

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der
Universitätsklinik Carl Gustav Carus Dresden
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Zahnert

**Nachweis und topographische Verteilung
trigeminaler Chemorezeptoren
in der Nasenschleimhaut normosmischer Probanden**

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Jacqueline Zimmermann

aus Freital

Dresden 2011

1. Gutachter: Herr Prof. Martin Witt

2. Gutachter: Herr Prof. Thomas Hummel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2012

Prof. Dr. med. Hans Zwipp
Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	6
2	Anatomische Grundlagen der Nase	9
2.1	Makroskopische Anatomie der Nase	9
2.2	Anatomie des Nervus trigeminus	11
2.2.1	Die Trigeminuskern.....	14
2.3	Mikroskopische Anatomie der Nase.....	15
2.3.1	Regio respiratoria	15
2.3.2	Regio olfactoria.....	16
3	Physiologische Grundlagen.....	20
3.1	Physiologische Grundlagen des olfaktorischen Systems	20
3.2	Physiologische Grundlagen des trigeminalen Systems	21
4	Trigeminale Rezeptoren	24
4.1	Die Transient-Rezeptor-Potential (TRP) -Kanäle	24
4.1.1	TRPV1 - Hitze-Vanilloid-Rezeptor.....	24
4.1.2	TRPA1 – Transient Receptor Potential Ankyrin Rezeptor	26
4.1.3	TRPM8 - Cold Menthol Rezeptor	27
4.2	ACCN3- amiloride-sensitive cation channel 3	28
4.3	CGRP- calcitonin-related polypeptide beta (CALCB)	29
5	Material und Methoden.....	31
5.1	Allgemeines	31
5.1.1	Ethische Rahmenbedingungen	31
5.1.2	Studiendesign.....	31
5.1.3	Rekrutierung der Versuchsteilnehmer	31
5.2	Vorangehende/begleitende Untersuchungen	32
5.2.1	Screening-Test: Riechprüfung	32
5.2.2	Probenentnahme	34
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	35
5.3.1	RNA-Isolation	35
5.3.2	Real-Time quantitative PCR	36
5.3.2.1	Funktionsprinzip	36
5.3.2.2	Produktspezifität	37
5.3.2.3	Quantifizierung	38
5.3.2.4	Primer.....	39
5.3.2.5	Real-Time-quantitative-PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen	42
5.3.3	Qualitative Primertests mittels RT-PCR	44

5.3.3.1	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	44
5.3.3.2	Reverse Transkription.....	45
5.3.3.3	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	46
5.3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	47
5.4	Statistische Methodik.....	48
6	Ergebnisse	50
6.1	Auswertung der Rezeptoren in einer Region.....	50
6.1.1	Region 1: Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand	50
6.1.2	Region 2: anteriores Septum	51
6.1.3	Region 3: posteriores Septum	52
6.1.4	Region 4: laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel).....	53
6.1.5	Region 5: laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)	54
6.2	Vergleich der Expression eines Rezeptors in den untersuchten Regionen	55
6.2.1	Die Expression von TRPV1 in den fünf Regionen.....	55
6.2.1.1	Schlussfolgerung für TRPV1.....	56
6.2.2	Die Expression von TRPA1 in den fünf Regionen.....	58
6.2.2.1	Schlussfolgerung für TRPA1.....	59
6.2.3	Die Expression von ACCN3 in den fünf Regionen	61
6.2.3.1	Schlussfolgerung für ACCN3.....	62
6.2.4	Die Expression von TRPM8 in den fünf Regionen	63
6.2.4.1	Schlussfolgerung für TRPM8	64
6.2.5	Die Expression von CALCB1 und CALCB2 in den fünf Regionen	65
7	Diskussion	66
7.1	Topographie der Rezeptoren.....	66
7.2	Ko-Lokalisationen der Rezeptoren.....	71
7.3	Allgemeine Methodenkritik.....	73
7.3.1	Die Probandenzahlen und Fallzahlen	73
7.3.2	Probenentnahme	74
7.3.3	Kritische Betrachtung der Messmethode	74
7.4	Genexpressionsregulation	76
7.5	Integration peripherer und zentraler Regulationsmechanismen	77
7.6	Expression von trigeminaler Rezeptor-DNA durch andere Zellen	78
7.7	Ausblick.....	79
8	Zusammenfassung.....	80
9	Literaturverzeichnis.....	82
10	Tabellenverzeichnis.....	96
11	Abbildungsverzeichnis.....	104

12	Abkürzungsverzeichnis	106
13	Anhänge	108
13.1	Anhang 1, Probandeninformation zur Studie.....	108
13.2	Anhang 2, Schmelzkurven der verwendeten Primer	111
13.3	Anhang 3, Abstract	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14	Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
15	Erklärung zur Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben Fehler! Textmarke nicht definiert.	
16	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
17	Curriculum Vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung und Zielsetzung

Der Hörsinn und der Sehsinn verarbeiten Reize, die sich mit nur wenigen Größen (Modalitäten) charakterisieren lassen. Licht wird z.B. durch unterschiedliche Wellenlängen, Töne durch unterschiedliche Tonhöhen (Schalldruck und Frequenz) charakterisiert. Der Riechsinn hingegen unterliegt viel komplexeren Reizen: es gibt eine immense Anzahl von Duftstoffen unterschiedlichster chemischer Strukturen. Die Einordnung in ein bestimmtes System ist daher nur sehr schwer möglich. Daher ist die Riechwahrnehmung auch nicht ausschließlich auf die Aktivierung eines einzelnen Sinnessystems zurückzuführen, sondern es sind vor allem zwei sensorische Systeme, die miteinander agieren, sich gegenseitig beeinflussen und durch gleiche oder sich unterscheidende Komponenten von Geruchsstoffen eine neuronale Aktivität auslösen: das olfaktorische und das trigeminale System.

Die chemischen Sinne gehören zu den phylogenetisch ältesten Sinnen des Menschen. Änderungen der chemischen Zusammensetzung der Umwelt können bereits von primitiven einzelligen Organismen wahrgenommen werden. Die chemischen Sinne wurden im Laufe der Evolution modifiziert und weiterentwickelt. Auch der Mensch verfügt über eine Vielzahl von Chemorezeptoren. Sie messen z.B. den Kohlenstoffdioxid-Gehalt im Blut, den Blutzucker etc., also Veränderungen im Körper selbst und werden als Enterozeptoren bezeichnet (Mayer 2010). Exterozeptive Sinne nehmen im Gegensatz dazu Veränderungen von außerhalb des Körpers wahr: mit den Augen sehen wir, der Geruchssinn reagiert hingegen auf Substanzen in der Luft, die mit der Atmung an Rezeptoren der Nasen- und Rachenschleimhaut gelangen. Der Geruchssinn ist bekanntermaßen für viele Tiere von entscheidender Bedeutung: olfaktorische Signale steuern u.a. die Nahrungssuche, das Reproduktionsverhalten und die Orientierung in der Umwelt (Doty 1986). Dies lässt sich in einigen Aspekten auch auf den Menschen übertragen, obwohl bei weitem nicht alle dazugehörigen Wahrnehmungsprozesse in das menschliche Bewusstsein gelangen (Stern & McClintock 1998).

Im Vergleich zu den anderen menschlichen Sinnessystemen gibt es verhältnismäßig wenig Untersuchungen zur Anatomie und Funktion des Geruchssinns. Jedoch änderte sich dies in den letzten Jahren und es wurden enorme Fortschritte im Verständnis und der Komplexität des Riechvorgangs und seiner Teilprozesse gemacht. Die hier vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur weiteren Erforschung des Geruchssinns leisten. Insbesondere sollen die Ergebnisse die Integration des Trigeminale Systems in die Olfaktorik verdeutlichen.

Der N. trigeminus als größter Hirnnerv spielt in der Sensorik eine bedeutende Rolle und dient der Abwehr potentiell schädlicher Umwelteinflüsse, trägt aber auch zur Geschmacks- und Geruchsfindung bei. Duftstoffe enthalten neben der olfaktorischen meist auch eine

trigeminale Komponente, so sind z.B. Schärfe, Brennen, Stechen oder Kribbeln Reize, die trigeminal vermittelt werden. So erklärt es sich, dass bei speziellen Störungen der Olfaktorik unter Umständen ein reduziertes Riechvermögen erhalten bleiben kann.

Während der letzten Jahre zeigten jedoch verschiedene Studien, dass das intranasale trigeminale System sehr viel komplexer ist als oft vorher gedacht. Es kann als eine Art Wächter des Respiratorischen Systems angesehen werden. In letzter Zeit wurde eine Reihe von spezifischen trigeminalen Rezeptoren entdeckt, so dass man davon ausgehen kann, dass freie Nervenendigungen des Nerves nicht unspezifisch angesprochen werden. Die molekularen Mechanismen, mit denen die Reizstoffe trigeminale freie Nervenendigungen letztendlich aktivieren, sind im Gegensatz zu den olfaktorischen Duftstoffen, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden, noch weitgehend unerforscht.

Zusätzlich wurde entdeckt, dass die Nasenschleimhaut in unterschiedlicher Intensität auf trigeminale Stimuli reagiert. Dabei liegt die trigeminale Aktivierungsschwelle deutlich höher als die olfaktorische (Hummel & Kobal 1992), (Thuerauf et al. 1999). Allerdings gibt es noch relativ wenig Untersuchungen zur intranasalen Verteilung dieser trigeminalen Rezeptoren.

Verschiedene Untersuchungen haben das Ziel, die Verteilung und Spezifität der trigeminalen Chemorezeptoren funktionell und topografisch zu charakterisieren. Es wurden u.a., basierend auf der Erstbeschreibung von Kobal (Kobal 1981), verschiedene Untersuchungen zu den NMP's (negative mucosa potential) durchgeführt und die Hypothese erstellt, dass diese NMP's ein Korrelat peripherer Nozizeption darstellen (Thuerauf et al. 1993). Schon 1926 postulierte von Skramlik in seinem Handbuch der Physiologie der niederen Sinne (Skramlik 1926), eine erhöhte trigeminale Chemosensitivität im anterioren Drittel der Nasenhöhle. Hummel et al. (1996) bestätigten dies in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts mit elektrophysiologischen Daten (Hummel et al. 1996).

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit der intranasalen Topografie verschiedener trigeminaler Rezeptoren, in dem mittels Real-Time-PCR die RNA-Expression der Gene, die für diese Rezeptoren kodieren, untersucht wird. Korrespondierend zu den in anderen Untersuchungen gemessenen NMP's (Scheibe et al. 2008; Meusel et al. 2010) werden Biopsien aus fünf unterschiedlichen nasalen Regionen entnommen.

Es soll damit die Hypothese untersucht werden, dass es unterschiedliche Verteilungsmuster des N. trigeminus innerhalb der Nasenschleimhaut gibt und so die Aussage, dass das respiratorische Epithel kein homogenes Gewebe ist, bestätigt werden.

Die Erkenntnisse zur Komplexität des Geruchssinns sollen nicht nur zu einem besseren Verständnis der Wahrnehmung von Geruch und Geschmack von Speisen führen, sondern auch Erklärungen für klinische Symptome wie z.B. das „Empty-Nose-Syndrom“ geben, die wahrscheinlich u.a. auf eine veränderte Wahrnehmung trigeminaler Reize zurückzuführen

sind. Nicht nur Therapieansätze können dadurch spezifischer werden, auch in der HNO-Chirurgie können nicht zuletzt durch die Erkenntnisse der topographischen Distribution trigeminaler Rezeptoren in der Nasenschleimhaut Operationsverfahren weiter verbessert werden und z.B. postoperatives Schmerzempfinden durch schonendere intranasale Chirurgie reduziert werden.

2 Anatomische Grundlagen der Nase

2.1 Makroskopische Anatomie der Nase

Anatomisch kann die Nase in einen äußeren und einen inneren Abschnitt eingeteilt werden. Die äußere Nase wird kranial durch die paarigen Ossa nasalia, kaudal und medial durch den Oberkieferfortsatz (Processus maxillaris) sowie einem flexiblen, knorpeligen Nasengerüst gebildet.

Das aus hyalinem Knorpel bestehende flexible Nasengerüst gliedert sich in den unpaaren Nasenspitzenknorpel (Cartilago alaris major), dem paarig angelegten Dreieckknorpel (Cartilago nasi lateralis) sowie dem ebenfalls paarigen Nasenflügelknorpel (Cartilago alaris major), bestehend aus einem medialen und lateralen Schenkel (Crus mediale et laterale). Form und die Stabilität der Nasenflügel bestimmen wesentlich das Aussehen der Nasenspitze und der Nasenlöcher (Aperturæ piriformes), welche die beiden Nasenhöhlen mit der Außenwelt verbinden und damit den Zugang zur inneren Nase darstellen. (Probst 2004)

Bild 1: Skelett der äußeren Nase (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)

Bild 2: Nasenknorpel (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)

Durch das Nasenseptum (Septum nasi) wird die Nase medial in zwei annähernd gleich große Höhlen getrennt: die Nasenhaupthöhle (Cavitas nasi) und der beidseits vorgeschaltete Nasenvorhof (Vestibulum nasi), welche durch die innere Nasenklappe (Limen nasi), eine bogenförmige Schleimhautleiste, voneinander getrennt sind. Das Nasenseptum wird dorsal aus einem knöchernen Anteil (Pars ossea), bestehend aus der Lamina perpendicularis des Siebbeins (Os ethmoidale) sowie dem Pflugscharbein (Vomer) gebildet. Ventral befinden sich Knorpel und straffes Bindegewebe. Dorsal werden die Nasenhöhlen vom Keilbein (Os sphenoidale) begrenzt. Die Lamina cribrosa des Siebbeines, durch die die Fila olfactoria ziehen, bildet die kraniale Begrenzung der Nasenhöhle und gleichzeitig die Grenze zur vorderen Schädelgrube (Probst 2004).

Die kaudale Begrenzung bilden der Processus palatinus der Maxilla, die Lamina horizontalis des Os palatinum (Palatum durum). Der Boden der Nasenhöhle bildet gleichzeitig das Dach der Mundhöhle, den Gaumen. Die laterale Begrenzung der Nasenhöhlen wird von den Strukturen des Os ethmoidale und dem Processus uncinatus, der Maxilla mit ihrer Facies nasalis sowie dem Processus frontalis, die Lamina perpendicularis des Os palatinum und dem Os lacrimale gebildet. Von den Nasenwänden ragen jeweils drei dünne Knochenplatten in die Nasenhöhle hinein. Diese mit Schleimhaut überzogenen Knochenplatten werden als Nasenmuscheln (Conchae nasales) bezeichnet. Die Nasenmuscheln vergrößern die Oberfläche der Nasenhöhle wesentlich.

In der seitlichen Nasenwand liegen die Öffnungen zu den Nasennebenhöhlen sowie die Öffnung des Tränennasenganges (Ductus nasolacrimalis). Die Nasennebenhöhlen sind Pneumatisationsräume, die in die angrenzenden Schädelknochen übergehen und so mit den Nasenhöhlen eine funktionelle Einheit bilden. Des Weiteren wird durch sie der Resonanzraum für die Stimmbildung vergrößert. Man unterscheidet die paarigen Sinus frontalis, Sinus maxillaris und Sinus sphenoidalis sowie das Siebbeinzellsystem (Cellulae ethmoidales) (Probst 2004).

Die untere Nasenmuschel (Concha nasalis inferior) ist die größte der drei Nasenmuscheln und ein eigenständiger Knochen. Die mittlere Nasenmuschel (Concha nasalis media) sowie die kleinste der drei, die obere Nasenmuschel (Concha nasalis superior), gehören zum Siebbein (Os ethmoidale). Alle drei Nasenmuscheln enden mit den Hinterrändern an dem Nasenrachengang (Meatus nasopharyngeus), der bis zu den Choanen reicht.

Über die inneren Öffnungen (Choanae nasi) stehen die beiden Nasenhöhlen mit dem Nasenrachenraum (Nasopharynx) in Verbindung.

Bild 3: Knochen der lateralen Nasenwand der rechten Nasenhöhle (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)

Bei der Innervation der Nasenhöhle kann zwischen einem vorderen und einem hinteren Versorgungsbereich unterschieden werden.

Die sensible Innervation der Nasenschleimhäute erfolgt im vorderen Bereich durch den N. ethmoidalis anterior, welcher aus dem N. ophthalmicus, dem ersten Ast des N. trigeminus (V1), hervorgeht. Der überwiegende Teil der Nasenschleimhaut wird jedoch von den Ästen des N. maxillaris (V2), dem zweiten trigeminalen Hauptast, sensibel innerviert. Der dritte Hauptast des N. trigeminus (N. mandibularis, V3) enthält neben den sensiblen Nervenfasern auch somatomotorische Fasern zur Versorgung der Kau- und Mundbodenmuskulatur und wird im nächsten Abschnitt (2.2) näher beschrieben.

Die sekretorische Innervation der Glandulae nasales erfolgt über präganglionäre parasympathische Fasern des N. petrosus major (N. intermedio-facialis), die sich im Canalis pterygoideus mit den sympathischen Fasern (N. petrosus profundus, sympathischer Ast aus dem Plexus caroticus internus), zum N. canalis pterygoidei vereinigen. Dieser parasympathische und sympathische Nerv zieht nun zum Ganglion pterygopalatinum, in dem die parasympathischen Fasern umgeschaltet werden und fördernd auf die Sekretion der Glandulae nasales wirken, während die sympathischen, hemmenden Fasern bereits im Ganglion cervicale superius umgeschaltet worden sind. (Schünke M. 2006)

Die sensorische Innervation erfolgt, wie oben schon angeführt, über die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone, die in den Fila olfactoria, als N. olfactorius (1. Hirnnerv) gebündelt, verlaufen.

Die arterielle Blutversorgung erfolgt über Äste der Aa. ethmoidales anterior et posterior (aus A. ophthalmica) sowohl aus der A. carotis interna als auch über die A. sphenopalatina, die über die A. maxillaris aus der A. carotis externa hervorgeht. Durch eine Vielzahl arteriovenöser Anastomosen (Locus Kiesselbachi) kann es vor allem im Septumbereich bei Verletzungen oder Druckerhöhung zu Blutungen kommen (Viehweg et al. 2006).

2.2 Anatomie des Nervus trigeminus

Der N. trigeminus ist der größte der zwölf Hirnnerven und enthält überwiegend somatoafferente (sensible) Fasern zur Innervation der Haut des Gesichtes und des Scheitels, der Schleimhäute des Kopfes und der Hirnhäute sowie somatoefferente (motorische) Fasern, mit denen er die Kau- und Mundbodenmuskulatur versorgt. Außerdem innerviert er als erster Schlundbogennerv den M. tensor tympani und den M. tensor veli palatini. Er verlässt den Hirnstamm an der lateralen Seite der Pons (Brücke). In der mittleren Schädelgrube liegt an der Spitze der Felsenbeinpyramide in einer Duraduplikatur das sensible Ganglion trigeminale (Gasseri, Ganglion semilunare). In diesem Ganglion liegen die Perikaryen der pseudounipolaren Nervenzellen, deren zentrale Fasern zu den Trigeminskernen ziehen und aus deren peripheren Fasern sich die drei Hauptäste bilden (Hummel & Livermore 2002). Die motorischen Anteile ziehen lediglich durch das Ganglion hindurch. Auch als „Drillingsnerv“ bezeichnet, verzweigt sich der N. trigeminus in den N. ophthalmicus (V1), den N. maxillaris (V2) und den N. mandibularis (V3) (Trepel 2004). Die drei Äste ziehen durch verschiedene Öffnungen an der Schädelbasis und versorgen u.a. drei voneinander getrennte Bereiche wie abgebildet:

Bild 4: Aufspaltungen und Versorgungsgebiete des N. trigeminus (aus: Grey, Henry, Anatomy of the Human Body, 1918, <http://www.bartleby.com/107/illus778.html>)

Nur die beiden oberen Äste (V1 und V2) des Nerves sind rein sensible Nervenfasern und u.a. für die somatoafferente Innervation der Nasenhöhle zuständig. Der dritte Trigeminasast enthält als einziger Ast neben sensiblen Fasern noch alle motorischen Anteile zur Versorgung der Kau- und Mundbodenmuskulatur. Allen drei Ästen ist jedoch gemein, dass sie einen rückläufigen Ast für die sensible Innervation der Hirnhäute abgeben (Trepel 2004). Der N. ophthalmicus (V1) tritt nach dem Ganglion trigeminale in den Sinus cavernosus, den venösen Blutleiter, ein und zieht seitlich darin nach ventral. Als Erstes verlässt ein rückläufiger Ast (Ramus tentorius) den Nerv zur sensiblen Innervation der Dura. Normalerweise teilt sich der erste Hauptast noch in der Schädelhöhle in seine drei Endäste, den N. frontalis, den N. lacrimalis und den N. nasociliaris, mit denen er gemeinsam durch die Fissura orbitalis superior von der Schädelhöhle in die Augenhöhle gelangt. Letzterer zieht über den N. opticus hinweg am medialen Orbitarand zum medialen Augenwinkel, um den dortigen Hautbereich und die Konjunktiva zu versorgen. Vorher gibt er einen Ast zur sensiblen Versorgung des Bulbus oculi sowie kleinere Äste zur sensiblen Versorgung der Cornea ab. Mit den Nervi ethmoidales anteriores et posteriores zieht er durch die Foramina ethmoidale anterius et posterius aus der Orbita durch die vorderen Siebbeinzellen, um von dort wieder durch die Lamina cribrosa (sensible Versorgung der vorderen Siebbeinzellen und der Keilbeinhöhle) in die Nasenhaupthöhle zu gelangen, die vor allem im vorderen Bereich und im vorderen Nasenseptumsbereich durch die Rami nasales mediales et laterales sensibel innerviert wird (Trepel 2004).

Auch der zweite Hauptast, der N. maxillaris (V2), verläuft nach dem Verlassen des Ganglion trigeminale durch den Sinus cavernosus nach ventral, um durch das Foramen rotundum durch die Schädelbasis hindurch in die Fossa pterygopalatina einzutreten und sich in seine drei Äste aufzuteilen: N. zygomaticus, N. infraorbitales und die Rami ganglionares. Die sensiblen Fasern der Rami ganglionares ziehen unverschaltet durch das sich in der Fossa pterygopalatina befindliche, gleichnamige parasymphatische Ganglion. Gemeinsam mit angelagerten parasymphatischen Fasern ziehen sie durch das Foramen sphenopalatinum in die Nasenhaupthöhle, wo sie sich noch einmal in die Rami nasales posteriores superiores laterales und mediales aufzweigen, um neben den Nasenmuscheln und den hinteren Siebbeinzellen das Nasenseptum sensibel zu innervieren (Trepel 2004).

Bild 5: Nerven des Nasenseptums; Aufzweigung des Nervus ophthalmicus (V1) und des Nervus maxillaris (V2). Die sensible Versorgung der Nasenhaupthöhle erfolgt im vorderen oberen Bereich des Septums von den Ästen des Nervus ophthalmicus (V1), in den übrigen Abschnitten von Ästen des Nervus maxillaris (V2). Das Areal der Riechschleimhaut wird vom Nervus olfactorius (I) speziell innerviert. (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)

2.2.1 Die Trigeminuskerne

Die Radix sensoria (Portio major) des N. trigeminus bildet, wie oben erwähnt, die Hauptmasse der Fasern und ist bereits am Austritt aus dem Pons von einer dünnen Radix motoria (Portio minor) zu unterscheiden. Die motorische Wurzel wird von einem kleinen, im Pons liegenden motorischen Kerngebiet gebildet (Nucleus motorius nervi trigemini), während man drei somatoafferente, also sensible Kerngebiete unterscheiden kann. Das erste Kerngebiet, der Nucleus principalis (pontinus) nervi trigemini, liegt im Tegmentum pontis und ist der sensible Hauptkern des N. trigeminus. Dieser Kern ist vor allem für die epikritische Sensibilität, also die feine Berührungsempfindung des Gesichts verantwortlich. Auch der Nucleus spinalis nervi trigemini ist ein ebenfalls im Tegmentum pontis lokalisiertes Kerngebiet. Hier enden überwiegend Fasern der protopathischen Sensibilität, also Fasern für die Schmerz-, Temperatur- und grobe Tastempfindung. Diese Fasern enden in somatotoper Gliederung im Kerngebiet: von kranial nach kaudal enden die Fasern der perioralen Region, der sich anschließenden Hautareale sowie die Fasern der Randbezirke des trigeminalen Innervationsgebietes (Trepel 2004).

Nach der Umschaltung in den Nuclei spinalis et principalis nervi trigemini der gleichen Seite kreuzen die 2. Neurone zur Gegenseite, um als Lemniscus medialis zum Thalamus zu ziehen und im Nucleus ventralis posterolateralis (VPL) auf das dritte Neuron umgeschaltet zu werden. Von dort gelangen sie u.a. weiter zum primären somatosensorischen Cortex (Gyrus postcentralis) (Wachsmuth 1979).

Das dritte sensible Kerngebiet, der Nucleus mesencephalicus nervi trigemini, weist die Besonderheit auf, dass es seine Afferenzen nicht wie bei anderen sensiblen Kernen des ZNS von Neuronen bekommt, deren Perikaryen in peripheren Ganglien liegen, sondern dass die pseudounipolaren Ganglienzellen (1. Neuron) des Kerngebietes ihre eigenen Fortsätze ohne Umschaltung aus der Kaumuskulatur der ipsilateralen Seite beziehen. Es sind vor allem Axone der Propriozeption, also der Tiefensensibilität, die vom Nucleus mesencephali kommen, Kollateralen zum Kleinhirn und Vestibularorgan abgeben und im Nucleus principalis nervi trigemini auf das zweite Neuron umgeschaltet werden, bevor auch sie, wie die Afferenzen der beiden anderen Kerngebiete, weiter zum Thalamus und zur Großhirnrinde ziehen (Trepel 2004).

Bild 6: Schema der nozizeptiven somatosensorischen Organisation des Gesichtsschädels. Der N. trigeminus ist dreigeteilt: N. ophthalmicus (V1), N. maxillaris (V2) und N. mandibularis (V3), die unterschiedliche Gewebe versorgen. V1 und V2 versorgen ebenfalls die Hirnhäute. Das erste Neuron, welches nozizeptive Afferenzen (über A-delta- und C-Fasern) vermittelt, projiziert zum Nucleus spinalis nervi trigemini. Aufsteigende Bahnen aus dem Nucleus spinalis erreichen suprasegmentale Ebenen wie den Thalamus und den Cortex. Ebenfalls gibt es wichtige absteigende Bahnen aus dem suprasegmentalen Zentren (z.B. Cortex), um die afferenten Informationen zu modulieren. (aus: Mager, Pillman, The encyclopedia of pain 2007)

2.3 Mikroskopische Anatomie der Nase

2.3.1 Regio respiratoria

Der Nasenvorhof ist mit mehrschichtigem verhornten Plattenepithel ausgekleidet, welches neben Talg- und Schweißdrüsen auch apokrine Drüsen und Borstenhaare (Vibrissen), die die in der Luft enthaltenen Verunreinigungen filtern, besitzt. Im Bereich der inneren Nasenklappe geht das mehrschichtige Plattenepithel in mehrreihiges Zylinderepithel über. Die Nasenhaupthöhle ist gänzlich mit Schleimhaut überzogen, die sich in zwei Bereiche trennen lässt: die Regio respiratoria sowie die Regio olfactoria. Die Regio respiratoria umfasst den Bereich der unteren und mittleren Nasenmuschel, d.h. den größten Teil der Nasenhaupthöhle. Sie besitzt ein zweireihiges hochprismatisches Epithel, deren Zellen mit rachenwärts schlagenden Kinozilien besetzt ist, sowie endoepitheliale seröse Drüsen (Glandulae nasales), Becherzellen, die die mukösen Bestandteile des Sekretes produzieren, eine auffallend dicke Basalmembran und eine darunter liegende, stark vaskularisierte Lamina propria (Kern 2000). In dieser befindet sich in der tiefen Schicht ein spezieller Venenplexus, der zur Erwärmung der inhalierten Luft beiträgt und auch als Schwellkörper funktioniert (Welsch 2002). Klinische Relevanz erhält diese Funktion u.a. bei Erkrankungen der oberen Atemwege mit einer behinderten Nasenatmung und Schwellung der Nasenschleimhaut aufgrund bakterieller oder viraler Entzündungen.

Im respiratorischen Epithel befinden sich Zellen der Immunabwehr wie Leukozyten, Neutrophile Granulozyten und v.a. bei Patienten mit allergischer Rhinitis, auch Mastzellen. Das Oberflächenepithel ist mit einem Schleimfilm bedeckt, welcher von den Drüsen gebildet wird und von den Flimmerzellen aboral bewegt wird. Auf diesem Schleimfilm bleiben nicht herausgefilterte Schmutzpartikel oder Krankheitserreger haften.

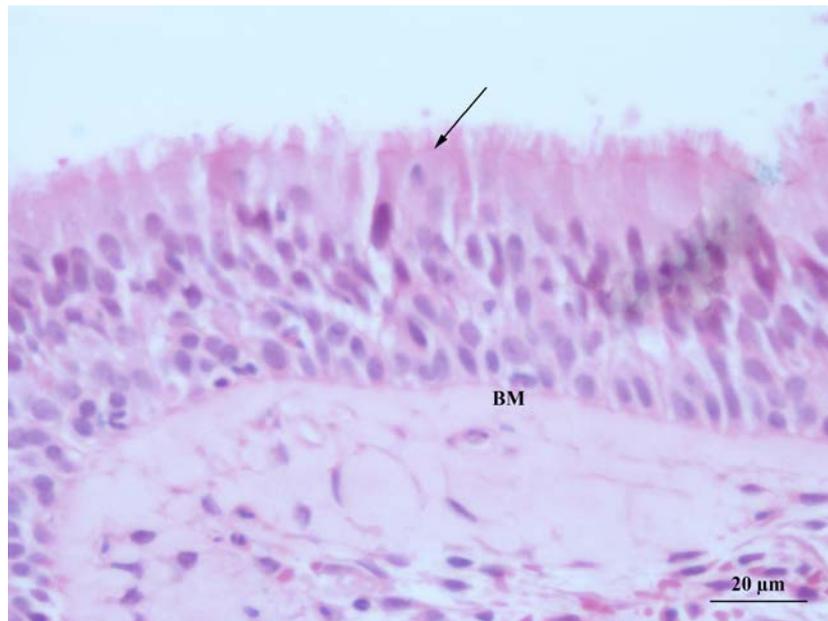


Bild 7: Histologischer Aufbau menschlicher Nasenschleimhaut (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) einer 18-jährigen Patientin. Die Biopsie zeigt oberhalb der breiten Basalmembran (BM) mehrschichtiges Epithel und apikal ein mit Zilien besetztes Zylinderepithel (Pfeil). Becherzellen fehlen. Dieses dysplastische Bild unterscheidet sich hinsichtlich des Aufbaus eines mehrschichtigen respiratorischen Epithels. Balken: 20 µm. (Freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Martin Witt, 27.10.2011)

2.3.2 Regio olfactoria

Die Riechschleimhaut (Regio olfactoria) ist ein etwa 2 cm² kleiner Schleimhautbereich im Dach der Nasenhöhle (Brunn 1982), der oberen Nasenmuschel sowie der oberen Septumanteile und enthält Chemorezeptoren, die in dem mehrreihigen olfaktorischen Epithel liegen. Auch die Regio olfactoria untergliedert sich in drei Gewebsschichten, unterscheidet sich aber von der respiratorischen Schleimhaut durch das oben liegende Riechepithel. Dieses Epithel ist ca. 60 µm dick und enthält im Gegensatz zum respiratorischen Epithel weder Becherzellen noch Flimmerepithel. Die Basalmembran ist hier dünner als die des respiratorischen Epithels, die Lamina propria hier eher zellreich und enthält außerdem seröse Drüsen (Bowman-Drüsen, Glandulae olfactoriae) und Gefäße. Wie abgebildet, erkennt man darin folgende Zelltypen: Riechsinneszellen, Mikrovilluszellen, Stütz- und Basalzellen (Moran et al. 1982).

Bild 8: Schematische Darstellung des Olfaktorischen Epithels. Die Epitheloberfläche ist mit Schleim (MU) aus den Bowmann-Drüsen (BG) bedeckt, in den die chemosensorischen Zilien (CI) der Olfaktorischen

Sinneszellen (OSN) hineinragen. Die Fortsätze der OSN (DK) ragen über das Epithel hinaus. Die Stützzellen (SC) bilden die apikale Oberfläche. Die Basalzellen (BC) sind undifferenzierte Neuronen, aus denen die OSN hervorgehen. (aus: Kaneko, H. et al., J. Neurosci., Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons, 2004)

Die Riechsinneszellen sind spezialisierte bipolare Neurone, die das erste Neuron der Riechbahn darstellen. Die apikalen Fortsätze der Riechzellen (olfactory knobs) ragen über das Epithel hinaus (Menco & Jackson 1997).

Diese Zilien sind beim Menschen wenige μm lang, nur passiv beweglich und tragen in ihrer Membran Rezeptoren für Geruchsstoffe. An ihrer Basis werden die Sinnes- bzw. Riechzellen zu 0,2 - 0,3 μm starken marklosen Axonen, welche die Basalmembran durchbrechen und als Fila olfactoria, welche anschließend den N. olfactorius bilden, durch die Lamina cribrosa zum Bulbus olfactorius ziehen und hier in den Glomeruli olfactorii enden. Unterhalb des olfaktorischen Epithels in der Lamina propria befinden sich olfaktorische Hüllzellen (ensheathing cells), die die Regeneration der Olfaktorischen Rezeptorneurone unterstützen (Au & Roskams 2003) und die Axonbündel in ihrer Zielrichtung zum Bulbus olfactorius umhüllen (Vincent et al. 2005). Im Riechepithel befinden sich des Weiteren Basalzellen (multipotente neuronale Stammzellen), die durch Teilung ca. alle 30-50 Tage die Riechsinneszellen ersetzen (Carr & Farbman 1993; Huard et al. 1998). Daher können zumindest bei Ratten Riechsinneszellen verschiedener Reifegrade unterschieden werden (Verhaagen et al. 1989), die während des Reifungsprozesses von der Basallamina in Richtung der Stützzellen wandern (Graziadei & Graziadei 1979; Verhaagen et al. 1989).

Die Stützzellen bilden palisadenförmig den Abschluss des Riechepithels zur Nasenhaupthöhle (Pixley et al. 1997). Die Stützzellen sind mitochondrienreich, bilden schleimhaltige Sekretgranula und sind apikal mit den Riechsinneszellen verbunden (Mendoza 1993). Sie phagozytieren abgestorbene Riechsinneszellen und gleichen das extrazelluläre Milieu aus (Trotier 1998).

Mikrovilluszellen, welche wahrscheinlich ebenfalls bipolare Rezeptorzellen darstellen, kommen im Riechepithel in deutlich geringerer Zahl vor als die Riechsinneszellen (Doty 2001). Unterhalb des Riechepithels in der Lamina propria befinden sich die Endstücke der Bowman'schen Drüsen (Glandulae olfactoriae). Sie produzieren den dem Epithel aufliegenden Schleim, welcher Elektrolyte und hydrophile olfaktorische Bindungsproteine enthält, die eine wichtige Rolle in der olfaktorischen Wahrnehmung spielen (Pelosi 1994).

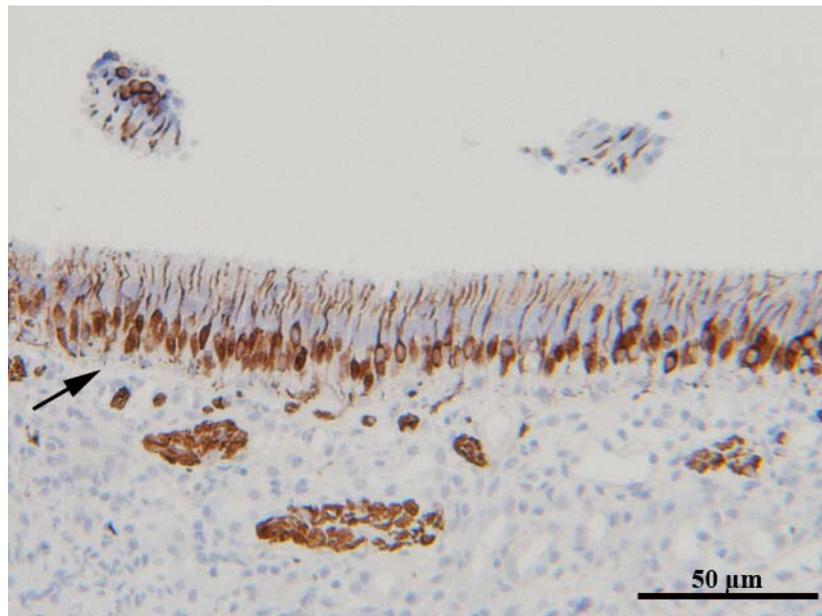


Bild 9: Histologischer Aufbau normaler menschlicher Riechschleimhaut (Immunhistochemische Markierung mit Antikörper gegen Neurotubulin) einer 18-jährigen Patientin. Die Basalmembran (Pfeil) ist dünner als die Basalmembran im respiratorischen Epithel. (Freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Martin Witt, 27.10.2011)

Beim Nager sind die Zellkerne dieser Zelltypen schichtartig verteilt, jedoch ist diese strenge zonenartige Aufteilung im (erwachsenen) menschlichen olfaktorischen Epithel aufgelockert (Nakashima et al. 1984).

Wie oben erwähnt, ist eine solche theoretische Zweiteilung zwischen respiratorischem und olfaktorischem Epithel histologisch schwierig, denn die menschliche Nasenschleimhaut unterliegt fortwährenden Umbauprozessen, die nicht nur bei chronisch-entzündlichen Rhinosinitiden zu beobachten, sondern unter anderem auch durch umweltbedingte irritierende Luftschadstoffe bedingt sind. Das olfaktorische Gewebe unterliegt nach einer Schädigung unter normalen Umständen Regenerations- und Abheilungsprozessen, jedoch können zum Teil persistierende Gewebsumwandlungen mit konsekutiven Verlust der Differenzierbarkeit sowohl des respiratorischen als auch des olfaktorischen Epithels einhergehen (Yee et al. 2009). Allerdings konnte in Postmortem-Studien gezeigt werden, dass das olfaktorische Epithel des Menschen auch im Laufe des Lebens zunehmend mit respiratorischem Epithel ersetzt wird. Dieser Sachverhalt trifft nicht nur bei viralen (Moran et al. 1992) oder traumatischen (Yamagishi, M et al. 1994) Schädigungen der Nasenschleimhaut zu, sondern scheint auch ein natürlicher Alterungsprozess zu sein (Kern 2000). Die Tatsache, dass die menschliche Nasenschleimhaut Gewebe mit Metaplasien, Becherzellhyperplasien, Übergangszuständen zwischen respiratorischem und olfaktorischem Epithel enthält, also ständigen Umwandlungsprozessen unterliegt, erschwert histologische Bewertungen dieser Gewebe zusätzlich (siehe Bild 7).

3 Physiologische Grundlagen

3.1 Physiologische Grundlagen des olfaktorischen Systems

Während der Inspiration gelangt die Luft als laminare Strömung über die Nasenlöcher in die Nase. Der Bereich des Limen nasi ist die Region mit dem geringsten Querschnitt, hinter der Nasenklappe verbreitert sich der Querschnitt der Nasenhöhle wieder, so dass aus der vorher laminaren nun eine turbulente Strömung der Einatemluft wird. Diese spezielle Strömungscharakteristik wurde in verschiedenen Studien untersucht (Hornung et al. 1987) und ist u.a. Voraussetzung für das Riechen, da es zu einer Verlangsamung der Flussgeschwindigkeit der eingeatmeten Luft und dadurch zu einem intensiveren Kontakt mit der Nasenschleimhaut kommt (Probst 2004).

Auch andere wichtige Funktionen wie Befeuchtung, Reinigung und Erwärmung der Einatemluft werden so ermöglicht (Zhao et al. 2004). Allerdings kommt nur ein relativ geringer Teil des Luftstromes in der olfaktorischen Region des Nasendaches an (Hahn et al. 1993). Dadurch können die sensiblen olfaktorischen Nervenfasern vor unnötiger Belastung durch größere Partikel geschützt werden, wohingegen leichte Duftstoffe weiterhin über den Luftstrom transportiert werden können (Kelly et al. 2000).

Die Duftmoleküle, die die Regio olfactoria mit dem nasalen Luftstrom orthograd erreichen, lösen sich in dem seromukösen Sekret, das die Riechzellen bedeckt und gelangen so zu den Riechrezeptoren in der Zilienmembran der Rezeptorsinneszellen. Die Viskosität der Schleimschicht, das Molekulargewicht der Duftstoffe sowie deren hydrophobe und hydrophile Eigenschaften beeinflussen diesen Prozess. Olfaktorische Bindungsproteine (odorant binding proteins) erleichtern den Durchtritt vorwiegend hydrophober Duftmoleküle (Pevsner et al. 1986). Durch den Duftstoff-Rezeptor-Komplex wird die intrazelluläre Signaltransduktion initiiert. Über G-Proteine wird eine spezifische Adenylatcyclase angeregt, welche cAMP als second messenger erzeugt. Die Konzentrationserhöhung von cAMP führt zur Öffnung unspezifischer Kationenkanäle und nach Überschreiten eines Schwellenwertes zur Auslösung eines Rezeptorpotentials (Schild, D & Restrepo 1998). Über die Axone der Riechsinneszellen werden Aktionspotentiale zu den Glomeruli des Bulbus olfactorius, einem paarig angelegten Teil des Telencephalons, welche durch die vordere Kommissur verbunden sind, geleitet. Dort enden die Riechzellaxone mit hoher Konvergenz an den Dendriten der Mitralzellen. Auf je eine Mitralzelle konvergieren ca. 100-1000 Riechzellen mit gleicher Duftstoffselektivität, d.h. Axone, die spezifische Rezeptoren exprimieren, projizieren in wenige bestimmte Glomeruli (Ressler et al. 1993). Dabei sind auch Axone aus bestimmten Bereichen der Regio olfactoria topografisch bestimmten korrespondierenden Zonen des Bulbus olfactorius zugeordnet (Ressler et al. 1994).

Bild 10: Modell der Konvergenz im olfaktorischen System (aus: Mombaerts, P., Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006.)

Die Vielzahl der (horizontalen) Verschaltungen, Interneurone wie Periglomerularzellen und Körnerzellen, wirken modulierend. Aber auch Afferenzen aus höher gelegenen Hirnteilen projizieren in den Bulbus olfactorius und erhöhen die Trennschärfe der Geruchswahrnehmung, in dem sie die Glomeruli mehr oder weniger stark aktivieren (Mori et al. 1998).

Die Axone der Mitralzellen verlassen den Bulbus olfactorius und ziehen als Tractus olfactorius zu den olfaktorischen Projektionsbezirken. Hirnregionen, die ihre Afferenzen direkt aus dem Bulbus olfactorius erhalten, werden als primär olfaktorischer Kortex bezeichnet. Die Stria olfactoria lateralis, die beim Menschen den größten Teil der olfaktorischen Informationen vermittelt, steuert also den piriformen Kortex, den Mandelkernkomplex (Amygdala) und den entorhinalen Kortex an, wo es zur Verknüpfung von Riechinformationen mit Erinnerungen und Emotionen kommt. Hier erfolgt ebenfalls die Umschaltung auf das 3. Neuron der Riechbahn und die Weiterleitung zu den tertiären olfaktorischen Zentren, z.B. den olfaktorischen Assoziationskortex (Gyrus parahippocampalis) sowie die Insula, Thalamus und Hypothalamus. Da die meisten olfaktorischen Fasern den Thalamus umgehen (Gottfried 2006) und das olfaktorische System auch vielfältige Verbindungen mit dem limbischen System eingeht, liegt die Annahme nahe, dass es auch eine direkte und bewusstseinsunabhängige Wirkung von Gerüchen auf das Verhalten gibt. Damit ist die Riechbahn als einziges afferentes System in der Lage, den Thalamus weitgehend zu umgehen und Limbisches System und neocorticale Anteile unabhängig zu informieren (Plailly et al. 2008).

3.2 Physiologische Grundlagen des trigeminalen Systems

Wie oben schon erwähnt, ist der N. trigeminus für einen Großteil der sensiblen Versorgung des Gesichtes, einschließlich der Cornea, der Konjunktiven, der Nasen- und der Mundhöhle sowie für die motorische Innervation der Kau- und Mundbodenmuskulatur zuständig (Silver W.L. 1991). Im trigeminalen System findet man alle vier Arten von Rezeptoren: Mechano- (Probst 2004) Chemo- und Thermo- sowie Proprio- und Nozizeptoren, die auf die unterschiedlichen Stimuli reagieren (Silver W.L. 1991).

So ist z.B. auch die Nasenschleimhaut sehr empfindlich gegenüber schmerzhaften Stimuli (Handwerker & Kobal 1993). Diese Eigenschaft schützt die oberen Luftwege vor schädlichen Reizen, in dem z.B. der Niesreflex ausgelöst, die Atemfrequenz verringert oder der intranasale Strömungswiderstand erhöht wird (Silver W.L. 1991). Aber auch ein Anstieg der

Schleimsekretion in der Nase (Doty et al. 1978), periphere Vasokonstriktion, die Herabsetzung der Herzfrequenz (Angell James & Daly Mde 1969) bis hin zum Atemstillstand (Tomori et al. 1977) können trigeminal reflektorisch zum Schutz der oberen Atemwege ausgelöst werden. Allerdings sind die trigeminal vermittelten Modalitäten im Vergleich zur Vielfältigkeit des olfaktorischen System limitierter (Brand 2006). Qualitäten trigeminal vermittelter Reize sind Brennen, Stechen, Kälte und Wärme, Kribbeln, Schärfe (Laska et al. 1997; Hummel & Livermore 2002), die eine Schädigung des Organismus wie eine Art Wächter anzeigen und so vor einer Aufnahme ungesunder Substanzen über die Atemwege schützen.

Dabei ist die Interaktion des trigeminalen mit dem olfaktorischen System besonders wichtig, denn beide sind sowohl anatomisch als auch funktionell eng miteinander verknüpft (Cain & Murphy 1980; Kobal & Hummel 1988; Hummel & Livermore 2002) und spielen nicht nur bei der Detektion von Duftstoffen gemeinsam eine Rolle (Doty et al. 1978). Viele chemische Substanzen können, in Abhängigkeit von der Konzentration der jeweiligen Substanzen, sowohl das trigeminale als auch das olfaktorische System aktivieren (Doty et al. 2004). Dabei ist in der Regel die olfaktorische Wahrnehmungsschwelle niedriger als die trigeminale (Dalton 2001), so dass mit steigender Konzentration eines Stoffes wie z.B. Nikotin nicht nur olfaktorische, sondern auch trigeminale Rezeptoren aktiviert werden (Hummel & Kobal 1992).

Die Wahrnehmung trigeminaler Reize erfolgt über freie Nervenendigungen in der gesamten Nasenschleimhaut (Damann et al. 2006). Hier konvergieren die nozizeptiven Fasern in der Lamina propria und verlaufen parallel zur Basallamina. Dies wurde von Finger et al. 1993 bei Nagern nachgewiesen (Finger & Bottger 1993). Die Fortsätze enden also ohne Kontakt zur Außenwelt als Nervenendigungen wenige Mikrometer unterhalb der Epitheloberfläche und reichen daher im Gegensatz zu den olfaktorischen Nervenendigungen nicht in das Epithel hinein. In der Regio olfactoria befinden sich, zumindest bei Nagern, trigeminale Fasern neben olfaktorischen Rezeptorneuronen, Drüsen, Stütz- und Basalzellen der Nasenschleimhaut (Finger et al. 1990). Des Weiteren wurden trigeminale Nervenfasern auch entlang des Nervus olfactorius sowie im Bulbus olfactorius von Ratten lokalisiert (Finger & Bottger 1993; Schaefer et al. 2002) . Aufgrund dieser strukturell engen Verbindungen kann man daher von einem olfaktorisch-trigeminalen Reizverarbeitungssystem ausgehen.

Die nozizeptiven trigeminalen Reize werden durch zwei verschiedene Nervenfasertypen (Sekizawa & Tsubone 1994) vermittelt: A-delta-Fasern und C-Fasern. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Durchmessers, ihrer Leitungsgeschwindigkeit und in anderen Eigenschaften voneinander (Anton & Peppel 1991). Afferenzen der Haut und Schleimhaut werden über die myelinisierten A-delta-Fasern weitergeleitet, deren Erregung eher scharfe, stechende Empfindungen verursachen, die bereits mit Beginn der Stimulation auftreten

(„erster Schmerz“) (Mackenzie et al. 1975; Hummel et al. 1994). Allerdings adaptiert dieser Schmerz bei wiederholtem und andauerndem Reiz (Torebjork & Hallin 1970). Viszerale Schmerzen, die als dumpf oder brennend empfunden werden, vermitteln die dünnen und nicht myelinisierten C-Fasern, deren Leitungsgeschwindigkeit langsamer als die der schnell leitenden A-delta-Fasern ist (Torebjork & Hallin 1970; Mackenzie et al. 1975). Der vermittelte, sogenannte „zweite Schmerz“ dauert länger, als der als akut empfundene Reiz der A-delta-Fasern, weist keine Adaptation auf und wird emotional intensiver empfunden. Nach Price et al. (1972) beruht diese Tatsache auf verschiedenen Summationsprozessen im zentralen Nervensystem und nicht auf einer peripheren Stimulierung der Nozizeptoren (Price, DD 1972). Für A-delta-Fasern wurde diese Summation nicht beschrieben, hier werden periphere Habituationsprozesse angenommen (Torebjork & Hallin 1970; Hummel & Kobal 1992). Wie oben schon am Beispiel der chemischen Substanz Nikotin erwähnt, werden die verschiedenen Fasertypen auch in Abhängigkeit von der Konzentration, mit der die Stoffe einwirken, erregt. Nikotin wird in niedriger Dosis als Geruch wahrgenommen, in steigender Konzentration wird es als brennend empfunden und in höherer Konzentration werden die trigeminal vermittelten Empfindungen als stechend-schmerzhaft angegeben (Hummel et al. 1992; Hummel et al. 1994).

Da viele trigeminale Reizstoffe fettlöslich sind, kann von einer Diffusion der Stoffe durch die Schleimhaut ausgegangen werden (Finger et al. 1990). Dabei werden die trigeminalen Nervenendigungen nicht unspezifisch erregt, sondern es werden eine Reihe von spezifischen Rezeptoren exprimiert, die durch trigeminale Stimuli aktiviert werden (Szallasi et al. 1993). Eine Aktivierung des N. trigeminus kann durch unterschiedliche Substanzen erfolgen. Pfefferminze, Menthol und Eukalyptus (Eccles et al. 1988) werden als kalt empfunden und können ebenfalls die Wahrnehmung des Luftflusses durch die Nase verändern. So wird z.B. der Luftdurchfluss durch den Einsatz von Menthol und Eukalyptus als erhöht empfunden, obwohl sich der Luftfluss durch die Nase nicht objektivierbar ändert (Eccles et al. 1988; Nishino et al. 1997). Diese Mechanismen sind allerdings noch Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen. Salzsäure, Ammoniak, Chlor oder CO₂ rufen stechende Empfindungen hervor (Kobal & Hummel 1988). Capsaicin wird als brennend, scharf wahrgenommen (Caterina et al. 1997), Nikotin wird wie oben schon ausgeführt, konzentrationsabhängig als brennend und stechend empfunden. Nachdem die Stimuli über spezifische Rezeptoren in elektrische Impulse umgewandelt worden sind, werden sie nach zentraler Verschaltung über den Thalamus in den somatosensorischen Kortex geleitet und dort als Schmerz wahrgenommen.

4 Trigeminale Rezeptoren

Durch viele Untersuchungen in den letzten Jahren konnte man belegen, dass das trigeminale System sehr viel komplexer ist, als vorher angenommen wurde. Dies betrifft neben der topografischen Struktur auch die Vielzahl von Chemorezeptoren, die immer wieder Gegenstand der Forschung sind.

4.1 Die Transient-Rezeptor-Potential (TRP) -Kanäle

Die Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle haben eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben in der sensorischen Signaltransduktion. Minke fand 1977 heraus, dass sie bei der Phototransduktion von mutierten *Drosophila* mitwirken (Minke 1977). Sie werden auch im Vomeronasal-Organ von Mäusen exprimiert, wo sie in der Geschlechtsdiskriminierung von Artgenossen sowie im geschlechtsspezifischen Verhalten eine Rolle spielen (Stowers et al. 2002). Aber auch bei der sensorischen Verarbeitung von Geschmack (süß, sauer, umami), Temperatur- und mechanischen Reizen sind diese Kanäle zu finden (Caterina et al. 2000; Zhang, Y et al. 2003). Die Familie der TRP-Kanäle sind Ionenkanäle, die in sieben Unterfamilien eingeteilt werden können (Montell 2005): die „klassischen“ TRP-Kanäle (TRPC), die Vanilloid-Rezeptoren (TRPV), die Melastin-Unterfamilie (TRPM8), die NOMPC-Unterfamilie (TRPN), die ANKTM1-Unterfamilie (TRPA), die Mucolipin-Unterfamilie (TRPML) und die Polycystin-Unterfamilie (TRPP). Alle TRP-Kanäle sind tetramere Proteine mit sechs Transmembrandomänen und einer Porenregion zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne (Planells-Cases et al. 2005). N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. Die TRP-Kanäle sind nicht-selektive Ionenkanäle, die verschiedene Kationen, wie Natriumionen, Kaliumionen und vor allem Calciumionen leiten können (Clapham 2003).

4.1.1 TRPV1 - Hitze-Vanilloid-Rezeptor

TRPV1, auch als Vanilloid-Rezeptor (V1) bezeichnet, ist der bekannteste Vertreter der TRP-Kanäle. Er wurde im Hirnstamm, in sensorischen Ganglien und im Hinterhorn des Rückenmarks von Nagern entdeckt (Szallasi et al. 1995) und konnte bereits 1997 kloniert werden (Caterina et al. 1997).

Er besitzt eine intrazelluläre Bindungsstelle für Capsaicin, welches unspezifisch Kationenkanäle aktiviert und sich als Schärfe vermittelnder Inhaltsstoff in Paprika und Chilischoten befindet. Da Capsaicin als chemische Struktur einen Vanilloidteil aufweist (Nelson 1919), wird dieser Ionenkanal auch als Vanilloidrezeptor bezeichnet.

TRPV1 befindet sich in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum und ist als unspezifischer Kationenkanal permeabel für Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Ionen sowie für Protonen (Hagenacker et al. 2008). Exprimiert wird der Rezeptortyp besonders in den freien Nervenendigungen der Riechschleimhaut, in trigeminalen Ganglien und in Spinalganglien (Maggi & Meli 1988; Szallasi et al. 1995). Die Rezeptoren führen meist zu unmyelinisierten C-Fasern aber auch A-delta-Neurone sind Capsaicin-sensitiv (Holzer 1991). Diese Neurone wurden in einer Vielzahl von Geweben im Körper nachgewiesen, z.B. in der humanen Haut und Zunge (Szolcsanyi 1977), der Cornea von Nagern (Szolcsanyi et al. 1975) sowie in deren Magen-Darm-Trakt (Maggi et al. 1986), im kardiopulmonalen System (Coleridge & Coleridge 1977) und im Hypothalamus, wo sie eine Rolle in der Thermoregulation spielen (Hori 1984).

Neben der direkten Aktivierung des Ionenkanals durch Capsaicin können TRPV1-Rezeptoren bei Raumtemperatur durch Säure (Tominaga et al. 1998), durch endogene Substanzen wie das inflammatorische Peptid Bradykinin, durch CGRP (siehe 4.3) sowie durch den Nerve Growth Factor (NGF) aktiviert werden (Chuang et al. 2001). Aber auch Hitze (über 42 Grad Celsius) aktiviert TRPV1, d.h. man kann annehmen, dass diese Kanäle bei normaler Körpertemperatur nicht aktiv sind (Caterina et al. 1997). Dadurch ist erklärbar, warum die Qualitäten „scharf“ und „heiß“ als ähnlich empfunden werden. TRPV1 ist also für eine gesteigerte Wahrnehmung von Wärme, wie sie z.B. bei bradykininvermittelten Entzündungsprozessen entsteht, verantwortlich (Davis et al. 2000). Weitere Substanzen, die den TRPV1-Rezeptor anregen, sind Adenosin, ATP (Tominaga et al. 2001), Leukotriene (Shin et al. 2002) und Prostaglandine (Moriyama et al. 2005), Stoffe, die unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt gebildet werden und über die Aktivierung des TRPV1-Rezeptors die Entzündungs- und Schmerzreaktionen wahrscheinlich verstärken (Zygmunt et al. 1999; Hwang et al. 2000). So besitzt die Aktivierung des Vanilloid-Rezeptors z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis (Fernandes et al.), bei Asthma, bei gastrointestinalen Entzündungssyndromen, aber auch bei der Entstehung von Migräne (Szallasi et al. 1995; Nicoletti et al. 2008) eine hohe Relevanz. Auch bei mechanischen und thermischen Hyperalgesien konnte eine Beteiligung des Rezeptors im Schmerzgeschehen nachgewiesen werden (Caterina et al. 2000; Alessandri-Haber et al. 2008).

2006). Möglicherweise spielt TRPA1 außerdem eine Rolle bei kälteinduzierter Hyperalgesie nach Entzündung und Nervenschädigungen (Obata et al. 2005). Trotz offener Fragen zu der Funktion und Aktivierung des Rezeptors ist eine Beteiligung an nozizeptiven Vorgängen sicher und eine Erklärung möglich, warum Kälte paradoxerweise als brennender Schmerz empfunden werden kann (Bandell et al. 2004). Auch die mögliche Kooperation mit TRPV1 lässt eine Verbindung des TRPA1-Rezeptors bei entzündlichem Schmerzgeschehen und chronischen Schmerzsyndromen vermuten.

4.1.3 TRPM8 - Cold Menthol Rezeptor

Sensorische Nervenfasern können Temperaturschwankungen über einen großen Bereich hin wahrnehmen. Dabei spielen die thermosensitiven transienten excitatorischen Rezeptorpotential-Ionenkanäle eine entscheidende Rolle. Neben den oben schon beschriebenen TRPV1 und TRPA1 ist eine Aktivierung des Cold Menthol Rezeptor CMR1 oder auch TRP-Melastin 8 (TRPM8) für das Kälteempfinden verantwortlich. Dieser Rezeptor erhielt seinen Namen, weil er durch Menthol und durch Temperaturen unter 25 °C aktiviert wird. Aber auch die Kanäle TRPV2, TRPV3 und TRPV4, die zur TRP-Superfamilie gehören, sind in den Prozess des Kälte- und Schmerzempfindens eingebunden. Die Rezeptoren werden in primären sensorischen Neuronen, aber auch in anderen Geweben exprimiert (Tominaga & Caterina 2004). So wird TRPM8 etwa in doppelter Menge in den trigeminalen Neuronen der Gesichtshaut exprimiert, als in den Spinalganglien (Peier et al. 2002). Aber auch in Epithelzellen der Prostata sowie in karzinomveränderten Prostatagewebe wurden Proteine mit bisher noch unbekannter Funktion entdeckt, die eine hohe Ähnlichkeit mit den TRPM8-Rezeptorproteinen aufweisen (Tsavaler et al. 2001).

Die Aktivierungsschwellen der Ionenkanäle sind dabei temperaturabhängig unterschiedlich. TRPM8 wird durch Temperaturen zwischen 15-25°C aktiviert und führt über einen Calciueinstrom in die kältesensitiven Neurone zu einem Aktionspotential, welches über spinale und zentrale Verschaltungen und Weiterleitung über den Thalamus im Kortex als Kälte empfunden wird (Schafer et al. 1986). Ein weiteres Absinken der Temperaturen führt zu einer zusätzlichen Aktivierung von TRPA1 und TRPV1 und einem brennenden Kälteempfinden. Menthol kann ebenfalls einen Calciueinstrom und damit eine Aktivierung des Kälterezeptors TRPM8 auslösen, was erklärt, warum dieser Inhaltsstoff als kühlend empfunden wird. Bei höheren Konzentrationen und längerer Applikation von Menthol kann allerdings auch eine Desensibilisierung bis hin zu einer lokalanästhetischen Wirkung eintreten (Green & McAuliffe 2000).

4.2 ACCN3- amiloride-sensitive cation channel 3

Der Säure-sensitive Ionenkanal ACCN3, den man synonym auch ASIC3, DRASIC, SLNAC1, TNaC1 bezeichnen kann, gehört zu der Familie der Enac/DEG. Alle Mitglieder der Familie zeichnen sich durch intrazellulär gelegene C- und N-Termini, zwei Transmembransegmente sowie eine sich dazwischen befindliche aber extrazelluläre Schlaufe aus, die die Bindungsstelle für Liganden wie Protonen und Amilorid enthält (Schild, L et al. 1997). Je nach Subtyp ist das Kanalprotein aus vier gleichen bzw. unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut (Kellenberger et al. 1999). ACCN3 (ASIC3), der als Mitglied der Enac/DEG-Superfamilie hier untersucht wird, ist ein spannungsgesteuerter Ionenkanal, der durch eine extrazelluläre pH-Verschiebung in das saure Milieu aktiviert wird. Calcium-Ionen, die an den Kanal gebunden sind, blockieren bei neutralen pH-Bedingungen den Einwärtsstrom, werden durch Protonen verdrängt und geben den Kanal für den Ioneneinstrom frei (Imcke & McCleskey 2003). Dadurch wird ein Aktionspotential generiert. Insgesamt zählt man heute sechs verschiedene Isoformen des Rezeptors, deren Eigenschaften wie pH-Sensitivität, Kinetik und Ionenselektivität durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten bedingt sind (Basilana et al. 1997). ACCN3 kommt sowohl in mechanosensitiven und nozizeptiven peripheren Neuronen als auch in zentralen Neuronen von Säugetieren vor. Auch in trigeminalen Nervenendigungen konnten ACCN3-Rezeptoren nachgewiesen werden (Waldmann et al. 1997). Mit dem humanen ASIC3 (hASIC3), lokalisiert auf dem humanen Chromosomen 7q35, konnte sogar eine Variante des Rezeptors im menschlichen Ganglion trigeminale nachgewiesen werden (de Weille et al. 1998) aber auch in anderen humanen Geweben, wie z.B. in Lunge und Hoden (Babinski et al. 1999) ist dieser Rezeptortyp vorhanden.

ACCN3 spielt u.a. bei der Wahrnehmung von mechanischen und schmerzhaften Stimuli eine Rolle (Price, MP et al. 2001). So wird z.B. vermutet, dass ACCN3 zur Schmerzwahrnehmung von pectanginösen Beschwerden beiträgt, bei denen es im Rahmen eines ischämischen Ereignisses zu einer pH-Wert-Verschiebung und Gewebsazidose und daraus resultierender Aktivierung des Ionenkanals kommt (Benson et al. 1999). Aber auch bei Entzündungsvorgängen konnte ein erhöhtes Transkriptionslevel von ACCN3 und damit eine Beteiligung des Rezeptors an der Schmerzwahrnehmung nachgewiesen werden (Mamet et al. 2002). So lässt sich u.a. die analgetische Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika erklären, bei denen u.a. eine hemmende Wirkung auf ACCN3 nachgewiesen wurde (Voilley et al. 2001).

CGRP nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde das Neuropeptid in der menschlichen Haut, Synovia, Periost sowie periartikulär immunhistochemisch detektiert (Bjorklund et al. 1986; Bjurholm et al. 1988; Messlinger et al. 1995). In diesen Neuronen konnte auch eine Co-Expression mit Noradrenalin, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Neuropeptid Y, Somatostatin und Substanz P nachgewiesen werden, wenngleich die funktionelle Bedeutung der Co-Transmission noch nicht abschließend geklärt ist. Es wurde aber z.B. gezeigt, dass eine Aktivierung von CGRP-Rezeptoren in spinalen Neuronen von Ratten zu einer vermehrten mRNA-Expression von Neurokinin-1-Rezeptoren aus der Gruppe der Tachykinin-Rezeptoren führen, deren Ligand Substanz P ist (Seybold et al. 2003). CGRP kann somit als Signalmolekül angesehen werden.

Bei intradermaler Injektion von CGRP konnte eine Quaddelbildung sowie ein Erythem ausgelöst werden, bei intramuskulärer Injektion von CGRP wurde anschließend das Schmerzempfinden bei Druck auf die Injektionsstelle untersucht. Injizierte man nun CGRP in Kombination mit Substanz P, konnte, im Gegensatz zur alleinigen Gabe von CGRP, eine Schmerzhaftigkeit sowohl in der Haut als auch im Muskel registriert werden. Aus dieser Studie geht hervor, dass CGRP in den Prozess neurogener Entzündungen involviert ist (Pedersen-Bjergaard et al. 1991). Dabei wirkt CGRP nicht selbst entzündungsauslösend, sondern verstärkt synergistisch die permeable Wirkung von Substanz P (Newbold & Brain 1993).

CGRP ist ein starker, lang anhaltender sowohl peripher und zerebral wirkender Vasodilatator (Brain et al. 1985; Uddman et al. 1986) und wirkt bei gleichzeitigem Blutdruckabfall positiv chronotrop. Untersuchungen an Knockout-Mäusen zeigten auch, dass ein Fehlen des α -CGRP-Gens zu signifikant höheren systolischen Blutdruckwerten führt und α -CGRP damit eine wichtige Rolle bei der Langzeitregulation des Blutdruckes spielt (Gangula et al. 2000). Auch eine Interaktion mit Capsaicin konnte gezeigt werden, wobei die kardialen Effekte von Capsaicin wahrscheinlich durch eine Freisetzung von endogenem CGRP bedingt sind (Sigrist et al. 1986).

Des Weiteren konnte in vivo ein erhöhtes CGRP auch mit einer Insulin-Resistenz, wie sie bei Typ II Diabetikern besteht, (Molina et al. 1990) in Verbindung gebracht werden. Auch als Regulator in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse spielt CGRP eine Rolle. In Studien konnte eine Reduzierung der pulsatilen Growth-Hormon Ausschüttung und eine Abnahme der Nahrungsaufnahmefrequenz bei Nagern nachgewiesen werden (Tannenbaum & Goltzman 1985).

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeines

5.1.1 Ethische Rahmenbedingungen

Am 25.04.2006 wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden der Antrag für vorliegende Studie zur Durchführung klinischer Untersuchungen am Menschen vorgelegt. Der Antrag ist von der Ethikkommission positiv begutachtet und am 18.05.2006 genehmigt worden. Die Planung und Durchführung der klinischen Studie erfolgte nach anerkannten ärztlichen und ethischen Grundsätzen, welche in der aktuell geltenden Deklaration von Helsinki (2004) niedergelegt worden sind.

Die Probanden wurden im Vorfeld der Studie vom Fachpersonal der Klinik und Poliklinik für HNO-Heilkunde sowohl mündlich als auch schriftlich über Ziele und Hintergründe sowie den Ablauf der stattfindenden Untersuchung, der Biopsieentnahme und selten auftretenden Nebenwirkungen ausführlich aufgeklärt (siehe Anhang 1, Probandeninformation). Des Weiteren wurden die Probanden darauf hingewiesen, dass ihre Daten pseudonymisiert behandelt, gespeichert und aufbewahrt werden. Ebenfalls wurden die Probanden darüber aufgeklärt, dass sie das Recht haben, ihre Teilnahme an der Studie ohne Angabe von Gründen abzuberechnen.

5.1.2 Studiendesign

Es handelt sich hierbei um eine offene Studie. Eine Fallzahlschätzung wurde nicht vorgenommen, da es sich um eine explorative Untersuchung handelt, die außerdem ohne wesentliche Beeinträchtigung der Patienten durchgeführt wird.

5.1.3 Rekrutierung der Versuchsteilnehmer

In die Studie wurden 18 normosmische Patienten im Alter von 21 bis 75 Jahren (elf männliche, sieben weibliche Patienten, MW: 43 Jahre, siehe Tabelle 1) eingeschlossen, die aufgrund einer Septorhinoplastik in der Klinik für HNO-Heilkunde operiert und behandelt wurden.

Neben dem Einverständnis der Patienten musste ein normales Riechvermögen vorhanden sein.

Bei Patientinnen wurde eine Schwangerschaft bzw. Stillzeit ausgeschlossen.

Weitere Ausschlusskriterien waren:

- ausgeprägte Hyposmie sowie Anosmie
- wesentliche gesundheitliche Beeinträchtigungen, wie z.B. Diabetes mellitus, M. Parkinson, Niereninsuffizienz, die mit einer Störung der olfaktorischen Funktion einhergehen können
- Personen mit akuten oder ausgeprägten chronischen Entzündungen der Nase und der Nasennebenhöhlen
- Personen mit relevanten Vor- bzw. Begleiterkrankungen im HNO-Bereich
- Allergien, Alkohol- bzw. Drogenmissbrauch

Nach der Patientenaufklärung und der Aufklärung über die Datenschutzbestimmungen sowie der Sicherstellung, dass keines der oben genannten Ausschlusskriterien vorlag, unterzeichneten die Patienten die Einverständniserklärung und wurden in die Studie aufgenommen.

5.2 Vorangehende/begleitende Untersuchungen

Im Rahmen der Operationsvorbereitung wurden die Patienten eingehend untersucht.

Mittels Endoskopie wurden die Nasen der Patienten inspiziert, um Begleiterkrankungen (z.B. Entzündungen, Polypen) auszuschließen.

Ein Anamnesebogen, auf dem verschiedene Fragen bezüglich ihres Geruchssinnes gestellt werden, musste von den Patienten ausgefüllt werden. Anschließend wurde ein sogenannter „Stiffin´Sticks“- Riechtest durchgeführt.

5.2.1 Screening-Test: Riechprüfung

Das trigeminale und das olfaktorische System interagieren anatomisch auf einer Ebene: Finger et al. fanden 1993 heraus, dass Aufzweigungen des N. ophthalmicus, dem 1. Hauptast des N. trigeminus, bei Nagern sowohl entlang des N. olfactorius als auch im Bulbus olfactorius zu finden sind (Finger & Bottger 1993).

Des Weiteren sind im Nasenepithel trigeminale sensorische Nervenendigungen zu finden, deren Äste direkt zu den bulbi olfactorii ziehen (Schaefer et al. 2002).

Bei einer Beeinträchtigung des N. olfactorius und damit verbunden dem Riechvermögen, kann eine Beeinträchtigung des trigeminalen Systems nicht ausgeschlossen werden.

Normosmie ist eine Voraussetzung für die Studie, um eine Verfälschung der Untersuchungen zu vermeiden. Es wurde daher bei den Patienten ein Test des Riechsinnens durchgeführt.

Der Riechtest basiert auf dem Riechtestverfahren, welches 1995 von Kobal und Hummel entwickelt worden ist (Kobal et al. 1996).



Bild 13: Screening 12 Test (aus: http://www.burghart-mt.de/index.php?p1=produkte&p2=sticks&p3=screening_12, gesehen am 07.05.2010)

Im klinischen Alltag bewährt hat sich der Sniffin` Sticks-Test. Er stellt eine einfach zu handhabende, günstige und sichere Möglichkeit dar, Riechstörungen zu detektieren (Wolfensberger & Schnieper 1999; Daum et al. 2000). Mit diesem Test ist es möglich, die Riechschwelle des Probanden, die Unterscheidungsfähigkeit und die Identifikationsfähigkeit für verschiedene Düfte zu bestimmen. Der Sniffin` Sticks-Riechtest enthält Stifte, die mit Duftstoffen (natürliche und künstliche Aromen) befüllt sind. Alle verwendeten Stoffe und deren Konzentrationen sind gesundheitlich unbedenklich. Der sogenannte „erweiterte Test“ wird klinisch sowohl im Bereich der HNO-Heilkunde, zum Beispiel zur Erstellung von Gutachten, als auch im Bereich der Psychiatrie, Inneren Medizin und der Neurologie angewandt.

Zur einfachen Feststellung einer Normosmie wurde hier auf den „Screening 12 Test“ zurückgegriffen und auf Diskriminationstest und Riechschwellenbestimmung verzichtet. Dieser „Screening 12 Test“ besteht aus 12 Riechstiften (Firma Burghart Messtechnik GmbH, Tinsdaler Weg 175, Wedel / Deutschland), deren Spitzen mit alltäglichen Gerüchen getränkt sind. Zur Präsentation wird die Verschlusskappe von dem Prüfer abgezogen und dem Patienten ca. 3 Sekunden abwechselnd vor beide Nasenlöcher gehalten. Der Patient

Die Biopsien wurden in zuvor beschriftete und mit RNA $later$ (Firma QIAGEN, Strasse 1, 40724 Hilden / Deutschland) gefüllten, RNase-freie Tubes (2ml bzw. 1,5 ml) gekühlt (bei 4 °C) max. 48 Stunden aufbewahrt, bevor sie anschließend weiter verarbeitet wurden.

Da RNA einer Biopsie sehr instabil ist, ist eine alsbaldige Stabilisierung und Konservierung der RNA Grundvoraussetzung einer genauen Analyse. Eine Geninduktion bzw. Downregulierung von Genen des entnommenen Materials muss vermieden werden. Das RNA $later$ RNA Stabilisierungsreagens durchdringt schnell das Gewebe, stabilisiert und schützt die in der Probe enthaltene RNA. Der schnelle Schutz garantiert, dass nachfolgende Analysen das Expressionsprofil des intakten Gewebes genau wiedergeben. Proben können ohne Risiko eines RNA-Abbaus bei -20 bis -80 °C gelagert werden (QIAGEN 2010).

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 RNA-Isolation

Das Prinzip der RNA-Isolation beruht auf zwei grundsätzlichen Schritten. Als Erstes werden die RNAsen inaktiviert und anschließend wird die Gesamt-RNA isoliert. Man erhält also ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger-RNA (mRNA) und anderen RNA-Arten, (snRNA und scRNA). Der Anteil der mRNA beträgt dabei lediglich 2-5% (Mühlhardt 2006).

Zur Aufarbeitung des Gewebes und damit zur RNA-Isolation wurde das kommerzielle Kit „RNeasy Lipid Tissue Mini Kit“ (QIAGEN) verwendet, welches auf der „single-step-Methode“ basiert (Chomczynski & Sacchi 1987). Mittels einer Guanidinisothiocyanatlösung werden die geordneten Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und damit Proteine und Enzyme, z.B. RNAsen, denaturiert und inaktiviert. Zugegebenes Phenol entfernt die Proteine und löst gleichzeitig über die Absenkung des pH-Wertes kleinere DNA-Fragmente. Größere DNA-Fragmente werden nach Zentrifugation und anschließendem Fällen des wässrigen Überstandes entfernt. Dabei ist die Methode sehr stabil und liefert qualitativ hochwertige RNA (Chomczynski & Sacchi 1987).

Das Gewebe wurde aus einem mit RNA $later$ gefülltem Tube einzeln entnommen, mit 300 μ l Qiazol-Lyse-Reagenz versetzt und anschließend mit einem Potter homogenisiert. Nach der Zugabe weiterer 700 μ l Lyse-Reagens wurde die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur zur Denaturierung belassen. Anschließend wurden 200 μ l Trichlormethan hinzugegeben, das Gemisch gut gerüttelt und erneut 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 15 Minuten bei 4°C und 10800 rpm zentrifugiert. Die wässrige Schicht wurde nach der Zentrifugation in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt, mit 600 μ l 70%igen Ethanol versetzt. 700 μ l dieser Mischung wurde auf die RNeasy Spin®-Säule aufgebracht und mit 8000 rpm zentrifugiert, wobei die RNA und DNA in der Membran der

Säule verblieb. Die Ethanol-Lysispuffer-Fraktion wurde verworfen. Die RNeasy Spin®-Säule wurde mit Entsalzungspuffer gewaschen, damit die anschließend hinzugegebene DNase (QIAGEN) effektiver wirken kann. Der nun folgende DNase-Verdau diente der Entfernung letzter DNA-Reste, die sich bei der Real-Time-PCR störend ausgewirkt hätten. Dazu wurden 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase-1-Stock-Lösung (1000 U/ml) gemischt und auf die Säule aufgetragen. Nach 15 Minuten Reaktionszeit wurde die DNase durch die Zugabe von RW1-Puffer inaktiviert. Es folgten nun zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl RPE-Puffer. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup gestellt, mit 25 µl N RNase-freiem Wasser beladen und 60s bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgte zweimal. Anschließend wurde die gereinigte RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.3.2 Real-Time quantitative PCR

5.3.2.1 Funktionsprinzip

Die Real-Time-quantitative-PCR (kurz *RTq-PCR* oder *qRT-PCR*, auch *Real Time Detection PCR*, kurz *RTD-PCR*) oder quantitative Echtzeit-PCR, ist eine auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhende Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren und ermöglicht zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA.

Im ersten Schritt wird zunächst die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche PCR. Die Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, die während des PCR-Zyklus erfasst werden. Mit der Menge der PCR-Produkte nimmt die Fluoreszenz proportional zu. Anhand der in einem PCR-Lauf erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgt die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR, denn nur in dieser Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, um eine korrekte Quantifizierung zu ermöglichen.

Hier liegt der Unterschied zu klassischen semiquantitativen PCR-Methoden (qPCR), die eine semiquantitative Auswertung erst nach Ablauf einer PCR vornehmen (Holzapfel & Wickert 2007).

Hybridisierungssonden, TaqMan-Sonden oder molecular Beacons sind nur einige Möglichkeiten der Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten. Die einfachste Möglichkeit, PCR-Produkte zu quantifizieren, ist jedoch die Verwendung von DNA-Farbstoffen. Das hier für die Real-Time-quantitative-PCR verwendete SYBRGreen™ 1 ist ein unspezifisch interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der unter Standardbedingungen zweifach positiv geladen vorliegt und somit leicht mit der negativ geladenen DNA in Wechselwirkung tritt. Die Wechselwirkung mit einzelsträngiger DNA kann dabei vernachlässigt werden. Mit kurzwelligem Licht (ca. 488 nm) angeregt, wird die Energie in Form von längerwelligem Licht (ca. 520 nm) wieder emittiert. Durch die einhergehende veränderte energetische Situation

des Moleküles kommt es zu einer Verschiebung der Absorptions- und Emmissionsbanden im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff (Zipper et al. 2004). Die Intensität der Fluoreszenz steigt linear an, je mehr PCR-Produkte gebildet und je mehr Farbstoffmoleküle gebunden werden (Wittwer et al. 1997; Monis & Giglio 2006). Der Grad der Polymerisation ist somit dem Anstieg des Fluoreszenzsignals proportional.

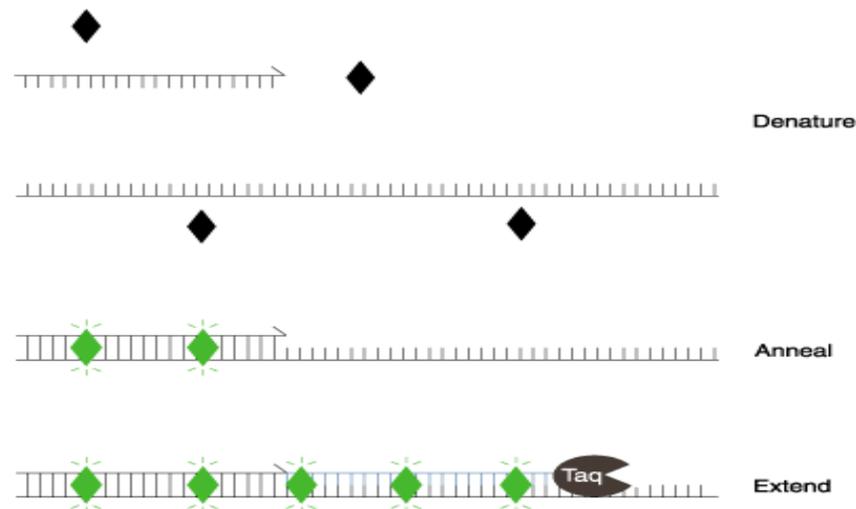


Bild 15: Nachweismethode der real-time quantitative PCR (aus: <http://diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm>, gesehen am 10.05.2010)

5.3.2.2 Produktspezifität

Eine Schwierigkeit dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen der Bildung eines spezifischen oder unspezifischen PCR-Produktes nicht unterschieden werden kann. Alle PCR-Produkte sind jedoch für sich genommen charakteristisch und unterscheiden sich durch die Anzahl der Basenpaare (bp), der Sequenzabfolge und der Struktur. Diese Unterschiede beeinflussen das Schmelzverhalten des Doppelstranges. Damit ist auch die Temperatur, bei der die beiden komplementären DNA-Sequenzen optimal hybridisieren, charakteristisch für die jeweiligen PCR-Produkte (Bustin & Mueller 2005). Wird diese optimale Temperatur überschritten, denaturieren die beiden Stränge. Kurze Fragmente wie Primerdimere haben eine niedrigere Schmelztemperatur (T_m) als längere Fragmente. Um den Nachteil der geringen Spezifität auszugleichen und die Spezifität der Produkte zu determinieren, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Woo et al. 1999). Durch Erhitzung denaturieren die PCR-Produkte, SYBRGreenTM wird freigesetzt und es entsteht ein Hintergrundfluoreszenzsignal. Nach einem schnellen Abkühlen steigt die Temperatur wieder an. Während jedes Temperaturschrittes wird die Fluoreszenz gemessen. Die komplementären DNA-Stränge lagern sich zusammen, der Farbstoff interkaliert und das

Fluoreszenzsignal steigt an, bis die spezifische Schmelztemperatur des Produktes erreicht ist. Anschließend zerfallen die Produkte nun aufgrund der steigenden Temperatur und SYBRGreen™ wird ebenfalls wieder freigesetzt. Für jedes Produkt erhält man so eine spezifische Schmelzkurve. Anhand der Höhe des Peaks der Schmelzkurve kann man annähernd Aussagen über die Menge des gebildeten Fragmentes tätigen, d. h. das Integral unter der Kurve gibt die Menge an.

5.3.2.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung kann man unterschiedliche Rechenmodelle benutzen, meist wird ein Referenzgen mitgemessen, um einen relativen Menge-Vergleich durchzuführen.

Wenn in einer Reaktion zwei verschiedene Sequenzen amplifiziert werden, kann man also davon ausgehen, dass das Mengenverhältnis der beiden zueinander während der gesamten Reaktion konstant bleibt. Ist nun die Ausgangsmenge des Standards bekannt, so kann aus dem Messwert der Relation beider Partner die Ausgangsmenge des Zielgens berechnet werden (Nedelman et al. 1992).

Von nichtkompetitiver quantitativer PCR spricht man, wenn Standard- und Zielgen nicht homolog sind und somit verschiedene Primerpaare benötigt werden. Häufig wird hierbei ein sogenanntes housekeeping gene verwendet. Dies sind Gene, die nicht reguliert, konstitutiv und unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und typischerweise mit dem Grundstoffwechsel von Zellen zusammenhängen. Das hier verwendete Standardgen ist das HMBS-Gen (Hydroxymethylbilan-Synthase, auch: Porphobilinogen-Deaminase [PBG-D] eine Transferase, die in allen Lebewesen in zwei Isoformen (eine nur in Erythrozyten, die andere in allen anderen Gewebearten) vorkommt und einen Teilschritt der Porphyrin-Biosynthese katalysiert (Deybach & Puy 1995).

Durch die Normalisierung können somit Matrix- und Gewebeeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler innerhalb eines Laufes vernachlässigt werden, da sie gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen (Pfaffl et al. 2004).

Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf der Kinetik der PCR (Higuchi et al. 1992), es werden keine absoluten Mengen gemessen. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Templatemenge noch gering. Es findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der Fragmente statt. Während die Amplifikation weiter voranschreitet, sammeln sich sowohl das Produkt als auch Pyrophosphat und Monophosphatnucleotide an, so dass es zu einer Hemmung durch diese kommt. Produktfragmente hybridisieren häufiger miteinander, die Substrate werden verbraucht und die Polymerasen und Nucleotide werden durch die Hitze mehr und mehr zerstört. Der Prozess verlangsamt sich also zu einem linearen Wachstum,

Gen	Sequenz (vorwärts; rückwärts)	Accession number	Produktlänge	Tm (°C)
<i>TRPM8</i> (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8)	5' -TCA AGC AAA TTT TAA GAA- 3' 3' -CAA AGG CGT CGG TAG GAA AT- 5'	NM_024080.4	176 bp	81,0
<i>CALCB1</i> (calcitonin-related polypeptide beta 1)	5' -ATG GGT TTC CGG AAG TTC TC- 3' 3' -GTC TCC TGC TCC TGC TTC AG- 5'	NM_000728.3	212 bp	87,0
<i>HMBS</i> (Hydroxymethyl-bilane synthase)	5' -TCG GGG AAA CCT CAA CAC C- 3' 3' -CCT GGC CCA CAG CAT ACA T- 5'	NM_000190.3	154 bp	86,0
<i>CALCB2</i> (calcitonin-related polypeptide beta 2)	5' -CTG CCA CCT GTG TGA CTC AT- 3' 3' -GGG CAT TCT CAC CAA GTT CT- 5'	NM_000728	222 bp	84,8

Tabelle 2: Primersequenzen der Firma eurofins MWG / Operon

Gen	Accession number	Produktlänge	TM (°C)
<i>TRPA1</i> (transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)	NM_007332.2	136 bp	83
<i>TRPV1</i> (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1)	NM_018727.5	92 bp	80,4
<i>ACCN3</i> (amiloride-sensitive cation channel 3)	NM_004769	112 bp	80

Tabelle 3: Kommerzielle Primer der Firma QIAGEN

5.3.2.5 Real-Time-quantitative-PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen

Die qRT-PCR erfolgte mit dem Brilliant[®] II SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix Kit der Firma QIAGEN in einem LightCycler[®]-Gerät (Stratagene, La Jolla, Canada). Die Amplifizierung erfolgte in 25 µl Ansätzen.

Komponente	Volumen
SYBR Green PCR MasterMix	12,5 µl
Rnase-freies Wasser	8,5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
RNA	1 µl
RT-Mix	1 µl

Tabelle 4: Pipettierschema qRT-PCR-Ansatz

Zu Beginn der Testreihe musste vorher jedoch die Menge an RNA bestimmt werden, die für die anschließenden Versuchsreihen eingesetzt werden sollte. Dazu wurde der PCR-Ansatz gemäß Tabelle 4 mit den Primern des Housekeeping-Gens HMBS zusammenpipettiert. Lag bei der anschließenden Auswertung der C_T -Wert für HMBS zwischen 20 und 26, wurde für die weiteren Läufe 1 µl der RNA verwendet. Lag der C_T -Wert über 26, so wurden 2 µl der RNA und entsprechend weniger RNase-freies Wasser für die Ansätze verwendet.

Die Reaktionsbedingungen im LightCycler[®] sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	50°C	25 min
Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min
Denaturierung	94°C	15 s
Annealing	55°C	20 s
Elongation und Einzelsignalmessung	72°C	30 s
Schmelzkurvenanalyse	95 °C	1 min
Kühlung	55°C	30 s

} 45 Zyklen

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen im LightCycler[®]

Die Richtigkeit der verwendeten Primer und damit im weiteren Sinne die der PCR-Produkte wurde des Weiteren mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5.3.3 Qualitative Primertests mittels RT-PCR

Um die Richtigkeit der Primer-Produkte in der Real-Time-PCR zu überprüfen, wurden die Primer mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und anschließender Gelelektrophorese ausgewertet.

5.3.3.1 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Da ultraviolettes Licht von den konjugierten Doppelbindungen in den aromatischen Ringen der Nukleinsäure-Basen absorbiert wird, kann mittels UV – Spektroskopie die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt werden. DNA und RNA zeigen bei 260 nm ein spezifisches Absorptionsmaximum. Verunreinigungen können aber bei ähnlichen Wellenlängen ebenfalls absorbieren. Proteine absorbieren allerdings, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurenreste bei einem Maximum von 280 nm.

Deshalb kann durch eine Referenzmessung und anschließender Verhältnisbildung der Absorptionswerte die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Die Extinktion von 1 OD bei 260 nm entspricht für RNA einer Konzentration von 40 µg/ml, für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Dieses gilt für Nucleinsäuren bei pH 7,0; die Messung wurden daher in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration (Tris-Puffer) durchgeführt.

Der Quotient aus 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung (FIZ Chemie 2010).

RNA aus dem Ganglion trigeminale sowie die isolierte RNA aus den Proben wurden ohne Verdünnung gemessen, um Messfehler zu vermeiden. Das Photometer errechnete für die Proben der Nasenschleimhaut Reinheitswerte zwischen 1,97 und 2,00. Es wurde eine RNA-Konzentration von 196 ng/µl und 291 ng/µl errechnet.

Im Ganglion betrug der Reinheitswert 2,04 und die Konzentration 258 ng/µl.

5.3.3.2 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis-Kit.

Bei der reversen Transkription wird RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dieses Enzym benötigt wie die DNA-Polymerase Primer für den Beginn der DNA-Synthese. Ein freies 3'-OH-Ende an einem gepaarten Nucleotid dient als Ausgangspunkt für die Reverse Transkriptase. Dies kann alternativ geschehen, in dem ein Gemisch von Random-Hexameren an verschiedenen Stellen innerhalb der mRNA bindet. Für die reverse Transkription wurden daher Random Hexamere und oligo-dT verwendet.

Der Reaktionsansatz erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers Fermentas (Opelstraße 9, St. Leon-Rot / Deutschland) und ist in Tabelle 6 aufgeführt. Die Amplifizierung erfolgte in 20 µl Ansätzen.

Komponente	Volumen Ganglion	Volumen Nasenschleimhaut
RNA	3 µl	9 µl
Random-Hexamer Primer	1 µl	1 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl	4 µl
Ribonuklease-Inhibitor	1 µl	1 µl
dNTP-Mix	2 µl	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl	1 µl
RNAse-freies Wasser	8 µl	2 µl

Tabelle 6: Reaktionsansatz Reverse Transkription

Die Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkription sind der Tabelle 7 dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Annealing	25 °C	10 min
Elongation	42 °C	60 min
Denaturierung	70 °C	10 min

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen Reverse Transkription

5.3.3.3 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum qualitativen Nachweis der gesuchten Gene wurde die Polymerasekettenreaktion benutzt. Für die RT-PCR-Ansätze wurde der PCR-MasterMix (2,5x) der Firma Eppendorf (Barkhausenweg 1, Hamburg / Deutschland) verwendet. Dieser enthält neben der Taq DNA – Polymerase die benötigten dNTP's sowie Mg²⁺-Ionen in gepufferter Lösung.

Zur Überprüfung wurde neben den bereits oben aufgeführten Primern außerdem ein bekannter und bereits getesteter Primer zur Kontrolle verwendet:

Gen	Sequenz (vorwärts; rückwärts)	Produktlänge
<i>TRPM8</i> (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8)	5' -TCAAGCAAATTTTAAGAAACGAGAA- 3' 3' -CAAAGGCGTCGGTAGGAAAT- 5'	176 bp

Tabelle 8: Gensequenz Kontrollprimer

Tabelle 9 zeigt das Pipettierschema des RT-PCR-Ansatzes (25 µl) für einen Primer.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	2 µl
2,5x MasterMix	10 µl
5 x Ladepuffer	5 µl
Primer forward (10 mM)	3 µl
Primer reward (10 mM)	3 µl
Template (cDNA)	2 µl

Tabelle 9: Pipettierschema des RT-PCR-Ansatzes

Die Proben wurden in einen Thermocycler TC 512 (Techne, Bibby Scientific Limited, Beacon Road, Stone, Staffordshire ST15 0SA, UK) amplifiziert. Das anschließende Temperaturprogramm ist in Tabelle 10 dargestellt (*hot start*).

Schritt	Temperatur	Dauer
Initialaktivierung	94 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Final Elongation	72 °C	7 min
Kühlung	4 °C	

} 35 Zyklen

Tabelle 10: Temperaturprogramm Thermocycler TC 512

5.3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die entstandenen PCR-Produkte wurden über 1,5 %iges Agarosegel (Firma Biozym LE, Steinbringsweg 27, Hessisch-Oldendorf / Deutschland) in Borax-Laufpuffer bei Raumtemperatur für 30 min bei 200 V in einer Gelkammer (Firma Bio Rad, Heidemannstraße 164, München / Deutschland) aufgetrennt. Dem Agarosegel wurde 5 µl 1%iges Ethidiumbromid (Firma AppliChem, Ottoweg 4, Darmstadt / Deutschland) zugegeben. Um die jeweilige Größe der PCR-Produkte abschätzen zu können, lief ein DNA-Marker (0,5 µg/µl, 100bp ladder, Fermentas) mit. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transilluminator fotografiert und mit der Software argus X1, Version 2 (Firma biostep GmbH, Meinersdorfer Straße 47a, Jahnsdorf / Deutschland) ausgewertet und dokumentiert.

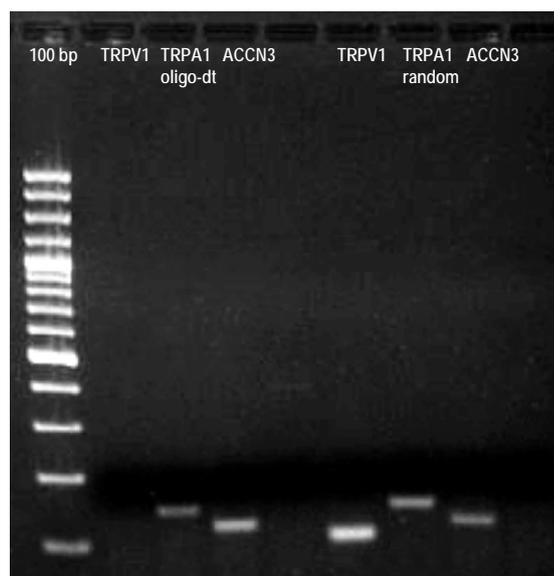


Bild 19a: Überprüfung der PCR-Fragmente auf korrekte bp-Länge mittels Gelelektrophorese



Bild 19b: Überprüfung der PCR-Fragmente auf korrekte bp-Länge mittels Gelelektrophorese

Es ist bei den zu verwendeten Primern jeweils nur eine Bande bei den entsprechenden Produktlängen ersichtlich. Damit kann von einer Primerspezifität sowohl bei den zu untersuchenden Proben als auch im Referenzgewebe ausgegangen und die in der Real-Time-quantitative-PCR verwendeten Primer bestätigt werden.

5.4 Statistische Methodik

Mit der Software SPSS (Statistical Packages for Social Sciences, Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) wurden die Daten der Real-Time-PCR statistisch aufgearbeitet und ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde durch das Programm ermittelt und erscheint in der statistischen Auswertung im Tabellenverzeichnis zu den jeweiligen Wertepaaren und der dazugehörigen Teststatistik.

Mit dieser Dissertation wird die Hypothese geprüft, dass trigeminale Chemorezeptoren der Nasenschleimhaut unterschiedliche Verteilungen zeigen. Aufgrund der topografischen Charakteristik soll somit die Hypothese unterstützt werden, dass auch der N. trigeminus differenzierte Aufgaben des Riechens erfüllt.

Es wurden in fünf unterschiedlichen Regionen der Nasenschleimhaut der Nasenhaupthöhle Biopsien entnommen und der RNA-Gehalt für verschiedene trigeminale Rezeptorproteine untersucht. Der gemessene RNA-Gehalt kann als statistisches Korrelat der Proteinexpression in den untersuchten Regionen dargestellt werden (Katsuoka et al. 1997; Yamagishi, S et al. 1998). Variationen ergeben sich daher zwischen dem RNA-Gehalt verschiedener Probanden am selben Ort der Nase, für einen RNA-Gehalt an den zu untersuchenden Orten eines Probanden und zwischen den verschiedenen RNA-Gehalten an

den fünf verschiedenen Biopsieentnahmestellen. Dementsprechend ergibt sich eine Vielzahl von statistisch auszuwertenden Kombinationsmöglichkeiten.

Da die „abhängige Variable“, der RNA-Gehalt an einem gegebenen Ort der Nase in metrischer Form als relativer Wert, bezogen auf das Housekeeping-Gen vorliegt, wurde die Suche nach signifikanten Unterschieden mit Hilfe der Varianzanalyse durchgeführt.

Varianzanalysen sind datenanalytische und strukturprüfende statistische Verfahren mit unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten (Wikipedia 2010). Es können Varianzen und Prüfgrößen berechnet werden, um so Zusammenhänge zwischen den Daten zu ermitteln, z.B. ob Mittelwertdifferenzen und deren Standardabweichungen, wie sie zwischen den unterschiedlichen RNA-Gehalten an unterschiedlichen Stellen der Nase bestehen, auch statistisch signifikant sind.

Allerdings muss bei der Interpretation der Gesamtheit der statistisch ermittelten Daten beachtet werden, dass eine Prüfung von Signifikanzen der Varianzunterschiede im Mittelpunkt der Auswertung steht.

Voraussetzung für die Varianzanalyse bei kleineren Stichprobenumfängen von $n < 30$, wie in dieser Arbeit, ist eine angenommene Normalverteilung der Stichprobenvariablen (Bortz & Schuster 2005).

Mit Hilfe eines gepaarten T-Testes wurde die Expressionstendenz der Rezeptoren in der Nasenschleimhaut der Probanden verglichen, es wurde also besonderes Augenmerk auf die jeweilige intraindividuelle Verteilung der einzelnen Rezeptorexpression gelegt.

6 Ergebnisse

Alle hier angegebenen Werte sind als Datengrundlage den jeweiligen Tabellen im Tabellenverzeichnis zu entnehmen.

6.1 Auswertung der Rezeptoren in einer Region

6.1.1 Region 1: Septum, Keilbeinhöhlevorderwand

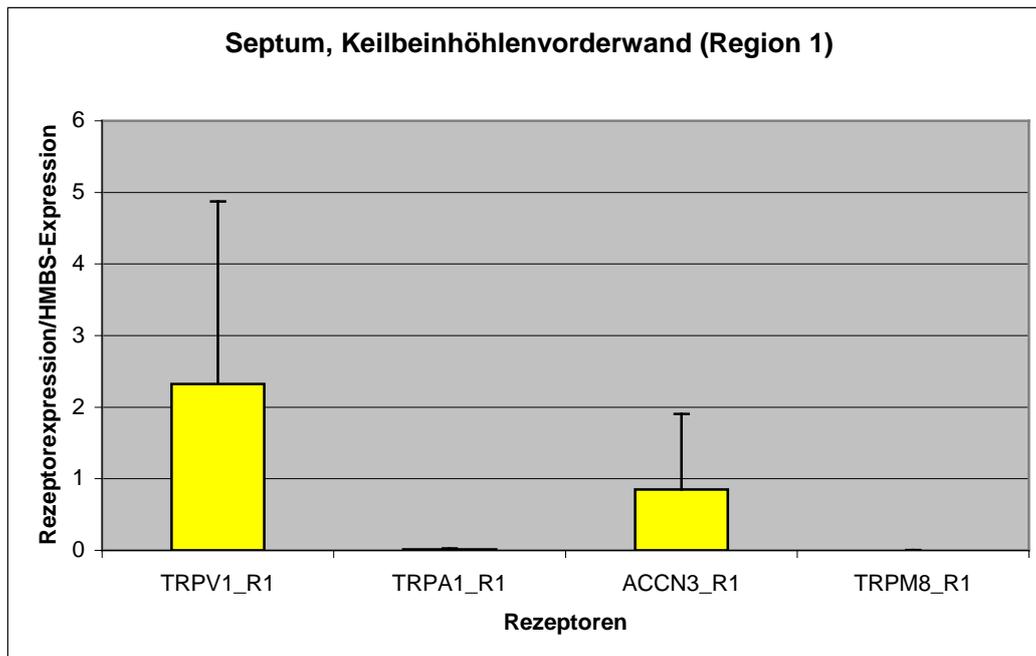


Bild 20: Auswertung der Rezeptoren in Region 1

In der grafischen Darstellung der Rezeptorexpression für die Region 1 ist ersichtlich, dass die Expression von TRPV1 mit einem Mittelwert von 2,32 dominiert.

Die RNA für ACCN3 ist mit einem Mittelwert von 0,85 am zweitstärksten exprimiert. TRPA1 und TRPM8 sind im Verhältnis dazu schwach ausgeprägt (MW TRPA1: 0,01; MW TRPM8: 0,001).

Es wurde versucht, CALCB1 und CALCB2 nachzuweisen, diese sind aber nur bei einem sehr geringen Teil der Probanden über der methodischen Nachweisgrenze zu bestimmen. Damit ist keine Aussage über deren Expression in Region 1 möglich.

Bei allen ermittelten Werten ist jedoch die hohe Standardabweichung zu beachten. Die höchste Standardabweichung mit dem 1,84-fachen des Mittelwertes ergibt sich bei TRPM8. Demzufolge sind große interindividuelle Unterschiede in der Expression der einzelnen

Rezeptoren in der Region 1 wahrscheinlich. Der Stichprobenumfang schwankte zwischen fünf und zwölf auswertbaren Probandenbiopsien aus Region 1.

6.1.2 Region 2: anteriores Septum

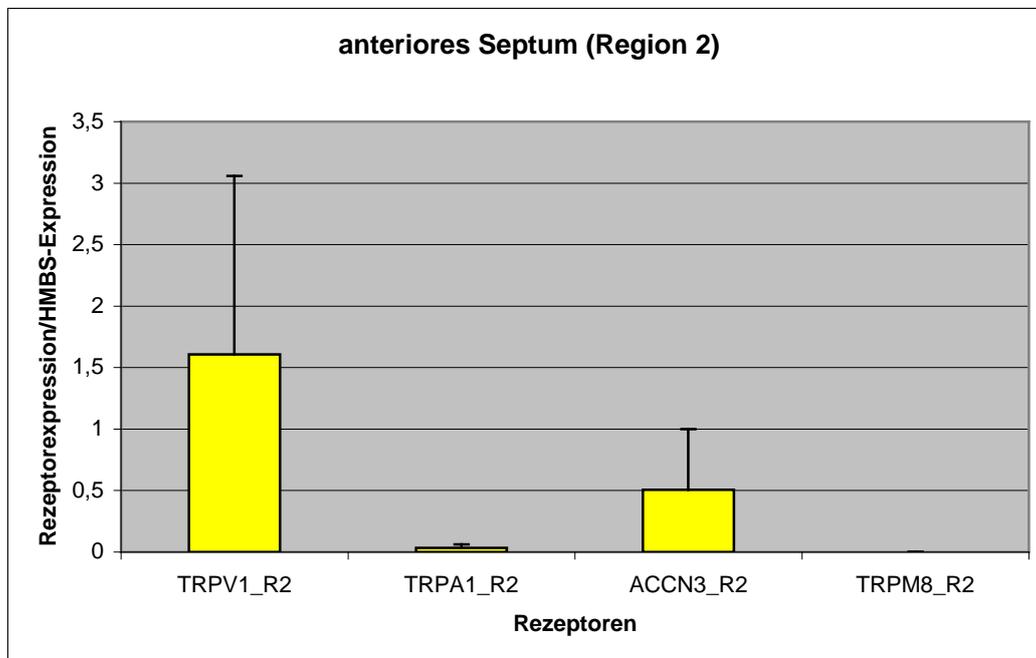


Bild 21: Auswertung der Rezeptoren in Region 2

Aus den Daten der Region 2 sind ähnliche Schlussfolgerungen wie bei Region 1 zu ziehen. Auch hier ist TRPV1 mit einem Mittelwert von 1,61 am stärksten exprimiert. Mit einem Mittelwert von 0,51 ist die RNA des ACCN3-Rezeptors am zweitstärksten exprimiert. Auch in Region 2 wurde versucht, CALCB1 und CALCB2 nachzuweisen, sie sind aber auch hier nur bei einem sehr geringen Teil der Probanden über der methodischen Nachweisgrenze zu bestimmen gewesen. Damit ist keine Aussage über deren Expression in Region 2 möglich. Aussagen zu TRPA1 und TRPM8 sind aufgrund des geringen RNA-Gehaltes beider Rezeptoren in Region zwei (MW TRPA1: 0,033 und MW TRPM8: 0,00075) nicht möglich. Eine Standardabweichung des 0,98-fachen des Mittelwertes ist bei ACCN3 beispielhaft für die große Streuung der Messwerte. Der Stichprobenumfang bewegte sich zwischen fünf und zwölf auswertbaren Probandenbiopsien.

6.1.3 Region 3: posteriores Septum

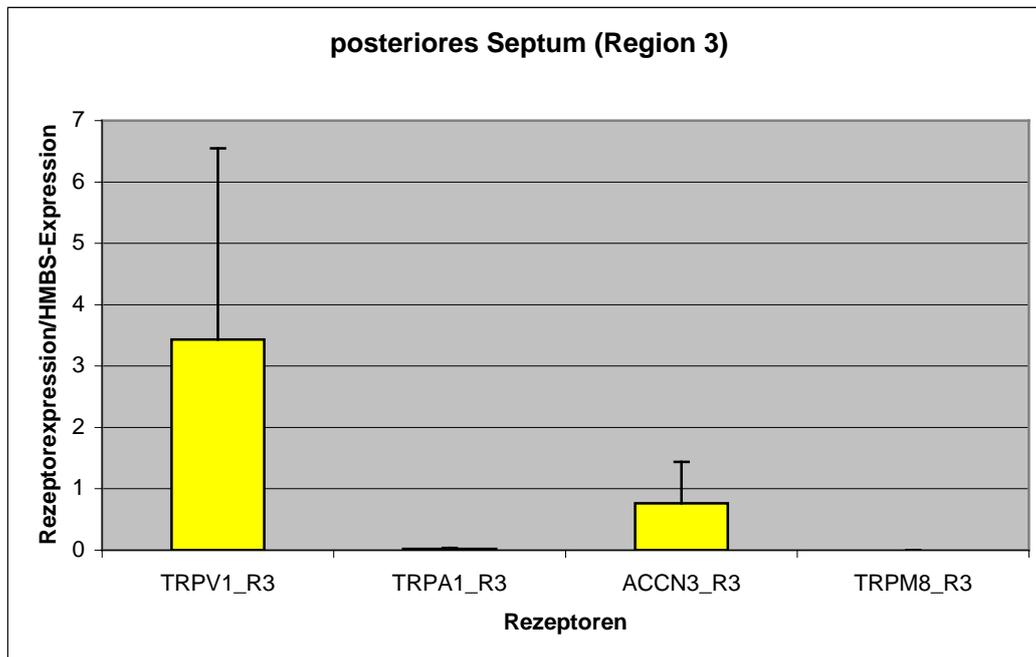


Bild 22: Auswertung der Rezeptoren in Region 3

Im posterioren Septum zeigt der Mittelwert von 3,43 die stärkste Expression für TRPV1 an. Die ACCN3-Rezeptor-RNA ist mit einem Mittelwert von 0,76 wieder die am zweitstärksten exprimierte Rezeptor-RNA in der Region 3. TRPA1 und TRPM8 sind mit Mittelwerten von 0,022 und 0,0008 auch hier deutlich geringer exprimiert als TRPV1 und ACCN3. Aussagen über die Expression von CALCB1 und CALCB2 sind in Region 3 ebenso wie in den Regionen 1 und 2 nicht möglich. Eine Standardabweichung des 0,9-fachen des Mittelwertes weist wiederholt auf ein breites Messwertspektrum hin. Der Stichprobenumfang bewegte sich zwischen fünf auswertbaren Probandenbiopsien für TRPM8 und zwölf auswertbaren Probandenbiopsien für TRPV1.

6.1.4 Region 4: laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

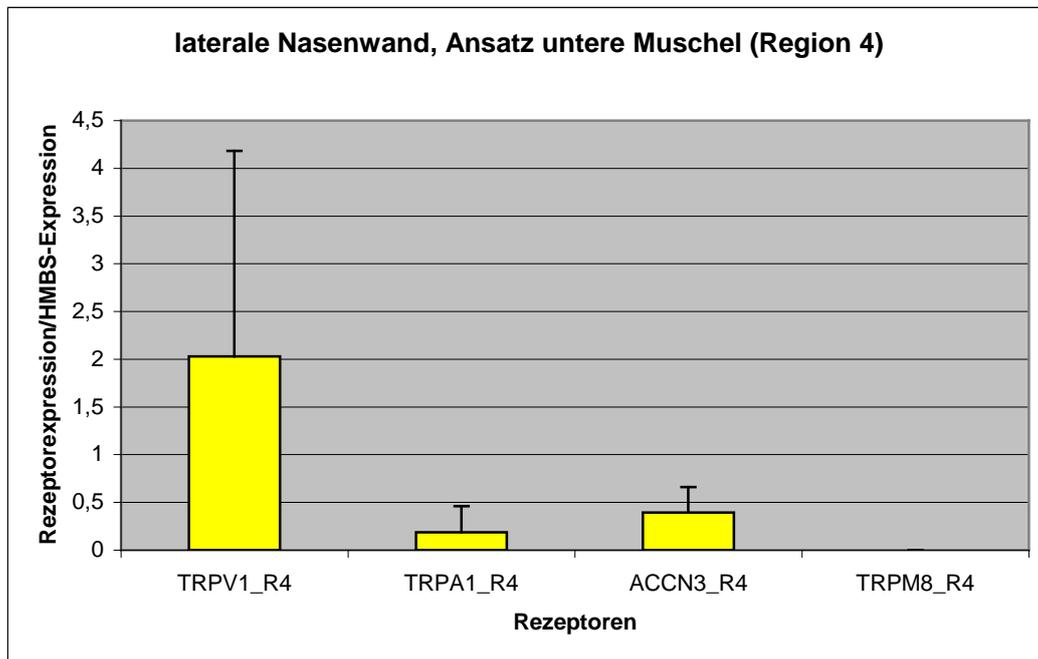


Bild 23: Auswertung der Rezeptoren in Region 4

TRPV1 und ACCN3 sind mit Mittelwerten von 2,03 und 0,39 die beiden am stärksten exprimierten Rezeptoren in Region 4. Mit einem Mittelwert von 0,19 ist TRPA1 am drittstärksten exprimiert. TRPM8 ist mit einem Messwert von 0,0004 auch in der vierten untersuchten Region am geringsten exprimiert. Aufgrund zu geringer Messwerte können wiederholt keine Aussagen zu CALCB1 und CALCB2 getroffen werden. Die Standardabweichung ist maximal das 1,5-fache des Mittelwertes bei TRPA1. Der Stichprobenumfang zwischen fünf und zwölf Biopsien schwankt bei den zu untersuchenden Rezeptoren.

6.1.5 Region 5: laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

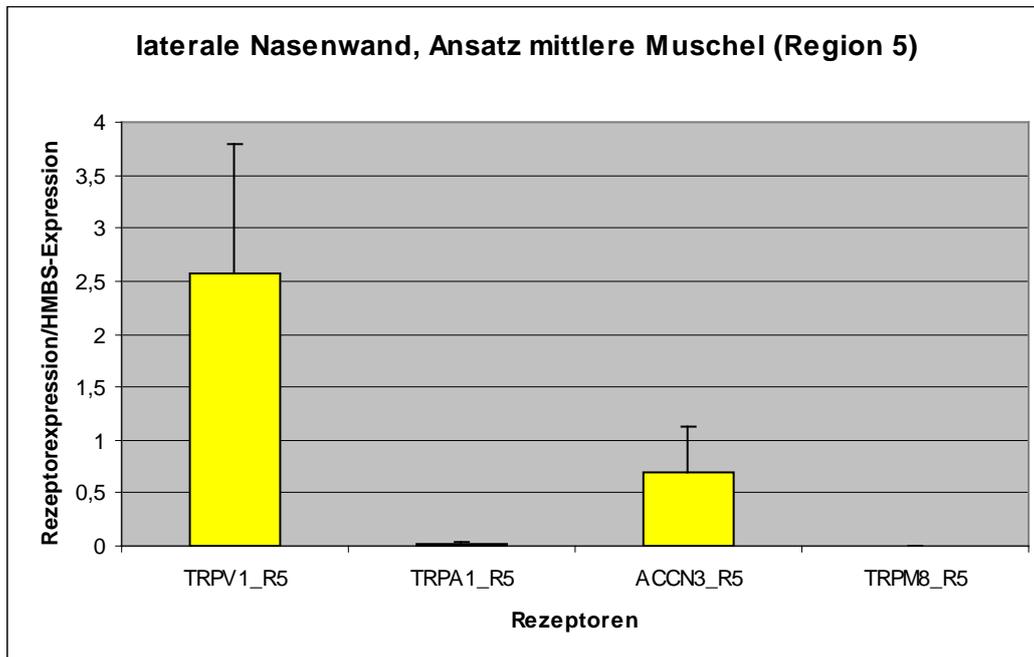


Bild 24: Auswertung der Rezeptoren in Region 5

Auch in Region 5 ergibt sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in den vorangegangenen Regionen. Der Mittelwert für den am stärksten exprimierten Rezeptor TRPV1 beträgt 2,59. ACCN3 ist mit 0,69 der am zweitstärksten exprimierte Rezeptor in der lateralen Nasenwand. TRPA1 und TRPM8 sind wiederholt sehr gering exprimiert, auch der Stichprobenumfang ist hier mit fünf bzw. sieben verwertbaren Probandenbiopsien geringer als bei TRPV1 mit zwölf verwertbaren Biopsien. CALCB1 und CALCB2 sind nicht nachweisbar.

6.2 Vergleich der Expression eines Rezeptors in den untersuchten Regionen

6.2.1 Die Expression von TRPV1 in den fünf Regionen

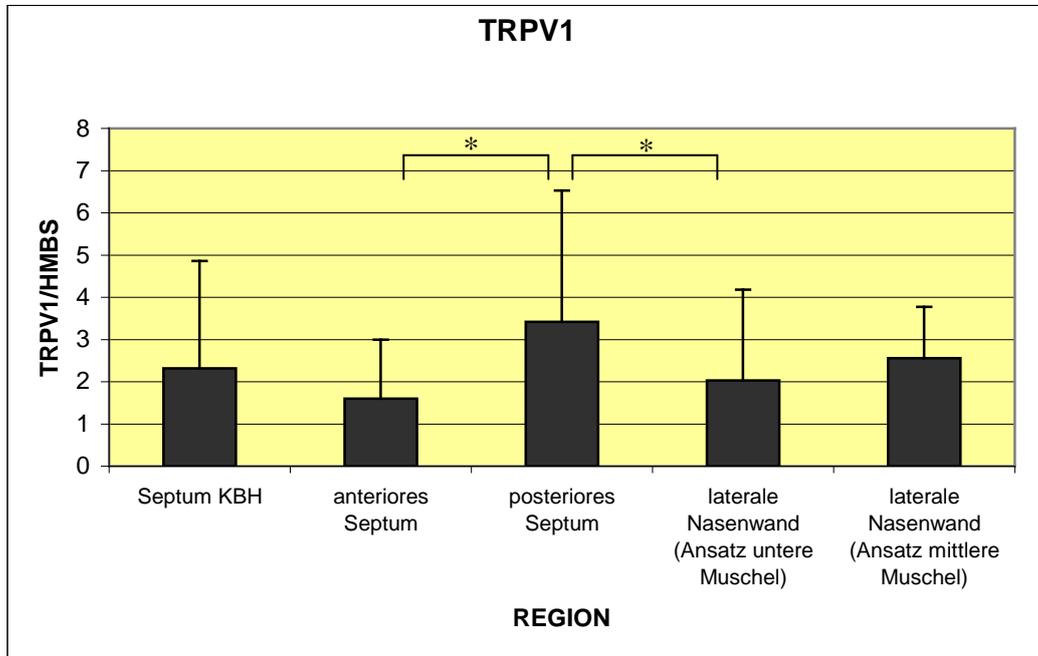


Bild 25: Expression von TRPV1 in den Regionen

Im oben angeführten Diagramm wird TRPV1 und dessen Expression in den fünf Biopsieentnahmestellen verglichen. Die stärkste Expression stellt sich im posterioren Septum mit einem Mittelwert von 3,43 und einer Standardabweichung von 3,12 dar. Die Standardabweichung beträgt das 0,9-fache des Mittelwertes. Dies weist auf eine große Streubreite der gemessenen Werte und damit auf große interindividuelle Unterschiede hin. Besonders deutlich wird die starke Expression im posterioren Septum, wenn man sie mit der Expression von TRPV1 im anterioren Septum, welches die niedrigste Expression aller fünf Regionen zeigt (MW: 1,61; SD: 1,45), darstellt. Der Unterschied der Expression im anterioren und posterioren Septum ist zum 5%-Niveau signifikant ($p = 0,012$). Die Teststatistik beim Vergleich der Region 2 und Region 3 beträgt -2,913, dies bestätigt ebenfalls, dass die Expression von TRPV1 im posterioren Septum signifikant stärker ist als im anterioren Septum. In Anbetracht des Korrelationskoeffizienten von 0,906 ergibt sich die Aussage, dass viele Werte auf der Regressionsgeraden liegen und damit eine Regelmäßigkeit zu vermuten ist. Diese Korrelation wurde bei einer Fallzahl von $n = 13$ ermittelt. Des Weiteren ist ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen posteriorem Septum und der lateralen Nasenwand, Ansatz an der unteren Muschel,

ersichtlich. Bei einer Fallzahl von $n = 12$ ergab sich ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Auch hier ist die Expression von TRPV1 im posterioren Septum stärker als in Region 4. Der Korrelationskoeffizient von 0,84 und die Teststatistik von 2,791 lassen auch hier auf einen signifikanten Unterschied schließen. In Region 4 wurde der TRPV1/HMBS-Quotient im Mittelwert mit 2,03 gemessen. Die Standardabweichung betrug 2,15 und ist damit das 1,06-fache des Mittelwertes. Auch hier ist eine große Streubreite der Messwerte ersichtlich. Besonders auffällig erscheint der Vergleich zwischen lateraler Nasenwand, Ansatz unterer Muschel und lateraler Nasenwand, Ansatz mittlere Muschel (MW: 2,57; SD: 1,22). Hier sind keinerlei signifikante Unterschiede ($p = 0,522$) ersichtlich. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,05 und macht damit einen linearen Zusammenhang unwahrscheinlich. Die Teststatistik mit einem Betrag von 0,659 bestätigt ein eher homogenes Verteilungsmuster der RNA des TRPV1-Rezeptors. Dies wurde an einem Stichprobenumfang von $n = 12$ ermittelt. Dieser Vergleich legt die Vermutung nahe, dass die Expression von TRPV1 in den lateralen Biopsieentnahmestellen (Region 4 und Region 5) ähnlich ist.

Vergleicht man nun Region 1 mit Region 3 und Region 5, so kommt man zu dem Ergebnis, dass sowohl zwischen Region 1 und 3 ($p = 0,368$, $n = 14$) als auch zwischen Region 1 und 5 ($p = 0,449$, $n = 13$) keine signifikanten Unterschiede bestehen. Auch im Vergleich zwischen Region 2 und der lateralen Nasenwand, Ansatz mittlere Muschel kam es zu keinen signifikanten Unterschieden ($p = 0,724$, $n = 12$). Aus einer Fallzahl von $n = 14$ wurde außerdem deutlich, dass zwischen Region 3 und 5 ebenfalls keine Signifikanz herrscht ($p = 0,157$). Dies trifft außerdem auf Region 1 und Region 2 ($p = 0,484$, $n = 13$), Region 1 und 4 ($p = 0,617$, $n = 11$) und auf Region 2 und 4 ($p = 0,302$, $n = 11$) zu, die ebenfalls kein signifikant unterschiedliches RNA-Expressionsmuster zeigen.

6.2.1.1 Schlussfolgerung für TRPV1

Die Ergebnisse für TRPV1 legen die Annahme nahe, dass die Expression des Rezeptors im Septumbereich von vorn nach hinten zunimmt (siehe Bild 27). Im anterioren Septum ist die Expression am geringsten und nimmt dann zu der sich im hinteren Bereich der Nase befindlichen Region (posteriores Septum) signifikant zu.

Betrachtet man nun die laterale Nasenwand, fällt, wie oben schon beschrieben, auf, dass zwischen Region 4 und 5 keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,87$) bestehen. Dies führt zu der Annahme, dass in der lateralen Nasenwand ein von kranial nach kaudal homogenes Bild der Rezeptorexpression vorherrscht.

Wenn man posteriores Septum mit lateraler Nasenwand vergleicht, besteht eine höhere Expression im hinteren Septumbereich. Ansonsten stellte sich das Verteilungsmuster der Rezeptor-RNA zwischen den einzelnen Regionen nicht signifikant unterschiedlich dar.

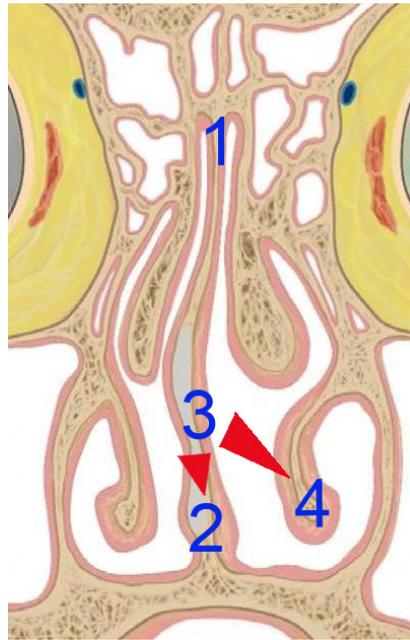


Bild 26: Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPV1 zwischen Septum und lateraler Nasenwand

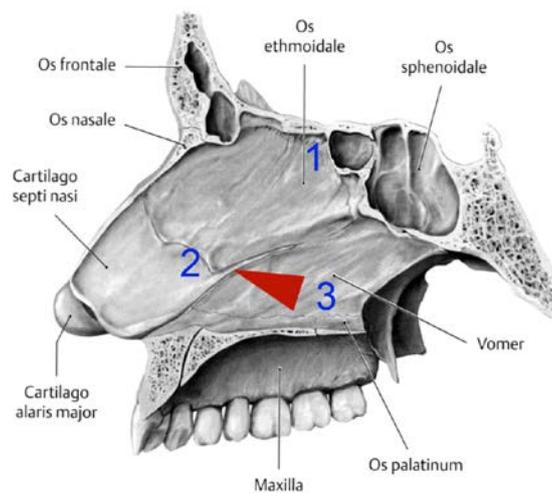


Bild 27: Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPV1 im Septum

Die Pfeile befinden sich zwischen den Regionen signifikanter Expressionsunterschiede. Die breite Seite beschreibt ein höheres Expressionsmuster im Vergleich zur Region, auf die die Pfeilspitze zeigt (siehe Text).

6.2.2 Die Expression von TRPA1 in den fünf Regionen

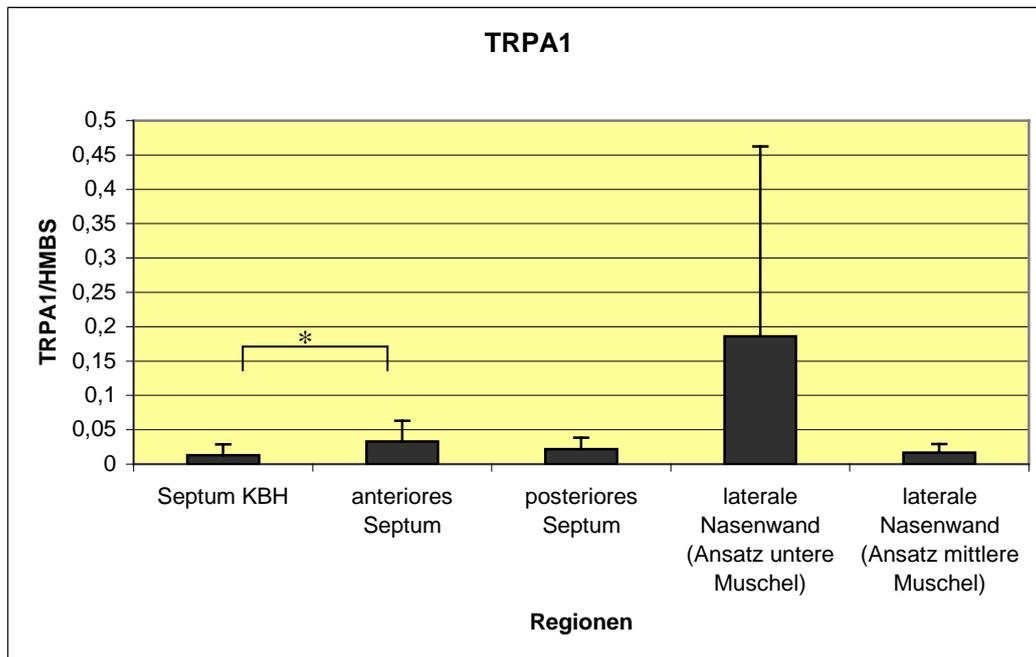


Bild 28: Expression von TRPA1 in den Regionen

In der Abbildung 28 wird die Expression von TRPA1 in den zu untersuchenden Regionen dargestellt. Die stärkste Expression ist mit einem Mittelwert von 0,19 in der lateralen Nasenwand, Ansatz untere Muschel, zu finden. Auffällig hier ist die hohe Standardabweichung von 0,28, welche das 1,5-fache des Mittelwertes beträgt und auf eine große Streubreite der experimentell ermittelten Daten schließen lässt. Damit lässt sich auch erklären, dass trotz der viel stärkeren Expression von TRPA1 in dieser Region keinerlei Signifikanzen mit einer der anderen Regionen zu verzeichnen sind. Im Vergleich mit Region 1 (MW: 0,013; SD: 0,016), welche aus einer Fallzahl von 10 Biopsien besteht, konnte ein $p = 0,129$ ermittelt werden. Vergleicht man nun Region 4 mit Region 2, wird auch hier kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,854$; $n = 8$) erkennbar. Der Mittelwert im anterioren Septum beträgt 0,033 bei einer Standardabweichung von 0,030. Die Rezeptor-RNA-Expression im posterioren Septum weist einen Mittelwert von 0,022 und eine Standardabweichung von 0,017 auf. Im Vergleich mit Region 4 konnte ein $p = 0,191$ ermittelt werden, dafür wurden Biopsien von 10 Probanden verglichen. Im Vergleich von Region 5 (Laterale Nasenwand, Ansatz mittlere Muschel) mit Region 4 konnte bei einem $p = 0,734$ keine Signifikanz nachgewiesen werden ($n = 10$). Der Mittelwert der Rezeptorexpression beträgt hier 0,017, die Standardabweichung 0,013. Trotz der deutlichen Dominanz des

Mittelwertes von TRPA1 in Region 4 im Vergleich zu den Mittelwerten der anderen Regionen, ist keine Signifikanz erkennbar.

In der Region 1, Septum, wurde der niedrigste Mittelwert (0,013) aller fünf Regionen ermittelt. Die Standardabweichung beträgt 0,016 und ist damit das 1,23-fache des Mittelwertes. Vergleicht man nun das Septum, Keilbeinhöhle, mit dem anterioren Septum (MW: 0,033, SD: 0,030), so lässt sich eine Signifikanz darstellen ($p = 0,017$; $n = 9$). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,746, die Teststatistik zwischen Region 1 und 2 beträgt -2,936. Damit wird deutlich, dass im anterioren Septum TRPA1 stärker exprimiert wird als im Septum, Keilbeinhöhle.

Betrachtet man nun das posteriore Septum (MW: 0,022, SD: 0,017) mit der Region 1, werden hier keine statistischen Signifikanzen deutlich ($p = 0,298$; $n = 11$). Im gepaarten T-Test sind zwischen Region 5 (MW: 0,017, SD: 0,013) und Region 1 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennbar ($p = 0,282$, $n = 11$). Beim Vergleich zwischen Region 5 und Region 2 ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,215$, $n = 8$), genau wie im Vergleich zwischen Region 2 und 3 kein Hinweis auf Signifikanz besteht ($p = 0,230$, $n = 10$).

Nun verbleibt noch der Vergleich zwischen Region 3 und 5. Hier ist ebenso keine Signifikanz feststellbar ($p = 0,890$, $n = 10$).

Es ist also anzunehmen, dass die Expression von TRPA1 im posterioren Septum ähnlich der Expression des Rezeptors in der lateralen Nasenwand (Region 4 und 5) ist. Die Fallzahl beträgt jeweils zehn Biopsien.

6.2.2.1 Schlussfolgerung für TRPA1

Wendet man diese Ergebnisse auf die Biopsieentnahmestellen der Nasenschleimhaut an, so ist die Expression von TRPA1 im vorderen Teil des Septums signifikant stärker als in der hinteren, oberen Region (Septum, Keilbeinhöhle). Die beiden hinteren Regionen (Region 1 und 3) für sich genommen, unterscheiden sich allerdings nicht im direkten Vergleich, so dass ein kraniokaudaler Unterschied im hinteren Septumbereich nicht vorhanden ist.

Zwischen lateraler Nasenwand und den hinteren Septumregionen gibt es keine Unterschiede, was auf eine gleichmäßige Verteilung von TRPA1 in der hinteren Nasenregion schließen lässt.

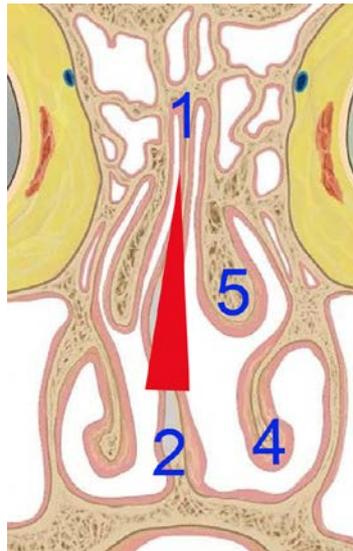


Bild 29: Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPA1 zwischen Septum und lateraler Nasenwand

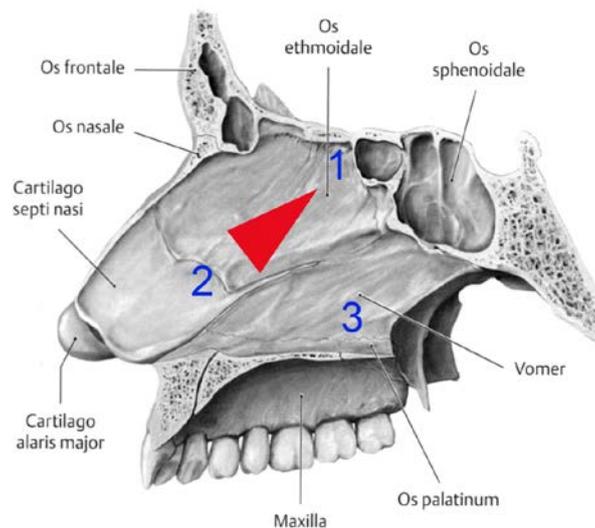


Bild 30: Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPA1 im Septum

Die Pfeile befinden sich zwischen den Regionen signifikanter Expressionsunterschiede. Die breite Seite beschreibt ein höheres Expressionsmuster im Vergleich zur Region, auf die die Pfeilspitze zeigt (siehe Text).

6.2.3 Die Expression von ACCN3 in den fünf Regionen

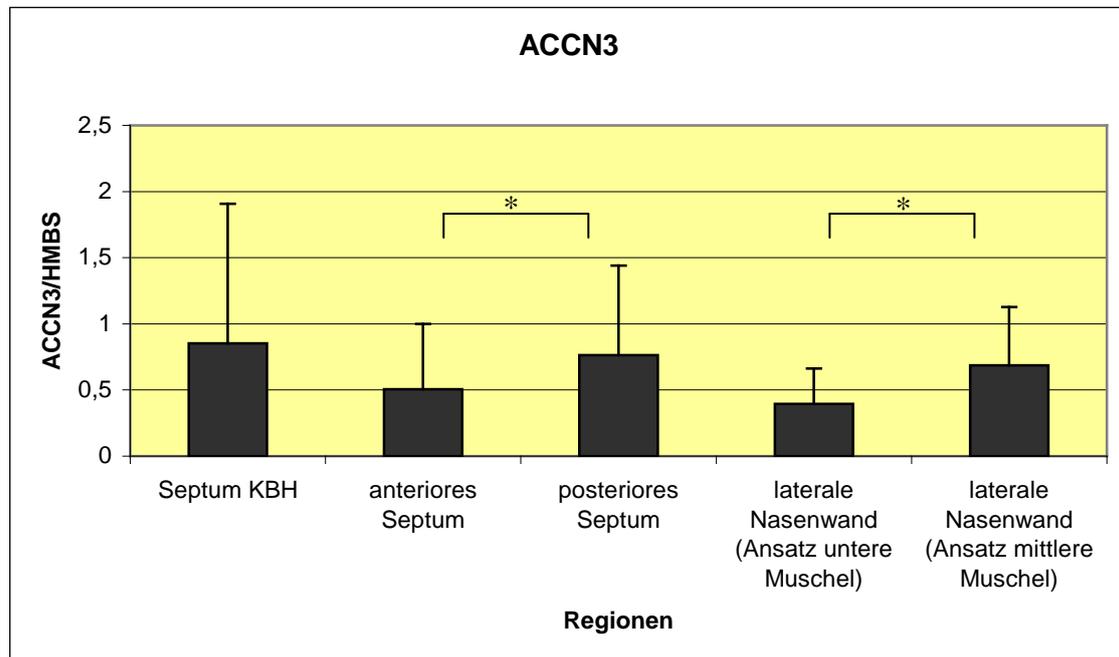


Bild 31: Expression von ACCN3 in den Regionen

Vergleicht man Region 1 mit allen anderen vier Regionen, stellen sich keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression dar. Im Septum, Keilbeinhöhle, beträgt der Mittelwert 0,85, die Standardabweichung beträgt mit 1,06 das 1,25-fache.

Im Vergleich mit Region zwei (MW: 0,51, SD: 0,49) ergibt sich $p = 0,475$ bei einem Stichprobenumfang von 12. In Bezug zu Region 3 (MW: 0,76, SD: 0,68) findet man mit $p = 0,699$ ($n = 14$) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Dies gilt auch im Vergleich mit Region 4 (MW: 0,39, SD: 0,27), mit einem $p = 0,233$ ($n = 11$) sowie für die Region 5 (MW: 0,69, SD: 0,44) mit einem $p = 0,421$ ($n = 13$).

Zwischen Region 2, anteriores Septum, und Region 3, posteriores Septum, gibt es einen signifikanten Unterschied der Rezeptor-RNA-Expression ($p = 0,020$, $T = [2,678]$, $n = 12$).

Auch im Vergleich der Regionen der lateralen Nasenwand (Region 4 und 5) zeigen sich signifikante Unterschiede ($p = 0,047$, $n = 12$). So stellt sich eine stärkere Expression in Region 5 als in Region 4 dar (Teststatistik [2,208]).

Im Vergleich des anterioren Septums mit Region 4 ($p = 0,491$, $n = 10$) und 5 ($p = 0,528$, $n = 11$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Betrachtet man Region 3 mit Region 4 ($p = 0,155$, $n = 12$) und 5 ($p = 0,316$, $n = 14$) stellt sich ebenfalls ein homogenes Verteilungsmuster dar.

6.2.3.1 Schlussfolgerung für ACCN3

Im Vergleich zwischen anterioren und posterioren Septum ist die Expression im hinteren Septumbereich signifikant stärker. Auch im Vergleich der beiden Regionen der lateralen Nasenwand findet sich eine signifikant stärkere RNA-Expression im Bereich der mittleren Nasenmuschel als in der unteren Nasenmuschel.

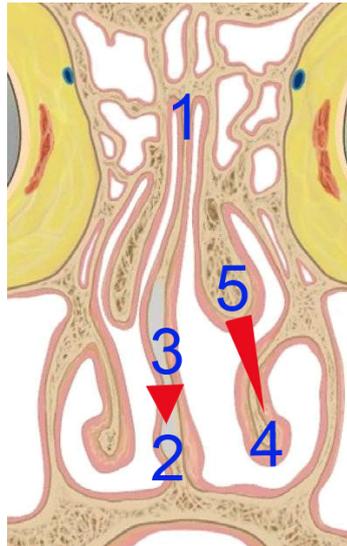


Bild 32: Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von ACCN3 zwischen Septum und lateraler Nasenwand

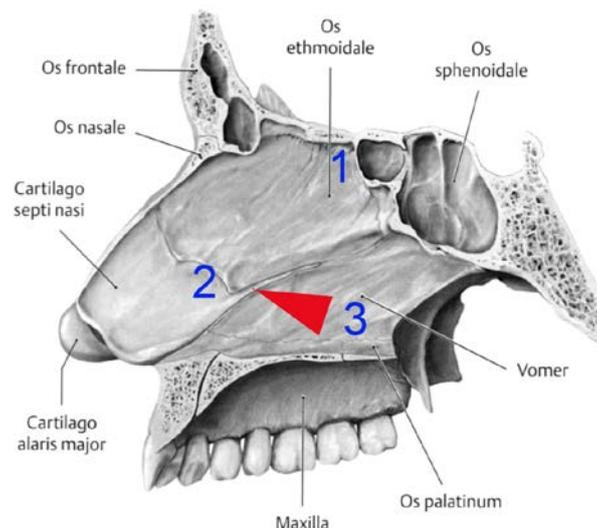


Bild 33: Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von ACCN3 im Septum

Der Pfeil befindet sich zwischen den Regionen signifikanter Expressionsunterschiede. Die breite Seite beschreibt ein höheres Expressionsmuster im Vergleich zur Region, auf die die Pfeilspitze zeigt (siehe Text).

6.2.4 Die Expression von TRPM8 in den fünf Regionen

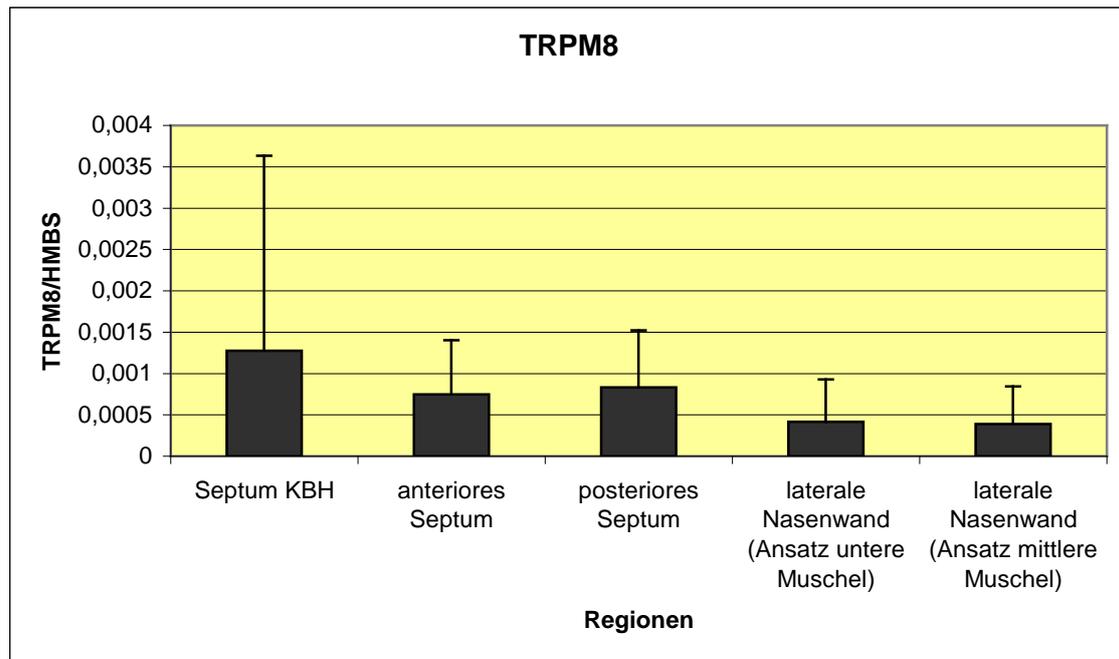


Bild 34: Expression von TRPM8 in den Regionen

Im Septum, Keilbeinhöhlevorderwand, wurde die höchste Rezeptorexpression von TRPM8 gemessen. Der Mittelwert beträgt hier 0,0013, die Standardabweichung 0,0024. An den relativen Werten im Vergleich zu HMBS wird deutlich, dass TRPM8 im Vergleich zu den bisher beschriebenen Rezeptoren eine deutlich geringere Expression aufweist. Durch die großen Schwankungen der Messergebnisse konnten im Vergleich mit allen anderen vier Regionen keine statistischen signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Im Vergleich mit Region 2 (MW: 0,0075, SD: 0,0007) ergibt sich ein $p = 0,375$ bei $n = 8$. Das posteriore Septum (MW: 0,0008, SD: 0,0007) weist ebenfalls keine Signifikanz ($p = 0,740$, $n = 6$) auf. Im Vergleich von Region 1 mit dem Ansatz der unteren Muschel, laterale Nasenwand (MW: 0,0004, SD: 0,0005) gibt es keine statistische Signifikanz ($p = 0,547$, $n = 6$). Ähnlich wie im Vergleich mit der 5. Region, dem Ansatz der mittleren Muschel (MW: 0,0004, SD: 0,0005), bei der mit einem $p = 0,543$ keine signifikanten Unterschiede ($n = 6$) herrschen.

Wertet man mit dem gepaarten T-Test das anteriore Septum mit den vier anderen Regionen aus, so erscheinen wie bei der Auswertung von Region 1 keine statistisch signifikant unterschiedlichen Expressionsmuster. Im Vergleich mit Region 3 ergibt sich ein $p = 0,375$, $n = 9$, im Vergleich mit der lateralen Nasenwand, Ansatz untere Muschel (Region 4) beträgt $p = 0,329$ bei einem Stichprobenumfang von neun. Im Vergleich zwischen der anterioren Septumregion mit der lateralen Nasenwand, Ansatz mittlere Muschel (Region 5) ergibt sich mit $p = 0,801$, $n = 9$ ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied.

Auch für Region 3 und 4 ($p = 0,336$, $n = 8$) sowie für Region 3 und 5 ($p = 0,097$, $n = 9$) ergeben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede

Zwischen Region 4 und 5 stellen sich mit einem $p = 0,768$ ($n = 9$) ebenfalls keine Unterschiede dar.

6.2.4.1 Schlussfolgerung für TRPM8

Für den Rezeptor TRPM8 stellt sich eine recht gleichmäßige Verteilung der Rezeptordichte über den fünf Regionen dar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

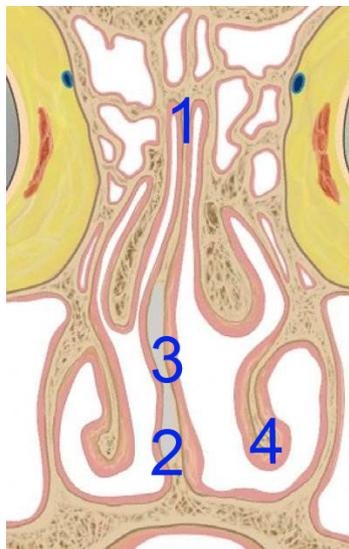


Bild 35: Frontalschnitt der Nase, Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TRPM8 zwischen Septum und lateraler Nasenwand darstellbar

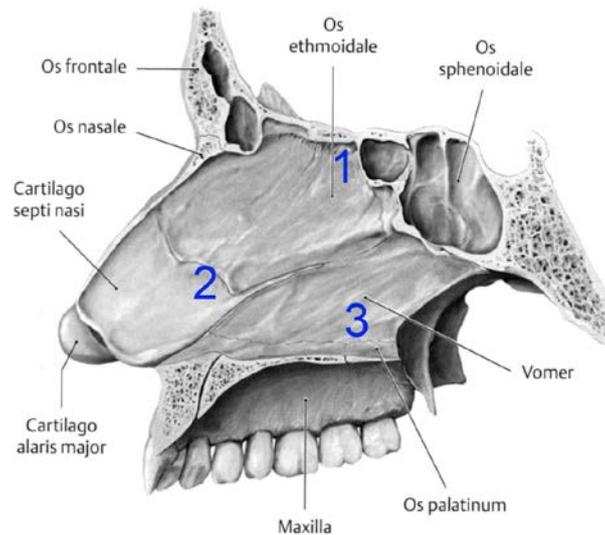


Bild 36: Mediansagittalschnitt der Nase, Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TRPM8 im Septum darstellbar

6.2.5 Die Expression von CALCB1 und CALCB2 in den fünf Regionen

Bei allen Probanden wurde an allen fünf Regionen die Expression von CALCB1 und CALCB2 gemessen. Allerdings konnten hier keine ausreichenden Konzentrationen bzw. Rezeptorexpressionen zur Auswertung nachgewiesen werden. So war CALCB1 bei einem Probanden nie in allen fünf Regionen nachweisbar. Dies ermöglicht keine statistische Auswertung mittels eines gepaarten T-Tests. Die für CALCB2 ermittelten Daten lieferten ebenfalls einen viel zu geringen Datenumfang, um sie statistisch auswerten zu können (siehe Tabellenverzeichnis, Tabellen 23 und 24).

7 Diskussion

Verschiedene vorangegangene Untersuchungen beschäftigten sich mit der Sensitivität der Nasenschleimhaut gegenüber trigeminalen Reizen (Thurauf et al. 1993; Frasnelli et al. 2004; Scheibe et al. 2006). Unterschiedliche Rezeptortypen wurden entdeckt, so dass man auf eine Spezifität trigeminaler Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli schließen kann. Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei der Nasenschleimhaut um ein homogenes Gewebe mit regelmäßiger Rezeptorverteilung handelt oder ob die Nasenschleimhaut ein eher heterogenes Verteilungsmuster bezüglich der trigeminalen Rezeptoren aufweist. Ziel dieser Arbeit ist es, die These, dass es in der menschlichen Nasenschleimhaut von normosmischen Probanden komplexe, heterogene trigeminale Verteilungsmuster gibt, zu bestätigen und dadurch dem N. trigeminus u.a. eine Wächterfunktion im respiratorischen System zuschreiben zu können. Der Hauptschwerpunkt der Arbeit besteht darin, eine Art trigeminale Rezeptor-Topografie mittels molekularbiologischer Methodik für ausgewählte trigeminale Rezeptoren zu erstellen.

7.1 Topographie der Rezeptoren

Schon 1926 wurden durch Emil Ritter von Skramlik, einem der Begründer der modernen Sinnesphysiologie, Untersuchungen zur regionalen Verteilung trigeminaler Afferenzen beim Menschen durchgeführt (Skramlik 1926). In seiner 1925 publizierten Arbeit „Die Lokalisation der Geruchsempfindungen“ entwickelte er das monorhine und das dichorhine Testverfahren, in dem er einem bzw. beiden Nasenlöchern einen Riechstoff anbot (Skramlik 1925a). Durch seine Untersuchungen konnten Geruchsstoffe nun näher klassifiziert werden: in reine Riechstoffe (Vanillin, Eugenol, u.a.), die nicht lokalisiert werden können und in Substanzen (z.B. Essigsäure, Eukalyptol), die nicht nur den Geruchssinn, sondern auch andere Sinnessysteme wie den Geschmackssinn und das trigeminale System aktivieren und lokalisiert werden können, d.h. die stimulierte Nasenseite kann identifiziert werden (Skramlik 1925b). Seine Erkenntnisse sind auch heute noch in vollem Umfang gültig, so bezogen sich z.B. Kobal und Stefan 1995 auf Skramlik und bewiesen mit ihren Riechtesten, dass nur wenige Duftstoffe wie z.B. Schwefelwasserstoff in niedriger Konzentration rein olfaktorisch sind (Kobal & Stefan 1995).

Nachdem Rosenfeld et al. 1983 das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in neuronalem Gewebe extrahierten und eine Beteiligung des Peptides u.a. bei der Schmerzverarbeitung postuliert hatten (Rosenfeld et al. 1983), wiesen Lee et al. 1995 eine regionalspezifische Verteilung CGRP-immunreaktiver Nervenfasern in der Nasenmukosa von Nagern nach. Im vorderen Septumbereich und den ventromedialen Nasenmuscheln konnte

immunhistochemisch eine höhere Dichte von CGRP-reaktiven Fasern als im lateralen Bereich der Nasenwand nachgewiesen werden (Lee et al. 1995). Auch Thurauf et al. versuchten 1991 durch die Ableitungen negativer Mukosapotentiale (NMP) der Nasenschleimhaut von Ratten eine unterschiedliche regionale Verteilung trigeminaler Afferenzen nachzuweisen. Nach nasopharyngealer, retrograder Stimulation mit CO₂ wurden NMPs bei Ratten aufgezeichnet. Nach lokaler Reizung mit Capsaicin und Lidocain (Thurauf et al. 1991) konnten sowohl die NMPs als auch die corticalen Antworten im EEG unterdrückt werden. Die NMPs sind jeweils auf den Ort der Stimulation beschränkt und ableitbar, dies wurde in weiteren Untersuchungen nach lokaler Reizung mit Schmerzfasern stimulierendem CO₂ im Nasenseptumbereich bewiesen (Thurauf et al. 1993). CO₂ ist ein spezifischer Aktivator von Nozizeptoren und stimuliert selektiv trigeminale Afferenzen. Im vorderen Anteil der Nase ist eine höhere Dichte schmerzsensibler Nervenfasern zur Kontrolle des eingeatmeten Luftstroms sinnvoll, um chemisch irritierende und toxische Inhalationsstoffe durch Reduktion des intranasalen Luftstroms an der Passage zu hindern (Lee et al. 1995). Funktionell sind damit Unterschiede bezüglich der Verteilung nozizeptiver Fasern zwischen vorderem und hinteren Bereichen der Nasenschleimhaut erklärbar.

Hummel et al. (1994) untersuchten diese These und leiteten chemosensorisch Ereignis-korrelierte Potentiale (CSSERPs) mittels EEG nach wiederholter Stimulation mit CO₂ ab. Dabei wurden die Interstimulationsintervalle variiert. Je kürzer diese Intervalle gesetzt wurden, desto mehr nahmen die Amplituden der CSSERPs ab und reflektieren damit die nozizeptiven Reize, welche vorwiegend über A-delta-Fasern vermittelt werden (Hummel et al. 1994). Weitere Untersuchungen (Hummel et al. 1996) ergaben, dass NMPs an der Grenze zwischen Nasenknorpel und Beginn der knöchernen Nase in höherem Maße ableitbar waren als an anderen Lokalisationen. Das bedeutet, dass im vorderen Anteil der Nase und im Septumbereich stärkere chemosensorische Impulse messbar sind als in der posterioren Nasenregion, was wiederum auf eine größere Anzahl chemosensorischer Rezeptoren schließen lässt.

In einer weiteren Studie von Frasnelli et al. (2004) versuchte man ebenfalls mittels EEG-Ableitung Ereignis-korrelierter Potentiale (ERP's) und psychophysischen Messmethoden dieser Theorie nachzugehen. CO₂ wurde als chemosensorischer Stimulus und kleine, schnelle Luftstöße, sogenannte air puffs, als mechanische Reize sowohl im hinteren als auch im vorderen Bereich der Nasenhöhle gesetzt. Im vorderen Bereich konnten nach CO₂-Reizung signifikant größere ERPs evoziert werden als im hinteren Anteil der Nasenhöhle. Für die mechanische Stimulation konnte dies nicht nachgewiesen werden. Diese verschiedenen Aktivierungsmuster sind also sowohl von der Reizqualität als auch vom Ort der Reizapplikation abhängig und untermauern damit die Theorie, dass die Regio respiratoria chemosensorisch unterschiedliche Eigenschaften aufweist (Frasnelli et al. 2004).

Die Mukosa im vestibulären Anteil der Nase reagiert sensibler auf mechanische Stimuli (air puffs) als die Mukosa im übrigen Bereich der Nase, wobei das Epithel der unteren Muschel noch sensibler als das Epithel der mittleren Muschel auf die Reize anspricht (Wrobel et al. 2006). Auch durch diese Arbeit sind lokale Unterschiede in der Rezeptorverteilung der Mukosa anzunehmen.

Scheibe et al. (2006) erweiterten den Bereich der Reizapplikation und leiteten NMPs vom vorderen Septumbereich, der unteren Nasenmuschel und der Riechspalte ab. Die höchsten Amplituden wurden nach chemosensorischer Reizung mit Co_2 auch hier im vorderen Septumbereich gemessen, die niedrigsten im hinteren Bereich, der Region der Riechspalte. Die untere Muschel zeigte eine mittelstarke Amplitudenstärke. Der Vergleich der Antwortmuster ergibt auch hier eine höhere Sensitivität des vorderen Nasenbereichs hinsichtlich trigeminaler Reize und unterschiedliche Rezeptoreigenschaften des Gewebes als im hinteren Nasenbereich (Scheibe et al. 2006). Durch den anterior höheren Luftdurchfluss ist eine höhere Sensitivität in den vorderen nasalen Abschnitten mit der trigeminalen Schutzfunktion vereinbar.

In einer weiteren Studie von Scheibe et al. (2008) erfolgte eine elektrophysiologische Reizung mit unterschiedlichen Irritantien an verschiedenen Lokalisationen der Nasenschleimhaut, um die regionalen Verteilungsunterschiede in Abhängigkeit variierender Konzentration des Reizstoffes zu untersuchen. Das mittlere Nasenseptum, die mittlere Nasenmuschel und der Nasenboden wurden als Ableitorte gewählt. Als Reizstoffe wurden als trigeminal-olfaktorische Stimulantien in zwei verschiedenen Konzentrationen Essigsäureethylester und Essigsäure verwendet, während Co_2 selektiv zu trigeminaler Aktivierung führt. Diese Irritantien sind als Säuren in der Lage, verschiedene Rezeptortypen wie den TRPV1-Rezeptor und den Säure-sensitiven Ionenkanal ACCN3 zu aktivieren. Die gemessenen Amplituden korrelierten mit den Konzentrationen des Reizstoffes. Die Verteilung der Reizstoffe in der Nase erfolgte homogen und spielte für die Auswertung der Amplituden keine Schlüsselrolle. Die höchsten Amplituden für alle drei Stoffe wurden wieder im Septumbereich abgeleitet, die niedrigsten Amplituden im Nasenboden und die mittlere Nasenmuschel zeigte eine zwischen beiden Extrema liegende Amplitudenhöhe (Scheibe et al. 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Amplituden kann man auch hier von einer unterschiedlichen Rezeptorexpression ausgehen. Dies kann anhand der RNA-Expression in dieser Arbeit bestätigt werden, die ebenfalls unterschiedliche Verteilungsmuster der Rezeptoren ergaben. Dadurch kann die These, dass die Nasenschleimhaut hinsichtlich ihrer trigeminalen Innervation und damit der Rezeptorexpression kein homogenes Gewebe ist, bestätigt werden. Durch die unterschiedlichen Mess- bzw. Biopsieentnahmestellen sowie unterschiedlicher Methodik der Untersuchungen, ist kein direkter Vergleich der Lokalisationsverteilung beider Arbeiten möglich. Erschwerend kommt noch hinzu, dass die

zur Nasenreizung verwendeten Stoffe mehrere der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren stimulieren und so eine Differenzierung nicht erlauben. Ein konkreter Vergleich der einzelnen Messorte ist aufgrund der oben genannten Faktoren nicht möglich.

Meusel et al. (2010) befassten sich ebenfalls mit der trigeminalen Topografie in der menschlichen Nasenhöhle und erweiterten die Untersuchung von Scheibe et al. (2008), in dem sie Probanden mit Hilfe eines Olfaktometers trigeminale Reizstoffe intranasal verabreichten, von denen bekannt ist, dass sie jeweils bestimmte Rezeptortypen erregen (Meusel et al. 2010). Die Antworten auf die Stimulation wurden als NMPs von fünf Lokalisationen in der Nase abgeleitet. Wenn man die Amplituden der NMPs mit den Ableitpositionen vergleicht, können nun Rückschlüsse über die Verteilungsdichte eines trigeminalen Chemorezeptors in der zu untersuchenden Region gezogen werden. Meusel verwendete als Reizstoff für TRPA1 Zimtaldehyd, Co_2 für den ACCN3-Rezeptor, Ethanol für den TRPV1-Rezeptor und Menthol für TRPM8. CALCB1 und CALCB2 wurden von Meusel nicht untersucht und können somit nicht verglichen werden. Meusels Arbeit zeigte ähnliche Tendenzen in der Rezeptorverteilung von TRPV1 wie die RNA-Expression für TRPV1 in dieser vorliegenden Arbeit. So kam Meusel zum Ergebnis, dass im vorderen Septumbereich eine geringere Reizantwort auf die Reizung mit Ethanol zu verzeichnen war als im hinteren Septumbereich. In hier vorliegender Studie war das posteriore Septum ebenfalls der Ort der stärksten RNA-Expression für TRPV1. Die Reizantworten der lateralen Nasenwand gestalteten sich in seiner Arbeit ähnlich homogen wie die RNA-Expression von TRPV1, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Damit deuten beide Arbeiten darauf hin, dass es sich im hinteren Nasenbereich, vor allem im posterioren Anteil des Septums, um eine Region mit besonders hoher Dichte von TRPV1-Rezeptoren handelt.

Bei der Beurteilung der RNA-Expression des ACCN3-Rezeptors wurden die stärksten Expressionen im hinteren Teil des Septums ermittelt. Damit zeigt der vordere Anteil des Septums eine signifikant ($p \leq 0,05$) geringere Expression. Dies steht im Gegensatz zu Meusels elektrophysiologischen Untersuchungen, die zu dem Ergebnis kamen, dass die Reizantworten auf Co_2 im vorderen Septumbereich höhere Amplituden zeigen. Ein weiterer Unterschied zu Meusels Untersuchungen besteht in der signifikant unterschiedlichen RNA-Expression des ACCN3-Rezeptors zwischen den beiden Regionen der lateralen Nasenwand. Im Gegensatz zu Meusel, welcher in dieser Region eher homogene Reizantworten ableitete, konnte im Bereich der Nasenwand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Expressionsmuster im Vergleich zum Septumbereich ermittelt werden. Dieser Widerspruch sollte in zukünftigen Studien noch einmal vergleichend untersucht werden.

Sowohl bei Meusels Arbeit (2010) als auch in vorliegender Untersuchung konnten für TRPM8 lediglich die Ergebnisse von einem Drittel der Probanden ausgewertet werden. Dabei konnten in keiner der beiden Arbeiten signifikante Unterschiede zwischen der

Expression wie auch der Reizantwort bei TRPM8 ermittelt werden. Es ist naheliegend, dass das Rezeptorverteilungsmuster für TRPM8 in der Nasenschleimhaut eher homogen ist.

Betrachtet man TRPA1, so wurde die stärkste RNA-Expression des Rezeptors im Ansatz der unteren Muschel nachgewiesen. Im vorderen Septumbereich konnte eine signifikant höhere Expression der Rezeptor-RNA im Vergleich zum kranialen Septum nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). Es ergaben sich jedoch keine Signifikanzen bezüglich der anderen untersuchten Regionen. Zum selben Ergebnis kamen auch die elektrophysiologischen Messungen von Meusel et al. (2010). Eine relativ homogene Verteilung ist damit auch bei diesem Rezeptor naheliegend. Die Vergleiche beider Arbeiten sind allerdings nur unter Einschränkung bewertbar, da die trigeminalen Reizstoffe, die von Meusel et al. (2010) verwendet wurden, mehrere der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren stimulieren. Zum Vergleich wurden die Stimulanzen genutzt, die zu einem Rezeptor die größte Affinität aufweisen. Beispielsweise führt CO_2 über Freisetzung von Protonen zum pH-Wert-Abfall und damit zur Aktivierung von ACCN3 aber auch TRPV1. Ausgehend von Meusel wird die TRPV1-Stimulation auch in vorliegender Arbeit als hintergründig betrachtet. Deswegen werden die NMPs nach Reizung mit CO_2 nur mit der Expression von ACCN3 verglichen.

Allerdings stellen neuere Studien die Hypothese einer selektiven Aktivierung einiger Rezeptoren in Frage. Klein et al. (2010) fanden heraus, dass die Hälfte der durch Menthol aktivierbaren Zellen im Ganglion trigeminale von Ratten ebenso auf Zimtaldehyd, ein TRPA1-Agonist anspricht und umgekehrt (Klein et al. 2010). Diese These unterstützend untersuchten Klein et al. (2011) in einer psychophysischen Studie am Menschen, dass die Applikation sowohl von Menthol als auch von Zimtaldehyd zu einer gegenseitigen Desensibilisierung führt. Jedoch kann durch diese Studie nicht differenziert werden, auf welcher Ebene, periphere- bzw. Rezeptorebene, neuronaler oder sogar zentral-nervöser Ebene diese gegenseitige Desensibilisierung stattfindet (Klein et al. 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich in oben angegebene, vorangegangene Studien von Hummel et al. (1994, 1996), Scheibe et al. (2006, 2008), sowie Meusel et al. (2010), gut einordnen. Der Septumbereich ist eine Region großer chemosensorischer Aktivierbarkeit. Die Expressionsmuster der Rezeptoren lässt auf eine hohe Dichte trigeminaler Rezeptoren schließen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch der hintere und laterale Bereich der Nase eine nennenswerte Dichte chemosensorischer Afferenzen aufweisen. Speziell für TRPV1 konnten der hintere Septumbereich und die laterale Nasenwand als Orte hoher Rezeptordichte und damit hoher Chemosensibilität detektiert werden. Ein direkter Vergleich kann für TRPV1 nur mit Meusels Arbeit (2010) gezogen werden, da in den vorangegangenen Untersuchungen die NMPs nicht mit Ethanol provoziert wurden. Der hintere und laterale Nasenbereich scheinen also Orte stärkerer Reaktionen auf stechende, brennende und schmerzinduzierende Stimulanzen zu sein.

Diese Schlussfolgerung kann anhand der stärkeren Rezeptorexpression von TRPV1 und ACCN3 gezogen werden. Für die Wahrnehmung des intranasalen Luftstromes sind also auch diese Rezeptoren von Bedeutung. Retronasal aufgenommene, potentiell schädigende Noxen können somit ebenso detektiert und selektiert werden. Eine retronasale chemische Aktivierung spielt sowohl in der Geruchswahrnehmung als auch in der Kontrolle auf Verträglichkeit und mögliches Schädigungspotential bei der Nahrungsaufnahme, beispielsweise von scharfen, Capsaicin enthaltenden Speisen wie Chili, eine bedeutende Rolle (Cain & Murphy 1980). Indirekt kann eine trigeminale Aktivierung auch die olfaktorische Wahrnehmung über die Auslösung trigeminal vermittelter Aktionen wie z.B. die Herabsetzung der Atemfrequenz, die Erhöhung der Schleimproduktion oder den Niesreflex beeinflussen und so potentiell schädigende Noxen reduzieren bzw. eliminieren (Hummel & Livermore 2002). Die höhere RNA-Expression von TRPV1, die in dieser Arbeit ermittelt wurde, sowie die durch Meusel (2010) abgeleiteten höheren Amplituden nach Reizung mit Ethanol im hinteren Bereich der Nasenhöhle unterstützen sowohl diese von Cain et al. (1980) postulierte Aussage als auch die von Hummel und Livermore (2002) beschriebene Interaktion des trigeminalen und olfaktorischen Systems. Sie zeigten, dass die Interaktion zwischen beiden Sinnessystemen nicht nur von einzelnen Duftstoffen, sondern auch von gemischten Geruchsstoffen beeinflusst wird (Hummel & Livermore 2002; Frasnelli et al. 2011).

7.2 Ko-Lokalisationen der Rezeptoren

Wie unter 4.1.2 schon angesprochen, wird TRPA1 häufig mit TRPV1 koexprimiert (Story et al. 2003). Dies wurde von Story et al. (2003) mittels in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischen Techniken an Nagern nachgewiesen. Allerdings wurden dort Proteinnachweise geführt und nicht, wie in hier vorliegender Arbeit, RNA-Nachweise erbracht. Bestätigt wurden die Untersuchungen von Salas et al. (2009), die durch elektrophysiologische Messungen an Nagern eine Koexprimierung von TRPV1 und TRPA1 untersuchten (Salas et al. 2009).

Demzufolge wäre es naheliegend, dass diese beiden Rezeptoren ähnliche Verteilungsmuster aufweisen. Dies konnte mit dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch Price et al. (2007) führten immunhistochemische Untersuchungen zu Ko-Lokalisationen von Substanz P, CGRP, IB4 (Isolectin B4) und TRPV1 sowohl in trigeminalen Ganglien als auch in den sensiblen pseudounipolaren Spinalganglien durch, um eventuelle Ko-Lokalisationen miteinander vergleichen zu können (Price, TJ & Flores 2007). Sie fanden u.a. Ko-Expressionen von CGRP und TRPV1, die in trigeminalen Ganglien deutlich stärker ausgeprägt sind, als im Spinalganglion. Eine engere Verbindung von TRPV1 und CGRP

konnte anhand vorliegender Verteilungsmuster der Rezeptoren nicht beurteilt werden, da die Daten für die CALC-Rezeptoren nicht statistisch auswertbar sind. Die angewendete Untersuchungstechnik über die RNA-Expression lässt zu diesem Sachverhalt keine weiteren Aussagen zu und sollte tiefergehend geprüft werden.

Frasnelli et al. (2011) führten Untersuchungen zu den Rezeptoren TRPA1 und TRPM8 durch (Frasnelli et al.). Basierend auf von Skramliks (1926) monorhinalen Testverfahren wurden 20 Probanden Geruchsstoffe, die jeweils spezifisch den TRPM8-Rezeptor (Menthol, Eucalyptol) sowie den TRPA1-Rezeptor (Senföl) reizen sollen, dargeboten. Es wurden des Weiteren Gemische der Stoffe (Menthol und Eugenol sowie Menthol und Senföl) angeboten. Frasnelli et al. summierten die korrekten Identifizierungen der Stoffe in einem Lateralisationsscore (Hummel et al. 2003; Boyle et al. 2009). Geprüft wurde der Zusammenhang zwischen der Wahrnehmungsintensität und dem Lateralisationsscore sowie mögliche additive Effekte der Mixstoffe. Als Ergebnis konnte postuliert werden, dass die Lateralisationsscores der Einzelstoffe stärker korrelieren als die der Stoffgemische. Das Stoffgemisch Menthol und Eukalyptol wurde schwächer und ungenauer lateralisiert als die Mixtur von Menthol und Senföl, dies legt einen Verdrängungseffekt für Stoffe, die den gleichen Rezeptor aktivieren, nahe. Ähnliche Effekte von Stoffgemischen konnten auch in anderen chemosensorischen Systemen, wie z.B. dem Geschmackssinn beobachtet werden (Keast et al. 2003). Außerdem ergab sich im Lateralisationsscore eine stärkere Korrelation der zwei TRPM8-Agonisten im Vergleich zum TRPA1-Agonisten, als die der Einzelstoffe. Zusammenfassend kann diese Studie die These, dass TRPA1 und TRPM8 in verschiedenen Arten menschlicher sensorischer Neuronen exprimiert werden (Bandell et al. 2004) und eine Ko-Expression eher gering ist, unterstützen. Auch in hier vorliegender Arbeit sind die Expressionsmuster von TRPA1 und TRPM8 unterschiedlich. Die stärkere Expression des TRPA1-Rezeptors im vorderen Septumbereich steht hier im Gegensatz zur insgesamt geringeren Ausprägung des RNA-Gehaltes des TRPM8-Rezeptors, welcher eher homogen in der Nasenschleimhaut exprimiert zu sein scheint. Sowohl die unterschiedlichen Expressionsmuster als auch die in Frasnellis Arbeit (2011) ermittelte unterschiedliche Sensitivität der beiden Rezeptoren legen diese Vermutung nahe und sollten durch weitere Studien zu den funktionellen Unterschieden der trigeminalen sensorischen Neuronen ergänzt werden. Ob eine endgültige Ko-Expression letztendlich vorliegt oder nicht, kann jedoch mit der hier angewandten Methode nicht beurteilt werden.

7.3 Allgemeine Methodenkritik

7.3.1 Die Probandenzahlen und Fallzahlen

Bei kritischer Beleuchtung der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Methodik soll hier auch auf die Anzahl der verwendeten Biopsien eingegangen werden. Untersucht wurden 18 Probanden, allerdings schwankte die Fallzahl, bei der die RNA-Expression der Rezeptorproteine messbar war, stark und es gab große Unterschiede im Nachweis der einzelnen Rezeptoren über den Regionen. Die Mittelwerte der Quotienten (Rezeptor-RNA/Housekeeping-Gen-RNA) lassen jedoch die Tendenz erkennen, dass bei einer Erhöhung der Probandenzahl signifikante Unterschiede in der Rezeptorverteilung in den verschiedenen Regionen nachweisbar sein können. So konnte TRPV1 mit einer Fallzahl von 12 Biopsien und ACCN3 mit einer Fallzahl von 11 Biopsien statistisch ausgewertet werden, wohingegen CALCB1 und 2 lediglich bei 2 bis 6 Probanden nachgewiesen wurde, jedoch in nicht ausreichender Häufigkeit, um mit den Daten statistisch zu arbeiten. Auch bei Meusel et al. (2010) variierten die Fallzahlen. Interessant ist, dass auch bei ihm der auf Reizung mit Ethanol ansprechende TRPV1-Rezeptor zu etwa bei zwei Drittel der Probanden nachweisbar ist. Die NMPs für die Reizung des ACCN3-Rezeptors mit CO₂ sind ebenso wie in dieser Studie mit 47 auswertbaren Ergebnissen in etwa zwei Drittel der 60 Probanden gemessen worden. Die RNA-Expression von TRPA1 konnte mit einer Fallzahl von 7 in etwa der Hälfte der untersuchten Biopsien untersucht werden. Auch Meusel et al. (2010) konnten in 30 von 60 Probanden eine Reizantwort auf Zimtaldehyd detektieren. TRPM8 ist in beiden Arbeiten mit deutlich geringeren Fallzahlen gemessen bzw. exprimiert worden. In nur etwa einem Drittel der Biopsien bzw. Probanden konnte eine RNA-Expression bzw. eine Reizantwort nachgewiesen werden. Die Häufigkeiten der Nachweisbarkeit der Rezeptoren sowie der evozierten Potentiale stimmen also sowohl bei Meusel et al. (2010) als auch in dieser Arbeit weitgehend überein. Wenn man nun davon ausgeht, dass die Expression dieser Rezeptoren tatsächlich der Häufigkeit der Nachweisbarkeit entspricht, lässt sich vermuten, dass sowohl TRPV1 als auch ACCN3 für die trigeminale Wahrnehmung und Funktion eine entscheidendere Bedeutung haben als die anderen, weniger häufig nachweisbaren Rezeptoren. Dieser Überlegung könnte in weiteren Studien nachgegangen werden.

Wenn man die Probandenzahlen der Studie von Meusel et al. (2010) und vorliegender Studie vergleicht, muss die unterschiedliche Methodik ebenfalls betrachtet werden. Im ersten Fall wurden bei 60 Probanden evozierte Potentiale auf nichtinvasive Weise abgeleitet. In dieser Studie jedoch war es nötig, intraoperativ den Probanden während ihrer Septorhinoplastik Gewebe zu entnehmen. Dies findet zwar ohne wesentliche Beeinträchtigung des Patienten statt, ist aber aufgrund der Invasivität mit einer geringeren Probandenzahl als nichtinvasive Untersuchungsmethoden von der Ethikkommission

genehmigt worden. Dieser Punkt sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Durch eine Erhöhung der Probandenzahlen kann der Mittelwert genauer gemessen werden. Damit könnte die Standardabweichung minimiert und signifikante Unterschiede in der Verteilung der Rezeptoren statistisch deutlicher gemacht werden.

7.3.2 Probenentnahme

Auch die Durchführung der intraoperativen Probenentnahmen stellt eine Quelle für eventuelle methodische Messfehler dar. So wurden die Septorhinoplastiken der Probanden und die Gewebeproben von verschiedenen Operateuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt bzw. entnommen. Die Probeentnahmen sollten stecknadelkopf groß sein. Ein größeres Biopat ist verständlicherweise den Patienten nicht zumutbar. Außerdem könnten aufgrund der anatomisch kleinen Fläche der Nasenschleimhaut regionale Unterschiede nicht mehr herausgearbeitet werden, wenn das entnommene Gewebe größer wäre. Trotz klarer Definition der zu biopsierenden fünf Regionen ist zu berücksichtigen, dass die Entnahmen nicht 100% an genau derselben Lokalisation entnommen werden können, da auch intraoperative und individuelle Umstände beachtet werden müssen. Vor allem die Region 1 (Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand) ist bei einer Septorhinoplastik nicht primär Zielgebiet des Operateurs und bei einem derartigen OP-Ablauf relativ schwer zugänglich und biopsierbar. Eine Erweiterung oder Verlängerung des Eingriffs kann die Risiken wie Blutungen oder Beschädigung der Schädelbasis bei Kontakt mit der Keilbeinhöhlenvorderwand für den Patienten erhöhen und muss vermieden werden. Daher kann es durchaus sein, dass die Materialentnahme nicht immer genau an der vorgegebenen Lokalisation erfolgte und damit Einfluss auf die Ergebnisse dieser Region hatte. Weiterhin ist zu beachten, dass die Nasenschleimhaut allgemein ein sehr leicht zu verletzendes Gewebe ist.

7.3.3 Kritische Betrachtung der Messmethode

Die besonderen Vorteile der quantitativen Real-Time-PCR bestehen in der hohen Sensitivität, die durch die exponentielle Vervielfältigung des Zielgenes erreicht werden kann (Rawer et al. 2003) und in der präzisen Quantifizierung (Reischl & Kochanowski 1999). Das Funktionsprinzip der quantitativen Real-Time-PCR wurde im Material- und Methoden-Teil ausführlich beschrieben. Die synthetisierte DNA weist eine bestimmte Länge auf, die durch die verwendeten Primer vorgegeben ist. Damit kann eine Unterscheidung von anderen Nukleinsäuren vorgenommen werden. Da es während der PCR zu einer starken Vervielfältigung des Templates kommt, werden nicht amplifizierte Sequenzen quantitativ

außer Acht gelassen. So kann durch eine Gelelektrophorese auch mit sequenzunspezifischen Verfahren, z.B. die Anfärbung mit Ethidiumbromid wie bei der qualitativen PCR in hier vorliegender Arbeit, das Zielgen nachgewiesen werden (Reischl & Kochanowski 1999).

Allerdings beeinflussen auch systematische und zufällige Faktoren die Effizienz der PCR. Mit der richtigen Auswahl und Konzentration der Reaktionspartner, Pufferverhältnisse wie die Zugabe von Mg^{2+} in den Reaktionsansatz, dem Vermeiden von Pipettierfehlern und die richtige Position im Thermocycler wurde versucht, solche Faktoren zu verringern. Mögliche methodische Fehler resultieren meist nicht aus der Messung durch die Real-Time PCR selbst, sondern durch die Probenaufbereitung während der Vorphase der PCR (Bustin 2000). Globale methodische Fehler verfälschen die Messung der Expression aller Gene in einer Biopsie gleichermaßen, können aber durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens wie in dieser Arbeit, ausgeglichen werden. Um ein Maß für die Kopiezahl pro Zelle zu erhalten, wird sich hier auf das Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle bezogen. Dieses Gen wird in allen Proben konstant exprimiert und damit kann angenommen werden, dass die Einflussfaktoren der Probenaufarbeitung in gleicher Weise auf das Zielgen und das Housekeeping-Gen wirken. Der Quotient aus Zielgen und Housekeeping-Gen stellt somit das Maß für die Kopiezahl des Zielgenes in einer Zelle dar (Schild, T 1999). Damit können durch die relative Quantifizierung über ein Housekeeping-Gen quantitative Aussagen über den RNA-Gehalt in einer Probe erfolgen und gleichzeitig methodische Fehler in der Vorphase der PCR ausgeglichen werden. Allerdings kann man von einer Validität des Housekeeping-Gens nur ausgehen, wenn dessen Expression in allen Proben und unter allen Bedingungen konstant ist. Wenn hier Schwankungen auftreten, so kann das Ergebnis verfälscht werden. Das in dieser Studie verwendete Housekeeping-Gen HMBS wurde sorgfältig ausgewählt und ist auch in anderen Studien auf seine Validität geprüft und verwendet worden (Fink et al. 1998; Mensink et al. 1998).

Eine Verringerung der Streuung der Daten wäre durch einen dreifachen Ansatz in der Real-Time möglich (Stahlberg et al. 2004), dies ist aber durch den geringen Probengehalt (siehe oben) nicht umsetzbar gewesen. Außerdem steigt dadurch bei erhöhtem Aufwand gleichzeitig die Kontaminationsgefahr. Als Qualitätskontrolle wurde in dieser Studie daher bei jedem Durchlauf eine Negativ-Kontrolle mitgeführt und die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese geprüft. Weiterhin wurde die RNA-Isolierung im Vorfeld der Real-Time PCR optimiert, in dem Qiazol-Lyse-Reagenz zur Denaturierung und ein DNase-Verdau durchgeführt wurden. Damit konnte verbliebene RNA entfernt werden, welche als cDNA-RNA-Hybride einen starken Einfluss auf das SYBRGreen™ -Fluoreszenzsignal hätte.

Allerdings muss bei vorliegender Arbeit beachtet werden, dass mit Hilfe der Real-time-PCR lediglich der RNA-Gehalt der trigeminalen Rezeptorproteine in den verschiedenen Regionen

untersucht wird. Dies kann zwar statistisch als Korrelat der Proteinexpression angesehen werden, jedoch muss beachtet werden, dass auf unterschiedlichen Ebenen von der DNA bis zum Protein eine Vielzahl von Prozessen ablaufen, die regulierend auf die Genexpression wirken können.

7.4 Genexpressionsregulation

Die transkriptionelle Regulation spielt bei der Regulation der Genexpression sicherlich die wichtigste Rolle, da hier weniger Zwischenprodukte entstehen. Aber auch auf mRNA-Ebene kann in die Genexpression noch eingegriffen werden. Dies wird als posttranskriptionelle Regulation bezeichnet. Eine mit der Proteinexpression korrelierende mRNA-Expression entspräche dem klassischen Transkriptionsweg, d.h. die Proteinexpression würde in Abhängigkeit von der RNA-Expression steigen bzw. sinken. Wenn man nun davon ausgeht, dass Proteinexpressionen der trigeminalen Rezeptoren mit der Amplitudenhöhe der NMPs korrelieren (Scheibe et al. 2006; Scheibe et al. 2008; Meusel et al. 2010), der gemessene RNA-Gehalt in vorliegender Arbeit jedoch in den hinteren Nasenbereichen ebenfalls auf eine große Rezeptordichte schließen lässt, so liegt die Vermutung nahe, dass diese Rezeptoren nicht auf dem klassischen Transkriptionsweg, sondern posttranskriptionell reguliert werden. Dies kann man auch bei anderen Proteinen beobachten (Cebers et al. 2001), so z.B. bei dem Rezeptor für Bradykinin (Zhou et al. 1999), welches u.a. eine Rolle bei der Aktivierung von TRPA1 spielt (Bandell et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die Genexpression zu steuern, ist die translationale Regulation, welche vorwiegend durch Phosphorylierung bestimmter Translationsinitiationsfaktoren erfolgt (Knippers 2006). Eine von der RNA-Expression abweichende Proteinexpression könnte Folge des Alterungsprozesses oder auch durch pathologische Prozesse bedingt sein (Rattan 1996). So geht eine erniedrigte Proteinsynthese zumeist mit einer verringerten Aktivität der Ribosomen einher (Rattan 1996), eine Steigerung der Translation ist jedoch auch schon in Zusammenhang mit Alterungsprozessen beobachtet worden (Halle et al. 1997). Ob und wie sich dieses jedoch tatsächlich auf die RNA bzw. deren Expression auswirkt, ist unklar und nicht Gegenstand dieser Arbeit. Als ein weiterer Grund für mögliche Unterschiede in der RNA-Expression und der Rezeptorexpression wäre ein verringerter Abbau der Rezeptoren denkbar, der wiederum zu einer erhöhten RNA-Expression führen kann. Nachgewiesen ist, dass die Prozesse des Proteinabbaus durch verschiedene Faktoren, z.B. reaktive Sauerstoffverbindungen beeinflusst werden (Petropoulos et al. 2000). Damit wäre eine Diskrepanz zwischen RNA-Expression und Proteinexpression erklärbar.

Ein weiterer Punkt in der kritischen Betrachtung der Proteinexpressionsregulation ist die Halbwertszeit der mRNA. Da diese bei menschlicher mRNA im Vergleich zu bakterieller

mRNA mit bis zu mehreren Stunden relativ stabil ist, kann die Proteinexpression auch noch nach Inaktivierung des Genes stattfinden (Lodish H. 2006). Somit ist die Halbwertszeit der mRNA ebenfalls ein wichtiger Regulationsfaktor. Des Weiteren können auch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle spezifisch an bestimmte mRNA binden und dadurch deren Expression beeinflussen, in dem sie deren Abbau bzw. Translation verhindern (Timmons et al. 2003). Dieser natürliche Mechanismus in Eukaryonten wird als RNA-Silencing bezeichnet. Diese die Genexpression beeinflussenden Faktoren sollen bei hier erfolgter Analyse nicht in Betracht gezogen werden, jedoch beim Vergleich der vorangegangenen Studien mit hier vorliegender Arbeit bedacht werden.

Eine andere Methode, um den Ort der RNA-Präsenz in der menschlichen Nasenschleimhaut zu detektieren, stellt die in-situ-Hybridisierung dar. Auch mit dieser Methode können Nukleinsäuren direkt im Gewebe nachgewiesen werden.

7.5 Integration peripherer und zentraler Regulationsmechanismen

Ein weiterer, kritisch zu betrachtender Aspekt ist, wie oben schon durch die Arbeit von Klein et al. (2011) angeführt, die Integration von peripheren und zentralen Regulationsmechanismen, zu der es jedoch noch kaum Untersuchungen gibt. Zhao et al. (2011) untersuchten verschiedene Einflussfaktoren auf die Wahrnehmung nasaler Durchgängigkeit, wie z.B. Luftfeuchtigkeit und -temperatur oder trigeminale Sensitivität u.a. mittels monorhinaler und birhinaler Exposition dieser an Probanden. Die Ergebnisse der unilateralen Testung sind signifikant stärker als die der bilateralen Messungen, was in Studien, deren Ziel ist, objektive Messmethoden mit subjektiver Wahrnehmung in Beziehung setzen, oftmals der Fall ist. Die in dieser Studie signifikant geringeren Messergebnisse bei bilateraler Wahrnehmung verdeutlichen möglicherweise eine zentrale Integration (Zhao et al. 2004). Geht man von einer zentral modulierten Verarbeitung der trigeminalen chemosensorischen Wahrnehmung aus, ist es möglich, dass trotz geringerer RNA-Expression, und damit auch Rezeptorexpression, in bestimmten Regionen der Nasenschleimhaut trotzdem eine verstärkte zentrale Wahrnehmung stattfindet. Um diese These zu belegen, müssten die einzelnen Konvergenzen der Nervenfasern und ihre Repräsentation im Kortex untersucht werden.

Umgekehrt kann es bei den elektrophysiologischen Ableitungen von Scheibe et al. (2006, 2008) sowie von Meusel et al. (2010) sein, dass lokal hohe Reizantworten in Ihrer Verarbeitung in den spezifischen Hirnregionen abgeschwächt werden. Dafür kann als Mechanismus eine starke Konvergenz von Nervenfasern der vorderen Nasenschleimhautregion in Betracht gezogen werden, wobei es trotz peripher starker Reizantwort nur zu einer geringen Stimulation des Kortex kommt. Ein weiterer denkbarer

zentral-modulierender Faktor könnten die Supprimierungen bestimmter peripherer elektrischer Signale durch absteigende Bahnen sein.

7.6 Expression von trigeminaler Rezeptor-DNA durch andere Zellen

Da nahezu die gesamte Syntheseleistung in den Perikaryen der Zelle selbst stattfinden und die Moleküle mittels axonalem Transport zu ihren zum Teil weit entfernten Wirkorten, den Nervenendigungen, transportiert werden müssen (Chan et al. 1989), stellt sich die Frage, ob es eine mögliche Expression von trigeminaler Rezeptor-RNA auch durch andere Zellen als durch Nervenzellen gibt. Während man im olfaktorischen System die olfaktorischen Rezeptorneurone oder im auditiven System die Haarzellen kennt, wurden bislang noch keine spezifischen sensorischen trigeminalen Rezeptorsinneszellen beim Menschen identifiziert. Man geht davon aus, dass die trigeminalen Sinnesempfindungen über den N. trigeminus und den freien Nervenendigungen des Ganglion trigeminale wahrgenommen und übermittelt werden. Viele trigeminale Reizstoffe sind lipophil und diffundieren durch die Schleimhaut zu den freien Nervenendigungen. Der Mechanismus, wie lipophobe Substanzen die Nervenendigungen erreichen, ist noch unklar und lässt vermuten, dass es noch einen anderen transzellulären Signalübertragungsweg gibt. Die Existenz spezialisierter epithelialer chemosensorischer Zellen würde diese Vermutung unterstützen. Finger et al. wiesen 2003 mittels immunhistochemischen Methoden solitäre chemosensorische Zellen (SCC) im Nasenepithel von Mäusen und deren synaptische Verbindung zu afferenten trigeminalen Nervenendigungen nach. Diese Zellen enthalten neben dem „Bitter-Rezeptor“ T2R auch ein Protein, welches in der chemosensorischen Transduktion eine Rolle spielt. Nach Reizung mit Bitterstoffen konnte eine trigeminale Aktivierung mit nachfolgender Änderung der Respirationsrate detektiert werden (Finger et al. 2003). Diese Zellen wurden entlang des Septums, im vorderen Bereich der Nasenmuscheln und in der lateralen Nasenwand bei Nagern nachgewiesen, in Regionen, in denen der Luftdurchfluss hoch ist. Hansen et al. (2005) fanden diese einzelnen chemosensorischen Zellen durch elektronenmikroskopische Studien auch im humanen respiratorischen Epithel (Hansen 2005). Auch immunhistochemisch und mittels DNA-Microarrays konnten SCC in aktuellen Untersuchungen in der menschlichen Nasenschleimhaut nachgewiesen werden (Braun et al. 2011). Überträgt man diesen Ansatz auf die hier vorliegende Arbeit am menschlichen Gewebe, so ist nicht ausgeschlossen, dass die hier erhaltenen Messergebnisse sowohl aus der in den trigeminalen Neuronen enthaltenen RNA als auch aus der Rezeptor-RNA der vermuteten solitären chemosensorischen Sinneszellen additiv zusammengesetzt sein könnten. Dieser Umstand erweitert die These der trigeminalen Wächterfunktion und zeigt an, dass nicht nur die vorderen Nasenbereiche mit ihrer hohen Dichte an nozizeptiven Fasern,

sondern auch der posteriore und laterale Nasenbereich Orte trigeminaler RNA-Expression sind und Schutzfunktionen erfüllen. Eine trigeminale Wächterfunktion ist daher ebenso im hinteren Nasenbereich wie auch im vorderen Bereich denkbar. Eine eindeutige Klärung wird allerdings erst durch zelluläre Zuordnung mittels in-situ-Hybridisierung bzw. durch den Proteinnachweis möglich sein.

7.7 Ausblick

Mittels immunhistochemischer Verfahren bzw. in-situ-Hybridisierung können letztendlich tatsächlich exprimierte Proteine im menschlichen Gewebe detektiert werden, wohingegen mittels Real-Time PCR ein quantitativer Nachweis der zugrundeliegenden RNA erbracht wird. Ein Vergleich der Ergebnisse vorliegender Arbeit mit histochemischen Methoden sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In diesen Arbeiten sollte dann im Vordergrund stehen, ob die Menge der in dieser Arbeit detektierten Rezeptor-RNA tatsächlich mit der Menge des exprimierten Proteins korreliert.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie besteht darin, die These zu prüfen, ob die menschliche Nasenschleimhaut ein heterogenes Gewebe ist und ein unregelmäßiges Verteilungsmuster bezüglich trigeminaler Rezeptoren aufweist. Eine weitere Arbeitshypothese ist, dass das intranasale trigeminale System weitaus komplexer ist, als bisher angenommen. Topografisch spiegelt sich dieses in einem unterschiedlichen Verteilungsmuster der trigeminalen Rezeptor-RNA wieder. Daher sollte eine Übersicht der Dichte der Rezeptor-RNA an unterschiedlichen Regionen der Nase erstellt werden. Durch eine regionale Zuordnung der Expressionsmuster der RNA sollte eine trigeminale Wächterfunktion bezüglich des respiratorischen Systems näher beleuchtet und bestätigt werden.

Um diese Arbeitshypothesen zu bestätigen und die Verteilung der Rezeptoren zu charakterisieren, wurde eine Real-Time PCR zur molekularbiologischen Quantifizierung des RNA-Gehaltes der Zielgene, also der trigeminalen Rezeptoren, durchgeführt. Untersucht wurde die Verteilung des Capsaicin-sensitiven Vanilloidrezeptors TRPV1, welcher durch Hitze, Säuren und inflammatorische Peptide aktiviert werden kann. Als weiteres Mitglied der TRP-Familie wurde die RNA-Expression von TRPA1 untersucht, welcher neben osmotischen oder mechanischen Reizen auch durch verschiedene Stoffe, die ein akutes, brennendes Schmerzempfinden induzieren, aktiviert wird. Der Cold Menthol-Rezeptor TRPM8, der für Kälteempfinden verantwortlich ist und neben Temperaturen unter 25°C auch auf Menthol anspricht, wurde ebenso wie der Säure-sensitive Ionenkanal ACCN3 bezüglich der RNA-Expressionsmuster in der Nasenschleimhaut untersucht. Die beiden Isoformen des Neuropeptides CGRP, welches als Mediator neurogener Entzündungsprozesse eine wesentliche Rolle spielt, sind als weitere Rezeptortypen bezüglich ihres Verteilungsmusters quantifiziert worden.

18 Probanden wurden in dieser Studie während einer Septorhinoplastik Nasenschleimhautbiopsien aus fünf vorher definierten Regionen entnommen. Diese fünf Regionen charakterisieren die Nasenschleimhaut in einen vorderen, hinteren sowie einen lateralen Bereich. Nach Aufbereitung der Biopsien wurde eine Real-Time PCR zur Quantifizierung der Zielgene durchgeführt. Verifiziert wurden die PCR-Produkte durch RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese.

Als Ergebnis der Messungen kann zusammenfassend postuliert werden:

Es gibt unterschiedliche Expressionsmuster der untersuchten RNA der trigeminalen Rezeptoren. Damit kann die These, dass das menschliche respiratorische Epithel inhomogen bezüglich trigeminaler chemosensorischer Afferenzen ist, bestätigt werden.

Topografisch kann das Epithel in Bereiche stärkerer und geringerer Expressionsmuster eingeteilt werden. Der vordere Bereich der Nase weist allgemein eine hohe Rezeptor-RNA-

Dichte auf. Vorherige elektrophysiologisch und psychophysisch ermittelte Befunde, die diesen Bereich der Nase als Ort ausgeprägter chemosensorischer, nozizeptiver Afferenzen charakterisieren und dem N. trigeminus eine funktionelle und strukturelle Wächterfunktion zuschreiben, können somit untermauert werden.

Auch der hintere und laterale Bereich der Nase weisen ein hohes Expressionsmuster von trigeminaler Rezeptor-RNA, im speziellen TRPV1 und ACCN3 auf. Damit kann eine trigeminale Wächterfunktion auch im hinteren Bereich der Nase vermutet werden und so die Komplexität des trigeminalen Systems bestätigt werden.

Die Erkenntnisse zur Vielfältigkeit der trigeminalen und olfaktorischen Interaktion können zu einem besseren Verständnis der Riech- und Schmeckwahrnehmung führen. Klinische Relevanz erhalten die Ergebnisse, wenn man Krankheitsbilder unter dem Gesichtspunkt einer veränderten Wahrnehmung trigeminaler Reize wie beim „Empty-Nose-Syndrom“ betrachtet. Auch in der Nasenchirurgie können Erkenntnisse der topografischen Verteilung trigeminaler Afferenzen eine Optimierung von OP-Verfahren und möglicherweise zur Reduktion postoperativer Komplikationen führen. Hier wären in Zukunft weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene (Immunhistochemie, Western-Blot, in-situ-Hybridisierung) sowie Elektrophysiologie der menschlichen Nasenschleimhaut angezeigt, um deren Topografie umfassend zu charakterisieren. Die hier durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen mittels Real-Time PCR können, in dem sie den quantitativen Nachweis der zugrundeliegenden RNA erbringen, als ein wesentlicher Teil der komplexen topografischen Darstellung der Rezeptoren angesehen werden.

9 Literaturverzeichnis

Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB & Levine JD (2008) Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* 28:1046-57

Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM & Rosenfeld MG (1985) Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229:1094-7

Angell James JE & Daly Mde B (1969) Nasal reflexes. *Proc R Soc Med* 62:1287-93

Anton F & Peppel P (1991) Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 41:617-28

Au E & Roskams AJ (2003) Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41:224-36

AWMF (2010) Leitlinie Riechstörungen. [Aktualisiert am 07.05.2010, Aufruf am 10.12. 2011]
URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/leitlinien-suche/II-ergebnis/liste/II-seite/20/II-dok/alle/II-klass/alle/II-gesellschaft/deutsche-gesellschaft-fuer-hals-nasen-ohren-heilkunde-kopf-und-hals-chirurgie-e-v-bonn-dg-hno/II-org/0/II-sort/rel/II-erg/10.html>

Babinski K, Le KT & Seguela P (1999) Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 72:51-7

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ & Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849-57

Bassilana F, Champigny G, Waldmann R, de Weille JR, Heurteaux C & Lazdunski M (1997) The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. *J Biol Chem* 272:28819-22

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Pobleto J, Yamoah EN, Basbaum AI & Julius D (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269-82

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE & Zygmunt PM (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12248-52

Benson CJ, Eckert SP & McCleskey EW (1999) Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 84:921-8

Bjorklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE & Hermansson A (1986) Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 243:51-7

Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E & Schultzberg M (1988) Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9:165-71

Bortz & Schuster (2005) Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin

- Boyle JA, Djordjevic J, Olsson MJ, Lundstrom JN & Jones-Gotman M (2009) The human brain distinguishes between single odorants and binary mixtures. *Cereb Cortex* 19:66-71
- Brain SD (1997) Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* 37:133-52
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR & MacIntyre I (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313:54-6
- Brand G (2006) Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci Biobehav Rev* 30:908-17
- Braun T, Mack B & Kramer MF (2011) Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology* 49:507-12
- Brunn Av (1982) Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der menschlichen Nasenhöhle in *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. Arch. Mikr. Anat. 39:
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-93
- Bustin SA & Mueller R (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 109:365-79
- Cain WS & Murphy CL (1980) Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. *Nature* 284:255-7
- Carr VM & Farbman AI (1993) The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* 124:308-14
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI & Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-13
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-24
- Cebers G, Cebere A, Kovacs AD, Hogberg H, Moreira T & Liljequist S (2001) Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 39:151-60
- Chan KY, Beck TW, Mullen P & Dong WK (1989) Increased axonal transport of trigeminal ganglion proteins in an electrode model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:2050-5
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV & Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411:957-62
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-24

- Coleridge JC & Coleridge HM (1977) Afferent C-fibers and cardiorespiratory chemoreflexes. *Am Rev Respir Dis* 115:251-60
- Dalton P (2001) Psychophysical methods in the study of olfaction and respiratory tract irritation. *AIHAJ* 62:705-10
- Damann N, Rothermel M, Klupp BG, Mettenleiter TC, Hatt H & Wetzel CH (2006) Chemosensory properties of murine nasal and cutaneous trigeminal neurons identified by viral tracing. *BMC Neurosci* 7:46
- Daum RF, Sekinger B, Kobal G & Lang CJ (2000) [Olfactory testing with "sniffin' sticks" for clinical diagnosis of Parkinson disease]. *Nervenarzt* 71:643-50
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A & Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-7
- de Weille JR, Bassilana F, Lazdunski M & Waldmann R (1998) Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel. *FEBS Lett* 433:257-60
- Deybach JC & Puy H (1995) Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. *J Bioenerg Biomembr* 27:197-205
- Doty RL (1986) Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42:257-71
- Doty RL (2001) Olfaction. *Annu Rev Psychol* 52:423-52
- Doty RL, Brugger WE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ & Lowry LD (1978) Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol Behav* 20:175-85
- Doty RL, Cometto-Muniz JE, Jalowayski AA, Dalton P, Kendal-Reed M & Hodgson M (2004) Assessment of upper respiratory tract and ocular irritative effects of volatile chemicals in humans. *Crit Rev Toxicol* 34:85-142
- Eccles R, Griffiths DH, Newton CG & Tolley NS (1988) The effects of menthol isomers on nasal sensation of airflow. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 13:25-9
- Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, Staniland AA, Mountford DM, Keeble JE, Malcangio M, Bevan S & Brain SD A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum* 63:819-29
- Finger TE & Bottger B (1993) Peripheral peptidergic fibers of the trigeminal nerve in the olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 334:117-24
- Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H & Silver WL (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8981-6

- Finger TE, St Jeor VL, Kinnamon JC & Silver WL (1990) Ultrastructure of substance P- and CGRP-immunoreactive nerve fibers in the nasal epithelium of rodents. *J Comp Neurol* 294:293-305
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W & Bohle RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4:1329-33
- FIZ Chemie (2010) Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren. [Aktualisiert am 03.06.2010, Aufruf am 10.12. 2011] URL: http://www.chemgapedia.de/vsengine/tra/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/methoden.tra/Vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/prak_dna_isolierung.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/reinheit_ns/reinheit_ns.vscml.html
- Frasnelli J, Albrecht J, Bryant B & Lundstrom JN Perception of specific trigeminal chemosensory agonists. *Neuroscience* 189:377-83
- Frasnelli J, Albrecht J, Bryant B & Lundstrom JN (2011) Perception of specific trigeminal chemosensory agonists. *Neuroscience* 189:377-83
- Frasnelli J, Heilmann S & Hummel T (2004) Responsiveness of human nasal mucosa to trigeminal stimuli depends on the site of stimulation. *Neurosci Lett* 362:65-9
- Gangula PR, Zhao H, Supowit SC, Wimalawansa SJ, Dipette DJ, Westlund KN, Gagel RF & Yallampalli C (2000) Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. *Hypertension* 35:470-5
- Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM & et al. (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 4:3101-11
- Gottfried JA (2006) Smell: central nervous processing. *Adv Otorhinolaryngol* 63:44-69
- Graziadei PP & Graziadei GA (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8:1-18
- Green BG & McAuliffe BL (2000) Menthol desensitization of capsaicin irritation. Evidence of a short-term anti-nociceptive effect. *Physiol Behav* 68:631-9
- Hagenacker T, Ledwig D & Busselberg D (2008) Feedback mechanisms in the regulation of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in the peripheral nociceptive system: role of TRPV-1 and pain related receptors. *Cell Calcium* 43:215-27
- Hahn I, Scherer PW & Mozell MM (1993) Velocity profiles measured for airflow through a large-scale model of the human nasal cavity. *J Appl Physiol* 75:2273-87
- Halle JP, Muller S, Simm A & Adam G (1997) Copy number, epigenetic state and expression of the rRNA genes in young and senescent rat embryo fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 74:281-8
- Handwerker HO & Kobal G (1993) Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 73:639-71
- Hansen A, Witt, M., Hummel, T (2005) Unconventional neurons in the nasal cavity of humans
Chem Senses

- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS & Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-7
- Holzappel B & Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). In: *Biologie in unserer Zeit Band 37*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S.120-6
- Holzer P (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43:143-201
- Hori T (1984) Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmacol Ther* 26:389-416
- Hornung DE, Leopold DA, Youngentob SL, Sheehe PR, Gagne GM, Thomas FD & Mozell MM (1987) Airflow patterns in a human nasal model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:169-72
- Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB & Schwob JE (1998) Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 400:469-86
- Hummel T, Futschik T, Frasnelli J & Huttenbrink KB (2003) Effects of olfactory function, age, and gender on trigeminally mediated sensations: a study based on the lateralization of chemosensory stimuli. *Toxicol Lett* 140-141:273-80
- Hummel T, Gruber M, Pauli E & Kobal G (1994) Chemo-somatosensory event-related potentials in response to repetitive painful chemical stimulation of the nasal mucosa. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 92:426-32
- Hummel T & Kobal G (1992) Differences in human evoked potentials related to olfactory or trigeminal chemosensory activation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 84:84-9
- Hummel T & Livermore A (2002) Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *Int Arch Occup Environ Health* 75:305-13
- Hummel T, Livermore A, Hummel C & Kobal G (1992) Chemosensory event-related potentials in man: relation to olfactory and painful sensations elicited by nicotine. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 84:192-5
- Hummel T, Schiessl C, Wendler J & Kobal G (1996) Peripheral electrophysiological responses decrease in response to repetitive painful stimulation of the human nasal mucosa. *Neurosci Lett* 212:37-40
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D & Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6155-60
- Immke DC & McCleskey EW (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron* 37:75-84
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID & Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-5

- Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H & Yamashita K (1997) Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 238:512-6
- Keast RS, Bournazel MM & Breslin PA (2003) A psychophysical investigation of binary bitter-compound interactions. *Chem Senses* 28:301-13
- Kellenberger S, Hoffmann-Pochon N, Gautschi I, Schneeberger E & Schild L (1999) On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol* 114:13-30
- Kelly JT, Prasad AK & Wexler AS (2000) Detailed flow patterns in the nasal cavity. *J Appl Physiol* 89:323-37
- Kern RC (2000) Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope* 110:1071-7
- Klein AH, Carstens MI, Zanotto KL, Sawyer CM, Ivanov M, Cheung S & Carstens E (2010) Self- and cross-desensitization of oral irritation by menthol and cinnamaldehyde (CA) via peripheral interactions at trigeminal sensory neurons. *Chem Senses* 36:199-208
- Klein AH, Iodi Carstens M, McCluskey TS, Blancher G, Simons CT, Slack JP, Furrer S & Carstens E (2011) Novel menthol-derived cooling compounds activate primary and second-order trigeminal sensory neurons and modulate lingual thermosensitivity. *Chem Senses* 36:649-58
- Knippers R (2006) *Molekulare Genetik*. 9. Auflage. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kobal G (1981) *Elektrophysiologische Untersuchungen des menschlichen Geruchsinns*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kobal G & Hummel C (1988) Cerebral chemosensory evoked potentials elicited by chemical stimulation of the human olfactory and respiratory nasal mucosa. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 71:241-50
- Kobal G, Hummel T, Sekinger B, Barz S, Roscher S & Wolf S (1996) "Sniffin' sticks": screening of olfactory performance. *Rhinology* 34:222-6
- Kobal G & Stefan H (1995) [Diagnostic methods in the assessment of anosmia in neurologic diseases]. *Nervenarzt* 66:869-84
- Laska M, Distel H & Hudson R (1997) Trigeminal perception of odorant quality in congenitally anosmic subjects. *Chem Senses* 22:447-56
- Lee SH, Iwanaga T, Hoshi O, Adachi I & Fujita T (1995) Regional differences of CGRP-immunoreactive nerve fibers in nasal epithelium of the rat. *Arch Histol Cytol* 58:117-26
- Levine JD, Fields HL & Basbaum AI (1993) Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13:2273-86
- Lodish H. AB, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J.E. Darnell (2006) *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Gustav Fischer
- Mackenzie RA, Burke D, Skuse NF & Lethlean AK (1975) Fibre function and perception during cutaneous nerve block. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38:865-73

- Maggi CA, Manzini S, Giuliani S, Santicoli P & Meli A (1986) Extrinsic origin of the capsaicin-sensitive innervation of rat duodenum: possible involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the capsaicin-induced activation of intramural non-adrenergic non-cholinergic neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 334:172-80
- Maggi CA & Meli A (1988) The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 19:1-43
- Mamet J, Baron A, Lazdunski M & Voilley N (2002) Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 22:10662-70
- Mayer KC (2010) Glossar Psychiatrie/Psychosomatik/Psychotherapie/Neurologie/Neuropsychologie. [Aktualisiert am 13.11.2010, Aufruf am 10.12.2011] URL: <http://www.neuro24.de/glossartest.php?limit=40&anfangsbuchstabe=e>
- Menco BP & Jackson JE (1997) Neuron-like cells on the apical surface of the developing rat olfactory epithelium. *Neurosci Lett* 239:117-20
- Mendoza AS (1993) Morphological studies on the rodent main and accessory olfactory systems: the regio olfactoria and vomeronasal organ. *Ann Anat* 175:425-46
- Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A & De Witte T (1998) Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol* 102:768-74
- Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M & Schmidt RF (1995) Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1020-4
- Meusel T, Negoias S, Scheibe M & Hummel T (2010) Topographical differences in distribution and responsiveness of trigeminal sensitivity within the human nasal mucosa. *Pain* 151:516-21
- Minke B (1977) *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 3:59-64
- Molina JM, Cooper GJ, Leighton B & Olefsky JM (1990) Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide. *Diabetes* 39:260-5
- Monis PT & Giglio S (2006) Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 6:2-12
- Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005:re3
- Moran DT, Jafek BW, Eller PM & Rowley JC, 3rd (1992) Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction. *Microsc Res Tech* 23:103-10
- Moran DT, Rowley JC, 3rd, Jafek BW & Lovell MA (1982) The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocytol* 11:721-46
- Mori K, Nagao H & Sasaki YF (1998) Computation of molecular information in mammalian olfactory systems. *Network* 9:R79-102

- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S & Tominaga M (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1:3
- Mühlhardt C (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie und Genomics*. 5. Auflage. Elsevier GmbH, München.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G & Garcia-Anoveros J (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25:4052-61
- Nakashima T, Kimmelman CP & Snow JB, Jr. (1984) Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol* 110:641-6
- NCBI (2010) National Center for Biotechnology Information. [Aktualisiert am 20.04.2010, Aufruf am 10.12. 2011] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>
- Nedelman J, Heagerty P & Lawrence C (1992) Quantitative PCR with internal controls. *Comput Appl Biosci* 8:65-70
- Nelson EK (1919) The constitution of capsaicin—the pungent principle of capsicum. *Am Chem Soc* 1115–21
- Newbold P & Brain SD (1993) The modulation of inflammatory oedema by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 108:705-10
- Nicoletti P, Trevisani M, Manconi M, Gatti R, De Siena G, Zagli G, Benemei S, Capone JA, Geppetti P & Pini LA (2008) Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig. *Cephalalgia* 28:9-17
- Nishino T, Tagaito Y & Sakurai Y (1997) Nasal inhalation of l-menthol reduces respiratory discomfort associated with loaded breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 156:309-13
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M & Noguchi K (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115:2393-401
- Pedersen-Bjergaard U, Nielsen LB, Jensen K, Edvinsson L, Jansen I & Olesen J (1991) Calcitonin gene-related peptide, neurokinin A and substance P: effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. *Peptides* 12:333-7
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S & Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-15
- Pelosi P (1994) Odorant-binding proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29:199-228
- Petropoulos I, Conconi M, Wang X, Hoemel B, Bregegere F, Milner Y & Friguet B (2000) Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55:B220-7
- Pevsner J, Sklar PB & Snyder SH (1986) Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4942-6
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45

- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C & Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509-15
- Pixley SK, Farbman AI & Menco BP (1997) Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anat Rec* 248:307-21
- Plailly J, Howard JD, Gitelman DR & Gottfried JA (2008) Attention to odor modulates thalamocortical connectivity in the human brain. *J Neurosci* 28:5257-67
- Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Morenilla-Palao C & Ferrer-Montiel A (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* 451:151-9
- Price DD (1972) Characteristics of second pain and flexion reflexes indicative of prolonged central summation. *Exp Neurol* 37:371-87
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR & Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32:1071-83
- Price TJ & Flores CM (2007) Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related 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* 8:263-72
- Probst RG, G.; Iro, H. (2004) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- QIAGEN (2010) RNeasy RNA Stabilization Reagent [Aktualisiert am 07.05.2010, Aufruf am 10.12.2011] URL: <http://www.qiagen.com/products/RnaStabilizationPurification/RnaLaterRnaProtectSystems/RnaLaterRnaStabilization.aspx#Tabs=t1>
- Rattan SI (1996) Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Exp Gerontol* 31:33-47
- Rawer D, Borkhardt A, Wilda M, Kropf S & Kreuder J (2003) Influence of stochastics on quantitative PCR in the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 17:2527-8; author reply 8-31
- Reichel J (2011) Sniffin'Sticks-Verfahren. [Aktualisiert am 12.09.2011, Aufruf am 09.12.2011] URL: http://www.hnoinfo.com/fb/fb0405arnold/tes_sniff.html
- Reischl U & Kochanowski B (1999) Quantitative PCR : a survey of the present technology. *Methods Mol Med* 26:3-30
- Ressler KJ, Sullivan SL & Buck LB (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73:597-609
- Ressler KJ, Sullivan SL & Buck LB (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-55

- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW & Evans RM (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-35
- Salas MM, Hargreaves KM & Akopian AN (2009) TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 29:1568-78
- Schaefer ML, Bottger B, Silver WL & Finger TE (2002) Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J Comp Neurol* 444:221-6
- Schafer K, Braun HA & Isenberg C (1986) Effect of menthol on cold receptor activity. Analysis of receptor processes. *J Gen Physiol* 88:757-76
- Scheibe M, Thriel Cv & Hummel T (2008) Responses to trigeminal irritants at different locations of the human nasal mucosa. *Laryngoscope* 118:152-5
- Scheibe M, Zahnert T & Hummel T (2006) Topographical differences in the trigeminal sensitivity of the human nasal mucosa. *Neuroreport* 17:1417-20
- Schild D & Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78:429-66
- Schild L, Schneeberger E, Gautschi I & Firsov D (1997) Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol* 109:15-26
- Schild T (1999) Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. Auflage. Applied Biosystems, Weiterstadt
- Schünke M. SE, Schumacher U. (2006) Prometheus Lernatlas Anatomie (Kopf- und Neuroanatomie). 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Sekizawa SI & Tsubone H (1994) Nasal receptors responding to noxious chemical irritants. *Respir Physiol* 96:37-48
- Seybold VS, McCarson KE, Mermelstein PG, Groth RD & Abrahams LG (2003) Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. *J Neurosci* 23:1816-24
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD & Oh U (2002) Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10150-5
- Sigrist S, Franco-Cereceda A, Muff R, Henke H, Lundberg JM & Fischer JA (1986) Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 119:381-9
- Silver W.L. FTE (1991) Smell and Taste in Health and Disease. Auflage. Raven Press New York
- Skramlik Ev 1925a, 'Über die Lokalisation der Empfindungen bei den niederen Sinnen', *Zeitschrift für Sinnesphysiologie* vol. 56, p. 90.

- Skramlik Ev (1925b) Über die Lokalisation der Empfindungen bei den niederen Sinnen. Zeitschrift für Sinnesphysiologie 56:101-10
- Skramlik Ev (1926) Handbuch der Physiologie niederer Sinne. 1. Auflage. Thieme Verlag, Leipzig
- Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H & Kubista M (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. Clin Chem 50:509-15
- Stern K & McClintock MK (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. Nature 392:177-9
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S & Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 112:819-29
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C & Koentges G (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. Science 295:1493-500
- Szallasi A, Goso C, Blumberg PM & Manzini S (1993) Competitive inhibition by capsazepine of [3H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. J Pharmacol Exp Ther 267:728-33
- Szallasi A, Nilsson S, Farkas-Szallasi T, Blumberg PM, Hokfelt T & Lundberg JM (1995) Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. Brain Res 703:175-83
- Szolcsanyi J (1977) A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. J Physiol (Paris) 73:251-9
- Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A & Joo F (1975) Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 287:157-69
- Tannenbaum GS & Goltzman D (1985) Calcitonin gene-related peptide mimics calcitonin actions in brain on growth hormone release and feeding. Endocrinology 116:2685-7
- Thurauf N, Kaegler M, Dietz R, Barocka A & Kobal G (1999) Dose-dependent stereoselective activation of the trigeminal sensory system by nicotine in man. Psychopharmacology (Berl) 142:236-43
- Thurauf N, Friedel I, Hummel C & Kobal G (1991) The mucosal potential elicited by noxious chemical stimuli with CO₂ in rats: is it a peripheral nociceptive event? Neurosci Lett 128:297-300
- Thurauf N, Hummel T, Kettenmann B & Kobal G (1993) Nociceptive and reflexive responses recorded from the human nasal mucosa. Brain Res 629:293-9
- Timmons L, Tabara H, Mello CC & Fire AZ (2003) Inducible systemic RNA silencing in Caenorhabditis elegans. Mol Biol Cell 14:2972-83
- Tominaga M & Caterina MJ (2004) Thermosensation and pain. J Neurobiol 61:3-12

- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI & Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-43
- Tominaga M, Wada M & Masu M (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6951-6
- Tomori Z, Lemakova S & Holecyova A (1977) Defensive reflexes of the respiratory tract in dogs. *Physiol Bohemoslov* 26:49-54
- Torebjork HE & Hallin RG (1970) C-fibre units recorded from human sensory nerve fascicles in situ. A preliminary report. *Acta Soc Med Ups* 75:81-4
- Trepel M (2004) *Neuroanatomie-Struktur und Funktion*. Auflage. Urban & Fischer Verlag München
- Trotier D (1998) Electrophysiological properties of frog olfactory supporting cells. *Chem Senses* 23:363-9
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S & Laus R (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61:3760-9
- Uddman R, Edvinsson L, Ekblad E, Hakanson R & Sundler F (1986) Calcitonin gene-related peptide (CGRP): perivascular distribution and vasodilatory effects. *Regul Pept* 15:1-23
- Unger JW & Lange W (1991) Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat* 4:299-309
- Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH & Margolis FL (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9:683-91
- Viehweg TL, Roberson JB & Hudson JW (2006) Epistaxis: diagnosis and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 64:511-8
- Vincent AJ, West AK & Chuah MI (2005) Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol* 34:65-80
- Voilley N, de Weille J, Mamet J & Lazdunski M (2001) Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 21:8026-33
- Wachsmuth L (1979) *Praktische Anatomie. Kopf: Gehirn- und Augenschädel: Ein Lehr- und Hilfsbuch der anatomischen Grundlagen ärztlichen Handelns*. 1.Auflage. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C & Lazdunski M (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386:173-7
- Welsch U (2002) *Lehrbuch Histologie*. 1. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München

- Wikipedia (2010) Varianzanalyse. [Aktualisiert am 30.10.2011, Aufruf am 10.12. 2011] URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Varianzanalyse>
- Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17:533-85
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA & Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-1, 4-8
- Wolfensberger M & Schnieper I (1999) [Sniffin'Sticks: a new system for olfactory assessment in routine clinical practice]. *HNO* 47:629-36
- Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF & Piispanen J (1999) Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. *J Microbiol Methods* 35:23-30
- Wrobel BB, Bien AG, Holbrook EH, Meyer GE, Bratney NA, Meza J & Leopold DA (2006) Decreased nasal mucosal sensitivity in older subjects. *Am J Rhinol* 20:364-8
- Yamagishi M, Okazoe R & Ishizuka Y (1994) Olfactory mucosa of patients with olfactory disturbance following head trauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 103:279-84
- Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y & Yamamoto H (1998) Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41:1435-41
- Yee KK, Pribitkin EA, Cowart BJ, Rosen D, Feng P & Rawson NE (2009) Analysis of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis. *Ann N Y Acad Sci* 1170:590-5
- Zhang XF, Chen J, Faltynek CR, Moreland RB & Neelands TR (2008) Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel. *Eur J Neurosci* 27:605-11
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS & Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301
- Zhao K, Scherer PW, Hajiloo SA & Dalton P (2004) Effect of anatomy on human nasal air flow and odorant transport patterns: implications for olfaction. *Chem Senses* 29:365-79
- Zhou X, Prado GN, Chai M, Yang X, Taylor L & Polgar P (1999) Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B1 receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'-untranslated region. *Mol Cell Biol Res Commun* 1:29-35
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J & Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D & Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-7

10 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen:

Zimmermann J, Hummel T, Hermann A, Storch A, Kanzler S, Scheibe M, Witt M. Real-time PCR of trigeminal receptor mRNAs in human nasal biopsies. 32nd Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences (AChemS), St.Petersburg, FL, USA, April 21-25, 2010, [Chem Senses 2010, 35, A47-48](#) und in European Chemoreception Research Organization (ECRO), 14.-19.09.2010, Avignon, Frankreich

Vortrag:

Zimmermann J, Hummel T, Hermann A, Storch A, Kanzler S, Scheibe M, Meusel M, Witt M. Real-time PCR of trigeminal receptor mRNAs in human nasal biopsies. Arbeitsgemeinschaft Olfaktologie und Gustologie, Köln, Germany, Dec 2-3, 2011

Dresden, den 16.12.2011

Jacqueline Zimmermann

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Patienten nach Geschlecht und Alter

Patient	Geburtsjahr	Geschlecht	Alter
1	1987	m	23
2	1973	m	37
3	1978	m	32
4	1969	w	41
5	1940	m	70
6	1986	w	24
7	1940	m	70
8	1959	w	51
9	1966	m	44
10	1986	m	24
11	1952	m	58
12	1984	m	26
13	1944	m	66
14	1977	m	33
15	1971	w	39
16	1935	w	75
17	1964	w	46
18	1989	w	21
MW			43,3333

MW = Mittelwert

Tabelle 2: Primersequenzen der Firma eurofins MWG / Operon, Ebersberg / Deutschland

Tabelle 3: Kommerzielle Primer der Firma QIAGEN, Hilden / Deutschland

Tabelle 4: Pipettierschema qRT-PCR-Ansatz

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen im LightCycler®

Tabelle 6: Reaktionsansatz Reverse Transkription

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen Reverse Transkription

Tabelle 8: Gensequenz Kontrollprimer

Tabelle 9: Pipettierschema des RT-PCR-Ansatzes

Tabelle 10: Temperaturprogramm Thermocycler TC 512

Tabelle 11:

Vergleich der Rezeptoren über der Region 1, Septum, Keilbeinhöhlevorderwand

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R1	2,3247	2,5482	12
TRPA1_R1	0,0129	0,0157	7
ACCN3_R1	0,8520	1,0551	11
TRPM8_R1	0,0013	0,0024	5

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlevorderwand
n = Fallzahl

Tabelle 12:

Vergleich der Rezeptoren über der Region 2, anteriores Septum

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R2	1,6070	1,4509	12
TRPA1_R2	0,0330	0,0301	7
ACCN3_R2	0,5059	0,4945	11
TRPM8_R2	0,0007	0,0007	5

R2 = Region 2, anteriores Septum
n = Fallzahl

Tabelle 13:

Vergleich der Rezeptoren über der Region 3, posteriores Septum

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R3	3,4300	3,1164	12
TRPA1_R3	0,0219	0,0167	7
ACCN3_R3	0,7626	0,6783	11
TRPM8_R3	0,0008	0,0007	5

R3 = Region 3, posteriores Septum
n = Fallzahl

Tabelle 14:

Vergleich der Rezeptoren über der Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R4	2,0311	2,1523	12
TRPA1_R4	0,1858	0,2764	7
ACCN3_R4	0,3947	0,2677	11
TRPM8_R4	0,0004	0,0005	5

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)
n = Fallzahl

Tabelle 15:

Vergleich der Rezeptoren über der Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R5	2,5685	1,2195	12
TRPA1_R5	0,0166	0,0126	7
ACCN3_R5	0,6862	0,4410	11
TRPM8_R5	0,0004	0,0005	5

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)
n = Fallzahl

Tabelle 16:

Expression von TRPV1 in den fünf Regionen

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPV1_R1	2,3247	2,5482	12
TRPV1_R2	1,6070	1,4509	12
TRPV1_R3	3,4300	3,1164	12
TRPV1_R4	2,0311	2,1523	12
TRPV1_R5	2,5685	1,2195	12

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 17:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

Test bei gepaarten Stichproben

		T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 1	TRPV1_R1 - TRPV1_R2	,720	13	,484
Paaren 2	TRPV1_R1 - TRPV1_R3	-,931	14	,368
Paaren 3	TRPV1_R1 - TRPV1_R4	,515	11	,617
Paaren 4	TRPV1_R1 - TRPV1_R5	,781	13	,449
Paaren 5	TRPV1_R2 - TRPV1_R3	-2,913	13	,012
Paaren 6	TRPV1_R2 - TRPV1_R4	-1,084	11	,302
Paaren 7	TRPV1_R2 - TRPV1_R5	-,361	12	,724
Paaren 8	TRPV1_R3 - TRPV1_R4	2,791	12	,016
Paaren 9	TRPV1_R3 - TRPV1_R5	1,494	14	,157
Paaren 10	TRPV1_R4 - TRPV1_R5	-,659	12	,522

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 18:

Expression von TRPA1 in den fünf Regionen

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPA1_R1	0,0129	0,0157	7
TRPA1_R2	0,0330	0,0301	7
TRPA1_R3	0,0219	0,0167	7
TRPA1_R4	0,1858	0,2764	7
TRPA1_R5	0,0166	0,0126	7

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 19:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

R1

Test bei gepaarten Stichproben

		T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 1	TRPA1_R1 - TRPA1_R2	-2,936	9	,017
Paaren 2	TRPA1_R1 - TRPA1_R3	-1,093	11	,298
Paaren 3	TRPA1_R1 - TRPA1_R4	-1,656	10	,129
Paaren 4	TRPA1_R1 - TRPA1_R5	-1,131	11	,282
Paaren 5	TRPA1_R2 - TRPA1_R3	1,279	10	,230
Paaren 6	TRPA1_R2 - TRPA1_R4	-,190	8	,854
Paaren 7	TRPA1_R2 - TRPA1_R5	1,347	8	,215
Paaren 8	TRPA1_R3 - TRPA1_R4	-1,402	10	,191
Paaren 9	TRPA1_R3 - TRPA1_R5	-,142	10	,890
Paaren 10	TRPA1_R4 - TRPA1_R5	-,349	10	,734

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 20:

Expression von ACCN3 in den fünf Regionen

	Mittelwert	Standardabweichung	n
ACCN3_R1	0,8520	1,0551	11
ACCN3_R2	0,5059	0,4945	11
ACCN3_R3	0,7626	0,6783	11
ACCN3_R4	0,3947	0,2677	11
ACCN3_R5	0,6862	0,4410	11

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 21:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

Test bei gepaarten Stichproben

		T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 1	ACCN3_R1 - ACCN3_R2	,738	12	,475
Paaren 2	ACCN3_R1 - ACCN3_R3	,395	14	,699
Paaren 3	ACCN3_R1 - ACCN3_R4	1,261	11	,233
Paaren 4	ACCN3_R1 - ACCN3_R5	,831	13	,421
Paaren 5	ACCN3_R2 - ACCN3_R3	-2,678	12	,020
Paaren 6	ACCN3_R2 - ACCN3_R4	,715	10	,491
Paaren 7	ACCN3_R2 - ACCN3_R5	-,652	11	,528
Paaren 8	ACCN3_R3 - ACCN3_R4	1,518	12	,155
Paaren 9	ACCN3_R3 - ACCN3_R5	1,039	14	,316
Paaren 10	ACCN3_R4 - ACCN3_R5	-2,208	12	,047

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 22:

Expression von TRPM8 in den fünf Regionen

	Mittelwert	Standardabweichung	n
TRPM8_R1	0,0013	0,0024	5
TRPM8_R2	0,0007	0,0007	5
TRPM8_R3	0,0008	0,0007	5
TRPM8_R4	0,0004	0,0005	5
TRPM8_R5	0,0004	0,0005	5

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand

R2 = Region 2, anteriores Septum

R3 = Region 3, posteriores Septum

R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)

R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)

n = Fallzahl

Tabelle 23:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

Test bei gepaarten Stichproben

		T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 1	TRPM8_R1 - TRPM8_R2	-,939	8	,375
Paaren 2	TRPM8_R1 - TRPM8_R3	,348	6	,740
Paaren 3	TRPM8_R1 - TRPM8_R4	,638	6	,547
Paaren 4	TRPM8_R1 - TRPM8_R5	,645	6	,543
Paaren 5	TRPM8_R2 - TRPM8_R3	-,933	9	,375
Paaren 6	TRPM8_R2 - TRPM8_R4	1,033	9	,329
Paaren 7	TRPM8_R2 - TRPM8_R5	,259	9	,801
Paaren 8	TRPM8_R3 - TRPM8_R4	1,024	8	,336
Paaren 9	TRPM8_R3 - TRPM8_R5	1,853	9	,097
Paaren 10	TRPM8_R4 - TRPM8_R5	-,304	9	,768

Tabelle 24:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

		n	Korrelation	Signifikanz
Paaren 3	CALB1_R1 & CALB1_R4	2	1	0
Paaren 8	CALB1_R3 & CALB1_R4	2	1	0

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand
 R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)
 R3 = Region 3, posteriores Septum

Tabelle 25:

T-Test, Teststatistik bei gepaarten Stichproben

Test bei gepaarten Stichproben

		T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 3	CALB1_R1 - CALB1_R4	-1,058	1	,482
Paaren 8	CALB1_R3 - CALB1_R4	-1,000	1	,500

R1 = Region 1, Septum, Keilbeinhöhlenvorderwand
 R2 = Region 2, anteriores Septum
 R3 = Region 3, posteriores Septum
 R4 = Region 4, laterale Nasenwand (Ansatz untere Muschel)
 R5 = Region 5, laterale Nasenwand (Ansatz mittlere Muschel)
 n = Fallzahl

12 Abbildungsverzeichnis

- Bild 1:** Skelett der äußeren Nase (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)
- Bild 2:** Nasenknorpel (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)
- Bild 3:** Knochen der lateralen Nasenwand der rechten Nasenhöhle (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)
- Bild 4:** Aufspaltungen und Versorgungsgebiete des N. trigeminus (aus: Grey, Henry, Anatomy of the Human Body, 1918), <http://www.bartleby.com/107/illus778.html>)
- Bild 5:** Nerven des Nasenseptums (aus: Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 1. Auflage, 2006)
- Bild 6:** Schema der nocizeptiven somatosensorischen Organisation des Gesichtsschädels (aus: Mager, Pillman, The encyclopedia of pain 2007)
- Bild 7:** Histologischer Aufbau menschlicher Nasenschleimhaut (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Martin Witt, 27.10.2011)
- Bild 8:** Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels (aus: Kaneko, H. et al., J. Neurosci., Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons, 2004)
- Bild 9:** Histologischer Aufbau normaler menschlicher Riechschleimhaut (Immunhistochemische Markierung mit Antikörper gegen Neurotubulin, Freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Martin Witt, 27.10.2011)
- Bild 10:** Modell der Konvergenz im olfaktorischen System (aus: Mombaerts, P., Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2006.)
- Bild 11:** TRPV1-Rezeptor (aus: Mager, Pillman, The encyclopedia of pain 2007)
- Bild 12:** ACCN3-Rezeptor (aus: Mager, Pillman, The encyclopedia of pain 2007)
- Bild 13:** Screening 12 Test, (aus: http://www.burghart-mt.de/index.php?p1=produkte&p2=sticks&p3=screening_12, gesehen am 07.05.2010)
- Bild 14:** schematische Darstellung der Probenentnahmestellen (aus: gastrowein.blogspot.com/2009_01_01_archive.html, gesehen am 08.05.2010)
- Bild 15:** Nachweismethode der real-time quantitative PCR (aus: <http://diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm>, gesehen am 10.05.2010)
- Bild 16:** Darstellung der PCR-Phasen (aus: Wikipedia, gesehen im Mai, 2010)
- Bild 17:** Ansicht der Schädelbasis und Lage des Ganglion trigeminale Ansicht der Schädelbasis und Lage des Ganglion trigeminale (aus: Trepel, Neuroanatomie, 4. Auflage, Urban und Fischer 2008, S.88)

- Bild 18:** Schmelzkurven für den Primer TRPV1 in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe
- Bild 19a:** Überprüfung der PCR-Fragmente auf korrekte bp-Länge mittels Gelelektrophorese
- Bild 19b:** Überprüfung der PCR-Fragmente auf korrekte bp-Länge mittels Gelelektrophorese.
- Bild 20:** Auswertung der Rezeptoren in Region 1
- Bild 21:** Auswertung der Rezeptoren in Region 2
- Bild 22:** Auswertung der Rezeptoren in Region 3
- Bild 23:** Auswertung der Rezeptoren in Region 4
- Bild 24:** Auswertung der Rezeptoren in Region 5
- Bild 25:** Expression von TRPV1 in den Regionen
- Bild 26:** Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPV1 zwischen Septum und lateraler Nasenwand
- Bild 27:** Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPV1 im Septum
- Bild 28:** Expression von TRPA1 in den Regionen
- Bild 29:** Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPA1 zwischen Septum und lateraler Nasenwand
- Bild 30:** Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von TRPA1 im Septum
- Bild 31:** Expression von ACCN3 in den Regionen
- Bild 32:** Frontalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von ACCN3 zwischen Septum und lateraler Nasenwand
- Bild 33:** Mediansagittalschnitt der Nase, Darstellung signifikanter Unterschiede in der Expression von ACCN3 im Septum
- Bild 34:** Expression von TRPM8 in den Regionen
- Bild 35:** Frontalschnitt der Nase, Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TRPM8 zwischen Septum und lateraler Nasenwand darstellbar
- Bild 36:** Mediansagittalschnitt der Nase, Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TRPM8 im Septum darstellbar

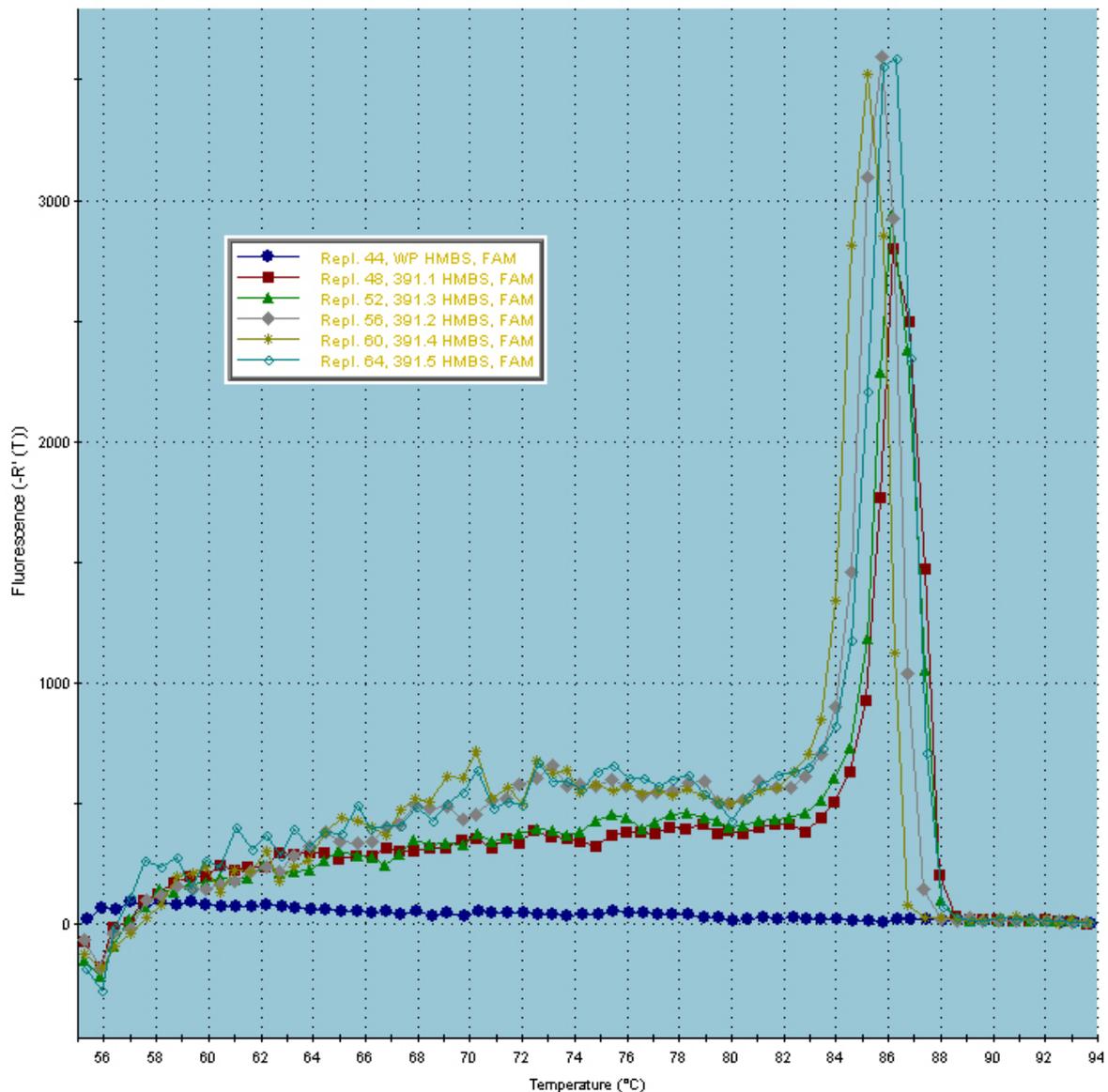
13 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-DNA
cm ²	Quadratcentimeter
DNA	desoxyribonucleic acid, deutsch: Desoxyribonukleinsäuren
Enac/DEG	Epithelialer Natriumkanal/Degenerinen
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes-Protein
h	Stunde
HNO	Hals-Nasen-Ohren
K ⁺	Kalium
M.	Morbus
M.	Muskulus
N.	Nervus
Na ⁺	Natrium
nm	Nanometer
NMP	negative mucosa potential, deutsch: negatives Mukosapotential
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-chain-reaction, deutsch: Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadische Logarithmus (= „Zehnerlogarithmus“) der Wasserstoffionen-Aktivität
RNA	ribonucleic acid, deutsch: Ribonukleinsäuren
RNAsen	Ribonukleasen
rpm	rounds per minute

s	Sekunde
scRNA	small cytoplasmatic RNA
snRNA	small nuclear RNA
T _m	Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett

14.2 Anhang 2, Schmelzkurven der verwendeten Primer

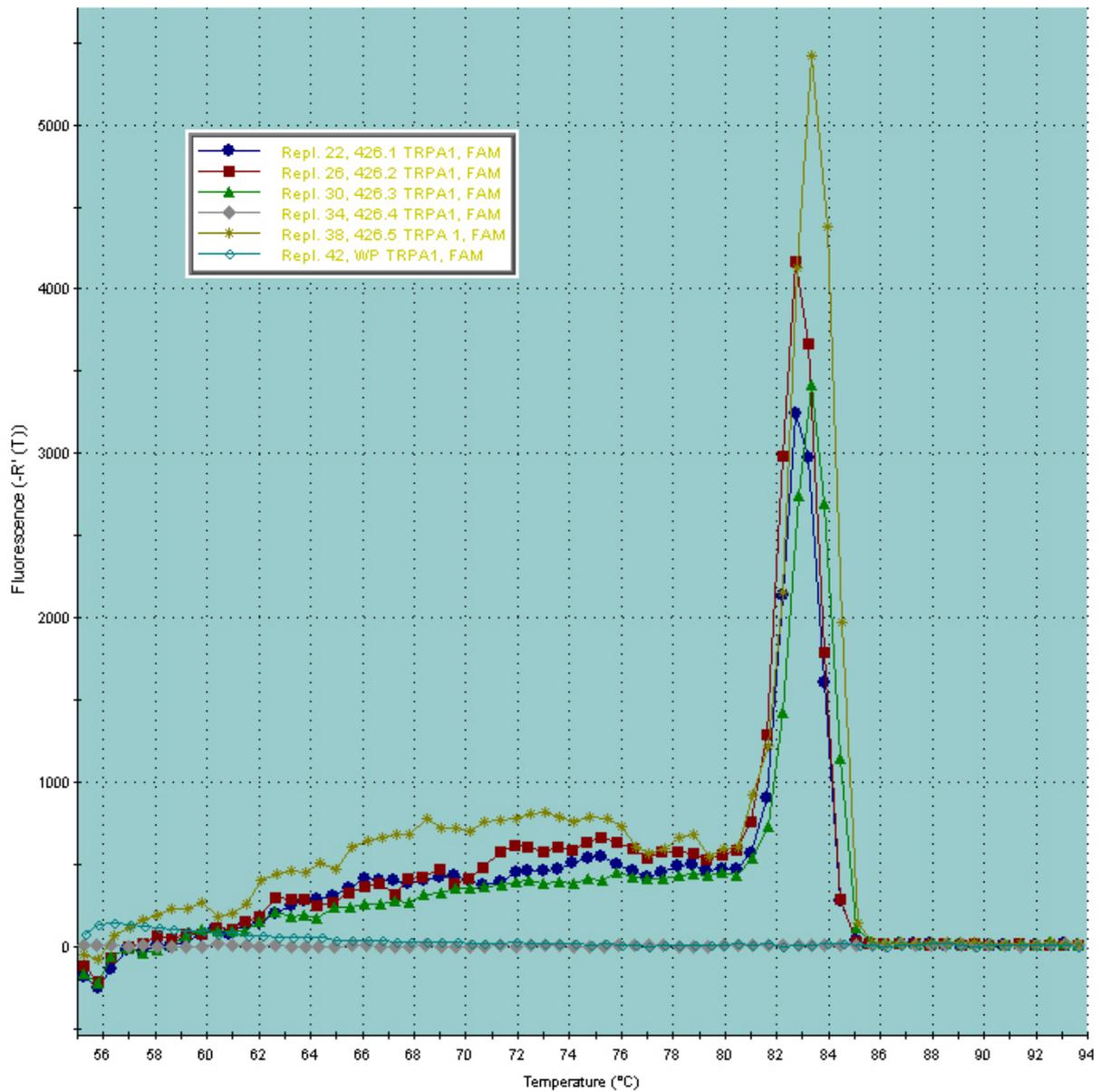
Dissociation Curve



Schmelzkurven für den Primer HMBS in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe.

Die Kurve zeigt, dass das Maximum (Schmelzpunkt des Amplifikates) bei 86,0 °C liegt. Ebenfalls zeigt die Grafik, dass keine Verunreinigungen durch andere Produkte entstanden sind.

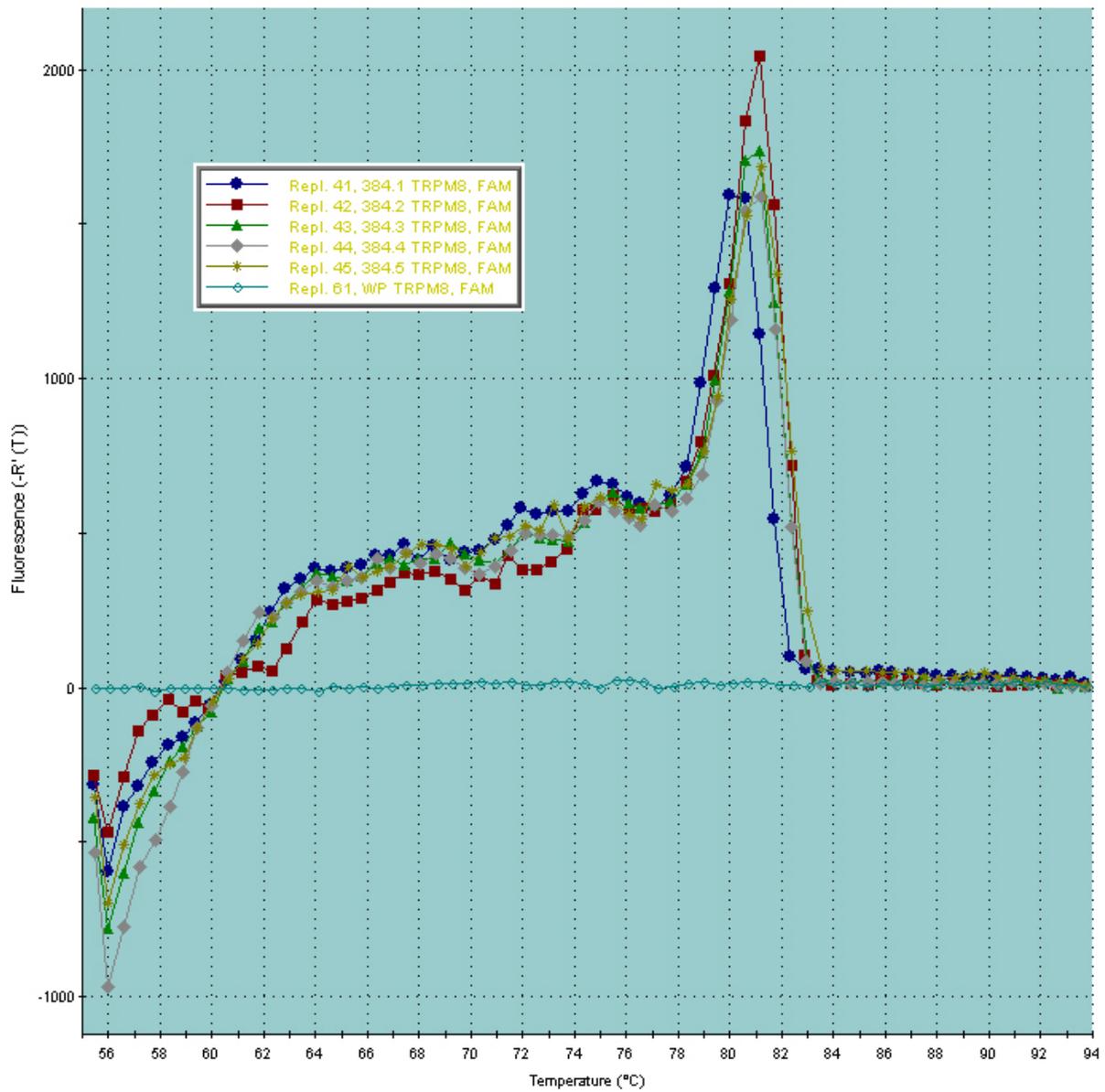
Dissociation Curve



Schmelzkurven für den Primer TRPA1 in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe.

Die Kurve zeigt, dass das Maximum (Schmelzpunkt des Amplifikates) bei 83,0 °C liegt. Ebenfalls zeigt die Grafik, dass keine Verunreinigungen durch andere Produkte entstanden sind.

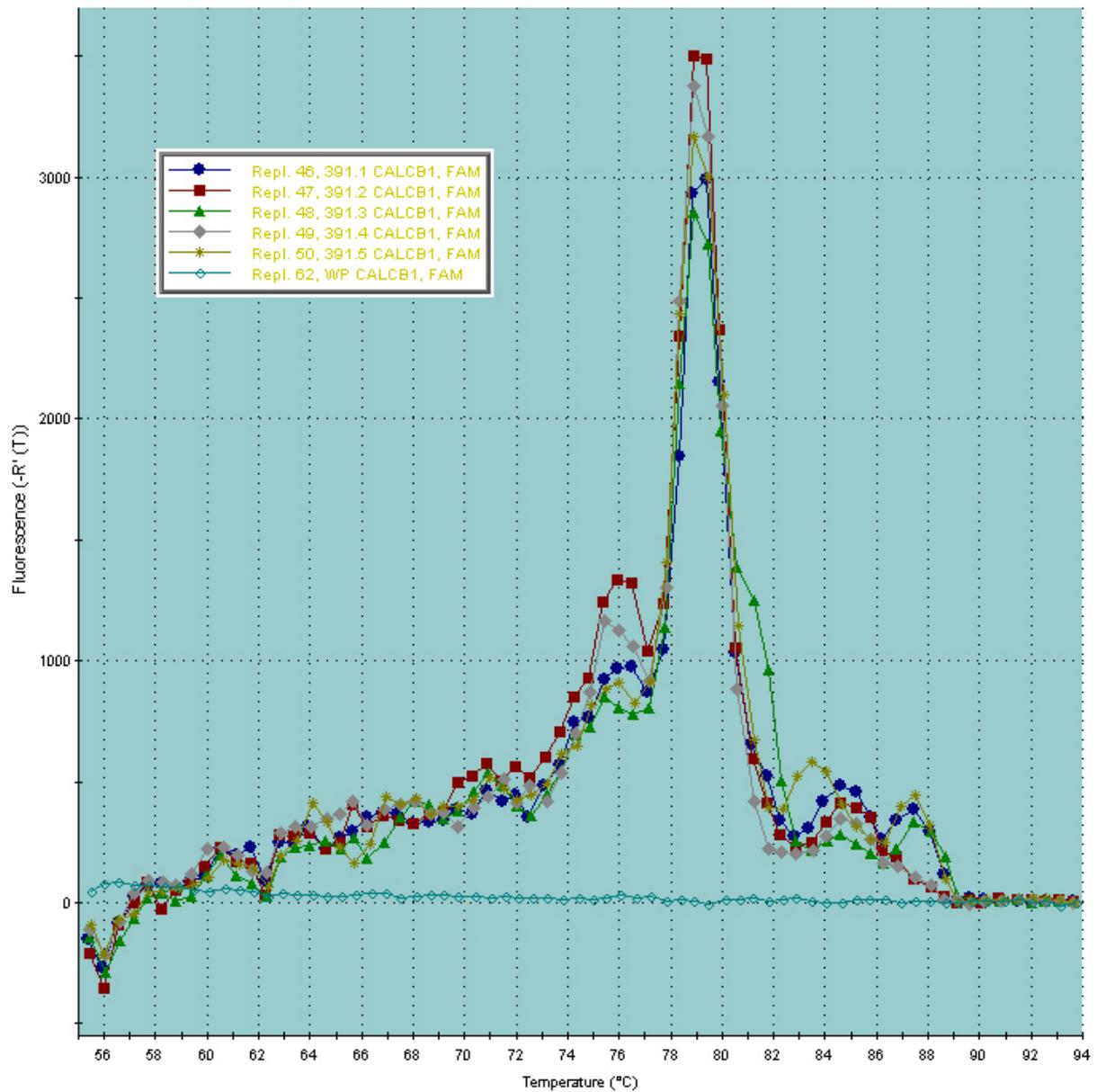
Dissociation Curve



Schmelzkurven für den Primer TRPM8 in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe.

Die Kurve zeigt, dass das Maximum (Schmelzpunkt des Amplifikates) bei 81,0 °C liegt. Ebenfalls zeigt die Grafik, dass keine Verunreinigungen durch andere Produkte entstanden sind.

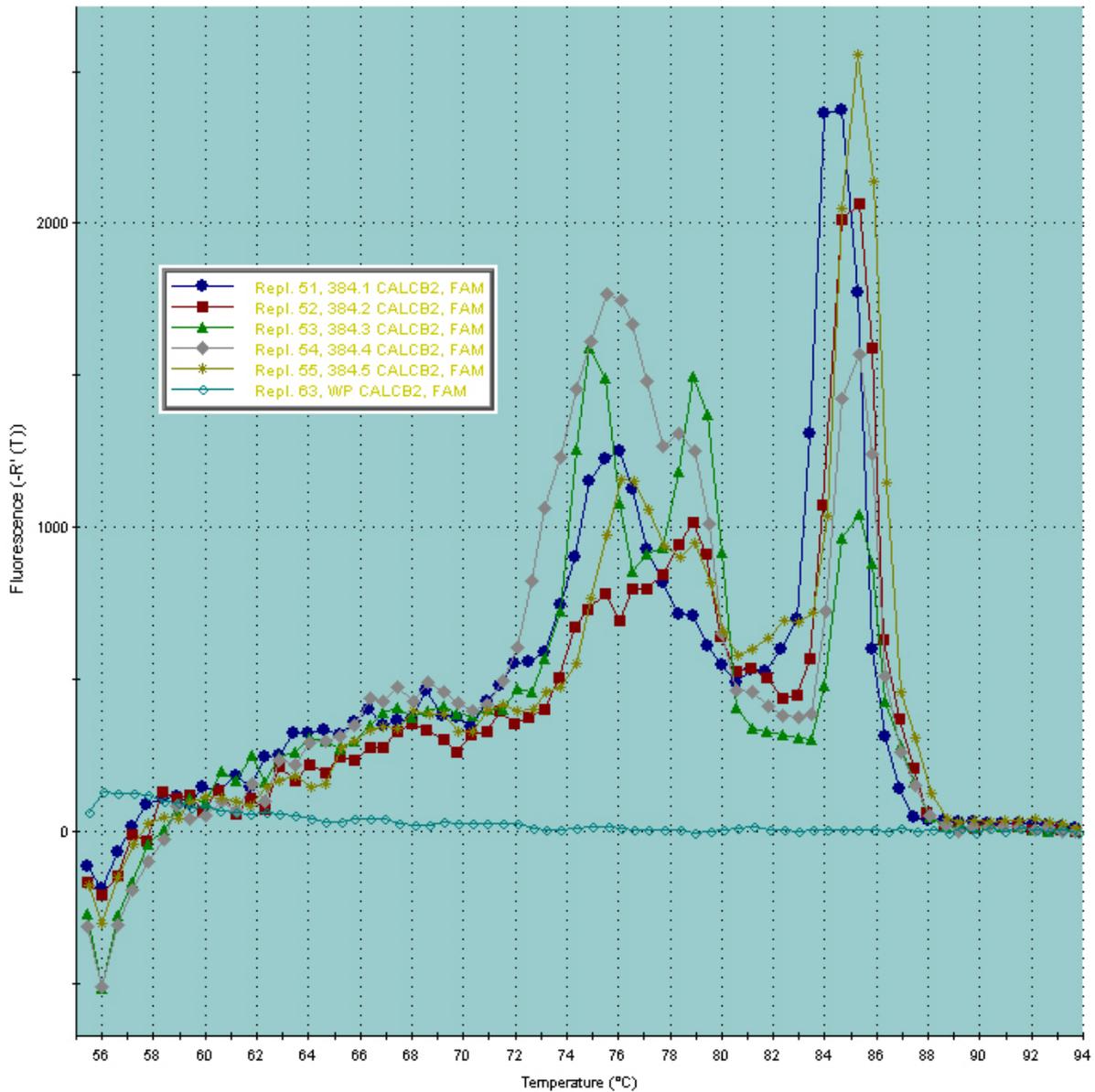
Dissociation Curve



Schmelzkurven für den Primer CALCB1 in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe.

Ebenfalls deutet die Grafik an, dass der Primer nicht optimal und eine statistische Auswertung schwierig ist.

Dissociation Curve



Schmelzkurven für den Primer CALCB2 in den fünf zu untersuchenden Regionen zweier Probanden inklusive Kontroll-Wasserprobe.

Die Kurve zeigt uneindeutig, dass das Maximum (Schmelzpunkt des Amplifikates) bei 84,8 °C liegt. Ebenfalls deutet die Grafik an, dass der Primer nicht optimal und eine statistische Auswertung schwierig ist.

15