität in Abhängigkeit von der betreffenden Subpopulation möglich. Die Experimente wurden am Thermo Fisher Cellomics Array Scan VTI der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Tim Hucho (heute Universität Köln) im Max Planck Institut für Humangenetik in Berlin durchgeführt.

Initial wurden die Zellen für das Kalziumimaging mit 0,005 µg Fura-2-Azetoxymethyl (Fura-2-AM) geladen (entsprechend einer Konzentration von 3 µM) und für 40 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Fura-2-AM ändert nach Bindung an Kalzium sein Extinktionsmaximum von 380 nm zu 340 nm, so dass über die gebildete Ratio (F340/F380) auf den Kalziumeinstrom in die Zelle rückgeschlossen werden kann.

Nach dem Laden der DRG-Neurone mit Fura-2-AM erfolgte ein Waschschritt mit erwärmter Neurobasal-Lösung. Nach einer zweiten Inkubation wie oben beschrieben und erneutem Waschen der Zellkulturen wurde die nach einem standardisierten Protokoll definierte automatisierte Stimulation der Zellkulturen mit Capsaicin eingeleitet. Der zweite Inkubations- und Waschschritt erfolgte zur Optimierung der Zellbeladung und resultierender Bildanalyse. Die DRG-Neurone wurden bei 37°C inkubiert. Zur Vermeidung eines "Temperaturschocks" wurde die Waschlösung auf die gleiche Temperatur erwärmt, da eine abrupte Temperaturänderung u.U. mit veränderter intrazellulärer Kalziumfreisetzung und/oder verändertem Rezeptorrecycling einhergehen könnte.

Das Protokoll umfasst vier Abschnitte:

- 1. Ermittlung der Baseline-Ratio
- 2. Artefaktbestimmung durch Medium-Perfusion bei 60 s
- 3. die "eigentliche" Stimulation mit 50 nM Capsaicin bei 80 s
- 4. die Stimulation mit 30 mM KCl zur Identifikation von vitalen Zellen bei 130 s

Zu allen Zeitpunkten wurde die Extinktion von Fura-2-AM bei 340 nm und 380 nm gemessen. Der gesamte Prozess wurde mit Hilfe des Mikroskops und der daran gekoppelten Kamera in Bildern zu den verschiedenen Zeitpunkten festgehalten. Dabei korrespondiert die Helligkeit bzw. Fluoreszenz-Intensität der Zelle mit ihrem Kalziumeinstrom.

Nach der KCI-Stimulation wurden die DRG-Neurone durch Zugabe von Fixierungslösung für 10 min bei RT fixiert. Nach dem anschließenden Waschschritt (3 x 10 min in PBS), wurden die Zellen mit Blockpuffer für eine Stunde bei RT inkubiert. Analog dem Immunhistochemie-Protokoll, wurde die Primärantikörperzugabe in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Es erfolgte die Ko-Färbung für TRPV1 und ARMS zur Untersuchung der (TRPV1+/ARMS+)- und (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulationen um eine mögliche funktionale Bedeutung der Ko-Expression beider Proteine für den Kalziumeinstrom in eine Zelle zu detektieren. Die Sekundärantikörper wurden nach einem weiteren Waschschritt (3 x 10 min in PBS) hinzugefügt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Der abschließende Waschschritt wurde analog den vorherigen durchgeführt und die DRG-Neurone versiegelt. Die nun gefärbten Zellen wurden erneut unter dem Mikroskop gescannt und fotografiert. Durch Auswertung der Pixelintensität der immunzytochemischen Kanäle für ARMS und TRPV1 und Korrelation mit der Intensität der Capsaicin-induzierten Änderung der Fura-Ratio durch Kalziumeinstrom in die Zelle können somit Rückschlüsse auf die Capsaicin-Sensitivität der verschiedenen Subpopulationen getroffen werden.

Anhand des Kalziumeinstroms im Anschluss an die KCI-Stimulation kann eine vitale von einer nicht vitalen Zelle unterschieden werden. Die Fluoreszenz-Intensität nach KCI Stimulation wurde somit als ein Einschlusskriterium hinzugezogen. Die positive IR für *protein gene product* (PGP) 9.5, einen neuronalen Marker, wurde als zweites Einschlusskriterium angewendet. Analog dem unter **4.2.6** beschriebenen Auswertungsprozess, wurden Masken der Neurone generiert. Die Festlegung der *cut offs* erfolgte ebenfalls wie zuvor unter **4.2.6** erläutert. Die generierten Masken schließen somit alle als Neuron identifizierten vitalen Zellen ein.

#### 4.2.8 Statistische Auswertung

Da die Auswertung der Subpopulationen auf Zellebene erfolgen sollte, wurden von vornherein intraindividuelle Unterschiede im Einzeltier als vernachlässigbar eingestuft. Demnach wurden auch mögliche statistische Abhängigkeiten nicht berücksichtigt. Die errechneten p-Werte haben somit nur explorativen Charakter. Da die p-Werte nur explorativ betrachtet werden, wurde auf eine  $\alpha$ -Adjustierung im Zusammenhang mit dem multiplen Testen verzichtet.

Da es sich um nicht-normalverteilte Daten (Shapiro-Wilks-Test) handelt, wurde mit nicht-parametrischen Verfahren getestet. Zum Vergleich von zwei Subpopulationen erfolgte die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede in Hinblick auf ihre Zellfläche mit dem Mann-Whitney-Test. Bei der Untersuchung von mehr als zwei Subpopulationen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Zur weiteren Differenzierung zwischen welchen Subpopulationen signifikante Unterschiede vorliegen, wurde Dunn's multiple comparison posthoc Test angewandt. Unterschiede in der Verteilung der Anteile der verschiedenen Subpopulationen zwischen ipsi- und kontralateralen DRG-Neuronen im CCI-Experiment wurden mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt. Zum Vergleich der Änderung des Fura-Verhältnisses zwischen den beiden Subpopulationen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $\leq$  0,05 gewertet. Dabei wurde folgende Zuordnung gewählt: \* = p  $\leq$ 0.05; \*\* =  $p \le 0.01$ ; \*\*\* =  $p \le 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p \le 0.0001$ . Alle Tests wurden mit Graph Pad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

# 5 Ergebnisse

#### 5.1 Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen

Aus den lumbalen (und thorakalen) Spinalganglien von insgesamt 6 gesunden Mäusen wurden 13348 DRG-Neurone hinsichtlich ihrer Proteinexpressionsmuster untersucht. Primär wurde zwischen ir-positiven und ir-negativen Zellen differenziert (**3.1.1 Hauptpopulationen**). In einem zweiten Schritt wurde zwischen hochpositiver und positiver Proteinexpression unterschieden, da bei der Auswertung eine unterschiedliche Intensität der Immunoreaktivität auffiel (**3.1.2 Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen**). Zur weiteren Klassifikation wurde die Ko-Expression der (TRPV1+/ARMS+)- bzw. (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulationen mit verschiedenen etablierten Markern für Nozizeptor-Untergruppen beschrieben (**3.1.3 und 3.1.4**). Für alle Experimente wurde der Anteil der neu identifizierten Population als Häufigkeit in Bezug zur Gesamt- oder einer weiteren Subpopulation sowie die Zellgröße als MW ± SEM in  $\mu$ m<sup>2</sup> untersucht.

#### 5.1.1 Hauptpopulationen

### **TRPV1-Expression in DRG-Neuronen**

Bezogen auf die Gesamtpopulation waren 35 % der Zellen TRPV1-positiv (n= 4737; Abb. 1Gi). Hinsichtlich ihrer Zellfläche wiesen TRPV1-positive Zellen signifikant kleinere Zellflächen als die Gesamtzellpopulation und TRPV1-negative Zellen auf (395,1 ± 4,3 µm<sup>2</sup>; 527,0 ± 3,8 µm<sup>2</sup>; 600,2 ± 5,3 µm<sup>2</sup>; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, p ≤ 0,0001)

### **ARMS-Expression in DRG-Neuronen**

79 % der untersuchten Zellen exprimierten ARMS (n= 10578; Abb. 1Gii). Mit 543,1 ± 4,3  $\mu$ m<sup>2</sup> war ihr Zellkörper signifikant größer als der ARMS-negativer Zellen (465,7 ± 7,6  $\mu$ m<sup>2</sup>; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, p ≤ 0,0001)

Abbildung 1D zeigt die Zellgrößen der verschiedenen Subpopulationen anhand ihrer Fläche in  $\mu$ m<sup>2</sup> zur deskriptiven Analyse ihrer Verteilung in 100  $\mu$ m<sup>2</sup> Schritten. Auch hier kommt zum Ausdruck, dass TRPV1-positive Zellen deutlich kleiner als ARMS-negative Zellen und die Gesamtzellpopulation waren.

#### Ko-Expression von TRPV1 und ARMS

Auf der Ebene einer Differenzierung in positiv und negativ ließen sich vier Subpopulationen klassifizieren: TRPV1+/ARMS-, TRPV1+/ARMS+, TRPV1-/ARMS-, TRPV1-/ARMS+. Abbildung 1Giii zeigt deren Anteile bezogen auf die Gesamtzellzahl. Dabei entfielen 5 % auf eine Subpopulation, die TRPV1, aber nicht ARMS exprimierte (n=689), 30 % auf Zellen, die TRPV1 und ARMS ko-exprimierten (n=4048), 16 % auf eine Zellgruppe, die weder TRPV1- noch ARMS-immunoreaktiv war (n=2081) und 49 % auf eine Subpopulation, die ARMS, aber nicht TRPV1 aufwies (n=6530). Die Ko-Expression von TRPV1 und ARMS in Relation zur Gesamtzellzahl lag also bei 30 %. Betrachtet man die Ko-Expression von TRPV1 und ARMS bezogen auf alle Zellen, die TRPV1 exprimierten, lag diese bei 85 % (Abb. 1H). Analog exprimierten 38 % der ARMS-positiven Zellen auch TRPV1 (Abb. 11). Die Zellgrößen unterschieden sich innerhalb dieser Subpopulationen signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test,  $p \le 0,0001$ ; Abb. 1F). Dabei stellte sich die Subpopulation, die TRPV1, aber nicht ARMS exprimierte als kleinste (n= 689;  $337.8 \pm 9.5 \,\mu\text{m}^2$ ) und die TRPV1-negative, aber ARMS-positive Zellgruppe als größte dar (n= 6530; 628,8  $\pm$  6,1  $\mu$ m<sup>2</sup>). In der Mitte lagen die DRG-Neurone, die TRPV1 und ARMS ko-exprimierten (n= 4048; 404,8 ± 4,8 µm<sup>2</sup>) und Zellen, die weder TRPV1noch ARMS-immunoreaktiv waren (n=2081; 508,1 ± 9,4 µm<sup>2</sup>). Abbildung 1E veranschaulicht die Größenverteilung der TRPV1-positiven Gesamtpopulation im Vergleich zur (TRPV1+/ARMS-)- und (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulation. Hier zeigte sich eine Häufung der (TRPV1+/ARMS)-Zellen bei den sehr kleinen Zellkörpern.



**Abbildung 1:** *Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen* (Hauptpopulationen).

A) Repräsentative immunhistochemische Färbung des TRPV1-Kanals im konfokalen Lasermikroskop. B) Repräsentative immunhistochemische Färbung von ARMS im Lasermikroskop. C) Ko-Expressionsmuster von TRPV1 (blau) und ARMS (rot). Sternchen markieren DRG-Neurone, die beide Proteine exprimieren. TRPV1-positive Zellen, die ARMS-negativ sind, werden durch Pfeile gekennzeichnet. Pfeilköpfe weisen auf die Subpopulation hin, die ARMS-immunoreaktiv ist, aber kein TRPV1 enthält. D) Größenverteilung ARMS-positiver (rot), TRPV1-positiver (blau) und aller Zellen (grau). E) Größenverteilung von TRPV1 und ARMS ko-exprimierenden Zellen (rot) im Vergleich zu denen, die TRPV1-positiv, aber ARMS-negativ (blau) sind. Der graue Balken zeigt alle TRPV1-positiven Zellen unabhängig von ihrem Ko-Expressionsmuster. F) Darstellung der subpopulations-bezogenen durchschnittlichen Zellfläche. Diese unterscheiden sich je nach Ko-Expressionsmuster signifikant voneinander (Boxplots mit Median, min. und max. Werten; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, \*\*\*\*,  $p \le 0,0001$ ). G) Anteile der Subpopulationen in Bezug zur Gesamtzellpopulation. i) TRPV1-positive (blau) und -negative (grau) Subpopulation. ii) ARMS-positive (rot) und -negative (grau) Subpopulation. iii) Verteilung der 4 Hauptpopulationen: TRPV1+/ARMS- (blau), TRPV1+/ARMS+ (magenta), TRPV1-/ARMS-(grau), TRPV1-/ARMS+ (rot). H) TRPV1+/ARMS-(blau) und TRPV1+/ARMS+ (magenta) DRG-Neurone in Relation zu allen TRPV1-positiven Zellen. I) TRPV1-/ARMS+ (rot) und TRPV1+/ARMS+ (magenta) DRG-Neurone in Relation zu allen ARMS-positiven Zellen.

#### 5.1.2 Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen

Die unter **3.1.1** beschriebenen Subpopulationen ließen sich weiter unterteilen. Immunoreaktivität als Maß für Proteinexpression kann unterschiedlich interpretiert werden. In jedem Fall muss zwischen positiv und negativ differenziert werden. Der irpositive Bereich ist allerdings heterogen. Die festgelegte diskrete Grenze ist artifiziell und berücksichtigt nicht die graduellen Unterschiede der Proteinexpression. Da bereits rein visuell der Eindruck entstand, dass es mehr und weniger stark ir-positive Zellen gibt, wurde im Folgenden eine Aufgliederung in positive (+) und hochpositive (++) Neurone vorgenommen und deren Verteilungsmuster untersucht. Als *cut off* für das Kriterium "hochpositive Immunoreaktivität" (entsprechend einer besonders ausgeprägten Proteinexpression) wurde der Mittelwert des Hintergrundsignals + 15fache Standardabweichung (SD) gewählt.

#### **TRPV1-Expression in DRG-Neuronen**

Differenzierte man die TRPV1-positiven Zellen weiter und unterschied zwischen hochpositiven und positiven Neuronen, ergab sich ein signifikanter Größenunterschied zwischen diesen beiden Zellpopulationen (333,1 ± 4,6 µm<sup>2</sup> für TRPV1++; 440,5 ± 6,65 µm<sup>2</sup> für TRPV1+; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test,  $p \le 0,0001$ ; Abb. 2A), wobei 58 % der TRPV1-positiven Gesamtpopulation als positiv und 42 % als hochpositiv eingeordnet wurden (Abb. 2C). Bezogen auf die Gesamtzellpopulation (n=13348) stellten sich 20 % der Neurone als TRPV1-positiv (n=2670), 15 % als hochpositiv (n=2002) und 65 % als TRPV1-negativ (n=8676) dar (Abb. 2B). TRPV1-negative Zellen zeigten sich mit einer Zellfläche von 599,6 ± 5,2 µm<sup>2</sup> signifikant größer als sowohl TRPV1-positive und hochpositive DRG-Neurone, als auch im Vergleich zur Gesamtheit aller untersuchten Neurone (Abb. 2A).



#### Abbildung 2: Expressionsmuster von TRPV1 in DRG-Neuronen

A) Durchschnittliche Zellfläche (MW + SEM) von TRPV1-hochpositiven (++, dunkelblau, n= 2002), -positiven (+, blau, n= 2670) und -negativen (-, gemustert, n= 8676) Zellen im Vergleich zur Gesamtzellpopulation (weiß, n= 13348). Die

Zellgrößen unterscheiden sich signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, \*\*\*\*,  $p \le 0,0001$ ; \*\*\*  $p \le 0,001$ ). B) Verteilung zwischen TRPV1hochpositiven (dunkelblau), -positiven (blau) und -negativen (grau) Zellen in Bezug zur Gesamtzellpopulation. C) Anteile von TRPV1-hochpositiven (dunkelblau) und positiven (blau) Neuronen an der Gesamtheit aller TRPV1-positiven Zellen.

#### **ARMS-Expression in DRG-Neuronen**

Auch die ARMS-positiven Zellen ließen sich weiter differenzieren, wobei 76 % auf positive (+) und 24 % auf hochpositive (++) Neuronen entfielen (Abb. 3C). Diese Subpopulationen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Zellfläche nicht signifikant voneinander (534,3 ± 8,4 µm² für ARMS++; 545, 9 ± 5,1 µm² für ARMS+; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test; Abb. 3A). Bezogen auf die Gesamtzellpopulation (n=13348) stellten sich 60 % der Neurone als ARMS-positiv (n=8009), 19 % als hochpositiv (n=2536) und 21 % als ARMS-negativ (n=2803) dar (Abb. 3B). Es zeigte sich ein signifikanter Größenunterschied zwischen der ARMS-negativen Zellgruppe und der Gesamtzellpopulation sowie ARMS-exprimierenden Zellen (467,7 ± 7,8 µm² für ARMS- vs. 527 ± 3,8 µm², 534,3 ± 8,4 µm² und 545, 9 ± 5,1 µm², Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, p ≤ 0,0001; Abb. 3A). ARMS-positive Zellen waren weiterhin größer als die Gesamtzellpopulation (545, 9 ± 5,1 µm² vs. 527 ± 3,8 µm², p ≤ 0,01; Abb. 2A).




A) Durchschnittliche Zellfläche (MW + SEM) von ARMS-hochpositiven (dunkelrot, n= 2536), -positiven (rot, n= 8009) und -negativen (gemustert, n= 2803) Zellen im Vergleich zur Gesamtzellpopulation (schwarz, n= 13348). Die Zellgrößen unterscheiden sich signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, \*\*\*\*,  $p \le 0,0001$ ; \*\*,  $p \le 0,01$ ). B) Verteilung zwischen ARMS-hochpositiven (dunkelrot), -positiven (rot) und -negativen (grau) Zellen in Bezug zur Gesamtzellpopulation. C) Anteile von ARMS-hochpositiven (dunkelrot) und -positiven (rot) Neuronen an der Gesamtheit aller ARMS-positiven Zellen.

#### Ko-Expression von TRPV1 und ARMS

Die TRPV1-hochpositiven Zellen (15 % der Gesamtzellpopulation; Abb. 2B) ließen sich anhand ihres ARMS-Ko-Expressionsmuster weiter differenzieren. 61 % dieser Neurone wurden als ARMS-positiv beschrieben (bezogen auf die Gesamtzellpopulation entsprach dies 9 %; Abb. 4A). 23 % ko-exprimierten auch ARMS hochpositiv. Dies entsprach einer kleinen Subpopulation von 3 % in Hinblick auf alle beschriebenen Zellen (Abb. 4A). Die verbleibenden 16 % der TRPV1-hochpositiven Zellen waren ARMS-negativ. Auf diese DRG-Neurone, die hochpositiv

TRPV1, aber kein ARMS exprimierten, entfiel somit ein Anteil von 2 % der Gesamtzellpopulation (Abb. 4A). Sie stellte sich als die kleinste aller beschriebenen Subpopulationen dar.

TRPV1-positive (+) Zellen machten einen Anteil von 20 % (Abb. 2B) an der Gesamtzellpopulation aus. Auch sie ließen sich anhand ihrer ARMS Ko-Expressionsrate weiter unterteilen. 56 % ko-exprimierten ARMS (entsprechend 11 % aller untersuchten Zellen; Abb. 2A). Als ARMS-hochpositiv wurden 31 % der TRPV1positiven Neurone klassifiziert (6 % bezogen auf die Gesamtzellpopulation; Abb. 4C). Auch bei den TRPV1-positiven Zellen stellte sich die ARMS-negative Subpopulation mit 14 %, entsprechend 3 % der Gesamtzellpopulation, als die kleinste dar.

64 % aller Zellen waren TRPV1-negativ (Abb. 2B). Von dieser Population exprimierten 61 % ARMS, 15 % waren ARMS-hochpositiv und 24 % zeigten keine Immunoreaktivität für ARMS und TRPV1. Dies entsprach, bezogen auf alle Zellen, einer Verteilung von 16 % für TRPV1- und ARMS-negative Neurone, 39 % wurden als TRPV1-negativ, aber ARMS-positiv klassifiziert und 10 % aller Zellen exprimierten zwar kein TRPV1, aber ARMS hochpositiv (Abb. 4A).

Abbildung 4B beschreibt die verschiedenen Subpopulationen im Hinblick auf ihre Zellfläche. Die Zellfläche kann, wie auch der Zelldurchmesser, zur Größeneinteilung genutzt werden. Die Größe von Neuronen gilt als wichtiges Kriterium zur Einordnung in verschiedene Klassen. Es werden zunächst rein deskriptiv die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt. Tabelle 1 enthält eine Auflistung der untersuchten Subpopulationen mit der Anzahl untersuchter Neurone und deren Zellfläche.

Untersuchte man die Zellfläche der TRPV1-hochpositiven, -positiven und -negativen Zellen in Hinblick auf ihre ARMS-Ko-Expressionsmuster ließen sich folgende Aussagen treffen (Abb. 4B und Tabelle 1):

 Innerhalb der TRPV1-hochpositiven Subpopulation ergaben sich keine signifikanten Größenunterschiede zwischen hochpositiver, positiver und negativer ARMS-Ko-Expressionsrate (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post

34

Test). Die Flächen der Zellen wurden jedoch korrelierend mit ihrer ARMS-Ko-Expression größer.

- Dieser Effekt war auch in TRPV1-positiven Neuronen nachweisbar. Hier zeigten sich die ARMS-negativen Zellen signifikant kleiner als die, die ARMSpositiv oder hochpositiv ko-exprimierten (Abb. 4B und Tabelle 1). Die TRPV1+/ARMS+ Subpopulation wies eine signifikant kleinere Zellfläche auf im Vergleich zu TRPV1-positiven Neuronen, die ARMS hochpositiv koexprimierten.
- In der Gruppe der TRPV1-negativen Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen positiver und hochpositiver ARMS-Expression (Abb. 4B und Tabelle 1). Neurone, die weder TRPV1 noch ARMS aufwiesen, waren signifikant kleiner als solche, die ARMS-immunoreaktiv waren.

Bezogen auf die durchschnittliche Zellfläche aller Neurone ließen sich folgende Zusammenhänge herausarbeiten (Abb. 4B und Tabelle 1):

- Im Vergleich zu den beiden TRPV1-negativen Subpopulationen, die ARMSpositiv bzw. hochpositiv exprimierten, zeigte sich die durchschnittliche Zellfläche der Gesamtzellpopulation signifikant kleiner.
- Die Zellfläche aller Neurone war jedoch signifikant größer als alle Subpopulationen, die TRPV1-hochpositiv waren, sowie die TRPV1-positiven Zellgruppen, die als ARMS-positiv und -negativ klassifiziert wurden.
- Die Gesamtzellpopulation unterschied sich hinsichtlich ihrer Zellfläche nicht signifikant von TRPV1-positiven Neuronen, die ARMS hochpositiv koexprimierten. Ebenfalls bestand kein signifikanter Größenunterschied im Vergleich zu Zellen, die für beide Proteine keine Immunoreaktivität aufwiesen.

Die Histogramme (Abb. 4C-E) repräsentieren, ergänzend zu den in Abbildung 4B dargestellten und in Tabelle 1 aufgeführten Mittelwerten, das Verteilungsmuster der verschiedenen Subpopulationen. In den TRPV1-positiven und -hochpositiven Subpopulationen nahm die Zellgröße mit der ARMS-Ko-Expressionsrate zu. TRPV1- negative Neurone hingegen verteilten sich unabhängig von ihrer ARMS-Ko-Expression in einem breiteren Größenbereich. Prozentual entfielen dabei im Vergleich deutlich weniger Zellen auf den Bereich der "kleinen Zellen".



**Abbildung 4:** *Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen (erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen).* 

A) Prozentuale Anteile aller klassifizierten TRPV1- und ARMS-abhängigen Subpopulationen (Farbzuordnung Legende in absteigender Reihenfolge: dunkelblau, lila, violett, blau, magenta, pink, hellgrau, rot, dunkelrot). B) MW + SEM der zugehörigen Zellflächen. Die DRG-Neurone unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe je nach Ko-Expressionsmuster signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test, \*\*\*\*,  $p \le 0,0001$ ; \*\*,  $p \le 0,01$ ). C)-E) Größenverteilung der verschiedenen TRPV1-Subpopulationen in Abhängigkeit ihrer ARMS-Ko-Expression und im Vergleich zur Gesamtzellpopulation (schwarz). C) TRPV1-hochpositive Zellen mit ARMS-negativer (dunkelblau), -positiver (lila) und -hochpositiver (violett) Ko-Expression. D) TRPV1-positive Zellen mit ARMS-negativer (blau), -positiver (magenta) und -hochpositiver (pink) Ko-Expression. E) TRPV1-negative Zellen mit ARMS-negativer (grau), -positiver (rot) und -hochpositiver (dunkelrot) Ko-Expression.

Subpopulation	Anzahl der Zellen (n)	Zellfläche MW ± SEM (µm²)
Alle Zellen	13348	527,0 ± 3,8
TRPV1++/ARMS-	320	305,5 ± 11,3
TRPV1++/ARMS+	1233	331,2 ± 6,0
TRPV1++/ARMS++	455	355,4 ± 9,7
TRPV1+/ARMS-	371	363,8 ± 14,6
TRPV1+/ARMS+	1526	433,7 ± 8,6
TRPV1+/ARMS++	838	485,4 ± 12,7
TRPV1-/ARMS-	2082	507,8 ± 9,4
TRPV1-/ARMS+	5247	628,7 ± 6,9
TRPV1-/ARMS++	1285	628,3 ± 13,6

**Tabelle 1:** Absolute Anzahl und mittlere Zellflächen der DRG-Neurone differenziert nach Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS (erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen).

### 5.1.3 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit CGRP, IB4 und NF 200

Zur weiteren Klassifikation wurde die Ko-Expression der (TRPV1+/ARMS+)- bzw. (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulationen mit verschiedenen neuronalen Markern untersucht. Zur Identifikation peptiderger Neurone wurde CGRP verwendet. Nonpeptiderge Neurone wurden mittels IB4 identifiziert. Zum Nachweis einer Myelinisierung wurde NF 200 genutzt. Die Abbildungen 5A-L zeigen repräsentative Bildausschnitte der immunhistochemischen Färbungen sowohl der einzelnen Kanäle als auch der Ko-Expressionsmuster im zusammengefügten Kanal. Tabelle 2 führt die Ergebnisse der Quantifizierung auf. Die Hälfte aller Neurone, die TRPV1 und ARMS ko-exprimierten, exprimierten auch CGRP. Knapp ein Drittel der (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulation zeigte Immunoreaktivität für IB4. Gut ein Fünftel dieser Zellen gehörte zu den NF-200-positiven Neuronen. Im Vergleich dazu wies die TRPV1-positive und ARMS-negative Gruppe deutlich seltener eine Ko-Expression mit den untersuchten Markern auf. Am häufigsten zeigte sich eine positive Immunoreaktivität für CGRP. Die Ko-Expression der (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulation mit IB4 und NF 200 lag unter 10 %.

Es wurde bereits festgestellt, dass TRPV1-positive Zellen, die ARMS-negativ sind, eine signifikant kleineren Zellkörper aufwiesen als Neurone, die beide Proteine koexprimierten (Abb. 1F). Der Vergleich dieser Subpopulationen für CGRP-, IB4- und NF-200-immunoreaktive Zellen zeigte ebenfalls einen Größenunterschied (Tabelle 2). Dieser war allerdings nur für IB4-positive Neurone signifikant (Mann-Whitney-Test, p=0,0107; Tabelle 2).

#### 5.1.4 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit AKAP 150

Ergänzend zu den neuronalen Markern erfolgte die Untersuchung der Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in einer Subpopulation, die AKAP 150 exprimierte. AKAP 150 ist als Strukturprotein für die PKA bekannt und an der PKAvermittelten Phosphorylierung und somit Sensitivierung von TRPV1 beteiligt. Abbildungen 5M-P demonstrieren repräsentative Bildausschnitte des Ko-Expressionsmusters, das hinsichtlich Vorkommen und Zellgröße in Tabelle 2 beschrieben wird. Ein Fünftel der AKAP-150-positiven Neurone ko-exprimierten TRPV1 und ARMS, wohingegen nur weniger als 5 % TRPV1 ohne ARMS aufwiesen. In Bezug auf ihre Größe unterschieden sich die Zellkörper deutlich. (TRPV1+/ARMS-/AKAP 150+)-Neurone waren kleiner als (TRPV1+/ARMS+/AKAP 150+)-Zellen. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Mann-Whitney-Test).

### **TRPV1**

### ARMS



## Marker





# **TRPV1**

# ARMS

F



# Marker







### **TRPV1**

## ARMS







**Abbildung 5:** Dreifachfärbungen (TRPV1, ARMS, neuronaler Marker) von DRG-Neuronen im konfokalen Lasermikroskop.

A-D) Immunoreaktivität für TRPV1 (blau) (A), ARMS (rot) (B), CGRP (grün) (C), und zusammengefügter Kanal (merge) (D). E-H) Immunoreaktivität für TRPV1 (blau) (E), ARMS (rot) (F), IB4 (grün) (G) und zusammengefügter Kanal (merge) (H). I-L) Immunoreaktivität für TRPV1 (blau) (I), ARMS (rot) (J), NF 200 (grün) (K) und zusammengefügter Kanal (merge) (L). M-P) Immunoreaktivität für TRPV1 (blau) (M), ARMS (rot) (N), AKAP 150 (grün) (O) und zusammengefügter Kanal (merge) (P).

(TRPV1+/ARMS-/Marker+)-Neurone werden durch Pfeile markiert. Sternchen verweisen auf (TRPV1+/ARMS+/Marker+)-Zellen. (ARMS+/Marker+)-DRG-Neurone, die TRPV1-negativ sind, sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

	TRPV1+/ARMS+ DRG-Subpopulationen	TRPV1+/ARMS- DRG-Subpopulationen
Marker	% der TRPV1+/ARMS+ DRG-Neurone, die Marker exprimieren	% der TRPV1+/ARMS- DRG-Neurone, die Marker exprimieren
AKAP	21	5
CGRP	50	24
IB4	30	6
NF 200	22	6
	Zellfläche (µm²) TRPV1+/ARMS+/Marker+ Neurone	Zellfläche (µm²) TRPV1+/ARMS-/Marker+ Neurone
AKAP	506,5 ± 33,5 (n=175)	322,7 ± 47,1 (n=6)
CGRP	232,3 ± 5,6 (n=524)	201,2 ± 17,7 (n=33)
IB4	475,9 ± 12,9 (n=339)	311,5 ± 48,8 (n=12)
NF 200	592,7 ± 29,4 (n=250)	565,4 ± 84,3 (n=31)

**Tabelle 2:** Prozentuale Anteile der Marker-Ko-Expression im Vergleich zwischen (TRPV1+/ARMS-)- und (TRPV1+/ARMS+)-DRG-Neuronen und MW ± SEM der zugehörigen Zellflächen.

### 5.2 Funktionelle Bedeutung der Ko-Expression von TRPV1 und ARMS

In den bisherigen Experimenten wurden mittels immunhistochemischer Methoden Subpopulationen untersucht, die TRPV1 und ARMS ko-exprimierten, und ihr Vorkommen sowie ihre Größenverteilung in µm<sup>2</sup> beschrieben. Dabei zeigte sich eine hohe Ko-Expressionsrate von ARMS in TRPV1-positiven Zellen (85 % Abb. 1H) sowie ein Gesamtanteil von 30 % (Abb. 1Giii) der (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulation

bezogen auf alle Zellen. Aus der rein deskriptiven Analyse und Quantifizierung dieser Subpopulationen lassen sich jedoch keinerlei Rückschlüsse auf eine funktionelle Bedeutung der Ko-Expression ziehen. Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Interaktion beider Proteine wurden kultivierte DRG-Neurone zunächst mit Capsaicin stimuliert und mittels Kalziumimaging analysiert. Anschließend wurden TRPV1- und immunzytochemisch bestimmt. Durch ARMS-Expression Auswertung der Pixelintensität der immunzytochemischen Intensität für ARMS und TRPV1 und Korrelation mit der Intensität der Capsaicin-induzierten Änderung der Fura-Ratio, auf die Capsaicin-Sensitivität konnten Rückschlüsse der verschiedenen Subpopulationen getroffen werden. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Es wurden Neurone, die TRPV1 und ARMS ko-exprimierten, mit Zellen verglichen, die TRPV1-, aber nicht ARMS-positiv waren. Abbildung 6A-D zeigt ein DRG-Neuron, das TRPV1 und ARMS ko-exprimierte und nach Capsaicin-Stimulation hell aufleuchtete, entsprechend einer hohen Fura-Ratio, als Indikator für einen Kalziumeinstrom in die Zelle. In den Abbildungen 6E-H sind zwei verschiedene Neurone dargestellt, die jeweils nur TRPV1 oder ARMS exprimierten. Die Zelle, die nur immunoreaktiv für ARMS war, wies keine Reaktion auf die Capsaicin-Stimulation auf. Exemplarisch zeigte die Zelle, die TRPV1- (aber nicht ARMS)-positiv war ein Aufleuchten nach Capsaicin-Gabe. Die Intensität des Aufleuchtens nach Capsaicin-Stimulation war jedoch niedriger als in dem Neuron, das beide Proteine koexprimierte (Abb. 6H im Vergleich mit 6D). Verglich man die maximale Änderung der Fura-Ratio nach Capsaicin-Stimulation zwischen den beiden Subpopulationen (TRPV1+/ARMS+ vs. TRPV1+/ARMS-) zeigte sich passend zum visuellen Eindruck eine größere Änderung bei den Neuronen, die beide Proteine ko-exprimierten. Dieser Effekt war nicht signifikant (Abb. 6I, Mann-Whitney-Test). Die Änderung der Fura-Ratio aller untersuchter Neurone im zeitlichen Verlauf zeigt Abbildung 6J. Von den insgesamt 458 TRPV1-positiven (+) DRG-Neuronen waren 91 % positiv (+) für ARMS. Nur 9 % zeigten keine Immunoreaktivität für das Adaptorprotein. Dies entspricht in etwa der Verteilung der beiden Populationen, die in der Quantifizierung der immunhistochemischen Untersuchung der DRG-Neurone in Gefrierschnitten gezeigt wurde (Abb. 1H).



**Abbildung 6:** Funktionelle Untersuchung von TRPV1- und ARMS-ko-exprimierenden DRG-Neuronen mittels kombiniertem Kalziumimaging und immunozytochemischer Analyse.

A-D). TRPV1- (A) und ARMS- (B) ko-exprimierendes DRG-Neuron (violett, C). Capsaicin-induzierte Änderung der Fluoreszenz-Intensität desselben DRG-Neurons (D). E-H). DRG-Neurone immunoreaktiv für TRPV1 (E) oder ARMS (F). Keine Ko-Expression von TRPV1 (blau) und ARMS (rot) (G). Capsaicin-induzierte Änderung der Fluoreszenz-Intensität der Zellen von G) (H). I) Maximale Änderung der Fura-Ratio nach Zugabe von 50 nM Capsaicin für die (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulation (weißer Balken) und TRPV1- und ARMS-ko-exprimierende DRG-Neurone (schwarzer Balken), (Mann-Whitney-Test, p>0.05). J) Änderung der Fura-Ratio über die Zeit nach Perfusion mit Medium (60 s), 50 nM Capsaicin (80 s) und 30 mM KCI (130 s) für TRPV1+/ARMS- (schwarz) und TRPV1+/ARMS+ (rot) Neurone.

#### 5.3 Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS nach Nervenläsion

Zur Einschätzung der Bedeutung im Kontext einer schmerzhaften neuronalen Läsion wurden die zuvor beschriebenen Subpopulationen in einem neuropathischen Schmerzmodell (CCI) mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Hierbei wurden zwei Fragestellungen bearbeitet:

- 1. Ändert sich die Anzahl der Neurone, die zu einer Subpopulation gehören?
- 2. Ändert sich das Expressionsmuster der Neurone hinsichtlich ihrer Größenklassifikation?

Es wurden insgesamt 3941 DRG-Neurone kontralateral und 3296 Neurone ipsilateral zur CCI-induzierten Nervenverletzung verglichen. Analog zum Vorgehen der zuvor erläuterten immunohistochemischen Untersuchungen wurde wiederum primär zwischen ir-positiven und ir-negativen Zellen differenziert. In einem zweiten Schritt wurde darauffolgend zwischen hochpositiver und positiver Proteinexpression unterschieden. Da sich die Gesamtzellpopulationsgröße zwischen kontra- und ipsilateralen DRG-Neuronen unterschied wurde zur Vergleichbarkeit auf diese bezogen normalisiert.

#### 5.3.1 Die DRG-Hauptpopulationen kontra- und ipsilateral nach Nervenläsion

Hinsichtlich der Zellfläche zeigten sich keine Unterschiede zwischen kontra- und ipsilateralen Neuronen (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test; Abb. 7A). Ipsilateral fiel ein verminderter Anteil der (TRPV1+/ARMS-) und (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulationen in Bezug zur Gesamtzellpopulation auf. Nach CCI waren ipsilateral nur noch 39 % der kontralateral detektierten (TRPV1+/ARMS-)-Zellen und 85 % der (TRPV1+/ARMS+)-Neurone vorhanden. Bezogen auf die Gesamtzellzahl entsprach dies einer Reduktion von 3 % für die (TRPV1+/ ARMS-) Population (5 % kontralateral im Vergleich zu 2 % ipsilateral). Die TRPV1- und ARMS-ko-exprimierenden Neurone verminderten sich um 4 % von 29 % (kontralateral) auf 25 % (ipsilateral). Für beide Subpopulationen war dieser Effekt signifikant (Chi-Quadrat-Test, p  $\leq$  0,0001; Abb. 7B und C).



**Abbildung 7:** Veränderte Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen nach CCI (Hauptpopulationen).

A) Durchschnittliche Zellflächen der kontra- (ungemustert) und ipsilateralen (gemustert) DRG-Neuronen nach CCI. Es zeigen sich keine signifikanten Größenunterschiede zwischen kontra- und ipsilateralen DRG-Neuronen insgesamt (grau), der TRPV1+/ARMS- (blau) und TRPV1+/ARMS+ (magenta) Subpopulationen (Kruskal-Walli-Test mit Dunn's post Test, p > 0,05). B und C) TRPV1- und ARMS-koexprimierende Zellen (magenta) und TRPV1+/ARMS- (blau) Subpopulation bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Verbleibende Restpopulationen sind grau dargestellt. Kontralateral (B) zeigt sich der Anteil der (TRPV1+/ARMS-)- und (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulationen größer als ipsilateral (C). Dieser Unterschied ist signifikant (Chi-Quadrat-Test, \*\*\*\*, p ≤ 0,0001).

# 5.3.2 Erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen kontra- und ipsilateral nach Nervenläsion

Differenzierte man die Zellpopulationen weiter und unterschied zwischen hochpositiver und positiver Immunoreaktivität für TRPV1 und ARMS, zeigte sich für keine der untersuchten Subpopulationen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellfläche als Größenmaß (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post Test; Abb. 8A,D,G).

Die prozentualen Anteile der Subpopulationen änderten sich allerdings. Die DRG-Neurone, deren Anteil ipsilateral nach CCI-Induktion abnahm, ließen sich weiter spezifizieren: Die drei Subpopulationen TRPV1++/ARMS-, TRPV1+/ARMS- und TRPV1++/ARMS+ zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen kontra- und ipsilateralem Vorkommen (Chi-Quadrat-Test,  $p \le 0,0001$ ; Abb. 8B und C; Abb. 8E und F). Die TRPV1-hochpositiven und -positiven Zellgruppen, die kein ARMS exprimierten, nahmen, bezogen auf die Gesamtzellpopulation, einen geringen Anteil ein. Die (TRPV++/ARMS-)-Subpopulation nahm von knapp 2 % kontralateral auf 0,5 % ipsilateral (Anteile bezogen auf die Gesamtpopulation) ab. Dies entsprach einer Reduktion um fast 1,5 % insgesamt und bedeutet, dass nur noch knapp ein Drittel (29 %) der Subpopulation ipsilateral vorhanden war. Die (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulation reduzierten sich von 3 % in der kontralateralen Seite auf 1,33 % in der ipsilateralen Seite. Dies entsprach einer Abnahme von fast 2 % (Anteile bezogen auf die Gesamtpopulation). Entsprechend sank der Anteil dieser Population ipsilateral auf 45 % im Vergleich zur kontralateralen ab. Mit 10 % nahmen die (TRPV1++/ARMS+)-Zellen kontralateral einen größeren Anteil ein. Auf der ipsilateralen Seite verringerte sich der Anteil um die Hälfte (bezogen auf die Gesamtpopulation). Zusammengenommen verminderte sich der Anteil der drei Subpopulationen nach CCI im Vergleich zur unverletzten kontralateralen Seite um 7 %. Entsprechend erhöhte sich der Anteil der TRPV1-negativen DRG-Neuronen. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme sowohl für (TRPV1-/ARMS-)-Zellen, als auch für (TRPV1-/ARMS+)-Zellen (Chi-Quadrat-Test, p= 0,0004 für TRPV1-/ARMS+, Chi-Quadrat-Test p ≤ 0,0001 für TRPV1-/ARMS-; Abb. 8H und I). Dabei entfiel eine Zunahme von 4 % auf die TRPV1- und ARMS-negative Subpopulation. 13 % aller kontralateralen DRG-Neurone gehörten dieser Gruppe an im Vergleich zu 17 % ipsilateral. Bezogen auf die Gesamtzellzahl nahm die TRPV1-negative und ARMSpositive Zellgruppe mit 42 % in der kontralateralen Seite den größten Anteil ein. Dieser war ipsilateral noch um 5 % größer.

Schlussfolgernd lässt sich die unter **3.3.1** beschriebene Reduktion der (TRPV1+/ARMS+)- und (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulationen weiter spezifizieren. Insbesondere der Anteil der TRPV1-hochpositiven Neuronen schien zu sinken. Dieser Effekt fand sowohl in ARMS-positiven als auch in ARMS-negativen Zellen

statt. Der Anteil TRPV1-negativer DRG-Neurone nahm auf der ipsilateralen Seite zur CCI ab.



**Abbildung 8:** Veränderte Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen nach CCI (erweiterte Differenzierung der Hauptpopulationen).

A-C) TRPV1-hochpositive DRG-Neurone: A) Es besteht kein signifikanter Größenunterschied zwischen kontra- und ipsilateralen DRG-Neuronen (Kruskal-Wallis-Test, p > 0,05); alle Zellen (grau), TRPV1++/ARMS- (dunkelblau), TRPV1++/ARMS+ (lila) und TRPV1++/ARMS++ (violett). Bezogen auf die Gesamtzellpopulation zeigt sich ipsilateral (C) ein signifikant verminderter Anteil der DRG-Neurone im Vergleich zu kontralateral (B) für die (TRPV1++/ARMS-)- und (TRPV1++/ARMS+)-Subpopulationen (Chi-Quadrat-Test, \*\*\*\*,  $p \le 0,0001$ ).

D-F) TRPV1-positive Zellen: D) Es besteht kein signifikanter Größenunterschied hinsichtlich der Zellfläche zwischen kontra- und ipsilateralen DRG-Neuronen (Kruskal-Wallis-Test, p > 0,05); alle Zellen (grau), TRPV1+/ARMS- (blau), TRPV1+/ARMS+ (magenta) und TRPV1+/ARMS++ (pink). Bezogen auf die Gesamtzellpopulation zeigt sich ipsilateral (C) ein signifikant verminderter Anteil der (TRPV1+/ARMS-)-DRG-Neurone im Vergleich zu kontralateral (B) (Chi-Quadrat-Test, \*\*\*\*, p ≤ 0,0001).

G-I) TRPV1-negative Neurone: G) Es besteht kein signifikanter Größenunterschied zwischen kontra- und ipsilateralen DRG-Neuronen (Kruskal-Wallis-Test, p > 0,05); alle Zellen (grau), TRPV1-/ARMS- (hellgrau), TRPV1-/ARMS+ (rot) und TRPV1-/ARMS++ (dunkelrot). Bezogen auf die Gesamtzellpopulation zeigt sich ipsilateral (C) ein signifikant erhöhter Anteil der (TRPV1-/ARMS-)- und (TRPV1-/ARMS+)-Zellen im Vergleich zu kontralateral (B) (Chi-Quadrat-Test, \*\*\*, p= 0,0004 für TRPV1-/ARMS+; Chi-Quadrat-Test \*\*\*\*, p ≤ 0,0001 für TRPV1-/ARMS-).

### 6 Diskussion

#### 6.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

#### 6.1.1 TRPV1-Expression

Der TRPV1-Kanal ist Gegenstand ausführlicher wissenschaftlicher Studien und einer der am häufigsten zitierten Ionenkanäle in der Literatur (Isserlin et al. 2011). Somit sind seine Expressionsmuster bereits vielfach untersucht worden. Die Ergebnisse meiner immunhistochemischen Untersuchung sollen daher kurz eingeordnet und diskutiert werden. Insgesamt stehen meine Ergebnisse im Einklang mit den bisherigen quantitativen Analysen der TRPV1-Expressionsmuster. In meiner Studie zeigten sich 35 % der untersuchten thorakalen und lumbalen (Mäuse)-DRG-Neurone positiv für TRPV1. Da bereits rein visuell der Eindruck entstand, dass es mehr und weniger stark positive Zellen gibt, wurde eine subjektive Aufgliederung in positive (+) und hochpositive (++) Neurone vorgenommen und deren Verteilungsmuster untersucht. Diese weitere Differenzierung ergab, dass 58 % der TRPV1-positiven Gesamtpopulation als positiv und 42 % als hochpositiv eingeordnet werden können. Vor dem Hintergrund einer potentiellen unterschiedlichen biologischen Funktion könnte es wichtig werden, diese Subpopulationen selektiv zu betrachten. Eine Quantifizierung der Differenzierung in positiv und hochpositiv für TRPV1 ist meines Wissens bisher noch nicht erfolgt. In der gesunden Maus zeigte sich in einer anderen Studie ein Anteil von 42 % TRPV1-positiv, wobei jedoch nur die lumbalen DRGs analysiert wurden (Lee et al. 2015). Es ist bekannt, dass TRPV1 v.a. in kleinen Zellen exprimiert wird (Caterina et al. 1997). Hinsichtlich ihrer Zellfläche wiesen auch in meiner Untersuchung TRPV1-positive Zellen signifikant kleinere Zellflächen als die Gesamtzellpopulation und TRPV1-negative Zellen auf. Zur Quantifizierung der TRPV1-Expression in peripheren sensorischen Neuronen liegen hauptsächlich Daten aus Rattengewebe vor. Hier waren in gesunden DRG-Neuronen laut immunhistochemischer Analyse 35 % (Aoki et al. 2005) bzw. 29 % der Zellen TRPV1-positiv (Price & Flores 2007). Dies bezieht sich auf DRGs der Höhe L4/L5. Teilweise erfolgte eine separate Auswertung einzelner DRGs. Es konnte gezeigt werden, dass 32 % aller neuronalen Zellen aus L4 und 39 % bzw. 33 % aus L5 TRPV1-positiv waren (Carlton & Hargett 2002; Ma et al. 2005). Eine weitere Studie wies für 35 % der L4 DRGs und 33 % der L5 DRGs positive Immunoreaktivität für TRPV1 nach (Xu et al. 2009). Von insgesamt 9715 ausgewerteten DRG-Neuronen zeigten sich in einer weiteren Studie 29 % TRPV1-positiv (Binzen et al. 2006). Neben immunhistochemischer Detektion auf Proteinlevel lässt sich mittels *polymerase chain reaction* (PCR) und *in situ* Hybridisierung auch mRNA nachweisen. Die prozentualen Angaben unterscheiden sich: Hara et al. zeigten, dass 21 % aller L4-6 DRGs mittels immunhistochemischer Analyse TRPV1-positiv waren. Dazu steht im Vergleich, dass 38 % für PCR/*in situ* TRPV1-positiv waren (Hara et al. 2013). Der intrazelluläre Vorrat an mRNA scheint höher als der tatsächlich exprimierte Ionenkanal. Diese Tendenz spiegelte sich mit einem Anteil von 47 % für TRPV1 in L4/L5 DRGs per PCR/*in situ* wider (Kobayashi et al. 2005). Als weiterer wesentlicher Faktor zur Erklärung prozentualer Unterschiede ist die Art der Gewebefixierung zu erwähnen. Bei einer geringeren Formaldehyd Konzentration von 0,25 % im Vergleich zur gängigen und auch in meinen Experimenten genutzten Konzentration von 4 % zeigt sich eine deutliche Zunahme der ir-positiven Neurone auf bis zu 77 % (Hoffman et al. 2010).

#### 6.1.2 ARMS-Expression

In dieser Studie wird zum ersten Mal die Expression des Adaptorproteins ARMS auf peripheren sensorischen Proteinlevel in Neuronen von Mäusen mittels immunhistochemischer Analyse nachgewiesen. Knapp 80 % aller untersuchten DRG-Neurone zeigten eine positive Immunoreaktivität für ARMS, davon konnten ca. ein Viertel als hochpositiv klassifiziert werden. Auffällig war ein im Durchschnitt größerer Zellkörper dieser Neurone im Vergleich zur Gesamtzellpopulation. Im Rahmen der ersten Untersuchungen zu ARMS erfolgte durch Kong et al. bereits der Nachweis von DNA und mRNA in peripheren und zentralen Neuronen der Ratte mittels Northern Blot und in situ Hybridisierung (Kong et al. 2001). ARMS-Protein konnte bisher aus Phäochromozytom-(PC12-)Zellen, einer Modell-Zelllinie aus der Ratte, isoliert werden (Iglesias et al. 2000). Immunhistochemisch erfolgte der Nachweis dieses Strukturproteins ergänzend in kultivierten primären kortikalen Neuronen von Ratten (Cabrera-Poch et al. 2004), Melanomzellen (Liao et al. 2011), der neuromuskulären Endplatte (Luo et al. 2005), bronchoalveolär-lavage-fluid-(BALF-)Zellen in der Maus (Ni et al. 2010) und in der Milz und peripheren Blutzellen nach allergeninduzierter Atemwegsprovokation (Li et al. 2013). Im Menschen wurde ARMS in Neuroblastomzellen detektiert (Rogers & Schor 2013). In Knockout-Experimenten zeigte sich dass ohne ARMS massive Defizite in der Entwicklung

sensorischer Neurone auftraten (Cesca et al. 2011). Die hier erfolgte quantitative Analyse und der Nachweis einer Expression auf Proteinebene von ARMS sind wesentliche ergänzende Informationen zu den bisher erfolgten Knockout-Studien und dem Nachweis auf RNA- und DNA-Level.

#### 6.1.3 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS

Die vorliegende Studie zeigt zum ersten Mal eine Ko-Expression von TRPV1 und ARMS Proteinen in DRG-Neuronen der Maus. Insgesamt 30 % aller DRG-Neurone (n=4048/13348) ko-exprimierten den Ionenkanal und das Adaptorprotein. Da bisher noch keine Quantifizierung von ARMS in DRG-Neuronen erfolgt ist, ist auch keine Analyse der Ko-Expression mit TRPV1 zum Vergleich der erhobenen Zahlen existent. Betrachtet man die Anzahl der TRPV1-positiven (inklusive der hochpositiven) DRGs, die auch ARMS enthalten, liegt dieser Anteil in der vorliegenden Untersuchung bei 85 %. Diese hohe Ko-Expressionsrate ist als wesentliche Voraussetzung für eine funktionelle Zusammenarbeit zu sehen, da ohne räumliche Nähe und relevante Anzahl von ko-exprimierenden Neuronen eine funktionelle Interaktion unwahrscheinlich erscheint. Nur 5 % aller Zellen (n=689) exprimierten TRPV1, aber kein ARMS.

Die Zellgrößen unterscheiden sich zwischen den Subpopulationen signifikant. Es zeigt sich eine Häufung der (TRPV1+/ARMS-)-Zellen bei den sehr kleinen Zellkörpern. Untersucht man die Zellfläche der TRPV1-hochpositiven, -positiven und -negativen Zellen weiter in Hinblick auf ihre Ko-Expressionsmuster lassen sich folgende Aussagen treffen: In den TRPV1-positiven und -hochpositiven Subpopulationen nimmt die Zellgröße mit der ARMS-Ko-Expressionsrate zu. TRPV1- negative Neurone hingegen verteilen sich unabhängig von ihrer ARMS-Ko-Expression in einem breiteren Größenbereich. Prozentual entfallen dabei im Vergleich deutlich weniger Zellen auf den Bereich der "kleinen Zellen".

Die insgesamt hohe Ko-Expressionsrate legt eine potentielle funktionelle Bedeutsamkeit nahe. Allerdings findet sich hier generell eine hohe ARMS-Expressionsrate in DRG-Neuronen (80 % aller DRGs), so dass auch TRPV1negative Zellen ARMS exprimieren, was darauf hinweist, dass ARMS auch mit anderen Proteinen interagieren könnte. Fast zwei Drittel der TRPV1-positiven, hochpositiven, aber eben auch -negativen Zellen sind ARMS-positiv, bis zu einem

53

Drittel ARMS-hochpositiv und nur 13-15 % der TRPV1-positiven und -hochpositiven und 24 % der TRPV1-negativen Neurone sind ARMS-negativ.

#### 6.1.4 Ko-Expression von TRPV1 und ARMS mit neuronalen Markern

Die guantitative Analyse der immunhistochemischen Daten erfolgte auch für die TRPV1- und ARMS-ko-exprimierenden DRG-Neurone in Hinblick auf ihre Ko-Expression mit verschiedenen neuronalen Markern. Untersucht wurden alle thorakalen und lumbalen Spinalganglienzellen in der gesunden Maus. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Studien ist auch hier nur eingeschränkt möglich. Da für ARMS noch keinerlei Daten zur Quantifizierung vorliegen, lassen sich nur Studien hinzuziehen, die die Verteilung der Ko-Expression von TRPV1 in peptidergen, nonpeptidergen und myelinisierten Nozizeptor-Subpopulationen untersuchten. Dies erscheint jedoch gerade bei der hohen Ko-Expressionsrate von TRPV1 und ARMS als erste Vergleichsoption sinnvoll. Alle im folgenden zitierten Studien beziehen sich demnach nur auf die Ko-Expression von TRPV1 und entsprechenden Markern ohne ARMS. Zusätzlich wird auf generelle Unterschiede hinsichtlich Spezies und Umfang der untersuchten Spinalganglienzellen (z.B. L4/L5 oder alle lumbalen, thorakalen, zervikalen DRGs) hingewiesen. Teilweise erfolgte eine retrograde Detektion zur gezielten Quantifizierung verschiedener Projektionsgebiete wie Haut, Knochen oder innerer Organe.

In meiner Studie entfällt der Großteil der (TRPV1+/ARMS+)-Nervenzellen auf die peptidergen Nozizeptoren. Sie sind jedoch auch in der non-peptidergen Gruppe und in myelinisierten DRG-Neuronen repräsentiert. Die Hälfte der DRG-Neurone, die TRPV1- und ARMS-positiv sind, sind auch immunoreaktiv für CGRP. Eine frühere Untersuchung der L4/L5 DRGs in Ratten detektierte 51 % der TRPV1-positiven Neuronen als CGRP-immunoreaktiv (Price & Flores 2007). In der gleichen Studie wurde eine Ko-Expressionsrate von IB4 in TRPV1-positiven Zellen von 68 % angegeben. Diese liegt deutlich über der von uns erhobenen Immunoreaktivität von 30 % für IB4 in TRPV1- und ARMS-positiven DRGs. Die (TRPV1+/ARMS-)-Gruppe weist in meiner Studie deutlich seltener eine Ko-Expression mit den untersuchten Markern auf. Ein Viertel lassen sich der peptidergen (CGRP) Population zuordnen, knapp 6 % der non-peptidergen (IB4) und den myelinisierten Neuronen (NF 200). Der Trend, dass TRPV1-positive Zellen, die ARMS-negativ sind, einen kleineren Zellkörper aufweisen als Neurone, die beide Proteine ko-exprimieren, bestätigt sich

unabhängig von der Marker-Expression. CGRP-, IB4- und NF-200-positive DRG-Neurone sind kleiner, wenn sie ARMS nicht exprimieren. Da sämtliche thorakalen und lumbalen Spinalganglienzellen der Maus untersucht wurden, bietet meine Arbeit einen Überblick über die Gesamtexpression und kann als Basis-Vergleich für detaillierte zukünftige Expressionsanalysen verwendet werden.

Die Differenzierung in peptiderge und non-peptiderge Neurone ist kritisch zu betrachten. Price und Flores z. B. zeigten eine Überlappung beider Gruppen. 10 % aller DRGs exprimierten CGRP und IB4. Auf meine Studie übertragen würde das bedeuten, dass ca. 45 % meiner CGRP-positiven Zellen auch IB4-positiv und 30 % der IB4-positiven Neuronen auch immunoreaktiv für CGRP wären. In Hinblick auf ihre Zuordnung zur peptidergen oder non-peptidergen Population untersuchte die Studie von Aoki et al. die Ko-Expressionsmuster von DRGs der Ratte, die entweder in die plantare Haut projizierten (DRG Th13-L5, n=205) oder die L5/L6 Bandscheibe innervierten (DRG L4/L5, n=859). Hier konnten Unterschiede in den Ko-Expressionsraten zwischen den beiden Projektionsgebieten gemessen werden. 73 % der TRPV1-positiven Nervenzellen exprimierten auch CGRP in DRG L4/L5, nur 58 % in Th13-L5. Deutlicher fiel die Diskrepanz bei der non-peptidergen TRPV1-positiven Subpopulation aus. 5 % der TRPV1-positiven Nozizeptoren der L5/L6 Bandscheibe waren IB4-positiv, wohingegen 45 % der plantaren Hautnozizeptoren TRPV1 und IB4 ko-exprimierten. Es ist zu beachten, dass insgesamt mehr IB4-positive DRGs in L4/L5 (20 %) als in Th13-L5 (1 %) vorlagen (Aoki et al. 2005). Die Differenzierung anhand von Markern in distinkte peptiderge und non-peptiderge Populationen von Nozizeptoren geht auf eine Reihe von Arbeiten zurück (siehe Review Woolf & Ma 2007). Prinzipiell wird die IB4-positive non-peptiderge Subpopulation als glial cellderived neurotrophic factor (GDNF)/Ret-abhängig und die CGRP/SP-positive peptiderge als NGF/TrkA-abhängig klassifiziert (Molliver et al. 1997). Beide Nozizeptor-Hauptpopulationen exprimieren TRPV1 (Snider & McMahon 1998), wobei ca. 40 % auf die NGF-abhängige Population und ca. 30 % auf die GDNF-abhängige Population entfallen. Je nach Expression der zugehörigen Rezeptoren (TrkA bzw. Ret) und CGRP/SP bzw. IB4 projizieren die Afferenzen in unterschiedliche Rückenmarksareale. dass unterschiedlichen und distinkten SO von Schmerzsignalwegen mit unterschiedlichen Aufgaben ausgegangen wird (Braz et al. 2005; Zylka et al. 2005). Diese Lamina-spezifischen Innervationsmuster der nozizeptiven Afferenzen im Rückenmark werden u.a. durch subpopulationsspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert (Chen et al. 2006). Der Annahme, das eine "molekulare Logik" hinter der Diversität der Nozizeptorausstattung steht und distinkte Ausstattungstypen mit klaren Aufgaben existieren, stehen eine Reihe von Ko-Expressionsstudien gegenüber. Wie zuvor detailliert aufgeführt, zeigt sich eine Überlappung der CGRP- und IB4-Expression in DRG-Neuronen (Price & Flores 2007). Für TrkA, den Rezeptor der peptidergen Nozizeptoren, und IB4 besteht in Ratten DRGs L3-L6 eine Ko-Expression von 35 % (Fang et al. 2006). Die Untersuchung von C-Faser-Bündeln im Nervus ischiadicus ergab das Vorliegen sowohl CGRP- als auch IB4-positiver Axone (Murinson et al. 2005). Auch die Definition von "peptiderg" ist kritisch zu hinterfragen, da CGRP und SP nicht immer ko-exprimiert werden. Eine aktuelle Studie untersuchte die Expressionsmuster von CGRP und SP in der Maus (DRG C7, n=898) und zeigte, dass nur 50 % aller CGRPpositiven Neurone auch SP exprimieren. Anders herum zeigten 91 % aller SPpositiven Spinalganglienzellen wiederum positive Immunoreaktivität für CGRP (Kestell et al. 2015). Die weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen der Autoren zur Klassifikation lassen auf eine Zuordnung der (CGRP+/SP-)-Subpopulation zu den Mechanozeptoren schließen. Ihr neurochemisches Profil (89 % % ko-exprimierten NF 200, nur 32 TRPV1), Zellkörpergröße und Rückenmarksprojektionsorte sprechen dafür. Insgesamt lag der Anteil der NF-200positiven Zellen in dieser Untersuchung überraschend hoch. In meiner Studie sind hingegen 22 % der (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulation NF-200-positiv. Eine andere Untersuchung in L4/L5 DRGs von Ratten zeigte eine gering ausgeprägte Expression von TRPV1 in myelinisierten Neuronen ohne diese konkret zu guantifizieren (Kobayashi et al. 2005).

#### 6.2 Funktionelle Bedeutung der Ko-Expression von TRPV1 und ARMS

#### 6.2.1 TRPV1 und seine Adaptorproteine

Die Modulationsmöglichkeiten des TRPV1-Kanals sind komplex und erfolgen über verschiedene Mechanismen. Phosphorylierung, transkriptionale und translationale Regulierung, Interaktionen mit Phospholipiden und Protein-Protein- sowie Protein-Lipid-Interaktionen zählen zu den wichtigen bekannten Optionen (Bhave et al. 2002; Zhang et al. 2005; Chu et al. 2011; Jeske 2012). Im Kontext dieser Vorgänge kann TRPV1 mit einer Reihe von modulationsfähigen Proteinen interagieren. Über die

Bildung Multi-Protein-Signalkomplexen mit z.B. Tubulinen. von dem Plasmamembran-assoziierten-Protein phosphoinositide interacting regulator of TRP (Pirt), dem Strukturprotein AKAP 79/150, dem Fas-assozierten Faktor (FAF1), dem GABA-A-Rezeptor-assoziierten-Protein (GABARAP) oder dem TRPV2-Kanal werden Expression und die Aktivität funktionaler TRPV1-Heteromere die in der Plasmamembran, der Transport und Einbau des Kanals und seine Sensitivität gegenüber verschiedenen Stimuli gesteuert und beeinflusst (Goswami et al. 2004; Liapi & Wood 2005; Kim et al. 2006; Jeske et al. 2008; Kim et al. 2008; Schnizler et al. 2008; Laínez et al. 2010).

#### 6.2.2 ARMS als Interaktionspartner des TRPV1-Kanals

Da eine Ko-Expression von TRPV1 und ARMS in DRG-Neuronen besteht und theoretische Überlegungen eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine möglich erscheinen lassen, ist mittels Capsaicin-Stimulation im Kalziumimaging-Experiment die Frage adressiert worden, ob hinsichtlich der Capsaicin-Sensitivität zwischen der TRPV1- und ARMS-ko-exprimierenden Subpopulation und der allein TRPV1positiven Subpopulation ein Unterschied in DRG-Neuronen der Maus besteht. Mittels Untersuchung der kombinierten von Kalziumimaging in anschließend immunzytochemisch identifizierten DRGs, die entweder nur TRPV1, nur ARMS oder TRPV1 und ARMS exprimieren, konnte hier gezeigt werden, dass der Capsaicininduzierte Kalziumeinstrom bzw. die gemessen Fura-Ratio für die ko-exprimierenden Neurone größer, wenn auch nicht signifikant, ist als für TRPV1-positive Zellen ohne das Adapterprotein. DRG-Neurone, die nur ARMS exprimieren, zeigten keine Antwort auf Capsaicin. Dies bestätigt die durch Ko-Expressionsstudien gewonnene Vermutung, dass eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine besteht, die sich auf die Sensitivität des Ionenkanals auswirkt. Weitere Experimente zur Untersuchung einer funktionellen Interaktion zwischen TRPV1 und ARMS liegen aus unserem Labor vor. Der Doktorand Christian Kasper wies eine funktionelle Interaktion zwischen ARMS und TRPV1 in ko-transfizierten HEK-Zellen mittels Kalziumimaging und Patch Clamp nach (nicht publizierte Daten). Hier zeigte sich beim Kalziumimaging in Übereinstimmung mit den Experimenten in DRG-Neuronen eine stärkere Capsaicin-Antwort in den TRPV1- und ARMS-ko-exprimierenden Zellen. In HEK-Zellen war dieser Effekt signifikant. Ergänzend zeigten elektrophysiologische Untersuchungen ebenfalls höhere Amplituden in ko-transfizierten Zellen im Vergleich zu allein TRPV1-positiven HEK-Zellen. Zusätzliche Kalziumimaging-Experimente mit Verwendung des PKA-Hemmers H89 gaben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges an der ARMS-vermittelten Sensitivierung von TRPV1. Von Frau Dr. rer. nat. Viola Spahn durchgeführte Radioligand-Bindungsstudien zeigten, dass eine Ko-Expression von TRPV1 und ARMS den Anteil von <sup>3</sup>[H]-RTXgebundenen TRPV1 im Vergleich zu rein TRPV1-positiven Zellen erhöht (nicht publizierte Daten). Dies bedeutet, dass in Anwesenheit von ARMS mehr TRPV1 in die Membran eingebaut wird. Möglicherweise ist die durch ARMS verursachte TRPV1-Sensitivierung somit zum Teil durch eine erhöhte TRPV1-Expression in der bedingt. Vermehrter Einbau von Plasmamembran TRPV1-Kanal in die Plasmamembran unter pathologischen Bedingungen kann eine Ursache für erhöhte Sensitivität sein (Ferrandiz-Huertas et al. 2014). Eine Beteiligung von ARMS ist denkbar und sollte in zukünftigen Untersuchungen weiter adressiert werden.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten, dass ARMS sehr wahrscheinlich einen neuen Interaktionspartner von TRPV1 darstellt und möglicherweise als Teil eines Signalkomplexes an den komplexen Sensitivierungsprozessen des Kanals beteiligt ist. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Ko-Expression von TRPV1 und ARMS als neuer Indikator für neuronale Sensitivierung gegenüber schmerzhaften Stimuli nutzbar ist. Die Klassifikation nozizeptiver Neurone sollte berücksichtigen, dass die komplexen Regulationsmechanismen von Ionenkanälen wie TRPV1 oft im Kontext von Signalkomplexen erfolgen. Bestandteile solcher Signalosome sind Proteine aus verschiedenen Untergruppen wie z.B. die PKA-Enzymuntereinheit RIIß als Teil des AKAP-Signalosoms (Isensee et al. 2014a), das Strukturprotein AKAP selbst (Stucky et al. 2009), oder potentiell auch ARMS. Zur Identifikation der exakten Interaktionsmechanismen zwischen TRPV1 ARMS und und der daraus resultierenden Sensitivierung des lonenkanals sind weitere Experimente unerlässlich.

#### 6.2.3 TRPV1-Signalkomplexe und ihre Wirkmechanismen

Neben dem von uns neu entdeckten Adaptorprotein ARMS wurden eine Reihe anderer bedeutsamer Interaktionspartner identifiziert. Über die TRPV1-assoziierten Proteine und die resultierenden Signalkomplexe ist allerdings insgesamt noch wenig bekannt. FAF1 ist als physikalischer Interaktionspartner von TRPV1 im DRG identifiziert worden und an dessen Aktivitätskontrolle beteiligt (Kim et al. 2006). Ein weiteres neu entdecktes Membranprotein, das einen Komplex mit TRPV1 bildet und den Kanal reguliert, ist Pirt (Kim et al. 2008). In DRG-Neuronen zeigt sich eine Ko-Expression von Pirt und TRPV1. Eine heterologe Pirt-Expression in transfizierten HEK-Zellen verstärkt die durch Hitze und Capsaicin hervorgerufenen TRPV1-Ströme analog dem in unseren Experimenten gezeigten Effekt durch ARMS. 84 % aller DRGs exprimieren Pirt, insbesonderere in peptidergen (CGRP) und non-peptidergen (IB4) C-Faser-Neuronen. ARMS hingegen wurde auch zu 20 % in mylinisierten NF-200-positiven Neuronen nachgewiesen. Eine weitere Studie zeigte den Einfluss von GABARAP auf die Modulation des TRPV1-Kanals. Auch in diesem Fall wurde die TRPV1-Expression in Anwesenheit des Ankerproteins erhöht und die Oberflächenexpression des Kanals in der Membran vermehrt. Allerdings sorgte die GABARAP-induzierte erhöhte Membranoberflächenexpression von TRPV1 nicht für eine erhöhte Aktivität des Kanals. Im Gegenteil wurde diese sogar reduziert (Laínez et al. 2010). Dies steht in Widerspruch zu unseren Ergebnissen mit ARMS. Zur Ko-Expressionsrate in DRG-Neuronen wurden keine guantitativen Daten erhoben, es wurde lediglich exemplarisch eine Ko-Expression für TRPV1 und den GABA-A-Rezeptor in einigen kultivierten Neuronen gezeigt. Ein neu entdeckter Interaktionspartner von TRVP1 ist die Untereinheit Kvß2 des spannungsabhängigen Kaliumkanals. Durch die Assoziation der beiden Proteine scheint es zu einem vermehrten Membraneinbau von TRPV1 und einer erhöhten Empfindlichkeit des TRPV1 gegenüber Capsaicin zu kommen (Bavassano et al. 2013). Die Autoren vermuten eine allosterische Veränderung der TRPV1-Konformation durch die Interaktion mit Kvß2. ARMS könnte seinen sensitivierenden Effekt über ähnliche Mechanismen entfalten. Auch für das Strukturprotein AKAP 79/150 ist eine TRPV1-Aktivität bekannt. AKAP TRPV1, Regulierung der kann aus Adenylylcyclasen, PKA und PKC ein Signalosom formieren, das wichtig für die Sensitivierung des Kanals ist. Die TRPV1-sensitivierende Wirkung von inflammatorischen Substanzen wie Prostaglandin E2 wird ebenfalls über AKAP vermittelt (Rathee et al. 2002; Schnizler et al. 2008; Jeske et al. 2009; Efendiev et al. 2013). Proinflammatorische Mediatoren wie Bradykinin und Prostaglandin E2 modulieren TRPV1 via AKAP über die Formation eines Signalkomplexes mit PKA, PKC und Calcineurin (Zhang et al. 2008). Für den Einbau funktionaler TRPV1-Tetramere in die Membran ist ein AKAP/PKA-Komplex verantwortlich (Vetter et al. 2008). Expressionsstudien zeigten, dass große Mengen des TRPV1-Kanals zytosolisch somit als gelagert werden und Vorrat vorliegen und zur Funktionsfähigkeit in die Membran eingebaut werden müssen (Brandao et al. 2012). Somit sind Strukturproteine wie AKAP essentiell für den TRPV1-Transport in der Zelle ohne den ein Großteil der Kanal-Funktion verloren geht. Neben dem PKAvermittelten Einbau von funktionalen TRPV1-Proteinen in die Membran als eine Ursache für erhöhte Sensitivität, wurde auch die Phosphorylierung des Kanals innerhalb des AKAP-Signalosoms als weitere Ursache für die Sensitivierung gegenüber Capsaicin nachgewiesen (Jeske et al. 2008; Vetter et al. 2008). Somit ist es wichtig, auch ARMS weiterführend im Kontext von Phosphorylierungsvorgängen zu untersuchen.

Interessanterweise haben wir in ca. 20 % der Zellen, die TRPV1 und ARMS koexprimieren, auch eine Expression von AKAP 150 zeigen können. Vor allem kleine nozizeptive Neurone zeigen dieses Expressionsmuster, wie auch schon andere Studien nachgewiesen haben (Brandao et al. 2012).

#### 6.2.4 Auf den Spuren des TRPV1/ARMS-Signalosoms

Die Ergebnisse der von Frau Dr. rer. nat. Viola Spahn durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien legen nahe, dass die durch ARMS verursachte TRPV1-Sensitivierung u.a. (wie bei AKAP) durch eine erhöhte TRPV1-Expression in der Plasmamembran bedingt ist. Diese Erkenntnis ist vor dem Hintergrund interessant, dass sowohl ARMS als auch TRPV1 in den TrkA/NGF-Signalweg involviert sind (Chuang et al. 2001; Kong et al. 2001; Ji et al. 2002; Zhang et al. 2005). Neben seiner bedeutenden Rolle in der Formation des TrkA-Rezeptorkomplexes hat das Für diverse weitere Interaktionspartner. Adaptorprotein Glutamat. Ephrin-Rezeptoren, VEGF-Rezeptoren, P-loop Nukleotidphosphatasen und ATP sind funktionelle Interaktionen identifiziert worden. ARMS zeichnet sich insgesamt durch multiple Bindungsdomänen aus. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für seine potentielle Rolle als integrative Signalplattform (Neubrand et al. 2012). ARMS reguliert weiterhin die Modellierung des Zytoskeletts, neuronale Differenzierung, Neurotrophin-Signalwege und interagiert mit Bestandteilen des Zytoskeletts wie Tubulin (Arévalo et al. 2004; Higuero et al. 2010). Es ist nennenswert, dass Interaktionen mit dem Zytoskelett und Neurotrophinen auch für TRPV1 bekannt sind (Goswami et al. 2004). Es gibt eine Reihe weiterer Signalwege und Interaktionspartner, die TRPV1 und ARMS teilen. Theoretisch weisen alle diese Schnittstellen auf eine mögliche Zusammenarbeit hin. ARMS wird auch als Kidins220 bezeichnet und ist als Substrat und Interaktionspartner der PKD bekannt (Iglesias et al. 2000). PKDs phosphorylieren TRPV1 und sind in Inflammationsprozesse involviert (Amadesi et al. 2009). Die ERK/MAPK-Signalwege sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt (Sweatt 2001). Im Kontext der TRPV1-assoziierten Signalwege spielt ERK eine Schlüsselrolle in der Sensitivierung des Kanals (Obata et al. 2004; Zhuang et al. 2004; Zhang et al. 2011). Die ERK-Aktivierung ist sowohl durch Capsaicin als auch NGF induzierbar (Dai et al. 2002; Hucho & Levine 2007) und in die retrograde Signalweiterleitung durch Neurotrophine involviert (Zweifel et al. 2005). ARMS ist ebenfalls im Zusammenhang der Neurotrophin-Signalweiterleitung mit ERK/MAPK verknüpft (Arévalo et al. 2004; Arévalo et al. 2006). Zusätzlich sind NGF/TrkA und seine ARMS-vermittelten ERK/MAPK-Signalwege auch an der Pathogenese von Asthma Bronchiale im Mausmodell beteiligt (Ni et al. 2010). Ein weiterer Link ist der Transkriptionsfaktor NF-kB, ein Bestandteil des ERK/MAPK-Signalweges, der im TRPV1- und ARMS-Kontext beschrieben wurde (Reichardt 2006; Zampieri & Chao 2006; Sniderhan et al. 2008).

#### 6.3 Veränderte Expressionsmuster nach Nervenläsion

#### 6.3.1 Tiermodelle für neuropathischen Schmerz

Die Betrachtung des TRPV1/ARMS-Signalkomplexes unter pathologischen Bedingungen im experimentellen Mausmodell sollte zu einer ersten Einschätzung seiner potentiellen Relevanz im Schmerzkontext dienen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich das Ko-Expressionsmuster bei diesem Modell für neuropathischen Schmerz zwischen den betroffenen ipsi- und den nicht betroffenen kontralateralen DRG-Neuronen ändert. Eine Änderung des Anteils der neu identifizierten Subpopulation an der Gesamtzellpopulation oder eine veränderte Zugehörigkeit zu anderen Größenkategorien könnte ein Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung im Schmerzkontext sein. Umfassende Veränderungen im Phänotyp primärer sensorischer afferenter Neurone bedingen die Entstehung neuropathischer Schmerzsymptome, wobei sowohl verletzte als auch nicht betroffene DRGs zur Entstehung beitragen (Gold 2000; Costigan et al. 2009). Neuropathischer Schmerz multiäthiologisches Phänomen (z.B. traumatische, infektiologische, ist ein toxikologische, metabolische und immunologische Ursachen), das mit multiplen molekularen und zellulären Veränderungen einhergeht und entsprechend auf verschiedene Analgetika unterschiedlich gut anspricht (Baron 2006; Campbell & Meyer 2006; Cohen & Mao 2014). Dies spricht für verschiedene Mechanismen, die den neuropathischen Schmerzsyndromen zugrunde liegen. Hinzu kommt die Möglichkeit einer neuroinflammatorischen Begleitreaktion (Ellis & Bennett 2013). Immunhistochemische Expressions- oder Ko-Expressionsstudien zur Identifikation und Evaluation am Schmerzgeschehen beteiligter "Mitspieler" sind eine häufig genutzte Methode um pathologische Modelle zu untersuchen (Hammond et al. 2004; Ruscheweyh et al. 2007; Xu et al. 2009; Nitzan-Luques et al. 2013; Liu et al. 2015).

#### 6.3.2 Expressionsmuster von TRPV1 und ARMS nach Nervenläsion

meinen Experimenten konnte eine veränderte Zusammensetzung In der untersuchten Subpopulationen (ipsi vs. kontra) nach CCI detektiert werden. Hinsichtlich der Zellgrößen gab es keinerlei Veränderungen. Ipsilateral waren nach CCI weniger DRG-Neurone der (TRPV1+/ARMS-)- und (TRPV1+/ARMS+)-Subpopulationen als kontralateral vorhanden. Die ipsilaterale Reduktion der (TRPV1+/ARMS+)- und (TRPV1+/ARMS-)-Subpopulationen ließ sich weiter spezifizieren. Insbesondere der Anteil der TRPV1-hochpositiven Neuronen schien zu sinken. Dieser Effekt fand sowohl in ARMS-positiven als auch -negativen Zellen statt. Die Hauptveränderung fand demnach bei der Proteinexpression des TRPV1-Kanals unabhängig von ARMS statt. Dabei kann die Veränderung bezogen auf die Subpopulation selbst betrachtet werden oder es wird die Abnahme anteilsmäßig bezogen auf die Gesamtzellpopulation evaluiert, um eine Einschätzung hinsichtlich der Relevanz zu treffen. Die angenommene Voraussetzung ist, dass eine große Veränderung auch mit einer großen Relevanz einhergeht. Man könnte jetzt spekulieren, dass TRPV1-assoziierte Sensitivierungsvorgänge im Zusammenhang mit neuropathischem Schmerz bei dem untersuchten CCI-Modell nicht durch eine Interaktion mit dem Adaptorprotein ARMS innerhalb eines Signalosoms assoziiert sind. Denn ein verändertes Expressionsmuster zeigt sich nicht für die TRPV1- und ARMS-ko-exprimierende Subpopulation, sondern nur für TRPV1 mit und ohne ARMS. Die Limitationen einer rein immunhistochemischen Analyse lassen eine solche Schlussfolgerung jedoch verfrüht erscheinen. Die Fragen, ob eine Sensitivierung des Ionenkanals stattfindet und ob ARMS dabei eine Rolle spielt, bleiben mit dieser Methode unbeantwortet. Die zuvor diskutierten Daten zur funktionellen Interaktion legen diese Möglichkeit jedoch eher nahe. Kürzlich ist eine modulierende Funktion von Natriumkanälen für ARMS gezeigt worden (Cesca et al. 2015). Natriumkanäle sind ebenfalls in die Genese neuropathischer Schmerzen involviert (Liu & Wood 2011; Tseng et al. 2014; Dib-hajj et al. 2015). Es bleibt die Frage zu beantworten, ob eine relevante funktionelle Interaktion zwischen TRPV1 und ARMS an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt ist. Sollte dies der Fall sein, wäre als nächstes zu klären, ob eine Inhibierung dieser Interaktion möglich ist und ob eine analgetische Wirkung ohne relevante Nebenwirkungen erzeugt werden kann.

In Bezug auf die Veränderungen der TRPV1-Proteinexpression nach CCI stellt sich die Frage, warum sich vor allem der Anteil der TRPV1-hochpositiven Neurone verringerte. Zunächst gilt es zu überlegen, wo im Zellkörper TRPV1 vorliegt. Nur ein Teil der exprimierten TRPV1-Kanäle ist in der Plasmamembran lokalisiert. Es gibt ein intrazellulär gespeichertes Reservoir an TRPV1, welches entweder für den Einbau in die Zellmembran oder zum Transport in Richtung peripheres oder zentrales Terminal vorliegt (Brandao et al. 2012). Anhand der vorliegenden Daten könnte man annehmen, dass Zellen mit viel intrazellulär gespeichertem TRPV1 die TRPV1hochpositiven DRGs repräsentieren und intrazellulär gespeichertes TRPV1 in die Peripherie "schicken", wodurch sich ihr Anteil verringert. Dies könnte vor Ort für eine Sensibilisierung sorgen. Diese Hypothese sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Eine erhöhte TRPV1-Proteinexpression am Ort der Verletzung konnte nach Nervenschädigung gezeigt werden und ist vermutlich an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt (Biggs et al. 2006). Eine Schädigung der DRGs bzw. der zugehörigen Axone führt zu einer Abnahme von TRPV1 in der Nervenzelle (Michael & Priestley 1998), so dass sehr wahrscheinlich auch die membranständigen Ionenkanäle betroffen sind. Die immunhistochemische Analyse sagt jedoch nichts über den Zustand der im Zellkörper befindlichen Kanäle hinsichtlich ihres Sensitivierungsstatus aus. In diversen neuropathischen und inflammatorischen Schmerzmodellen sind veränderte Expressionsmuster von TRPV1 detektiert worden.

Im Folgenden werden einige dieser anderen Studien zur TRPV1-Expression vorgestellt um die Ergebnisse meiner Studie einzuordnen. Zum Verhalten der ARMS-Expression und der Ko-Expressionsmuster von TRPV1 und Adaptorproteinen in pathologischen Schmerzmodellen liegen in der Literatur noch keine Daten vor. Hudson et al. untersuchten die Proteinexpression von TRPV1 in drei Modellen für neuropathischen Schmerz in der Ratte: spinal nerve ligation (SNL) von L5, partial sciatic nerve ligation (PSNL) und partial sciatic nerve section (PSNS). Besonders zwischen zweien dieser Modelle, die die Möglichkeit zur isolierten Untersuchung der geschädigten und nicht geschädigten DRG-Neurone bieten (SNL und PSNS), unterschieden sich die Ergebnisse. Während in den geschädigten Spinalganglienzellen eine Reduktion der TRPV1-Expression auf ein Zehntel im SNL-Modell und ein Drittel im PSNS zu beobachten war, zeigte sich in den intakten Neuronen eine Hochregulation des Ionenkanals, die teils mit einer vermehrten Proteinexpression von TRPV1 in NF-200-positiven-A-Faser-Neuronen verbunden war (Hudson et al. 2001). Ein Anstieg der TRPV1-mRNA wurde auch in kleinen und mittleren Nozizeptoren der intakten L4 DRG-Neurone in der Ratte beim L5 SNL-Modell nachgewiesen (Fukuoka et al. 2002). Nach SNL änderte sich die Genexpression von TRPV1 nicht (Macdonald et al. 2001). Ma et al. zeigten eine Reduktion der TRPV1-Expression in kleinen DRG-Neuronen (Nozizeptoren) nach SNL, in mittleren und großen Neuronen (Mechanorezeptoren) hingegen eine Hochregulation (Ma et al. 2005). Durch die mangelnde Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen geschädigt und nicht geschädigt im CCI-Modell (Bennett & Xie 1988; Hudson et al. 2001), konnte hier nur eine Gesamtauswertung aller DRG-Neuronen erfolgen. Meine Ergebnisse zeigen eine Reduktion von TRPV1 in DRG-Neuronen 14 Tage nach CCI. Eine andere Studie zur Veränderung der Proteinexpression von TRPV1 nach CCI liegt meines Wissens nicht vor. Eine Reduktion der TRPV1-Expression zeigte sich auch im Menschen nach traumatischer Verletzung der Spinalganglien und ihrer Neurone (Facer et al. 2007). Eine Zunahme der TRPV1-Proteinexpression konnte in IB4-positiven Neuronen nach SNL beobachtet werden (Vilceanu et al. 2010). Eine Zunahme des Ionenkanals zeigte sich auch in den großen trigeminalen Neuronen in einem Modell der Trigeminus-Neuralgie der Ratte (Urano et al. 2012). Thermale Hyperalgesie bei Paclitaxelinduzierter Neuropathie war mit einer erhöhten TRPV1-Expression assoziiert, wobei sich Unterschiede zwischen immunhistochemischer Untersuchung, Western Blot und PCR/in situ Hybridisierungsexperimenten darstellten (Hara et al. 2013).

# 6.4 Kritische Betrachtung und Limitationen immunhistochemischer und zellexperimenteller Ansätze

Ko-Expressionsstudien können zum Überdenken etablierter Modelle führen und stimmen häufig nicht mit den Erwartungen aus vorherigen Studien überein. Prinzipiell gilt es, die Qualität immunhistochemischer Untersuchungen einzuschätzen und eine Reihe wesentlicher Aspekte zu beachten, wie die eingangs erwähnten Unterschiede zwischen den Spezies Maus und Ratte (Price & Flores 2007), die Variabilität molekularer Muster je nach Projektionsort (Tan et al. 2008; Ivanusic 2009), die Antikörperspezifität (Saper 2009) und die bereits diskutierten fixierungsbedingten Unterschiede (Hoffman et al. 2010). Zusätzlich ist zu beachten, dass es Unterschiede zwischen Zellkulturen und Gewebeschnitten gibt sowie eine Abhängigkeit der Marker-Expression vom Entwicklungszustand bzw. Alters der Versuchstiere. In einem experimentellen Setting erhobene Expressionszahlen entsprechen somit fraglich der "realen" Expression, zumal es sich um Momentaufnahmen handelt. Der vermeintlich ausgewertete statische Expressionsstatus vernachlässigt die Tatsache, dass es sich um multifaktorielle und dynamische Systeme handelt (Chauvet 1995). Es stellt sich die Frage, wie neue Modelle zu besser verwertbaren experimentellen Ergebnisse führen können, um auch die Suche nach neuen Analgetika sinnvoller und erfolgsversprechender zu gestalten. Da schon innerhalb verschiedener Tierspezies große Unterschiede es wahrscheinlich, dass sich die menschliche bestehen. ist zelluläre Nozizeptorausstattung und die molekularen Interaktionen ebenfalls unterscheiden. Demzufolge wäre es sinnvoll, menschliche Gewebe zu untersuchen oder neue humane Modelle zu entwickeln (Reichling et al. 2013; Richards et al. 2013; Wainger deskriptive Ansatz Subpopulationen et al. 2014). Der anhand ihrer Expressionsmuster zu klassifizieren, ist trotz der mangelnden Aussagekraft in Bezug auf funktionelle Interaktion sinnvoll. Denn er liefert wesentliche Informationen als Ergänzung und Erklärung zu Größenanalysen, Leitungsgeschwindigkeiten und Myelinisierungsgraden und ist wertvolle Voraussetzung zur systembiologischen Analyse. Meine immunhistochemischen Ergebnisse geben einen Überblick über die Ko-Expressionsmuster einer neu detektierten Nozizeptor-Subpopulation, die eine Rolle für Sensitivierungsprozesse im Schmerzkontext spielt. Zur weiteren Evaluation der detektierten Ko-Expression von TRPV1 und ARMS in Gefrierschnitten von DRG-Neuronen erfolgte die funktionelle Untersuchung in DRG-Zellkulturen. Die KoExpression von Proteinen ist eine wichtige Voraussetzung für ihre funktionelle Zusammenarbeit, die definitive Ableitung einer funktionellen Bedeutung aus dieser Tatsache jedoch unmöglich. Die Relevanz einer deskriptiven Analyse bleibt ohne weitere Untersuchungen spekulativ, da sie die Physiologie weder voraussagen noch erklären kann. Eine hohe Ko-Expressionsrate bedeutet nicht zwingend eine funktionelle Interaktion, eine moderate wiederum kann für eine bedeutsame Zusammenarbeit ausreichen (Carlton & Hargett 2002; Price et al. 2005; Binzen et al. 2006; Hong et al. 2009; Kwon et al. 2014; Lee et al. 2015). Eine weitere zu berücksichtigende Tatsache ist, dass sich die Eigenschaften des TRPV1-Kanals im heterologen System und im DRG-Neuron voneinander unterscheiden. Der geklonte, transfizierte TRPV1-Kanal im heterologen System ist sensitiver gegenüber Capsaicin als TRPV1 im "Gesamtsystem" DRG (Shin et al. 2001). Dies wird eben auf das Vorhandensein verschiedener regulatorischer Proteine zurückgeführt, da diese die Aktivität und/oder Sensitivität des Kanals modifizieren können. Die regulatorischen und modifizierenden Hilfs-, Adaptor- oder Strukturproteine sorgen für wesentliche pharmakologische Unterschiede durch die Bildung von Signalkomplexen. Eine Untersuchung im individuellen Gesamtsystem Zelle ist essentiell. Effekte können jedoch weniger eindeutig als in heterologen Systemen zutage treten.

#### 6.5 Schlusswort und Ausblick

In der experimentellen Forschung ist es immer nur möglich, einen Teil des Gesamtkontextes zu erfassen. Die Untersuchungen erfolgen in artifiziellen Systemen, ohne die Komplexität eines Menschen in seiner Gesamtheit zu erfassen. Selbst der Gesamteinheit Zelle werden die angewendeten Methoden oft nicht gerecht, so dass diese vielen Informationen und Puzzlestücke zu einem großen Ganzen zusammengebracht werden müssen. Dieser Versuch erfolgt für den Bereich der Nozizeptoren mittels eines systembiologischen Ansatzes (hier im Rahmen von BMBF geförderten Forschungsverbünden MedSys 0101-31P5783 und NoPain 0316177B). Für das Gesamtkunstwerk Mensch scheint die Frage zu diesem Zeitpunkt so komplex, dass sie nur interdisziplinär mit Hilfe philosophischer und neurowissenschaftlicher Erkenntnisse zu diskutieren wäre, was den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Die molekularen Mechanismen in Nozizeptoren aufzuzeigen und das Zustandekommen von Schmerz auf dieser Ebene zu klären, ist ein

wesentlicher und wichtiger Ansatzunkt, um neue periphere Analgetika zu finden und den Schmerz am Entstehungsort zu bekämpfen (Stein et al. 2009; McDougall 2011). TRPV1 ist auf Grund seiner Expression in peripheren nozizeptiven Neuronen ein vielversprechender Ansatzpunkt. Aufgrund einer Reihe gravierender unerwünschter Nebenwirkungen (z.B. gestörte Temperaturregulation) mussten jedoch Wirkstoffe vom Markt zurückgenommen werden (für einen Überblick der Substanzen und deren Nebenwirkungsprofil siehe Brederson et al. 2013). Bei einem so vielversprechenden pharmakologischen Angriffspunkt wie dem TRPV1-Kanal sollten alternative Ideen zur direkten Inhibition angegangen werden. Die Identifikation von relevanten Interaktionsstellen des Kanals mit "Mitspielern" in seinen Signalwegen könnte eine neue Möglichkeit sein. Mittels eines solchen hochspezifischen Ansatzes könnten selektiv nozizeptive Signalwege unterbrochen werden ohne die Basisfunktion zu verändern. Insbesondere Adaptorproteine, wie AKAP 150 oder ARMS, die für die Koordination zwischen TRPV1 und seinen Interaktionspartnern verantwortlich sind, bieten einen vielversprechenden neuen Ansatz. Eine Unterbrechung der AKAP-Signalkaskade wurde bereits erfolgreich in inflammatorischen Mausmodellen angewendet (Fischer et al. 2013).

Dennoch darf nicht vergessen werden, dass es sich gerade bei chronifizierten Krankheitsgeschehen oft um eine komplexe Mischung aus molekularen Nozizeptorebene, Mechanismen auf zentralen Mechanismen und auch psychologischen Faktoren handelt (Braz et al. 2005; Zylka et al. 2005; Indo 2014; Jennings et al. 2014; Sturgeon 2014). Der Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen ist auf allen Ebenen gegeben und häufig sind multidisziplinäre Behandlungsansätze nötig.

### 7 Literaturverzeichnis

Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. J Biol Chem 2003;278:30429-34.

Amadesi S, Grant AD, Cottrell GS, Vaksman N, Poole DP, Rozengurt E, Bunnett NW. Protein kinase D isoforms are expressed in rat and mouse primary sensory neurons and are activated by agonists of protease-activated receptor 2. J Comp Neurol 2009;516:141-56.

Andreazzoli M, Gestri G, Landi E, D'Orsi B, Barilari M, Iervolino A, Vitiello M, Wilson SW, Dente L.. Kidins220/ARMS interacts with Pdzrn3, a protein containing multiple binding domains. Biochemie 2012;94:2054-7.

Aoki Y, Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, Moriya H. Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents. Spine (Phila Pa 1976) 2005;30:1496-500.

Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 2006;281:1001-7.

Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV. A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. EMBO J 2004;23:2358-68.

Backonja MM. Defining neuropathic pain. Anesth Analg 2003;97:785-90.

Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:10272-6.

Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. Nat Clin Pract Neurol 2006;2:95-106.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell 2009;139:267-84.

Bavassano C, Marvaldi L, Langeslag M, Sarg B, Lindner H, Klimaschewski L, Kress M, Ferrer-Montiel A, Knaus HG. Identification of voltage-gated K(+) channel beta 2 (Kvbeta2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1). Biochim Biophys Acta 2013;1833:3166-75.
Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988;33:87-107.

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWth. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. Neuron 2002;35:721-31.

Biggs JE, Yates JM, Loescher AR, Clayton NM, Boissonade FM, Robinson PP. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. Eur J Pain 2007;11:192-201.

Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S, Treede RD. Coexpression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 2006;142:527-39.

Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. Nat Neurosci 2002;5:856-60.

Bogen O, Dreger M, Gillen C, Schroder W, Hucho F. Identification of versican as an isolectin B4-binding glycoprotein from mammalian spinal cord tissue. FEBS J 2005;272:1090-102.

Bracale A, Cesca F, Neubrand VE, Newsome TP, Way M, Schiavo G.

Kidins220/ARMS is transported by a kinesin-1-based mechanism likely to be involved in neuronal differentiation. Mol Biol Cell 2007;18:142-52.

Brandao KE, Dell'Acqua ML, Levinson SR. A-kinase anchoring protein 150 expression in a specific subset of TRPV1- and CaV 1.2-positive nociceptive rat dorsal root ganglion neurons. J Comp Neurol 2012;520:81-99.

Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. Neuron 2005;47:787-93.

Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. Eur J Pharmacol 2013;716:61-76.

Burgess PR, Perl ER. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. J Physiol 1967;190:541-62.

Cabrera-Poch N, Sanchez-Ruiloba L, Rodriguez-Martinez M, Iglesias T. Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. J Biol Chem 2004;279:28592-602. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. Neuron 2006;52:77-92.

Carlton SM, Hargett GL. Stereological analysis of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II alpha -containing dorsal root ganglion neurons in the rat: colocalization with isolectin Griffonia simplicifolia, calcitonin gene-related peptide, or vanilloid receptor 1. J Comp Neurol 2002;448:102-10.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 2000;288:306-13.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 1997;389:816-24.

Cesca F, Satapathy A, Ferrea E, Nieus T, Benfenati F, Scholz-Starke J. Functional Interaction between the Scaffold Protein Kidins220/ARMS and Neuronal Voltage-Gated Na+ Channels. J Biol Chem 2015;290:18045-55.

Cesca F, Yabe A, Spencer-Dene B, Arrigoni A, Al-Qatari M, Henderson D, Phillips H, Koltzenburg M, Benfenati F, Schiavo G. Kidins220/ARMS is an essential modulator of cardiovascular and nervous system development. Cell Death Dis 2011;2:e226. Cesca F, Yabe A, Spencer-Dene B, Scholz-Starke J, Medrihan L, Maden CH, Gerhardt H, Orriss IR, Baldelli P, Al-Qatari M, Koltzenburg M, Adams RH, Benfenati F, Schiavo G. Kidins220/ARMS mediates the integration of the neurotrophin and

VEGF pathways in the vascular and nervous systems. Cell Death Differ 2012;19:194-208.

Chang MS, Arevalo JC, Chao MV. Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrinrich membrane spanning protein. J Neurosci Res 2004;78:186-92.

Chauvet N, Drian MJ, Privat A. Immunocytochemical study of phenotypic plasticity of cultured dorsal root ganglion neurons during development. Int J Dev Neurosci 1995;13:673-83.

Chen CL, Broom DC, Liu Y, de Nooij JC, Li Z, Cen C, Samad OA, Jessell TM, Woolf CJ, Ma Q. Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. Neuron 2006;49:365-77.

Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE. Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. Biochemistry 2004;43:2501-11.

Chu C, Zavala K, Fahimi A, Lee J, Xue Q, Eilers H, Schumacher MA. Transcription factors Sp1 and Sp4 regulate TRPV1 gene expression in rat sensory neurons. Mol Pain 2011;7:44.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. Nature 2001;411:957-62.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. Nature 2003;426:517-24.

Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. BMJ 2014;348:f7656.

Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. Nature 1969;224: 285-7.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci 2009;32:1-32.

Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. J Neurosci 2002;22:7737-45.

Dell'Acqua ML, Faux MC, Thorburn J, Thorburn A, Scott JD. Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. EMBO J 1998;17:2246-60.

Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. NaV1.9: a sodium channel linked to human pain. Nat Rev Neurosci 2015;16:511-9.

Dickenson AH, Dray A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. Br J Pharmacol 1991;104:1045-9.

Duffy AM, Schaner MJ, Wu SH, Staniszewski A, Kumar A, Arevalo JC, Arancio O, Chao MV, Scharfman HE. A selective role for ARMS/Kidins220 scaffold protein in spatial memory and trophic support of entorhinal and frontal cortical neurons. Exp Neurol 2011;229:409-20.

Efendiev R, Bavencoffe A, Hu H, Zhu MX, Dessauer CW. Scaffolding by A-kinase anchoring protein enhances functional coupling between adenylyl cyclase and TRPV1 channel. J Biol Chem 2013;288:3929-37.

Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. Br J Anaesth 2013;111:26-37.

Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schafer M, Stein C, Zollner C. Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. Mol Pharmacol 2007;71:12-8.

Facer P, Casula MA, Smith GD, Benham CD, Chessell IP, Bountra C, Sinisi M, Birch R, Anand P. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. BMC Neurol 2007;7:11.

Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, Lawson SN. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. J Neurosci 2006;26:7281-92.

Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. Trafficking of ThermoTRP Channels. Membranes (Basel) 2014;4:525-64.

Fischer MJ, Btesh J, McNaughton PA. Disrupting sensitization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 inhibits inflammatory hyperalgesia. J Neurosci 2013;33:7407-14.

Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. Pain 2002;99:111-20.

Gold MS. Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. Pain 2000;84:117-20.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F. Identification and characterization of a Ca2+ -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. J Neurochem 2004;91:1092-103.

Hammond DL, Ackerman L, Holdsworth R, Elzey B. Effects of spinal nerve ligation on immunohistochemically identified neurons in the L4 and L5 dorsal root ganglia of the rat. J Comp Neurol 2004;475:575-89.

Hanack C, Moroni M, Lima WC, Wende H, Kirchner M, Adelfinger L, Schrenk-Siemens K, Tappe-Theodor A, Wetzel C, Kuich PH, Gassmann M, Roggenkamp D, Bettler B, Lewin GR, Selbach M, Siemens J. GABA blocks pathological but not acute TRPV1 pain signals. Cell 2015;160:759-70. Hara T, Chiba T, Abe K, Makabe A, Ikeno S, Kawakami K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K. Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. Pain 2013;154:882-9.

Higuero AM, Sanchez-Ruiloba L, Doglio LE, Portillo F, Abad-Rodriguez J, Dotti CG, Iglesias T. Kidins220/ARMS modulates the activity of microtubule-regulating proteins and controls neuronal polarity and development. J Biol Chem 2010;285:1343-57. Hoffman EM, Schechter R, Miller KE. Fixative composition alters distributions of immunoreactivity for glutaminase and two markers of nociceptive neurons, Nav1.8 and TRPV1, in the rat dorsal root ganglion. J Histochem Cytochem 2010;58:329-44. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. Handb Exp Pharmacol 2009283-332.

Hong S, Fan J, Kemmerer ES, Evans S, Li Y, Wiley JW. Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. Gut 2009;58:202-10.

Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. Curr Neuropharmacol 2006;4:197-206.

Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. Neuron 2007;55:365-76.

Hucho TB, Dina OA, Levine JD. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. J Neurosci 2005;25:6119-26.

Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. Eur J Neurosci 2001;13:2105-14.

Iglesias T, Cabrera-Poch N, Mitchell MP, Naven TJ, Rozengurt E, Schiavo G. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. J Biol Chem 2000;275:40048-56.

Indo Y. Neurobiology of pain, interoception and emotional response: lessons from nerve growth factor-dependent neurons. Eur J Neurosci 2014;39:375-91.

Isensee J, Diskar M, Waldherr S, Buschow R, Hasenauer J, Prinz A, Allgower F, Herberg FW, Hucho T. Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. J Cell Sci 2014a;127:216-29. Isensee J, Wenzel C, Buschow R, Weissmann R, Kuss AW, Hucho T. Subgroupelimination transcriptomics identifies signaling proteins that define subclasses of TRPV1-positive neurons and a novel paracrine circuit. PLoS One 2014b;9:e115731. Isserlin R, Bader GD, Frye SV, Willson TM, Yu FH, Edwards AM. Too many roads not taken. Nature 2011;470:163-5.

Ivanusic JJ. Size, neurochemistry, and segmental distribution of sensory neurons innervating the rat tibia. J Comp Neurol 2009;517:276-83.

Iwasaki Y, Morita A, Iwasawa T, Kobata K, Sekiwa Y, Morimitsu Y, Kubota K, Watanabe T. A nonpungent component of steamed ginger--[10]-shogaol--increases adrenaline secretion via the activation of TRPV1. Nutr Neurosci 2006;9:169-78. Jean-Mairet RM, Lopez-Menendez C, Sanchez-Ruiloba L, Sacristan S, Rodriguez-Martinez M, Riol-Blanco L, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F, Rodriguez-Fernandez JL, Campanero MR, Iglesias T. The neuronal protein Kidins220/ARMS associates with ICAM-3 and other uropod components and regulates T-cell motility. Eur J Immunol 2011;41:1035-46.

Jennings EM, Okine BN, Roche M, Finn DP. Stress-induced hyperalgesia. Prog Neurobiol 2014;121:1-18.

Jeske NA. Somatosensory scaffolding structures. Front Mol Neurosci 2012;5:2. Jeske NA, Diogenes A, Ruparel NB, Fehrenbacher JC, Henry M, Akopian AN, Hargreaves KM. A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. Pain 2008;138:604-16.

Jeske NA, Patwardhan AM, Ruparel NB, Akopian AN, Shapiro MS, Henry MA. Akinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1. Pain 2009;146:301-7.

Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. Neuron 2002;36:57-68.

Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. Cell 2002;108:421-30.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:8134-9. Julius D. TRP channels and pain. Annu Rev Cell Dev Biol 2013;29:355-84. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature 2001;413:203-10. Jung H, Shin JH, Park YS, Chang MS. Ankyrin repeat-rich membrane spanning (ARMS)/Kidins220 scaffold protein regulates neuroblastoma cell proliferation through p21. Mol Cells 2014;37:881-7.

Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca2+/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. J Biol Chem 2004;279:7048-54.

Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, Takeuchi K. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. Biochem Pharmacol 2003;66:1115-21.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. J Biol Chem 2001;276:28613-9.

Kestell GR, Anderson RL, Clarke JN, Haberberger RV, Gibbins IL. Primary afferent neurons containing calcitonin gene-related peptide but not substance P in forepaw skin, dorsal root ganglia, and spinal cord of mice. J Comp Neurol 2015;523:2555-69. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. Br J Anaesth 2001;87:3-11. Kim AY, Tang Z, Liu Q, Patel KN, Maag D, Geng Y, Dong X. Pirt, a phosphoinositidebinding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. Cell 2008;133:475-85. Kim CF, Moalem-Taylor G. Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. Brain Res 2011;1405:95-108.

Kim S, Kang C, Shin CY, Hwang SW, Yang YD, Shim WS, Park MY, Kim E, Kim M, Kim BM, Cho H, Shin Y, Oh U. TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. J Neurosci 2006;26:2403-12.

Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. J Comp Neurol 2005;493:596-606.

Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV. An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. J Neurosci 2001;21:176-85.

Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Moon JY, Choi SR, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Blockade of peripheral P2Y1 receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced

inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs. Neuropharmacology 2014;79:368-79.

Lainez S, Valente P, Ontoria-Oviedo I, Estevez-Herrera J, Camprubi-Robles M, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R. GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. FASEB J 2010;24:1958-70.

Lee DW, Cho PS, Lee HK, Lee SH, Jung SJ, Oh SB. Trans-activation of TRPV1 by D1R in mouse dorsal root ganglion neurons. Biochem Biophys Res Commun 2015;465:832-7.

Lewin GR, Moshourab R. Mechanosensation and pain. J Neurobiol 2004;61:30-44. Li L, Hasan R, Zhang X. The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKCbetall. J Neurosci 2014;34:8246-58.

Li N, Dong X, Yang C, Liu Y, Ni X. Expression of neuronal protein Kidins220/ARMS in the spleen and peripheral blood of mice following airway allergen challenge. Mol Med Rep 2013;8:1871-5.

Liao YH, Hsu SM, Huang PH. ARMS depletion facilitates UV irradiation induced apoptotic cell death in melanoma. Cancer Res 2007;67:11547-56.

Liao YH, Hsu SM, Yang HL, Tsai MS, Huang PH. Upregulated ankyrin repeat-rich membrane spanning protein contributes to tumour progression in cutaneous melanoma. Br J Cancer 2011;104:982-8.

Liapi A, Wood JN. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. Eur J Neurosci 2005;22:825-34.

Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, Fang L. Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. Mol Pain 2007;3:30.

Liu L, Shenoy M, Pasricha PJ. Substance P and calcitonin gene related peptide mediate pain in chronic pancreatitis and their expression is driven by nerve growth factor. JOP 2011;12:389-94.

Liu M, Wood JN. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain. Pain Med 2011;12 Suppl 3:S93-9.

Liu Y, Feng Y, Zhang T. Pulsed Radiofrequency Treatment Enhances Dorsal Root Ganglion Expression of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in a Rat Model of Neuropathic Pain. J Mol Neurosci 2015;57:97-105. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain 2008;137:473-7.

Lopez-Menendez C, Gamir-Morralla A, Jurado-Arjona J, et al. Kidins220 accumulates with tau in human Alzheimer's disease and related models: modulation of its calpain-processing by GSK3beta/PP1 imbalance. Hum Mol Genet 2013;22:466-82.

Lopez-Menendez C, Gascon S, Sobrado M, Vidaurre OG, Higuero AM, Rodriguez-Pena A, Iglesias T, Diaz-Guerra M. Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways. J Cell Sci 2009;122:3554-65.

Luo S, Chen Y, Lai KO, Arevalo JC, Froehner SC, Adams ME, Chao MV, Ip NY. {alpha}-Syntrophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. J Cell Biol 2005;169:813-24.

Ma W, Zhang Y, Bantel C, Eisenach JC. Medium and large injured dorsal root ganglion cells increase TRPV-1, accompanied by increased alpha2C-adrenoceptor co-expression and functional inhibition by clonidine. Pain 2005;113:386-94. Macdonald R, Bingham S, Bond BC, Parsons AA, Philpott KL. Determination of changes in mRNA expression in a rat model of neuropathic pain by Taqman quantitative RT-PCR. Brain Res Mol Brain Res 2001;90:48-56.

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. Curr Biol 2005;15:929-34.

Magrinelli F, Zanette G, Tamburin S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. Pract Neurol 2013;13:292-307.

Maione S, Starowicz K, Cristino L, Guida F, Palazzo E, Luongo L, Rossi F, Marabese I, de Novellis V, Di Marzo V. Functional interaction between TRPV1 and mu-opioid receptors in the descending antinociceptive pathway activates glutamate transmission and induces analgesia. J Neurophysiol 2009;101:2411-22.

McDougall JJ. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. Biochim Biophys Acta 2011;1812:459-67.

McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). Br J Pharmacol 2005;144:781-90.

Menozzi-Smarrito C, Riera CE, Munari C, Le Coutre J, Robert F. Synthesis and evaluation of new alkylamides derived from alpha-hydroxysanshool, the pungent molecule in szechuan pepper. J Agric Food Chem 2009;57:1982-9.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:3655-60.

Michael GJ, Priestley JV. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. J Neurosci 1999;19:1844-54.

Min JW, Liu WH, He XH, Peng BW. Different types of toxins targeting TRPV1 in pain. Toxicon 2013;71:66-75.

Minke B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. J Neurogenet 2010; 24: 216-33.

Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. J Biol Chem 2003;278:50080-90.

Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca2+-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem 2005;280:13424-32.

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD. IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. Neuron 1997;19:849-61.

Montell C. The TRP superfamily of cation channels. Sci STKE 2005;2005:re3.

Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron 1989;2:1313-23.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. Mol Pain 2005;1:3.

Murinson BB, Hoffman PN, Banihashemi MR, Meyer RA, Griffin JW. C-fiber (Remak) bundles contain both isolectin B4-binding and calcitonin gene-related peptide-positive axons. J Comp Neurol 2005;484:392-402.

Neubrand VE, Cesca F, Benfenati F, Schiavo G. Kidins220/ARMS as a functional mediator of multiple receptor signalling pathways. J Cell Sci 2012;125:1845-54. Ni X, Li X, Fang X, Li N, Cui W, Zhang B. NGF/TrkA-mediated Kidins220/ARMS signaling activated in the allergic airway challenge in mice. Ann Allergy Asthma Immunol 2010;105:299-306.

Nitzan-Luques A, Minert A, Devor M, Tal M. Dynamic genotype-selective "phenotypic switching" of CGRP expression contributes to differential neuropathic pain phenotype. Exp Neurol 2013;250:194-204.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. J Biol Chem 2002;277:13375-8.

Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. J Neurosci 2004;24:10211-22.

Opree A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. J Neurosci 2000;20:6289-93.

Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. Nat Rev Drug Discov 2009;8:55-68.

Por ED, Samelson BK, Belugin S, Akopian AN, Scott JD, Jeske NA.

PP2B/calcineurin-mediated desensitization of TRPV1 does not require AKAP150. Biochem J 2010;432:549-56.

Price TJ, Flores CM. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin generelated peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. J Pain 2007;8:263-72.

Price TJ, Jeske NA, Flores CM, Hargreaves KM. Pharmacological interactions between calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha and TRPV1 receptors in rat trigeminal sensory neurons. Neurosci Lett 2005;389:94-8.

Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. J Neurosci 2002;22:4740-5.

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006;361:1545-64.

Reichling DB, Green PG, Levine JD. The fundamental unit of pain is the cell. Pain 2013;154 Suppl 1.

Richards N, McMahon SB. Targeting novel peripheral mediators for the treatment of chronic pain. Br J Anaesth 2013;111:46-51.

Rigaud M, Gemes G, Barabas ME, Chernoff DI, Abram SE, Stucky CL, Hogan QH. Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain. Pain 2008;136:188-201.

Riol-Blanco L, Iglesias T, Sanchez-Sanchez N, de la Rosa G, Sanchez-Ruiloba L, Cabrera-Poch N, Torres A, Longo I, Garcia-Bordas J, Longo N, Tejedor A, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez JL. The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. Eur J Immunol 2004;34:108-18.

Roberts JC, Davis JB, Benham CD. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. Brain Res 2004;995:176-83.

Rogers DA, Schor NF. Kidins220/ARMS depletion is associated with the neural-to Schwann-like transition in a human neuroblastoma cell line model. Exp Cell Res 2013;319:660-9.

Ruscheweyh R, Forsthuber L, Schoffnegger D, Sandkuhler J. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. J Comp Neurol 2007;502:325-36.

Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. J Histochem Cytochem 2009; 57:1-5

Schnizler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, Merrill MA, Nichols B, McKnight GS, Schuchmann S, Roesner J. Invitation for a walk through microscopy.

https://mikroskopenwfz.charite.de/en/microscopy/. S.35

Strack S, Hell JW, Usachev YM. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. J Neurosci 2008;28:4904-17.

Sharif-Naeini R, Basbaum AI. Targeting pain where it resides ... In the brain. Sci Transl Med 2011;3:65ps1.

Shin JS, Wang MH, Hwang SW, Cho H, Cho SY, Kwon MJ, Lee SY, Oh U. Differences in sensitivity of vanilloid receptor 1 transfected to human embryonic kidney cells and capsaicin-activated channels in cultured rat dorsal root ganglion neurons to capsaicin receptor agonists. Neurosci Lett 2001;299:135-9.

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

Sniderhan LF, Stout A, Lu Y, Chao MV, Maggirwar SB. Ankyrin-rich membrane spanning protein plays a critical role in nuclear factor-kappa B signaling. Mol Cell Neurosci 2008;38:404-16.

Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. J Pharmacol Exp Ther 2003;304:217-22.

Srinivasan R, Wolfe D, Goss J, Watkins S, de Groat WC, Sculptoreanu A, Glorioso JC. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. Eur J Neurosci 2008;28:1241-54.

Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. J Gen Physiol 2006;128:509-22.

Stein C, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, Vanderah TW, Spencer RH. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. Brain Res Rev 2009;60:90-113.

Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. Brain Res Rev 2009;60:2-23.

Stucky CL, Lewin GR. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. J Neurosci 1999;19:6497-505.

Sturgeon JA. Psychological therapies for the management of chronic pain. Psychol Res Behav Manag 2014;7:115-24.

Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. J Neurochem 2001;76:1-10. Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. Exp Neurol 1991;114:82-103.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. Nat Rev Drug Discov 2007;6:357-72.

Tan LL, Bornstein JC, Anderson CR. Distinct chemical classes of medium-sized transient receptor potential channel vanilloid 1-immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervate the adult mouse jejunum and colon. Neuroscience 2008;156:334-43.

Tominaga M. Nociception and TRP channels. Handb Exp Pharmacol 2007489-505. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple painproducing stimuli. Neuron 1998;21:531-43.

Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. Pflugers Arch 2005;451:143-50.

Tseng TJ, Hsieh YL, Ko MH, Hsieh ST. Redistribution of voltage-gated sodium channels after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain in chronic constriction injury. Brain Res 2014;1589C:15-25.

Urano H, Ara T, Fujinami Y, Hiraoka BY. Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. Int J Med Sci 2012;9:690-7.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. J Physiol 2001;534:813-25.

Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. Annu Rev Biochem 2007;76:387-417. Vetter I, Cheng W, Peiris M, Wyse BD, Roberts-Thomson SJ, Zheng J, Monteith GR, Cabot PJ. Rapid, opioid-sensitive mechanisms involved in transient receptor potential vanilloid 1 sensitization. J Biol Chem 2008;283:19540-50.

Vilceanu D, Honore P, Hogan QH, Stucky CL. Spinal nerve ligation in mouse upregulates TRPV1 heat function in injured IB4-positive nociceptors. J Pain 2010;11:588-99.

Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. Nat Chem Biol 2005;1:85-92.

Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. Mol Pharmacol 2009;75:1262-79.

Wainger BJ, Buttermore ED, Oliveira JT, Mellin C, Lee S, Saber WA, Wang AJ, Ichida JK, Chiu IM, Barrett L, Huebner EA, Bilgin C, Tsujimoto N, Brenneis C, Kapur K, Rubin LL, Eggan K, Woolf CJ. Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts. Nat Neurosci 2015;18:17-24.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92: 9652-6.

Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:959-70.

Wood JN. Nerve growth factor and pain. N Engl J Med 2010;363:1572-3.

Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. Neuron 2007;55:353-64. Wu SH, Arevalo JC, Sarti F, Tessarollo L, Gan WB, Chao MV. Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 protein regulates dendritic branching and spine stability in vivo. Dev Neurobiol 2009;69:547-57.

Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. J Neurosci 2005;25:8924-37.

Xu X, Wang P, Zou X, Li D, Fang L, Lin Q. Increases in transient receptor potential vanilloid-1 mRNA and protein in primary afferent neurons stimulated by protein kinase C and their possible role in neurogenic inflammation. J Neurosci Res 2009;87:482-94.

Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. J Dent Res 2003;82:781-5.

Yang D, Luo Z, Ma S, Wong WT, Ma L, Zhong J, He H, Zhao Z, Cao T, Yan Z, Liu D, Arendshorst WJ, Huang Y, Tepel M, Zhu Z. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. Cell Metab 2010;12:130-41.

Zampieri N, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. Biochem Soc Trans 2006;34:607-11.

Zhang X, Daugherty SL, de Groat WC. Activation of CaMKII and ERK1/2 contributes to the time-dependent potentiation of Ca2+ response elicited by repeated application of capsaicin in rat DRG neurons. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011;300:R644-54.

Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. EMBO J 2005;24:4211-23.

Zhang X, Li L, McNaughton PA. Proinflammatory mediators modulate the heatactivated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. Neuron 2008;59:450-61.

Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, Ji RR. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. J Neurosci 2004;24:8300-9.

Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. Nat Rev Neurosci 2005;6:615-25.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 1999;400:452-7.

Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. Neuron 2005;45:17-25.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AKAP	A-kinase anchoring protein	
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	
ARMS	ankrin-rich membrane spanning protein	
ATP	Adenosintriphosphat	
BALF	bronchoalveolär lavage fluid	
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	
BSA	bovine serum albumin	
CaMKII	Calcium-Calmodulin Kinase II	
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	
CCI	chronic constriction injury	
CGRP	calcitonin gene-related peptide	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DRG	dorsal root ganglion	
ERK	extracellular signal-regulated kinase	
FAF1	Fas-assoziierter Faktor 1	
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin	
Fura-2-AM	Fura-2-Azetoxymethyl	
G	Gauge	
GABA	γ-amino butyric acid	
GABARAP	GABA-A-Rezeptor-assoziiertes-Protein	
GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor	
<sup>3</sup> [H]	Tritium	
HEK	human embryonic kidney	
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	
IB4	Isolektin B4	
IR	Immunoreaktivität	
ir	immunoreaktiv	
KCI	Kaliumchlorid	
Kidins220	kinase D interacting substrate	
L	lumbal	
LSM	laser scanning microscope	
mm	Millimeter	
Μ	molar	

MAPK	mitogen-activated protein kinase	
min	Minuten	
mRNA	messenger Ribonukleinsäure	
MW	Mittelwert	
μg	Mikrogramm	
NF 200	Neurofilament 200	
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-	
	cells	
NGF	nerve growth factor	
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren	
nm	Nanometer	
n. s.	nicht signifikant	
PB	phosphat buffer	
PBS	phosphat buffer with saline	
PBT	phosphat buffer with triton X-100	
PC	Phäochromozytom	
PCR	polymerase chain reaction	
PFA	Paraformaldehyd	
PGP	protein gene product	
Pirt	phosphoinositide interacting regulator of TRP	
PKA	Protein Kinase A	
PKC	Protein Kinase C	
PKD	Protein Kinase D	
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase	
PP2B	Protein Phosphatase 2B (Calcineurin)	
PSNL	partial sciatic nerve ligation	
PSNS	partial sciatic nerve section	
R	Rezeptor	
Ret	rearranged during transfection	
ROI	Region of Interest	
RT	Raumtemperatur	
RTX	Resiniferatoxin	
SAM	sterile alpha motif	
SD	standard deviation	

SEM	standard error of the mean
SNI	spared nerve injury
SNL	spinal nerve ligation
Th	thorakal
TNF	Tumornekrose-Faktor
TrkA	Tropomysin Rezeptor Kinase A
TRP	transient receptor potential
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
TRPV2	transient receptor potential vanilloid 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 9 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Jessica Peter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Modulation von Schmerzassoziierten Ionenkanälen durch intrazelluläre Protein-Protein Interaktionen** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

## 10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Stein bedanken, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und dieses Dissertationsprojekt durch die großzügige Bereitstellung von Labor, Material und Zeit erst ermöglicht hat. Auch für die konstruktive Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Von Herrn Dr. rer. nat. Marian Brackmann, der die Grundidee zu diesem Thema entwickelt hat, habe ich wissenschaftliches Denken, Experimentierfreude und Frustrationstoleranz gelernt. Vielen Dank für die Einführung ins Laborleben und das entsprechende Handwerk sowie die Durchführung der initialen Experimente und Western-Blots. Deine Supervision, wissenschaftliche Anleitung und beständige Diskussionsbereitschaft haben den Grundstein für diese Arbeit gelegt.

Frau Dr. rer. nat. Viola Spahn, die die Betreuung meiner Arbeit zum Ende übernommen hat, hat mich tief in Hinblick auf Schnelligkeit, Präzision, Pragmatismus und Gründlichkeit beeindruckt und geprägt. Vielen herzlichen Dank für Deine Motivation und hilfreiche Korrektur!

Bei Frau Dr. rer. nat. Dominika Labuz möchte ich mich besonders für die Durchführung der chronische Nervenkonstriktion (CCI) bedanken.

Für diverse kritische Diskussionen, Spinnereien und vor allem die Einweisung in die Programmierung von Excel-Makros möchte ich Herrn Christian Kasper danken.

Ohne die aufmunternden Peptalks von Frau Dr. rer. nat Simone Scheffel wäre die Arbeit wohl noch um einige Jahre später vollendet worden. Insgesamt danke ich dem ganzen Laborteam für alle Hilfestellung und Aufmunterung in jeglicher Hinsicht. Johanna, Deine EndNote-Rettung bleibt unvergessen.

Dem Institut für Physiologie, insbesondere Frau Prof. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel, danke ich herzlich für die Nutzung ihres Lasermikroskops.

Der ehemaligen Arbeitsgruppe am Max Planck Institut für Humangenetik von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tim Hucho möchte ich für die Nutzung ihrer Labore und Bereitstellung der Geräte danken, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. René Buschow für die Einführung in die Zauberwelt des Thermo Fisher Cellomics Array Scan VTI. Großer Dank gilt dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, das mich in Hinblick auf die statistische Auswertung meiner Daten beraten hat.

Herzlich möchte ich mich bei den Menschen aus meinem persönlichen Umfeld bedanken, die mich und dieses Dissertationsprojekt begleitet haben. Meinen Freunden und meiner Familie bin ich zutiefst dankbar für ihre unendliche Geduld, ihr Vertrauen und andauernde Unterstützung auf dem Weg. Ohne ihren aufmunternden Optimismus und den bestärkenden Zuspruch hätte ich es nicht geschafft!