

MECHANISMEN DER STICKSTOFFMONOXID-VERMITTELTEN NOZIZEPTION

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Achim Schmidtko
aus Saarbrücken

Frankfurt am Main (2004)
(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger

Datum der Disputation: 23. März 2004

1	Einleitung	1
1.1	Spinale nozizeptive Transmission.....	2
1.1.1	Synaptische Plastizität der spinalen nozizeptiven Transmission.....	2
1.1.2	NO und cGMP als Mediatoren der spinalen nozizeptiven Transmission.....	5
1.2	Synaptische Vesikel.....	7
1.2.1	Der Zyklus der synaptischen Vesikel.....	7
1.2.2	Zusammensetzung synaptischer Vesikel.....	9
1.2.3	Synapsin.....	10
1.2.4	Rab3 und Rabphilin.....	14
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Versuchstiere.....	19
2.2	Implantation intrathekaler Katheter.....	19
2.3	Im Formalintest verwendete Prüfsubstanzen.....	20
2.3.1	Übersicht über die Prüfsubstanzen.....	20
2.3.2	Applikation der Prüfsubstanzen.....	20
2.4	Unterdrückung der Synapsin 2-Proteinexpression mit Antisense-Oligonukleotiden.....	21
2.4.1	Das Antisense-Prinzip.....	21
2.4.2	Versuchsdurchführung.....	21
2.5	Nozizeptive Tiermodelle.....	22
2.5.1	Formalintest.....	22
2.5.2	Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion.....	23
2.5.3	Hot-Plate-Test.....	24
2.6	Gewebeentnahme.....	24
2.7	Proteinanalytik.....	25
2.7.1	Proteinextraktion aus den Gewebeproben.....	25
2.7.2	Messung der Proteinkonzentration.....	26
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.7.4	Western Blot.....	27
2.7.5	Antikörper-Inkubation.....	28
2.7.6	Detektion.....	29
2.8	RNA-Analytik.....	29
2.8.1	RNA-Extraktion aus den Gewebeproben.....	29
2.8.2	Realtime RT-PCR.....	30
2.8.3	Berechnung der relativen mRNA-Menge.....	32
2.8.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	34

2.9	Statistik	34
2.10	Chemikalien und Reagenzien.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Formalintest nach pharmakologischer Beeinflussung bekannter cGMP-Targets.....	38
3.1.1	Rp-8-Br-cGMPS	38
3.1.2	8-Br-cGMP.....	38
3.1.3	Kombination 8-Br-cGMP + Rp-8-Br-cGMPS	41
3.1.4	L-cis-Diltiazem, EHNA und Milrinon	42
3.2	PKG-1-Expression im Lumbalmark	44
3.2.1	PKG-1-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation.....	44
3.2.2	Beeinflussung der PKG-1-Proteinexpression durch Morphin, Rp-8-Br-cGMPS und 8-Br-cGMP.....	45
3.3	Synapsin 2b-Expression im Lumbalmark	48
3.3.1	Synapsin 2b-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation.....	48
3.3.2	Synapsin 2b-mRNA-Expression nach nozizeptiver Stimulation.....	49
3.3.3	Synapsin 2b-Proteingehalt in CHAPS-unlöslichen Fraktionen.....	50
3.3.4	Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit Analgetika	51
3.3.5	Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit NOS-Modulatoren	52
3.3.6	Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit cGMP-Analoga.....	53
3.4	Formalintest mit Ratten nach Unterdrückung der Synapsin 2-Expression.....	56
3.5	Nozizeptive Tests mit Synapsin 2-Knockout-Mäusen	58
3.5.1	Formalintest.....	58
3.5.2	Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion	60
3.5.3	Hot-Plate-Test	60
3.6	Rabphilin-Expression im Lumbalmark	61
3.6.1	Rabphilin-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation.....	61
3.6.2	Rabphilin-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit NOC-5 oder cGMP-Analoga.....	63
4	Diskussion	65
4.1	PKG-1 als Target der NO-vermittelten Nozizeption.....	65
4.2	Synapsin 2b als Target der NO-vermittelten Nozizeption	70
4.3	Rabphilin als Target der NO-vermittelten Nozizeption	76
5	Zusammenfassung	78
6	Abkürzungsverzeichnis	80
7	Literaturverzeichnis	82

8	Anhang	91
8.1	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	91
8.2	Sonstige Veröffentlichungen.....	91
8.3	Lebenslauf.....	93

1 Einleitung

Schmerzen zählen zu den am häufigsten berichteten körperlichen Beschwerden. Im 1998 durchgeführten Bundes-Gesundheitssurvey, einer repräsentativen Befragung der bundesdeutschen Allgemeinbevölkerung, berichteten 47 % der Teilnehmer über „leichte und mäßige“ Schmerzen innerhalb der letzten vier Wochen. 10 % gaben an, unter „starken und sehr starken“ Schmerzen gelitten zu haben (Bellach et al. 2000; Kürten 2001). Ein vergleichsweise hoher Anteil der Schmerzen ist als chronisch einzustufen, da sie länger anhaltend oder dauerhaft bestehen oder aber immer wiederkehrend auftreten. Je nach Untersuchung und Definition reicht die Prävalenz chronischer Schmerzen in der Allgemeinbevölkerung von 10 % bis über 40 %, was mit erheblichen persönlichen Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten, aber auch mit hohen Kosten für das Gesundheitswesen verbunden ist (Nickel et al. 2001; Verhaak et al. 1998). Insbesondere chronische Schmerzen können mit den derzeit zur Verfügung stehenden Arzneistoffen oftmals nur unzureichend oder unter Inkaufnahme von z.T. erheblichen Nebenwirkungen therapiert werden, so dass ein hoher Forschungsbedarf bei der Suche nach Therapiealternativen besteht.

Schmerzen führen im Gegensatz zu vielen anderen Sinnesempfindungen nicht zu einer Habituation. Vielmehr wird bei anhaltenden Schmerzen oft eine Steigerung der Empfindlichkeit des nozizeptiven Systems beobachtet. Klinisch kann sich dies als Allodynie (Schmerzauslösung durch Reize, die normalerweise keinen Schmerz verursachen), Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindung auf physiologisch schmerzhaft Reize) oder Spontanschmerz äußern. Zur Steigerung der Empfindlichkeit tragen sowohl periphere Mechanismen im Bereich der Nozizeptoren als auch zentrale Mechanismen bei. Letztere beinhalten Vorgänge auf allen Ebenen der an der Schmerzverarbeitung beteiligten Neuronenpopulationen. Aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass den exzitatorischen Hinterhorn-Neuronen des Rückenmarks bei der Veränderung der Empfindlichkeit des nozizeptiven Systems eine besondere Bedeutung zukommt (Malmberg et al. 1993; Yaksh et al. 1999). Somit bildet die Aufklärung der molekularen Mechanismen der spinalen nozizeptiven Transmission eine Grundlage für die rationale Entwicklung neuer Analgetika.

1.1 Spinale nozizeptive Transmission

1.1.1 Synaptische Plastizität der spinalen nozizeptiven Transmission

Im Hinterhorn der grauen Substanz des Rückenmarks findet die erste synaptische Übertragung nozizeptiver Signale statt, welche von Nozizeptoren aufgenommen und über dünn-myelinisierte A δ -Fasern und nicht-myelinisierte C-Fasern weitergeleitet werden (Messlinger 1997). In der oberflächlichen Schicht des Hinterhorns (Lamina I) sind Neurone lokalisiert, die ausschließlich mit nozizeptiven Fasern synaptischen Kontakt aufnehmen, und deshalb als nozizeptiv-spezifisch (NS) bezeichnet werden. In den Laminae II und III findet man Dendriten von Neuronen, die neben nozizeptiven Signalen auch andere (z.B. mechanorezeptive) Afferenzen empfangen können und daher WDR-Neurone („wide-dynamic range“) genannt werden (Messlinger 2002). Die Axone der NS- und WDR-Neurone kreuzen überwiegend nach kontralateral und steigen v.a. über den Tractus spinothalamicus lateralis zu höheren Zentren des ZNS auf (siehe Abbildung 1-1). Wichtige Stationen der zentralen Schmerzverarbeitung sind der Thalamus, der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex (verantwortlich für die sensorisch-diskriminative Komponente des Schmerzes), sowie das limbische System (verantwortlich für die affektive Komponente des Schmerzes).

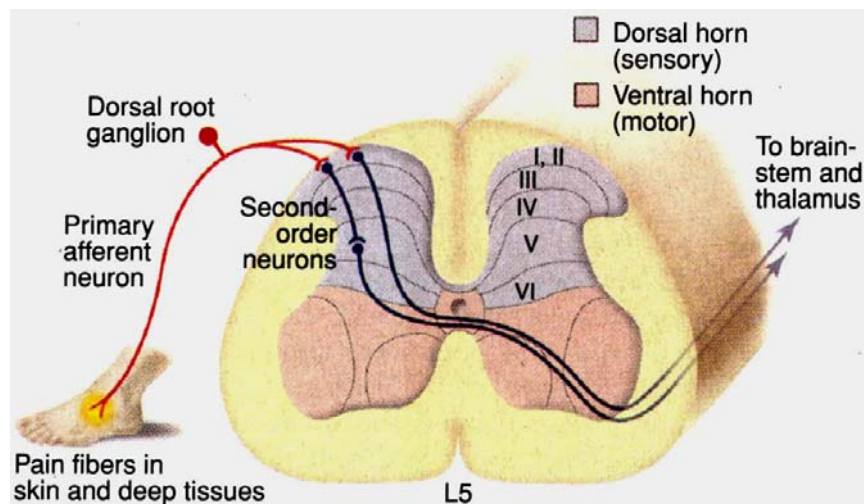


Abbildung 1-1: Aufsteigendes nozizeptives System, Querschnitt durch das Rückenmark in Höhe von L5. Die Laminae I bis VI sind mit römischen Ziffern beschriftet (aus: Iadarola et al. 1997).

Die synaptische Übertragung der nozizeptiven Signale im Hinterhorn des Rückenmarks wird in erster Linie durch Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat vermittelt, welche drei verschiedene Rezeptortypen stimulieren kann:

- den AMPA-Rezeptor, wodurch eine kurze Depolarisation hervorgerufen wird
- metabotrope Glutamatrezeptoren, deren Aktivierung länger dauernde Depolarisationen bewirkt
- den NMDA-Rezeptor, der erst nach Vordepolarisation der Membran aktiviert werden kann.

Bei schwacher, kurzzeitiger nozizeptiver Stimulation führt insbesondere die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zu einer Erregung der Hinterhornneuronen. Diese leiten die Information dann direkt oder über Interneurone zu den höheren Zentren des ZNS weiter, so dass schließlich der Sinneseindruck „Schmerz“ entsteht. Bei starker, lang anhaltender nozizeptiver Stimulation werden größere Glutamatmengen ausgeschüttet, die zusätzlich eine Stimulation der NMDA-Rezeptoren und metabotropen Glutamatrezeptoren bewirken. Darüber hinaus kommt es zur Freisetzung weiterer Botenstoffe wie z.B. Substanz P, welche durch Stimulation von NK1-Rezeptoren die postsynaptische Antwort moduliert (Woolf et al. 1999). Letzten Endes führt eine lang anhaltende nozizeptive Stimulation zu einer Veränderung der Empfindlichkeit des nozizeptiven Systems, was klinisch u.a. mit der Entwicklung einer Hyperalgesie verbunden ist.

Von besonderer Bedeutung für die Ausbildung der Hyperalgesie ist die Aktivierung spinaler NMDA-Rezeptoren (Coderre et al. 1992). So konnten z.B. durch Applikation von NMDA-Antagonisten sowohl die durch nozizeptive Stimuli hervorgerufenen elektrophysiologischen Veränderungen im Hinterhorn des Rückenmarks als auch die damit verbundene Hyperalgesie vermindert werden (Haley et al. 1990; Coderre et al. 1992). Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt zu einer Aufhebung der Blockade eines unspezifischen Kationenkanals, wodurch es zu einem Einstrom von Kationen in das Neuron kommt. Insbesondere durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration werden zahlreiche Prozesse in Gang gesetzt, die u.a. zur Aktivierung der neuronalen NO-Synthase (siehe Kapitel 1.1.2), der Proteinkinasen A und C (PKA und PKC), der Phospholipase A₂ (PLA₂), sowie zu Änderungen der Genexpression führen (Yaksh et al. 1999). Durch die PKA- und PKC-Stimulation werden zahlreiche Targets phosphoryliert. Dazu zählen auch NMDA-Rezeptoren, deren Empfindlichkeit durch die Phosphorylierung gesteigert wird (Leonard et al. 1997). Die Aktivierung der PLA₂ führt zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Plasmamembran und nachfolgend, unter Vermittlung von Cyclooxygenasen (COX 1 und 2), zur Bildung von Prostaglandin H₂. Aus Prostaglandin H₂ werden verschiedene Prostanoid synthetisiert, von denen Prostaglandin E₂ (PGE₂) als pronozizeptiver Mediator am besten untersucht ist. PGE₂ kann zur Präsynapse diffundieren und dort über die Stimulation von EP2-Rezeptoren die cAMP-Konzentration steigern, was u.a. in einer Aktivierung der PKA resultiert (Svensson et al. 2002). Die erwähnten Signalwege der nozizeptiven Transmission im Rückenmark sind in Abbildung 1-2 schematisch dargestellt.

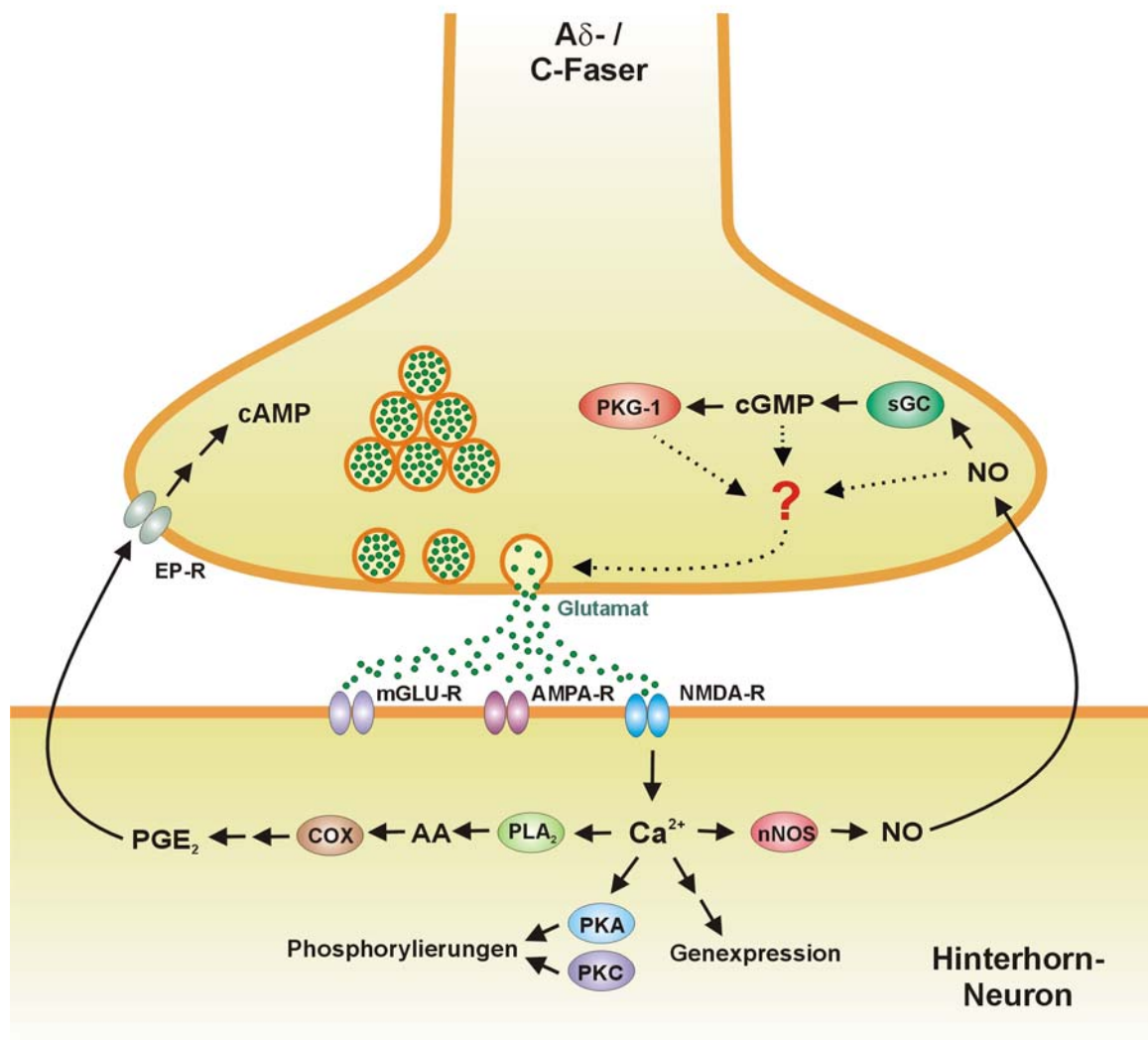


Abbildung 1-2: Synaptische Plastizität der spinalen nozizeptiven Transmission (vereinfacht, z.T. hypothetisch). Eine starke bzw. lang anhaltende nozizeptive Stimulation führt zu einer verstärkten Glutamatausschüttung, Erregung von NMDA-Rezeptoren und Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration in der Postsynapse. Dadurch werden u.a. PKA und PKC aktiviert und die Genexpression beeinflusst. Außerdem werden Mediatorstoffe (PGE_2 , NO, u.a.) gebildet, welche zur Präsynapse diffundieren und die Glutamatausschüttung beeinflussen können. NO bewirkt in der Präsynapse die Bildung von cGMP, welches PKG-1 stimulieren kann. Das Fragezeichen markiert die Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Weitere Erläuterungen: siehe Text.

Abkürzungen: AA: Arachidonsäure; AMPA-R: AMPA-Rezeptor; COX: Cyclooxygenase; EP-R: Prostaglandin E-Rezeptor; mGLU-R: metabotroper Glutamatrezeptor; NMDA-R: NMDA-Rezeptor; nNOS: neuronale NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; PGE_2 : Prostaglandin E_2 ; PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase; PKC: Proteinkinase C; PKG-1: cGMP-abhängige Proteinkinase 1; PLA₂: Phospholipase A₂; sGC: lösliche Guanylatcyclase.

1.1.2 NO und cGMP als Mediatoren der spinalen nozizeptiven Transmission

Der über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt auch zu einer Stimulation der neuronalen NO-Synthase (nNOS), welche über das Protein PSD-95 am NMDA-Rezeptor verankert ist (Brenman et al. 1997). Mit immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass nNOS in den Laminae I-IV und X des Rückenmarks der Ratte vorhanden ist (Saito et al. 1994) und nach peripherer nozizeptiver Stimulation im Bereich des Hinterhorns hochreguliert wird (Lam et al. 1996; Maihofner et al. 2000). Durch die Stimulation der nNOS wird Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, welches zur Ausbildung der Hyperalgesie entscheidend beiträgt. Dementsprechend wurden nach Applikation von Inhibitoren der nNOS antihyperalgetische Effekte beobachtet. Beispielsweise führte die Verabreichung des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NAME oder der nNOS-spezifischen Inhibitoren 7-NI und TRIM zu einer Reduktion der nozizeptiven Antwort im Formalintest (Malmberg et al. 1993; Moore et al. 1991; Moore et al. 1993; Handy et al. 1996). Die durch Carageenan-Injektion induzierte Hyperalgesie auf mechanische oder thermische Reize konnte durch NOS-Inhibitoren ebenfalls reduziert werden (Handy et al. 1998). Im Gegensatz dazu wurde durch Applikation von NO-Donoren sowohl eine mechanische als auch eine thermische Hyperalgesie hervorgerufen (Machelska et al. 1998; Inoue et al. 1997). Darüber hinaus bewirkte die intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Verabreichung des NO-Donors NOC-18 eine Verstärkung der nozizeptiven Antwort im Formalintest (Shibuta et al. 1996). Passend zu den o.g. Beobachtungen und der daraus gefolgerten Bedeutung von Glutamat und NO für die Ausbildung der Hyperalgesie wurden nach Formalin- oder Zymosaninjektion in die Hinterpfote eines Versuchstieres im Hinterhorn erhöhte Konzentrationen von Glutamat und den NO-Metaboliten Nitrit / Nitrat gemessen (Okuda et al. 2001; Vetter et al. 2001).

NO ist ein leicht membrangängiges Gas, das in der NO-produzierenden Zelle, aber auch in benachbarten Zellen wirksam ist. Es entfaltet seine Wirkungen durch Beeinflussung zahlreicher Zielstrukturen (zur Übersicht: siehe Garthwaite et al. (1995), Brenman et al. (1997) und Davis et al. (2001)). Das am besten untersuchte NO-Target ist die lösliche Guanylatcyclase (sGC), welche die Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintri-phosphat (GTP) katalysiert. Vermutlich werden die hyperalgetischen NO-Effekte im Rückenmark überwiegend durch Stimulation dieses Enzyms hervorgerufen, denn mit Inhibitoren der sGC konnte in mehreren Tiermodellen eine antihyperalgetische Wirkung erzielt werden. So wurde z.B. die Glutamat-induzierte thermische Hyperalgesie durch die i.t. verabreichten sGC-Inhibitoren LY 83583 oder ODQ vermindert (Ferreira et al. 1999). Auch im Formalintest wirkte ODQ antinozizeptiv (Tao et al. 2002). Darüber hinaus führte eine Formalininjektion in eine Hinterpfote nach 2 – 4 Tagen zu einer Hochregulation der α_1 -Untereinheit der sGC im Lumbalmark (Tao et al. 2002).

Bekannte Targets des cGMP sind cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG-1 und -2), zyklisch-Nukleotid gesteuerte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) und Phosphodiesterasen (PDE-2, -3 und -5). Die meisten physiologischen cGMP-Effekte werden durch Stimulation der PKG-1 hervorgerufen (Ruth 1999). Auch im ZNS nimmt PKG-1 als cGMP-Target eine zentrale Stellung ein, z.B. bei der cGMP-vermittelten Modulation der Neurotransmitterfreisetzung, Beeinflussung der Genexpression oder bei Lernvorgängen (Wang et al. 1997). PKG-1 ist auch in Spinalganglien und im Hinterhorn des Rückenmarks vorhanden, in letzterem wird jedoch nur die α -Isoform (PKG-1 α) exprimiert (Qian et al. 1996; Tao et al. 2000). Dementsprechend könnte die Stimulation der PKG-1 auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der NO-induzierten Hyperalgesie spielen. Diese Hypothese wird u.a. gestützt durch die Beobachtung, dass die i.t. Verabreichung des PKG-1-Inhibitors Rp-8-CPT-cGMPS die Schwelle für eine Isofluran-Anästhesie reduziert und die durch NMDA oder NO-Donoren induzierte thermische Hyperalgesie vermindert (Tao et al. 2000). Diese Befunde lassen erwarten, dass durch Stimulation der PKG-1 im Hinterhorn ein pronozizeptiver Effekt erzielt wird. Jedoch führt die Stimulation der PKG-1 in anderen Bereichen des ZNS zu einer Hemmung der synaptischen Übertragung, z. B. im Cerebellum und im Striatum (Hartell 1994; Calabresi et al. 1999). Im Hippocampus kann sogar durch Aktivierung der PKG sowohl eine Hemmung (Langzeit-Depression) als auch eine Steigerung (Langzeit-Potenzierung) der synaptischen Übertragung induziert werden (Arancio et al. 1995; Santschi et al. 1999; Zhuo et al. 1994). PKG-1 kann somit in verschiedenen ZNS-Regionen unterschiedliche Effekte vermitteln.

NO und cGMP können die synaptische Übertragung offenbar auch unabhängig von einer Stimulation der PKG-1 beeinflussen. Sequeira et al. (1999) berichten, dass NO die Glutamat-Freisetzung in Hippocampus-Neuronen sowohl über PKG-abhängige als auch über PKG-unabhängige Mechanismen moduliert. Dabei ist die NO-Konzentration für die Beteiligung der PKG entscheidend: Niedrige NO-Konzentrationen modulieren die Glutamat-Freisetzung PKG-abhängig, während bei höheren NO-Konzentrationen die Glutamat-Freisetzung cGMP-abhängig, aber PKG-unabhängig beeinflusst wird (Sequeira et al. 1999). Andere Studien führten zu der Annahme, dass NO die Neurotransmitter-Ausschüttung ganz unabhängig von einer cGMP-Produktion modulieren kann, z.B. die Dopamin-Freisetzung im Striatum (Lonart et al. 1993) oder die Acetylcholin-Freisetzung im Hippocampus (Suzuki et al. 1997).

Bezüglich der Mechanismen, über die NO, cGMP oder PKG-1 die synaptische Übertragung letzten Endes modulieren, ist bisher wenig bekannt. Einige Autoren vermuten eine direkte Beeinflussung der Proteine, welche innerhalb der Präsynapse den Zyklus der synaptischen Vesikel (siehe Kapitel 1.2.) regulieren. Beispielsweise wurde eine S-Nitrosylierung der Protonenpumpe synaptischer Vesikel durch NO nachgewiesen, was zu einer Hemmung der Glutamat-Aufnahme in die Vesikel führt (Wolosker et al. 1996). Auch das Andocken der synaptischen Vesikel an die präsynaptische Membran

sowie die Neurotransmitter-Ausschüttung können offenbar durch NO direkt moduliert werden (Meffert et al. 1996). Kürzlich wurde berichtet, dass nNOS über ein Adapterprotein (CAPON) mit Synapsinen verbunden ist, welche Bestandteil der Membran synaptischer Vesikel sind und eine wichtige Rolle bei der Regulation des Vesikelzyklus spielen (Jaffrey et al. 2002). Somit könnte NO auch durch Interaktion mit Synapsinen die synaptische Übertragung direkt beeinflussen. Der Zyklus der synaptischen Vesikel und die Proteinfamilie der Synapsine werden im nächsten Kapitel erläutert.

1.2 Synaptische Vesikel

1.2.1 Der Zyklus der synaptischen Vesikel

Klassische Neurotransmitter wie Glutamat werden innerhalb der Präsynapse in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei Bedarf per Exozytose in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Vesikel durchlaufen dabei einen Zyklus, der neben der besonders schnellen, Ca^{2+} -abhängigen Exozytose die Regeneration der Vesikel mit Wiederaufnahme des Neurotransmitters gewährleistet. In Abbildung 1-3 sind die wesentlichen Stationen des Zyklus in der Präsynapse dargestellt (Sudhof 1995; Fon et al. 2001):

- *Andocken und Reifung:* Mit Neurotransmitter beladene synaptische Vesikel docken an die präsynaptische Membran an. Dies geschieht zielgerichtet in der sog. aktiven Zone, auf deren gegenüberliegenden Seite der synaptische Spalt und die mit Neurotransmitter-Rezeptoren angereicherte postsynaptische Membranverdichtung liegen. Danach müssen die Vesikel noch einen Reifungsprozess vollziehen, um für die Ca^{2+} -abhängige Membranfusion empfänglich zu sein. Dieser Prozess führt zu einer partiellen Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran.
- *Fusion / Exozytose:* Gereifte Vesikel können durch einen Ca^{2+} -Influx im Rahmen eines Aktionspotentials innerhalb von weniger als 0,3 ms mit der präsynaptischen Membran vollständig fusionieren und dadurch den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausschütten. Der Ca^{2+} -Influx erfolgt durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die innerhalb der aktiven Zone in räumlicher Nähe zu den gereiften Vesikeln lokalisiert sind.
- *Recycling:* Leere Vesikel werden internalisiert und vorübergehend mit einem Clathrin-Überzug versehen. Nach Entfernung des Clathrin-Überzuges translozieren die Vesikel von der präsynaptischen Membran weg und nehmen durch einen aktiven Prozess Protonen in ihr Lumen auf. Durch den resultierenden pH-Gradienten können Neurotransmitter über spezifische Transporter im Austausch gegen H^+ in hoher Konzentration angereichert werden. Einige Vesikel stehen danach wieder für ein erneutes Andocken unmittelbar zur Verfügung, andere fusionieren vorübergehend mit Endosomen (Sudhof 2000). Vor kurzem wurde eine weitere Möglichkeit des

Recyclings beschrieben, die eine direkte Wiederauffüllung der Vesikel in der aktiven Zone und somit eine sehr rasche Form der Wiedergewinnung beinhaltet (Pyle et al. 2000).

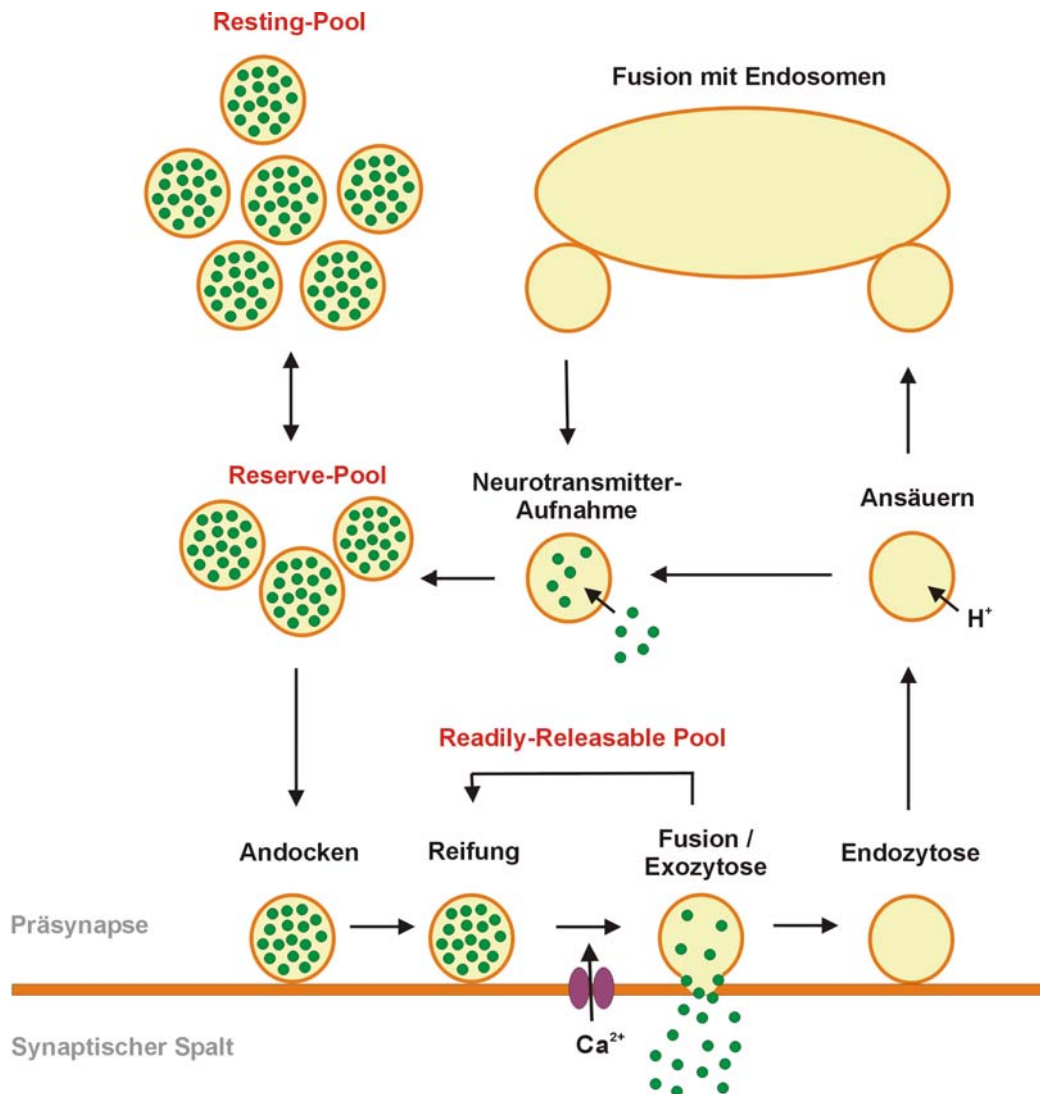


Abbildung 1-3: Der Zyklus der synaptischen Vesikel in der Präsynapse

Entsprechend den unterschiedlichen Formen des Recyclings können die synaptischen Vesikel innerhalb der Präsynapse drei verschiedenen Pools zugeordnet werden (siehe Abbildung 1-3). Im „Readily-Releasable Pool“ im Bereich der aktiven Zone befinden sich nur wenige (5 – 8) Vesikel, die jedoch nach der Exozytose sehr schnell regeneriert werden und die höchste Durchlauftrate besitzen. Der „Reserve Pool“ umfasst 17 – 20 Vesikel, welche an Bestandteile des Zytoskeletts gebunden vorliegen und bei Bedarf zur aktiven Zone befördert werden. Diese beiden Pools nehmen aktiv an der Neurotransmitterfreisetzung teil und gewährleisten bei normaler Stimulation den ständigen Nachschub Neurotransmitter-beladener Vesikel. Der größte Teil der Vesikel (ca. 200) befindet sich jedoch im

„Resting Pool“, der unter normalen Bedingungen nur wenig an der Neurotransmitterfreisetzung teilnimmt und eine Reserve bei erhöhtem Neurotransmitterbedarf darstellt (Sudhof 2000).

Der Zyklus der synaptischen Vesikel wird durch komplexe Wechselwirkungen zahlreicher Proteinfamilien reguliert (Sudhof 1995). Von entscheidender Bedeutung für den Transport der Vesikel innerhalb der Präsynapse und für die regelrechte Exozytose sind die Proteine, die Bestandteil der Membran der Vesikel oder mit diesen assoziiert sind.

1.2.2 Zusammensetzung synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel sind relativ kleine Organellen (Durchmesser: ca. 50 nm), in denen Neurotransmittermoleküle in hoher Konzentration gespeichert werden. Ihre Funktionalität wird v.a. durch die Vesikelmembran vermittelt, welche pro Vesikel schätzungsweise ca. 12.000 Phospholipidmoleküle und ca. 200 Proteinmoleküle enthält (Fernandez-Chacon et al. 1999). Die Proteine der Vesikelmembran können in zwei funktionelle Klassen eingeteilt werden: (1) Transporterproteine, die die Aufnahme von Neurotransmittern und anderen Komponenten in die Vesikel vermitteln und (2) Verkehrsproteine, die die Bewegungen der Vesikel in der Synapse steuern.

Zu der ersten Gruppe zählt eine aus mindestens 13 Untereinheiten bestehende ATP-abhängige Protonenpumpe, die aktiv H^+ in die Vesikel aufnimmt und so einen Protonengradienten aufbaut. Die Aufnahme der Neurotransmitter erfolgt über spezifische Transporter im Austausch gegen H^+ . Bisher sind spezifische Transporter für Glutamat, GABA, Acetylcholin und für Monoamine (Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und evtl. Histamin) identifiziert worden (Fon et al. 2001; Liu et al. 1997). Außerdem verfügen die Vesikel über Transporter für Zn^{2+} , Cl^- und ATP (Palmiter et al. 1996; Fernandez-Chacon et al. 1999).

Die Verkehrsproteine in der Membran synaptischer Vesikel werden derzeit in 11 Proteinfamilien eingeteilt (Fernandez-Chacon et al. 1999), eine schematische Darstellung ist in Abbildung 1-4 zu sehen. Viele dieser Proteinfamilien können mehrere Isoformen ausbilden, die auf verschiedenen synaptischen Vesikeln ein jeweils unterschiedliches Verteilungsmuster zeigen. Obwohl der molekulare Aufbau der meisten Proteinfamilien mit ihren Isoformen gut beschrieben ist, sind bisher nur wenige Proteine bezüglich ihrer Funktionen im Rahmen des Vesikelzyklus charakterisiert worden. Die Verkehrsproteine Synapsin, Rab3 und Rabphilin werden in den beiden nächsten Kapiteln kurz dargestellt.

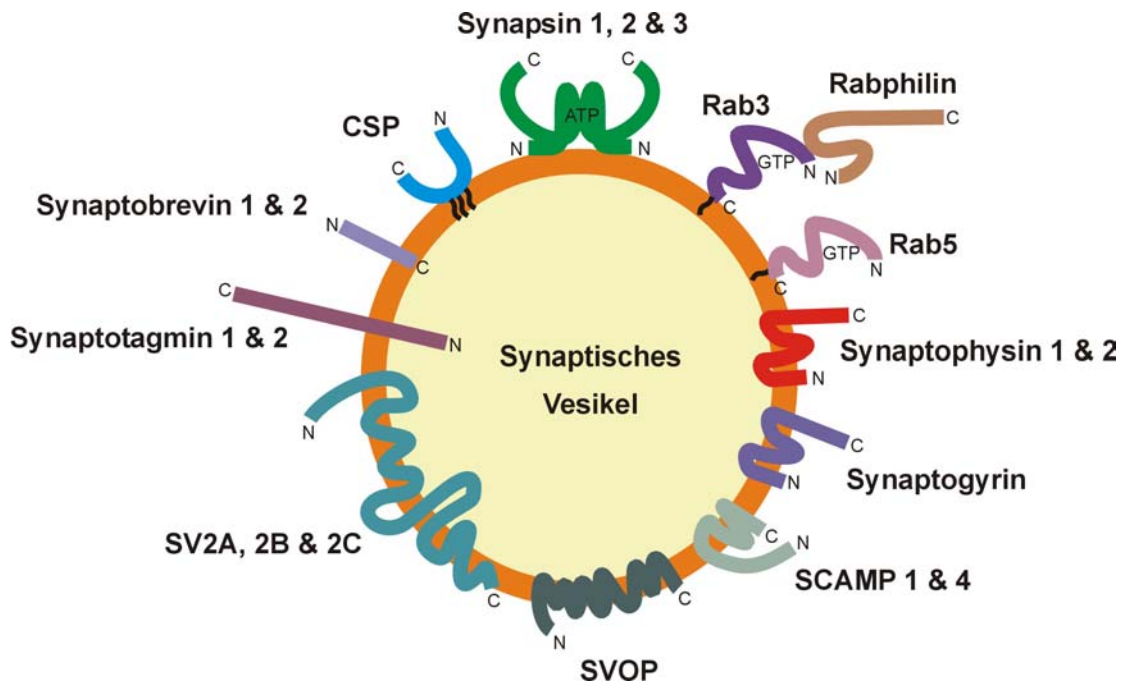


Abbildung 1-4: Verkehrsproteine der Membran synaptischer Vesikel (nach Fernandez-Chacon et al. 1999)

1.2.3 Synapsin

Die Synapsine sind eine Familie neuronaler Phosphoproteine, welche ausschließlich präsynaptisch lokalisiert sind. Sie bilden den größten Teil der Proteine synaptischer Vesikel und machen ca. 1 % des Gesamtproteins im ZNS aus (De Camilli et al. 1990). Bei Vertebraten sind bisher drei Synapsin-Gene identifiziert worden (Synapsin 1, 2 und 3), aus deren Primärtranskripten durch alternatives Spleißen mindestens fünf Isoformen (Synapsin 1a, 1b, 2a, 2b, 3a) gebildet werden (Sudhof et al. 1989; Kao et al. 1998).

Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Primärsequenz wird die Struktur der Synapsin-Isoformen mit einem Domänen-Modell beschrieben (Sudhof et al. 1989), welches schematisch in Abbildung 1-5 dargestellt ist. Am N-terminalen Ende aller Synapsine befinden sich die Domänen A – C, welche bei den aus dem gleichen Synapsin-Gen exprimierten Isoformen identisch sind und im Vergleich zu den anderen Synapsin-Genen ein hohes Maß an Homologie besitzen. Die A-Domäne aller Synapsin-Isoformen beinhaltet Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A und Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase I. Darüber hinaus binden die Synapsine vermutlich über die A-Domäne an Phospholipide der Membran synaptischer Vesikel (Hosaka et al. 1999). Die relativ große C-Domäne, deren Primärstruktur bei Synapsin 1 und 2 zu 78 % identisch ist, besitzt Bindungsstellen u.a. für Actin und ATP. Im Bereich der C-Domäne kann auch ein weiteres Synapsin-Protein gebunden werden, wodurch Homo- bzw. Heterodimere entstehen (Hosaka et al. 1999). Am C-Terminus weisen die Synapsin-Isoformen größere

strukturelle Unterschiede auf. Die D-Domäne, ein nur bei Synapsin 1 vorhandener Prolin-reicher Abschnitt, enthält weitere Phosphorylierungsstellen (u.a. für Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase II, MAP-Kinase und Cyclin-abhängige Kinase 5). Synapsin 2 besitzt ebenfalls einen Prolin-reichen Abschnitt (G-Domäne), der jedoch nicht phosphoryliert wird. Die Domänen E, F, H und I repräsentieren bei Synapsin 1 und 2 die Bereiche, die durch alternatives Spleißen gebildet werden, und stellen somit die strukturellen Unterschiede der Isoformen des gleichen Synapsin-Gens dar.

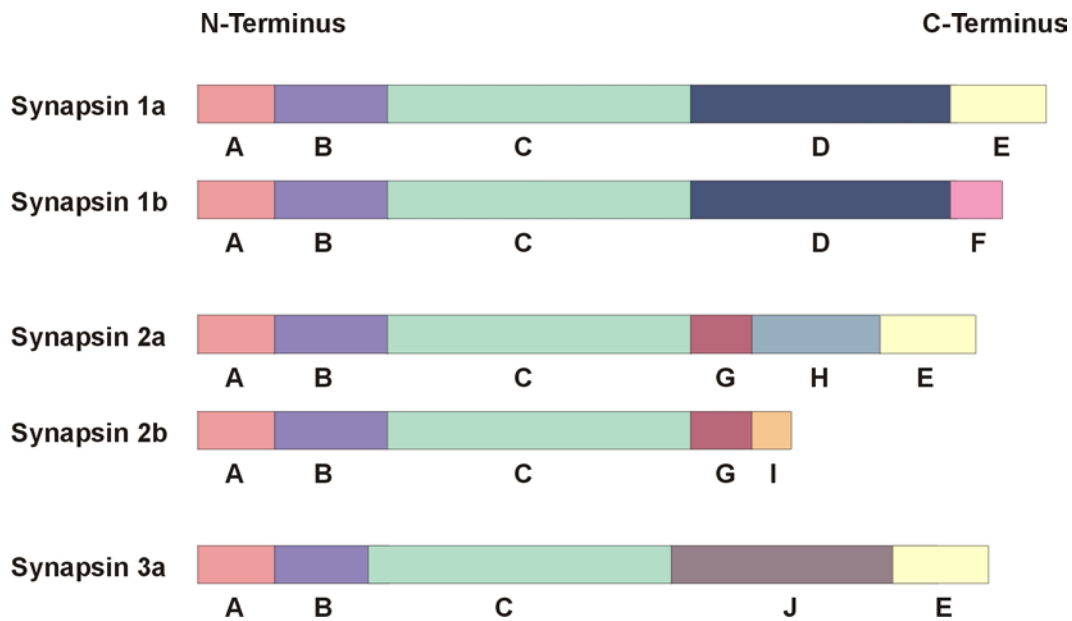


Abbildung 1-5: Das Domänen-Modell der Synapsine

Synapsine sind in allen Neuronen vorhanden, jedoch zeigen die Isoformen ein unterschiedliches Expressionsmuster. In den Synapsen der Moosfasern der CA3-Region des Hippocampus werden z.B. Synapsin 1a, 1b, 2a und 2b exprimiert. Demgegenüber konnte in den Purkinjezellen des Cerebellums Synapsin 2a nicht detektiert werden, während der Nucleus corporis trapezoidei des Hirnstammes nur wenig Synapsin 2b enthält (Sudhof et al. 1989). Bezüglich der funktionellen Konsequenzen der unterschiedlichen Expressionsmuster ist bisher wenig bekannt. Jedoch zeigten Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Cholinacetyltransferase und Glutamatdecarboxylase, dass Synapsin 1 in inhibitorischen Synapsen, Synapsin 2 dagegen in exzitatorischen Synapsen vermehrt exprimiert wird (Mandell et al. 1992).

Die genaue Lokalisation der Synapsine innerhalb der Präsynapse konnte mit Immunfärbungen und Elektronenmikroskopie ermittelt werden: Sie sind der zytoplasmatischen Oberfläche derjenigen synaptischen Vesikel angelagert, welche sich nicht in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran befinden (De Camilli et al. 1983; Hirokawa et al. 1989). Neben synaptischen Vesikeln können

Synapsine Bindungen mit Bestandteilen des Zytoskeletts eingehen. In vitro wurden Interaktionen mit Actin, Mikrotubuli, Neurofilamenten und Spectrin nachgewiesen (Bahler et al. 1987; Goldenring et al. 1986; Iga et al. 1997; Baines et al. 1985). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass Synapsine eine wichtige Rolle bei der Verankerung von synaptischen Vesikeln an Bestandteile des Zytoskeletts spielen, wodurch ein Reserve-Pool in Nähe der aktiven Zone gebildet wird (Hilfiker et al. 1999). Bei länger dauernder Stimulation der Synapse werden einzelne Vesikel aus diesem Pool freigesetzt. Dies scheint durch die Phosphorylierung der Synapsine vermittelt zu werden (siehe Abbildung 1-6). Alle Synapsin-Isoformen besitzen in der A-Domäne einen Phosphorylierungsbereich für Proteinkinase A und Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase I. Sowohl in vitro als auch in vivo findet hier eine Phosphorylierung als Antwort auf eintreffende Aktionspotentiale mit Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von cAMP oder Ca^{2+} statt (Czernik et al. 1987; Huttner et al. 1979; Nestler et al. 1982; Sihra et al. 1992). Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, reduziert die Affinität der Bindung an Actin und bewirkt die Entfernung der Synapsine von der Oberfläche synaptischer Vesikel (Benfenati et al. 1990; Bahler et al. 1987; Hosaka et al. 1999).

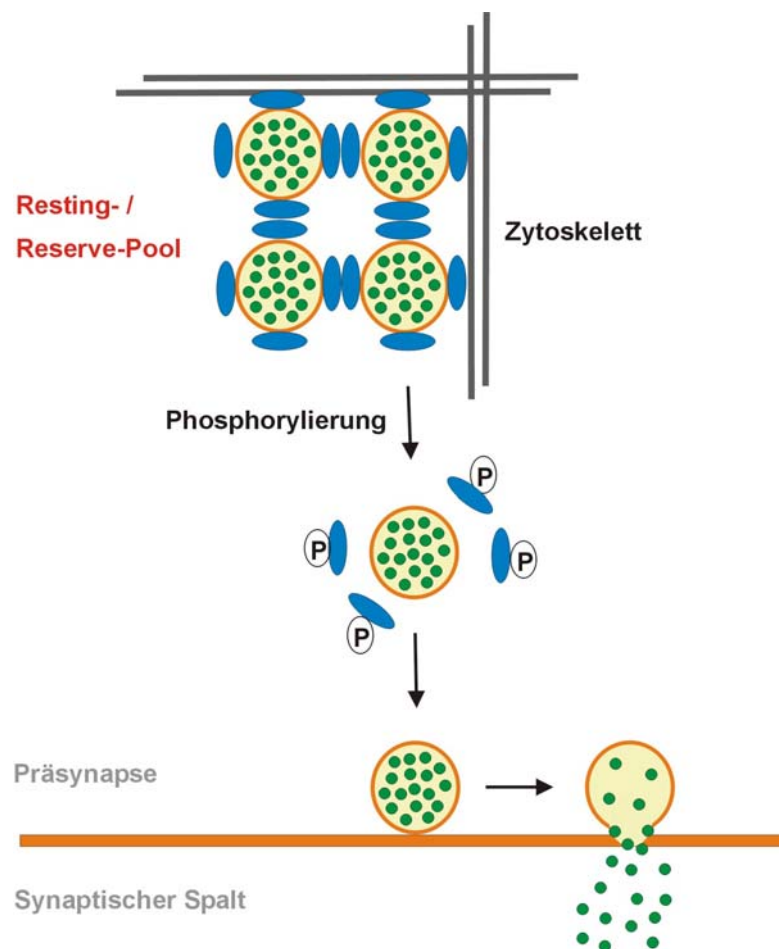


Abbildung 1-6: Freisetzung synaptischer Vesikel aus dem Resting- bzw. Reserve-Pool durch Phosphorylierung der Synapsine.

Passend zu der Hypothese, dass durch Phosphorylierung der Synapsine synaptische Vesikel aus dem Reserve-Pool freigegeben werden, wurden im Hippocampus nach experimenteller Induktion der „Long-term Potentiation“ (LTP), einer Form der langdauernden synaptischen Plastizität, über einen längeren Zeitraum erhöhte Konzentrationen von phosphoryliertem Synapsin 1 gemessen (Nayak et al. 1996). Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen nachgewiesen werden, dass Synapsin 1a bei hoher synaptischer Aktivität infolge einer Phosphorylierung reversibel von den synaptischen Vesikeln entfernt wird und in das Axon transloziert (Chi et al. 2001).

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Synapsine wurden Knockout-Mäuse generiert, denen entweder Synapsin 1, Synapsin 2 oder beide Gene fehlen. Die Versuchstiere sind lebensfähig und fertil und unterscheiden sich anatomisch nicht vom Wildtyp. Auffallend sind jedoch epileptische Anfälle vom Typ Grand-mal, die die Tiere ab einem Alter von 2 Monaten häufig erleiden (Rosahl et al. 1995). Bei allen Knockout-Mäusen ist die Anzahl der synaptischen Vesikel in den Synapsen reduziert, andere wichtige strukturelle Parameter von Synapsen, wie z.B. die Anzahl der Synapsen, die Bindung synaptischer Vesikel in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran und die Exozytose synaptischer Vesikel, sind allerdings nicht beeinträchtigt. Funktionell wurden Veränderungen in der sog. kurzzeitigen synaptischen Plastizität beobachtet. Bei den Synapsin 1-Nullmutanten ist die „Paired Pulse Facilitation“ (PPF) verstärkt. Bei diesem Test wird die Synapse mit zwei kurz hintereinander folgenden Aktionspotentialen erregt, was eine Zunahme der Neurotransmitterausschüttung zur Folge hat. Im Gegensatz zu Synapsin 1-Nullmutanten besitzen Synapsin 2-Knockout-Mäuse eine normale PPF, jedoch ist bei ihnen eine weitere Form der kurzzeitigen synaptischen Plastizität, die „Post-Tetanic Potentiation“ (PTP), stark vermindert. Dabei handelt es sich um die über mehrere Sekunden anhaltende Steigerung der Neurotransmitterausschüttung nach Reizung durch tetanische Stimuli. Außerdem führt die wiederholte Stimulation von Synapsen in physiologischen Frequenzen bei Synapsin 2-Nullmutanten zu einer ausgeprägten synaptischen Depression. Bei den Doppelmутanten (d.h. Synapsin 1- und 2-Nullmutanten) sind sowohl die Verminderung der PTP als auch die synaptische Depression bei physiologischer Stimulation noch stärker ausgeprägt. Bemerkenswerterweise bewirkt die gleichzeitige Deletion von Synapsin 1 und 2 zwar einen Verlust von 10 % der Proteine synaptischer Vesikel und von 98 % aller Synapsine (Synapsin 3 liegt in adulten Mäusen nur in geringer Konzentration vor), die wichtigsten synaptischen Parameter sind jedoch auch bei diesen Tieren unbeeinträchtigt. Insgesamt zeigen die nur geringen funktionellen Beeinträchtigungen der Knockout-Mäuse, dass Synapsine für die fundamentalen Mechanismen der Exozytose, Endozytose und Wiedergewinnung synaptischer Vesikel nicht benötigt werden bzw. dass das Fehlen der Synapsine in der Entwicklungsphase weitgehend kompensiert werden kann. Die elektrophysiologischen Untersuchungen lassen allerdings den Schluss zu, dass Synapsine für die Aufrechterhaltung eines Pools synaptischer Vesikel notwendig sind, aus dem bei länger dauernder

oder stärkerer Stimulation Vesikel schnell rekrutiert werden können (Rosahl et al. 1995; Li et al. 1995; Takei et al. 1995).

Neben den Versuchen mit Synapsin-Nullmutanten wurden auch Untersuchungen mit transfizierten NG108-15-Zellen durchgeführt, welche Synapsin 2 überexprimieren (Sugiyama et al. 2000). Die gesteigerte Synapsin 2-Konzentration führte hier zu einer Zunahme der Anzahl fusionsfähiger synaptischer Vesikel, sowie zu einer Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung. Dies bestätigt die Bedeutung von Synapsin 2 für die Bereitstellung fusionsfähiger synaptischer Vesikel.

Interessanterweise besitzt die Kristallstruktur der C-Domäne der Synapsine eine hohe Homologie zu prokaryotischen ATPasen, welche die Synthese kleiner Moleküle vermitteln, wie z.B. Glutathionsynthase oder D-Alanin-D-Alanin-Ligase (Esser et al. 1998). Die Bindung des ATP an Synapsine findet mit hoher Affinität statt, allerdings ist die Regulation durch Ca^{2+} bei den Synapsin-Isoformen unterschiedlich. Während die ATP-Bindung an die C-Domäne von Synapsin 1a und 1b Ca^{2+} benötigt, erfolgt die ATP-Bindung bei Synapsin 2a und 2b Ca^{2+} -unabhängig (Hosaka et al. 1998). Die Bindung von ATP an die C-Domäne von Synapsin 3a wird dagegen durch Ca^{2+} gehemmt (Hosaka et al. 1998). Die strukturelle Ähnlichkeit mit ATPasen und die Bindung von ATP lassen vermuten, dass Synapsine auf der Oberfläche von synaptischen Vesikeln als Enzyme fungieren, welche Ca^{2+} -abhängig reguliert werden. Bisher sind jedoch noch keine Substrate identifiziert worden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die kürzlich beschriebene Bindung der Synapsine an die neuronale NO-Synthase (nNOS), welche über das Adapterprotein CAPON vermittelt wird (Jaffrey et al. 2002). Damit wird Stickstoffmonoxid (NO) zum potentiellen Interaktionspartner der Synapsine. Dies ist auch für die Modulation der Neurotransmitterfreisetzung durch NO im Rahmen der Nozizeption von Bedeutung (siehe Kapitel 1.1). Bisher konnte jedoch noch keine direkte Interaktion zwischen Synapsinen und NO nachgewiesen werden.

1.2.4 Rab3 und Rabphilin

Rab-Proteine sind eine Familie GTP-bindender Proteine mit geringer Molekülmasse (sog. kleine G-Proteine), welche bei der Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes eine wichtige Rolle spielen. Bei Säugetieren sind bisher mehr als 40 Rab-Proteine identifiziert worden, die sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert werden (Somsel Rodman et al. 2000). An der Membran synaptischer Vesikel sind zwei Rab-Familien lokalisiert: Rab5, welches in allen Zellen vorkommt und für die Endosomenfusion benötigt wird, sowie die für neuronale und

neuroendokrine Zellen spezifischen Proteine Rab3A und Rab3C. Rab3A wird in den meisten Neuronen exprimiert und ist das im ZNS am weitesten verbreitete Rab-Protein, einige Neuronen exprimieren zusätzlich Rab3C (Sudhof 1995).

Rab3A enthält am C-Terminus zwei hydrophobe Geranylgeranyl-Gruppen, mit denen es in der aktivierten, GTP-bindenden Form (GTP-Rab3A) an der Membran synaptischer Vesikel verankert werden kann. Im Rahmen einer Ca^{2+} -abhängigen Exozytose wird an Rab3A gebundenes GTP in GDP hydrolysiert, der Rab3A-GDP-Komplex von den Vesikeln entfernt und im Zytosol an GDI (GDP dissociating inhibitor) gebunden. Erst nach einem Austausch von GDP durch GTP kann GTP-Rab3A wieder an synaptische Vesikel binden (Sudhof 1995). Der Rab3A-Zyklus ist in Abbildung 1-7 dargestellt.

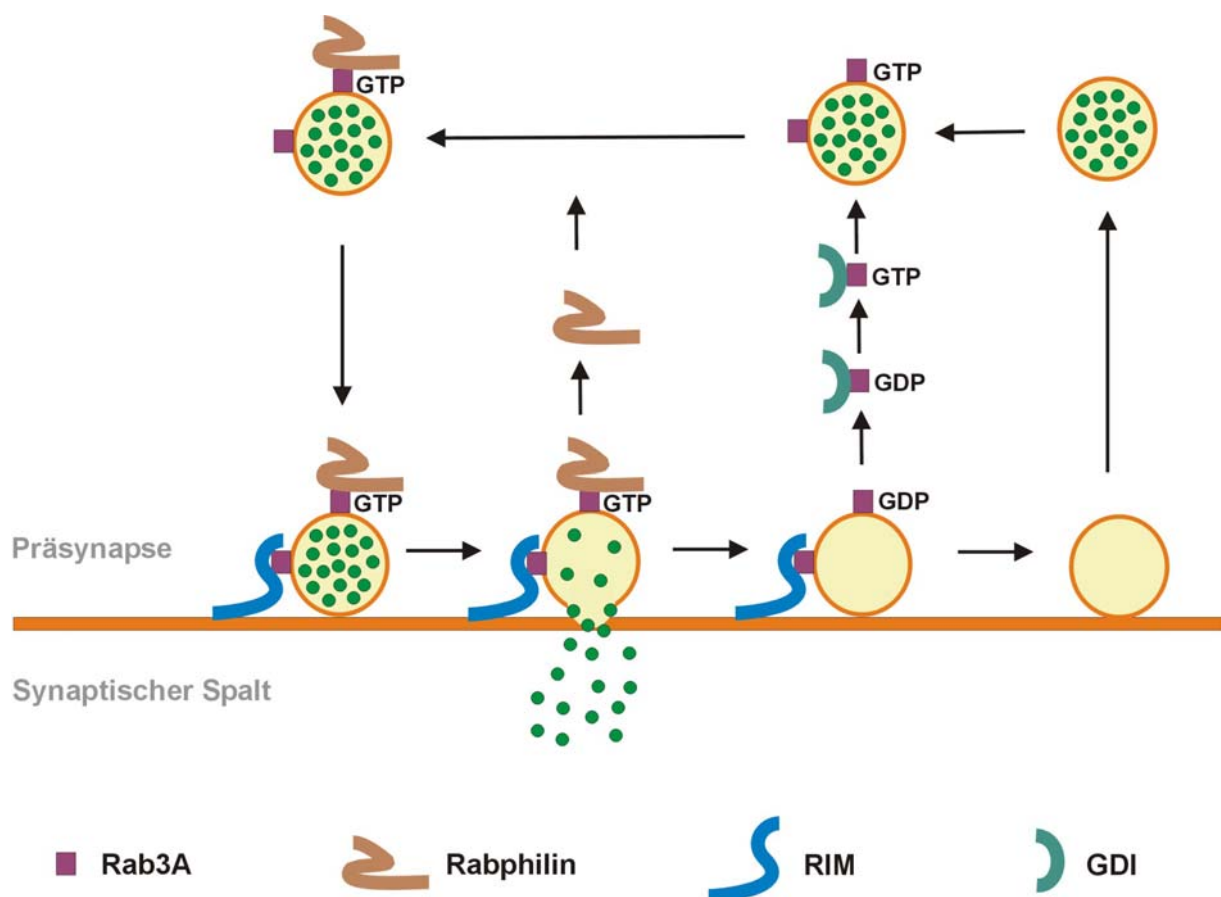


Abbildung 1-7: Der Rab3A-Rabphilin-Zyklus in der Präsynapse

Zu den potenziellen Rab3A-Effektoren zählen RIM (Rab3A/C interacting molecule), ein ausschließlich im Bereich der aktiven Zone lokalisierter Bestandteil der präsynaptischen Membran

(Wang et al. 1997) und Rabphilin¹, welches über Rab3A an synaptische Vesikel gebunden und im Rahmen der Ca²⁺-abhängigen Exozytose von den synaptischen Vesikeln entfernt wird (Stahl et al. 1996), siehe Abbildung 1-7. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch im Ratten-Rückenmark Rabphilin mit Rab3A größtenteils colokalisiert ist (Li 1996).

Rabphilin besteht aus 4 Domänen:

- Am N-Terminus befindet sich ein Zinkfinger-Motiv mit der Bindungsstelle für Rab3-Proteine, welche jedoch nur in der GTP-bindenden Form mit Rabphilin interagieren können (Sasaki et al. 1997).
- Eine zentrale Domäne beinhaltet Phosphorylierungsbereiche für Proteinkinasen. Bisher wurde eine Phosphorylierung durch Proteinkinase A und Ca²⁺/Calmodulin-Kinase II nachgewiesen (Fykse et al. 1995). Phosphoryliertes Rabphilin liegt in verschiedenen Hirnregionen in unterschiedlichen Konzentrationen vor, besonders hohe Konzentrationen wurden im Cerebellum, Mittelhirn und in der Medulla oblongata gefunden (Foletti et al. 2001).
- Im Bereich des C-Terminus befinden sich zwei C2-Domänen, über die mit hoher Affinität Ca²⁺-Ionen gebunden werden (Ubach et al. 1999).

Zusätzlich zu Rab3-Proteinen wurden weitere Bindungspartner für Rabphilin identifiziert:

- Vesikel, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat enthalten, können an die C2-Domänen des Rabphilins binden (Chung et al. 1998).
- β -Adducin, beteiligt an der Zusammenlagerung von Spectrin-Actin-Komplexen, interagiert in Gegenwart von Ca²⁺ und Phospholipiden mit der C-terminalen Region von Rabphilin (Miyazaki et al. 1994).
- α -Actinin bindet kompetitiv zu GTP-Rab3A an den N-Terminus von Rabphilin, wodurch die Bündelung von Actinfilamenten verstärkt wird (Kato et al. 1996).
- Rabaptin5, ein Bindungspartner für Rab5 im Rahmen der Endozytose, kann ebenfalls kompetitiv zu GTP-Rab3A mit dem N-Terminus von Rabphilin interagieren. Somit ist freies, nicht an GTP-Rab3A gebundenes Rabphilin vermutlich auch an der Regulation der Endozytose beteiligt (Ohya et al. 1998).

Bezüglich der funktionellen Bedeutung des Rabphilins existieren bisher nur wenige Untersuchungen. Die Injektion von Rabphilin-Fragmenten lieferte je nach Versuchsaufbau und Zellsystem widersprüchliche Ergebnisse. Mit Rabphilin-Fragmenten konnte z.B. in Mäuse-Eizellen und Tintenfisch-Synapsen die Exozytose gehemmt werden (Masumoto et al. 1996; Burns et al. 1998),

¹ Rabphilin wurde zunächst als Interaktionspartner von Rab3A entdeckt und ursprünglich Rabphilin-3A genannt (Shirataki et al. 1993). Es interagiert jedoch auch mit anderen Rab3-Proteinen.

während in adrenergen chromaffinen Zellen, PC12-Zellen und β -Zellen des Pankreas die Exozytose verstärkt wurde (Komuro et al. 1996; Chung et al. 1995; Arribas et al. 1997). Zur Klärung der funktionellen Bedeutung des Rabphilins wurden auch Untersuchungen mit Rabphilin- oder Rab3A-Nullmutanten durchgeführt. Bei Rab3A-Knockout-Mäusen ist die Rabphilin-Konzentration im ZNS insgesamt um ca. 70% vermindert, jedoch in Bereichen mit hoher Expression von Rab3C praktisch unverändert. Die Tiere sind lebensfähig und fertil, außerdem sind viele synaptische Parameter unauffällig. In Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus wurde jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp schnellere Erschöpfung der Vesikelfreisetzung nach wiederholter Stimulation gemessen (Geppert et al. 1994). Außerdem ist bei Rab3A-Knockout-Mäusen die Langzeitpotenzierung in den Moosfasern des Hippocampus aufgehoben (Castillo et al. 1997). Im Gegensatz dazu zeigen Rabphilin-Knockout-Mäuse keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich synaptischer Übertragung oder Plastizität. Sowohl die Vesikelfreisetzung nach wiederholter Stimulation als auch die Langzeitpotenzierung sind unverändert. Auch alle anderen untersuchten synaptischen Parameter waren bei den Rabphilin-Nullmutanten nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus liegt Rab3A in normaler Konzentration vor und kann an synaptische Vesikel binden (Schluter et al. 1999). Somit konnte auch mit diesen Experimenten die funktionelle Bedeutung des Rabphilins nicht geklärt werden.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass NO im Hinterhorn des Rückenmarks eine wichtige Rolle bei der nozizeptiven Transmission und der Ausbildung einer Hyperalgesie einnehmen kann. In der Postsynapse gebildetes NO kann zur Präsynapse diffundieren und dort die Steigerung der cGMP-Synthese sowie eine Verstärkung der Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter bewirken. Über die Zielstrukturen der NO/cGMP-Kaskade im Hinterhorn ist bisher wenig bekannt. Deren Charakterisierung bildet jedoch die Grundlage für die Entwicklung wirkungsvoller Arzneistoffe zur Therapie chronischer Schmerzzustände.

In der vorliegenden Arbeit sollten Targets der NO-vermittelten nozizeptiven Transmission im lumbalen Rückenmark identifiziert und in tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten und Mäusen hinsichtlich ihrer Relevanz getestet werden. Neben den bekannten Zielstrukturen der NO/cGMP-Kaskade (cGMP-abhängige Proteinkinase 1, Phosphodiesterasen, CNG-Kanäle) wurden auch Proteine synaptischer Vesikel (Synapsin 2, Rabphilin) untersucht. Als nozizeptive Tiermodelle dienten der Formalintest, die mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion sowie der Hot-Plate-Test. Veränderungen der mRNA- und Proteinexpression im Lumbalmark wurden mit quantitativer Realtime RT-PCR und Western-Blot-Analysen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit männlichen Sprague Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld), Synapsin 2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen beiderlei Geschlechts (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA; Rasse B6129S-Syn2^{tm1Sud} bzw. B6129SF2/J), sowie PKG-1-Knockout- und Wildtyp-Mäusen beiderlei Geschlechts (zur Verfügung gestellt von Prof. F. Hofmann, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München (Pfeifer et al. 1998)). Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur $22 \pm 0,5$ °C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt.

2.2 Implantation intrathekaler Katheter

Um eine intrathekale Applikation der Prüfsubstanzen unmittelbar in den lumbalen Liquorraum zu ermöglichen, wurde den Ratten vor Versuchsbeginn ein Lumbalkatheter nach der Methode von Yaksh und Rudy (1976) implantiert. Dazu wurden die Tiere mit 100 mg/kg i.p. Ketamin (Ketanest[®] S, Parke-Davis, Freiburg) und 5 kg/kg i.p. Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen) narkotisiert. Nach Fixierung des Kopfes wurden in der Mittellinie zwischen beiden Ohren Haut, darunterliegende Faszie und Nackenmuskulatur inzidiert und die Atlanto-Okzipitalmembran freigelegt. Die Membran wurde durchtrennt und ein 12 - 13 cm langer Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm) subdural nach kaudal bis zur Höhe des Lumbalmarkes vorgeschoben und mit chirurgischem Nahtmaterial an der Haut fixiert. Danach wurde der Katheter zur Prüfung der Durchlässigkeit mit 10 µl künstlichem Liquor (ACSF, artificial cerebrospinal fluid) gespült und die Katheteröffnung verschlossen. Die Applikation der Prüfsubstanzen erfolgte 3 - 5 Tage nach der Katheterimplantation. Versuchstiere, die nach der Implantation neurologische Ausfälle oder sonstige Verhaltensauffälligkeiten zeigten, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

<u>ACSF</u>	2,6 mM	Kaliumchlorid
	0,9 mM	Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O
	1,3 mM	Calciumchlorid x 2 H ₂ O
	115,7 mM	Natriumchlorid
	2,1 mM	Natriumhydrogencarbonat
	2,5 mM	Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O
	3,5 mM	D(+)-Glucose
	5 %	CO ₂ in O ₂ (zur Einstellung von pH 7,2)

2.3 Im Formalintest verwendete Prüfsubstanzen

2.3.1 Übersicht über die Prüfsubstanzen

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über Hersteller, Dosierung, Applikationsweg und Wirkmechanismus der in dieser Arbeit verwendeten Prüfsubstanzen.

<u>Name</u>	<u>Hersteller, Ort</u>	<u>Dosierung</u>	<u>Effekt/Wirkung</u>
8-Br-cGMP	Biolog, Bremen	0,1 - 2,5 µmol i.t. <i>Mäuse:</i> 50 nmol i.t.	PKG-Aktivator
Diclofenac (Voltaren [®])	Novartis, Nürnberg	5 - 10 mg/kg i.p.	COX-Inhibitor
EHNA	Biomol, Hamburg	0,25 µmol i.t.	PDE-2-Inhibitor
L-cis-Diltiazem	RBI, Natick (USA)	0,5 mg i.t.	CNG-Kanal-Inhibitor
L-NAME	Sigma, Deisenhofen	10 - 100 mg/kg i.p.	NOS-Inhibitor
Metamizol (Novalgin [®])	Aventis, Frankfurt	0,5 - 1,0 g/kg i.p.	Nichtopioid-Analgetikum
Milrinon (Corotrop [®])	Sanofi Winthrop, München	5 - 10 mg/kg i.p.	PDE-3-Inhibitor
Morphinhydrochlorid	Merck, Darmstadt	10 - 15 mg/kg i.p.	Opioid-Analgetikum
NOC-5	Calbiochem, Bad Soden	4 - 20 µg i.t.	NO-Donor
Rp-8-Br-cGMPS	Biolog, Bremen	0,1 - 1,0 µmol i.t.	PKG-Inhibitor

2.3.2 Applikation der Prüfsubstanzen

Zur intrathekalen Applikation wurden bei Ratten die Prüfsubstanzen in 10 µl ACSF gelöst und über den zuvor implantierten Katheter in den Liquorraum in Höhe des Lumbalmarks verabreicht. Anschließend wurde der Katheter mit 10 µl ACSF gespült. Bei Mäusen wurden die in 7 µl ACSF gelösten Prüfsubstanzen nach der Methode von Hylden und Wilcox (1980) durch den Intervertebralspalt L4/L5 direkt intrathekal appliziert. Zur intraperitonealen Applikation wurden

Morphinhydrochlorid und L-NAME in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst. Diclofenac, Metamizol und Milrinon wurden in der vom Hersteller gelieferten Lösung verabreicht.

2.4 Unterdrückung der Synapsin 2-Proteinexpression mit Antisense-Oligonukleotiden

2.4.1 Das Antisense-Prinzip

Ein Antisense-Oligonukleotid ist eine kurzkettige, synthetisch hergestellte Nukleinsäure, die an eine kurze komplementäre mRNA-Sequenz (Sense-Nukleinsäure) eines Zielproteins bindet. Durch diese spezifische Bindung entsteht ein Doppelstrang aus Oligonukleotid und mRNA (Heteroduplex). Dies führt zu einer sterischen Hemmung der Bindung von Ribosomen an die mRNA und zu einer enzymatischen Spaltung der mRNA im Bereich des Heteroduplex durch RNase H. Letztlich wird dadurch die Bildung des Zielproteins verhindert (Hartmann et al. 1998).

Die Kenntnis der Sequenz einer mRNA ist ausreichend für die Synthese von Antisense-Oligonukleotiden, die spezifisch an die vorgegebene Ziel-RNA binden. Dennoch bewirken nur wenige Antisense-Oligonukleotide eine Hemmung der Proteinsynthese, da die Oligonukleotide z.B. ungenügend in die Zellen aufgenommen, enzymatisch abgebaut oder durch unspezifische Bindungen an Proteine blockiert werden. In dieser Studie wurden Antisense-Oligonukleotide verwendet, die bereits in Zellkultur-Experimenten eine Inhibition der Synapsin 2-Proteinsynthese bewirken konnten (Ferreira et al. 1994). Die erfolgreiche Unterdrückung der Proteinexpression wurde zusätzlich mit Western Blot-Analysen bestätigt (siehe Abbildung 3-19 auf Seite 56).

2.4.2 Versuchsdurchführung

Folgende nichtüberlappende Antisense-Oligonukleotide, die die Expression beider Synapsin 2-Isoformen hemmen, wurden verwendet (Ferreira et al. 1994):

Antisense 1: 5'-AGT TCA TCA TCT GGC TTG AGG GA-3'

Antisense 2: 5'-CGA CCA AAG GTG GTC CGC GTC TC-3'

Bei Kontrolltieren kamen die korrespondierenden Sense-Oligonukleotide zum Einsatz:

Sense 1: 5'-TCC CTC AAG CCA GAT GAT GAA CT-3'
Sense 2: 5'-GAG ACG CGG ACC ACC TTT GGT CG-3'

Die in ACSF gelösten Oligonukleotide (BioSpring, Frankfurt am Main) wurden mit einer CMA/100-Mikroinjektionspumpe (CMA, Stockholm, Schweden) fünf Tage lang kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,03 µl/min in einer Konzentration von 2,5 mg/ml über einen Lumbalkatheter in den Liquorraum infundiert. Während der Infusionsdauer waren die Versuchstiere an ein CMA/120-System für frei bewegliche Tiere (CMA) angeschlossen und hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Die Untersuchungen wurden mit jeweils drei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Weitere Kontrolltiere (n = 6) erhielten eine Einzelinjektion von 20 µl ACSF i.t.

2.5 Nozizeptive Tiermodelle

Der Begriff „Schmerz“ ist 1979 von der International Association for the Study of Pain (IASP) definiert worden als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Schmerzen sind somit mit subjektiven Erlebnissen und Erfahrungen verbunden. Diese subjektive Komponente bedingt, dass Schmerzen im Tiermodell nur indirekt erfasst werden können, meist durch Beobachtung von zuvor definierten Verhaltensänderungen des Versuchstieres (z.B. Zurückziehen oder Lecken einer Pfote). Das Ausmaß dieser Verhaltensänderungen dient als Maß für die nozizeptive Antwort. Zu den etablierten nozizeptiven Tiermodellen zählen u.a. der Formalintest, die mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion und der Hot-Plate-Test.

2.5.1 Formalintest

Testprinzip: Bei dem von Dubuisson und Dennis 1977 eingeführten Formalintest wird dem Versuchstier eine verdünnte Formaldehyd-Lösung (Formalin) s.c. in eine Hinterpfote injiziert, wodurch eine nozizeptive Antwort in Form von Zucken („Flinchen“), Lecken, Beißen oder Anheben der betreffenden Pfote hervorgerufen wird (Dubuisson et al. 1977). Man beobachtet zwei Phasen der nozizeptiven Antwort: Die 1. Phase beginnt unmittelbar nach der Formalininjektion und dauert ca. 5 min an. Es folgt eine etwa fünf- bis zehnminütige Ruhephase mit einer geringen Aktivität. 15 - 20 min nach der Formalininjektion startet die 2. Phase. Die für das Auslösen der nozizeptiven Antwort vorrangigen Stimuli sind für beide Phasen verschieden: Die 1. Phase kann auf eine direkte Stimulation

der Nozizeptoren, insbesondere von A δ -Fasern, zurückgeführt werden. An der Entstehung der 2. Phase sind neben der Nozizeptoren-Stimulation sowohl eine Entzündung der Pfote als auch zentrale Veränderungen beteiligt, woraus eine anhaltende Aktivierung von C-Fasern resultiert (Coderre et al. 1990; Tjolsen et al. 1992). Insbesondere die Veränderungen im Rahmen der 2. Phase machen den Formalintest zu einem Tiermodell für die Simulation anhaltender, tonischer Schmerzen.

Durchführung: Zur nozizeptiven Stimulation wurden bei Ratten 50 μ l, bei Mäusen 15 μ l einer 5 %igen Formaldehydlösung subkutan auf der Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert. Die Injektion erfolgte 10 min nach intrathekalen bzw. 20 min nach intraperitonealer Applikation der Prüfsubstanzen, oder am Ende der Infusion der Antisense- oder Sense-Oligonukleotide. Unmittelbar nach der Formalininjektion wurde das Versuchstier über einen Zeitraum von 45 min (Mäuse) bzw. 60 min (Ratten) beobachtet. Als nozizeptive Antwort wurden bei Ratten die Flinches der Hinterpfote gewertet. Die Anzahl der Flinches wurde in einminütigen Intervallen erfasst, die Auswertung erfolgte durch Bildung des Mittelwertes aus jeweils 5 min Beobachtungszeit. Bei Mäusen diente die Zeit, die das Tier mit dem Lecken der betroffenen Hinterpfote verbrachte (Leckzeit), als Maß für die nozizeptive Antwort (Hunskar et al. 1985). Die Leckzeit wurde mit Hilfe einer Stoppuhr erfasst und in fünfminütigen Intervallen aufgezeichnet.

2.5.2 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion

Testprinzip: Durch Injektion einer Zymosanlösung in eine Hinterpfote wird dort eine Entzündung induziert. Dies führt u.a. zu einer Hyperalgesie der Hinterpfote gegenüber mechanischen Stimuli. Zur Quantifizierung der Hyperalgesie wird die Hinterpfote mit kalibrierten Haaren unterschiedlicher Dicke und Steifheit (sog. von Frey-Haaren) berührt und so ein definierter Druck ausgeübt. Als nozizeptive Reaktion des Tieres gilt das Anheben der Hinterpfote infolge der Druckausübung.

Durchführung: Jeweils vier Mäuse (Synapsin 2-Knockout bzw. Wildtyp) wurden in einen Käfig gesetzt, dessen Boden von einem engmaschigen Draht gebildet wird. Nach einer 60minütigen Gewöhnungszeit wurde die Plantarseite der rechten Hinterpfote mit von Frey-Haaren unterschiedlicher Druckwerte (8, 20, 40, 70, 160, 400, 600, 1000, 1400, 2000, 4000 mg/mm²; Stoelting Corp., Wood Dale, USA) dreimal kurz hintereinander berührt. Der Test wurde jeweils mit dem niedrigsten Druckwert begonnen und mit dem nächst höheren fortgeführt, bis das Versuchstier als Folge der Berührung die Hinterpfote anhub. Der dekadische Logarithmus dieses Druckwertes wurde als mechanische Schwelle gewertet. Der Test wurde bei jedem Versuchstier fünfmal im Abstand von jeweils 1 h durchgeführt. Der Mittelwert der Messungen diente als Leerwert für jedes Versuchstier. Einen Tag nach der Messung des Leerwertes wurde jedem Versuchstier 15 μ l einer 0,5 %igen

Zymosanlösung s.c. in die Plantarseite der rechten Hinterpfote injiziert, wodurch dort eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde. Anschließend wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach der Zymosaninjektion (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h) erneut ein Test durchgeführt.

2.5.3 Hot-Plate-Test

Testprinzip: Im Hot-Plate-Test wird das Versuchstier auf eine 50 – 55 °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zum Auftreten einer definierten Verhaltensänderung (z.B. Pfotenlecken, Hochspringen) gemessen (Eddy et al. 1953). In dem gewählten Temperaturbereich reagieren besonders Mäuse sehr empfindlich, es werden jedoch keine Gewebeschäden hervorgerufen. Der Hot-Plate-Test ist ein Modell für eine akute thermische Nozizeption. Für die Auslösung der Verhaltensänderungen sind vor allem supraspinale Mechanismen notwendig. Die Wirkungen von Opioid-Analgetika können mit diesem Test besonders gut erfasst werden, Nichtopioide-Analgetika bewirken nur geringfügige Veränderungen (Le Bars et al. 2001).

Durchführung: Je sieben Synapsin 2-Knockout- bzw. Wildtyp-Mäuse wurden auf eine 52,5 °C warme Platte (Hot Plate FMI, Föhr Medical Instruments, Seeheim) gesetzt. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurde die Zeit gemessen, bis das Tier sich an einer Pfote leckte oder noch oben sprang (Latenzzeit). Unmittelbar nach einer solchen Verhaltensänderung, spätestens jedoch nach 45 Sekunden, wurde das Tier von der Platte weggehoben. Der Versuch wurde mit jedem Tier fünfmal durchgeführt, wobei zwischen den Versuchen mindestens eine Stunde gewartet wurde.

2.6 Gewebeentnahme

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran narkotisiert und mittels kardialer Punktion entblutet. Unmittelbar danach wurden die Tiere in Bauchlage gebracht, das Rückenfell wurde wegrasiert und die Haut über der Wirbelsäule entfernt. Nach Inzision der Faszie wurde die Wirbelsäule freipräpariert und in Höhe des Zervikalmarkes quer durchschnitten. Vom Bereich des Querschnittes aus wurden die seitlichen Wirbelbögen nach kaudal fortschreitend vorsichtig durchtrennt und so das Rückenmark freigelegt. Schließlich wurde das lumbale Rückenmark entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung des Gewebes bis zur weiteren Aufbereitung erfolgte bei - 80 °C.

2.7 Proteinanalytik

2.7.1 Proteinextraktion aus den Gewebeproben

Zur Solubilisierung der Proteine wurden die Rückenmarks-Proben in einem 1,5 ml Microfuge[®] Tube (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof) mit 200 µl CHAPS-Puffer versetzt und mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator (neoLab, Heidelberg) unter Eiskühlung homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 700 µl CHAPS-Puffer wurden die Proben in einer Optima[®] TLX-Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) 60 min bei 40.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (CHAPS-lösliche Fraktion) abpipettiert und bei - 80 °C eingefroren.

Um die in CHAPS-Puffer unlösliche Fraktion einer Western Blot-Analyse zugänglich zu machen, wurde der Rückstand einmal mit 500 µl Tris-NaCl-Puffer gewaschen, mit 300 µl Triton X-100-Puffer vermischt und mit einem Branson Sonifier[®] 250 (Branson, Dietzenbach) sonifiziert (3 x 10 Impulse, Duty Cycle: 40 %, Micro Tip Limit: 4). Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde bei 40.000 g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand (Triton X-100-lösliche Fraktion) wurde abpipettiert und eingefroren, der Rückstand wurde einmal mit 500 µl Tris-NaCl-Puffer gewaschen, mit 300 µl Desoxycholat-Puffer versetzt, sonifiziert und eingefroren (Desoxycholat-Fraktion).

<u>CHAPS-Puffer</u>	20 mM	CHAPS
	10 mM	Tris
	1 mM	1,4-Dithiothreit
	0,5 mM	EDTA
	0,5 mM	PMSF
	1 µM	Pefabloc [®]
	q.s.	HCl (zur Einstellung von pH 7,4)
<u>Tris-NaCl-Puffer</u>	100 mM	NaCl
	50 mM	Tris
	2 mM	EDTA
	0,5 mM	PMSF
	2 µM	Pefabloc [®]
	q.s.	HCl (zur Einstellung von pH 7,4)
<u>Triton X-100-Puffer</u>	1 %	Triton X-100 in Tris-NaCl-Puffer
<u>Desoxycholat-Puffer</u>	1 %	Natriumdesoxycholat in Tris-NaCl-Puffer

2.7.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Proteinproben wurden mit Aqua purificata 1:50 verdünnt. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden diente eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (200, 100, 50, 25 und 12,5 mg/ml). Auf einer 96-well Microtiter[®]-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) wurden jeweils 200 µl des Bradford-Reagenzes mit 50 µl der verdünnten Proteinlösungen bzw. der Standards vermischt. Nach 2 min erfolgte die photometrische Auswertung bei 595 nm mittels Spectrafluor Plus[®]-Instrument und X-Fluor[®]-Software (Tecan, Crailsheim).

<u>Bradford-Reagenz</u>	0,01 %	Coomassie brillant blue G-250
	25 ml	Ethanol
	50 ml	Phosphorsäure 85 %
	ad 500 ml	Aqua purificata

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im diskontinuierlichen Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli 1970). Die Arbeiten wurden durchgeführt mit dem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean[®] 3 (Bio-Rad, München). Die 1 mm dicken Gele bestanden aus einem Trenngel (Höhe: ca. 5,5 cm; 10 % Polyacrylamid, pH 8,8) und einem Sammelgel (Höhe: ca. 1,5 cm; 3,75 % Polyacrylamid, pH 6,8). Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4fach Lämmli-Puffer versetzt und nach fünfminütigem Erhitzen bei 95 °C (Thermomixer compact[®], Eppendorf, Hamburg) in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Eine Tasche wurde jeweils mit Marker beschickt (SeeBlue[®] oder SeeBlue[®] Plus 2, Invitrogen, Karlsruhe). Die Elektrophorese wurde innerhalb der ersten 10 min bei 80 V, danach mit einer konstanten Spannung von 140 V durchgeführt.

<u>Trenngel</u>	2,08 ml	Aqua purificata
	1,23 ml	Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8)
	1,64 ml	Acrylamidlösung (rotiphorese [®] Gel 30, Roth, Karlsruhe)
	49,2 µl	SDS-Lösung (10 %)
	24,6 µl	APS-Lösung (10 %)
	2,46 µl	TEMED
<u>Sammelgel</u>	1,2 ml	Aqua purificata
	0,5 ml	Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
	0,25 ml	Acrylamidlösung (rotiphorese [®] Gel 30, Roth, Karlsruhe)
	20 µl	SDS-Lösung (10 %)
	20 µl	APS-Lösung (10 %)
	2 µl	TEMED
<u>Lämmli-puffer (4fach)</u>	1,0 g	SDS
	0,24 g	Tris
	0,1 g	Bromphenolblau
	4 ml	Glycerol
	ad 10 ml	Aqua purificata
	q.s.	konzentrierte Salzsäure (zur Einstellung von pH 6,8)
	20 %	β-Mercaptoethanol (jeweils frisch zugeben)
<u>Elektrophoresepuffer</u>	15 g	Glycin
	3 g	Tris
	1 g	SDS
	ad 1 l	Aqua purificata

2.7.4 Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Burnette-Methode (Burnette 1981) auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace[®] NT, Pall, Dreieich) überführt. Der Transfer erfolgte nach einer kurzen Äquilibrierung von Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), Membran und Gel in Transferpuffer mit einer Trans-Blot[®] Semi-Dry Transferzelle (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 12 V über 20 min. Unmittelbar danach wurde der Proteintransfer durch Färbung mit Ponceau-Lösung kontrolliert und mittels Fotokopie dokumentiert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei + 4 °C in Blockpuffer inkubiert.

<u>Transferpuffer</u>	5,81 g	Tris
	2,93 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	0,37 g	SDS
	ad 1 l	Aqua purificata
<u>Ponceau-Lösung</u>	3 %	Trichloressigsäure
	0,1 %	Ponceau S
<u>PBS-Puffer</u>	10 g	Natriumchlorid
	0,25 g	Kaliumchlorid
	1,77 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,25 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	3 ml	Tween [®] 20
	ad 1 l	Aqua purificata
<u>Blockpuffer</u>	5 %	Magermilchpulver in PBS-Puffer

2.7.5 Antikörper-Inkubation

Die Membran wurde zusammen mit dem in 4 ml Blockpuffer aufgenommenen Primärantikörper in Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte auf einem Überkopfmischer (Reax[®] 2, Heidolph, Schwabach) unter ständigem Umschütteln über einen Zeitraum von 2 h. Anschließend wurde die Membran aus der Folie entnommen, auf einem Schüttelapparat (GFL-3005[®], GFL, Burgwedel) dreimal für 10 min in PBS-Puffer gespült und für 1 h mit in 25 ml Blockpuffer aufgenommenem Sekundärantikörper inkubiert.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	<u>Name</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Lieferant</u>
<u>Primärantikörper</u>	PKG-1	1 : 500	Prof. Hofmann ²
	PKG-2	1 : 500	Prof. Hofmann
	ERK-2	1 : 2000	Santa Cruz, Heidelberg
	Synapsin 2	1 : 1000	Stressgen, Victoria, Kanada
	Rabphilin	1 : 1000	Stressgen, Victoria, Kanada
<u>Sekundärantikörper</u>	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 20.000	Santa Cruz, Heidelberg
	Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 10.000	Santa Cruz, Heidelberg

² Die Antikörper gegen PKG-1 und -2 wurden freundlicherweise von Prof. F. Hofmann, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München, zur Verfügung gestellt.

2.7.6 Detektion

Nach der Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal in PBS-Lösung gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL[®]-System (Amersham, Freiburg), Hyperfilm[®] ECL-Filmen (Amersham), Ultrafin[®] liquid-Entwickler und Superfix[®]-Fixierer (Tetenal, Norderstedt). Die Belichtungszeit betrug 20 sec (ERK-2, Synapsin 2, Rabphilin) bzw. 5 min (PKG-1 und -2).

2.8 RNA-Analytik

2.8.1 RNA-Extraktion aus den Gewebeproben

Die Gesamt-RNA wurde nach der Chomczynski-Methode mit Tri-Reagenz und Chloroform (Chomczynski et al. 1987; Chomczynski 1993) extrahiert. Im Tri-Reagenz sind Guanidiniumthiocyanat und saures Phenol enthalten. Nach Zugabe von Chloroform entsteht ein 3-Phasen-System, in dem die RNA in der oberen, wässrigen Phase angereichert ist, während sich Proteine in der Phenol-Phase und DNA in der Interphase befinden. Die RNA kann so leicht abpipettiert und mit Alkohol gefällt werden.

Die Rückenmarks-Proben wurden in einem Tube mit 200 µl Tri-Reagenz versetzt und unter Eiskühlung mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator (neoLab, Heidelberg) homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 600 µl Tri-Reagenz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde Chloroform (160 µl) zupipettiert, geschüttelt, 5 min inkubiert und 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Phasentrennung zu beobachten. Die obere, RNA-enhaltende Phase wurde abpipettiert und in ein frisches RNase-freies Tube überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 400 µl reinem Isopropylalkohol, fünfminütiger Inkubation und Zentrifugation über 8 min bei 12.000 g und 4 °C. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 700 µl Ethanol (70 %) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Zur Entfernung von mitextrahierten DNA-Anteilen wurden die Proben anschließend mit einem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers gereinigt. Schließlich erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA mit einem BioPhotometer[®] (Eppendorf, Hamburg).

<u>Tri-Reagenz</u>	800 mM	Guanidiniumthiocyanat
	400 mM	Ammoniumthiocyanat
	0,1 mM	Natriumacetat
	5 %	Glycerol
	ad 1 l	Aqua purificata
	q.s.	Essigsäure (zur Einstellung von pH 5)
	1 kg	geschmolzenes Phenol
	ad 2,6 l	Aqua purificata

2.8.2 Realtime RT-PCR

Die Quantifizierung der Synapsin 2b- und Rabphilin-mRNA erfolgte mittels Reverser Transkription und nachfolgender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) am LightCycler[®] (Roche Diagnostics, Mannheim). Zur Detektion wurden sequenzspezifische Hybridisierungssonden verwendet. Diese binden innerhalb des PCR-Produktes an ihre komplementäre Sequenz und emittieren via Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Licht, dessen Signalstärke proportional zur amplifizierten DNA-Menge ist. Aufgrund der unterschiedlichen Markierung der Hybridisierungssonden für Synapsin 2b bzw. Rabphilin (markiert mit LC-Red 640) und für das zur Normierung verwendete Housekeeping Gen GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, markiert mit LC-Red 705) konnte in jeder Probe die Amplifikation beider Sequenzen gleichzeitig gemessen und so die relative Menge der mRNA von Synapsin 2b bzw. Rabphilin berechnet werden (siehe Kapitel 2.8.3).

Die Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen RNA Amplification Kit Hybridization Probes (Roche Diagnostics) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Da sich die Emissionsspektren der beiden gleichzeitig gemessenen Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überlagern, erfolgte durch die LightCycler[®]-Software eine Korrektur mit einem Color Compensation File, das zuvor mit einem Color Compensation Set (Roche Diagnostics) erstellt wurde.

Folgende Primer und Hybridisierungssonden wurden verwendet:

Synapsin 2b-Primer 1:	5'-CGC CTG CTC TGA GAT GTT TG-3'
Synapsin 2b-Primer 2:	5'-GCT TGG ACT TGT TTT GGA CCT AC-3'
Synapsin 2b-Sonde 1:	5'-ACC TTT AAC CAC CCA ACA GCC-3' - Fluorescein
Synapsin 2b-Sonde 2:	Red 640 - 5'-AGA GTG GAA CAC TTA AGG AAC CG-3'

Rabphilin-Primer 1:	5'-CGG ATC GGA GAC ATA GAG GAA C-3'
Rabphilin-Primer 2:	5'-CCA GGT CGC TGT GTT TGA TAT C-3'
Rabphilin-Sonde 1:	5'-CAA CGG CTA CTC AGA CCC CTT CGT C-3' - Fluorescein
Rabphilin-Sonde 2:	Red 640 - 5'-AGC TCT GGC TGA AAC CGG ACA TGG-3'
GAPDH-Primer 1:	5'-GGC CTC GTC TCA TAG ACA-3'
GAPDH-Primer 2:	5'-ATG TTA GCG GGA TCG C-3'
GAPDH-Sonde 1:	5'-GTA TGA TTC TAC CCA CGG CAA GT-3' - Fluorescein
GAPDH-Sonde 2:	Red 705 - 5'-AAT GGC ACA GTC AAG GCT G-3'

Die Primer für Synapsin 2b und GAPDH wurden von MWG-Biotech (Ebersberg), die entsprechenden Sonden von Genset Oligos (Paris, Frankreich) bezogen. Primer und Sonden für Rabphilin stammten von Tib Molbiol, Berlin.

Die RT-PCR von Synapsin 2b wurde wie folgt durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz (20 µl):</u>	0,5 µM	Synapsin 2b-Primer	
	0,4 µM	Synapsin 2b-Sonden	
	0,5 µM	GAPDH-Primer	
	0,2 µM	GAPDH-Sonden	
	0,35 µg	RNA	
	6 mM	Magnesiumchlorid	
	4 µl	LightCycler RT-PCR Reaction Mix (5x)	
	0,4 µl	LightCycler RT-PCR Enzyme Mix	
<u>Reaktionsbedingungen:</u>	Reverse Transkription	10 min	55 °C
	Denaturierung	30 sec	95 °C
	Amplifizierung (35 Zyklen)	0 sec	95 °C
		15 sec	55 °C
		10 sec	72 °C

Rabphilin wurde wie folgt amplifiziert:

<u>Reaktionsansatz (20 µl):</u>	0,5 µM	Rabphilin-Primer
	0,2 µM	Rabphilin-Sonden
	0,5 µM	GAPDH-Primer
	0,2 µM	GAPDH-Sonde 1
	0,5 µM	GAPDH-Sonde 2
	0,35 µg	RNA
	6 mM	Magnesiumchlorid
	4 µl	LightCycler RT-PCR Reaction Mix (5x)
	0,4 µl	LightCycler RT-PCR Enzyme Mix

<u>Reaktionsbedingungen:</u>	Reverse Transkription	10 min	55 °C
	Denaturierung	30 sec	95 °C
	Amplifizierung (35 Zyklen)	0 sec	95 °C
		15 sec	60 °C
		10 sec	72 °C

2.8.3 Berechnung der relativen mRNA-Menge

Zur Berechnung der in den Proben vorhandenen relativen Mengen der mRNA wurde die Amplifikation des Zielgens (Synapsin 2b bzw. Rabphilin) und des Referenzgens (GAPDH) gleichzeitig gemessen und mit der Fit Point-Methode des LightCycler[®]-Instrumentes analysiert. Dabei wird eine horizontale Linie in die exponentielle Phase des gemessenen Fluoreszenzsignals gelegt. An den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale verschiedener Proben mit der horizontalen Linie liegt die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche aktuelle DNA-Menge vor (siehe Abbildung 2-1). Die Expression des Zielgens im Verhältnis zu der des Referenzgens (normalisierte relative Quantifizierung) kann dann wie folgt berechnet werden:

Allgemein gilt während der logarithmischen Phase der PCR-Amplifizierung:

$$C_n = C_0 * E^n$$

(C_n : DNA-Menge im Zyklus n ; C_0 : DNA-Ausgangsmenge; E : Effizienz der PCR; n : Zykluszahl)

An den Schnittpunkten zweier Fluoreszenzsignale mit der horizontalen Linie gilt:

$$C_{n(1)} = C_{n(2)}$$

Beim Vergleich der Fluoreszenzsignale einer Probe (d.h. das Gewebe stammt von einem behandelten Tier) und einer Kontrolle (d.h. das Gewebe stammt von einem unbehandeltem Tier) gilt entsprechend für die Schnittpunkte:

$$\begin{aligned} C_n(\text{Probe}) &= C_n(\text{Kontrolle}) \\ \Leftrightarrow C_{0(\text{Probe})} * E^{n(\text{Probe})} &= C_{0(\text{Kontrolle})} * E^{n(\text{Kontrolle})} \\ \Leftrightarrow C_{0(\text{Probe})} / C_{0(\text{Kontrolle})} &= E^{n(\text{Kontrolle})} / E^{n(\text{Probe})} = E^{n(\text{Kontrolle}) - n(\text{Probe})} \end{aligned}$$

Die relative DNA-Ausgangsmenge eines Zielgens Z (Synapsin 2b oder Rabphilin) einer Probe im Vergleich zu einem Referenzgen R (GAPDH) lässt sich dann aus der Zykluszahl n am Schnittpunkt mit der horizontalen Linie wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned} Z / R &= (C_{0Z(\text{Probe})} / C_{0Z(\text{Kontrolle})}) / (C_{0R(\text{Probe})} / C_{0R(\text{Kontrolle})}) \\ \Leftrightarrow Z / R &= E_Z^{n(\text{Kontrolle}) Z - n(\text{Probe}) Z} / E_R^{n(\text{Kontrolle}) R - n(\text{Probe}) R} \end{aligned}$$

Wenn allgemein die Effizienz $E = 2$ gesetzt wird, gilt:

$$Z / R = 2^{(n(\text{Kontrolle}) Z - n(\text{Probe}) Z) - (n(\text{Kontrolle}) R - n(\text{Probe}) R)}$$

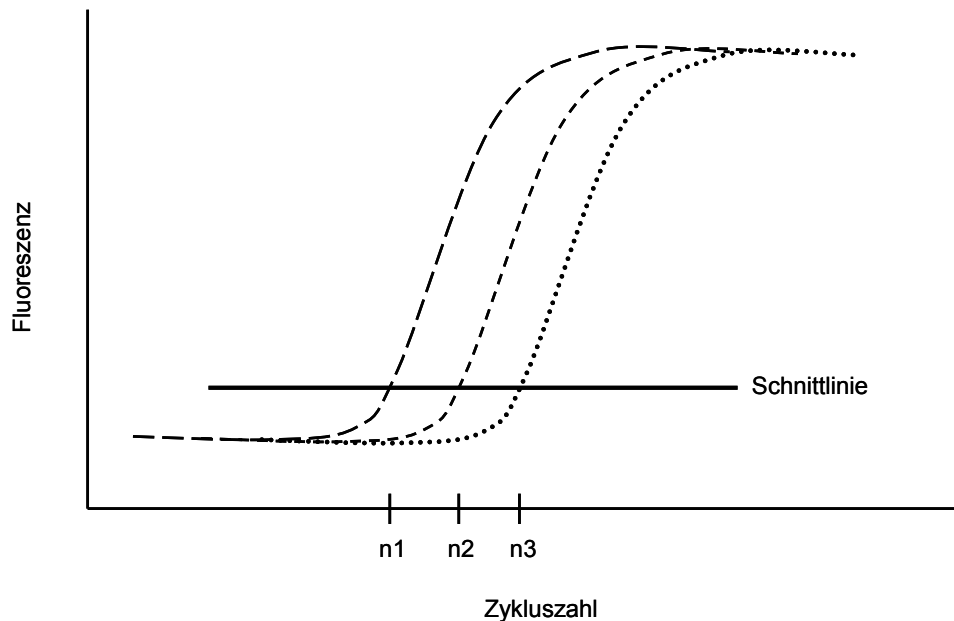


Abbildung 2-1: PCR-Quantifizierung mit der Fit Point-Methode des LightCycler[®]-Instrumentes. An den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale der drei Proben mit der horizontalen Linie liegt die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche aktuelle DNA-Menge vor.

2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nach jeder RT-PCR wurden die Reaktionsprodukte per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Agarose (2 %) wurde unter Erhitzen in 50 ml TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,3 µg/ml), die Lösung in die Gelkammer eines Sub-Cell[®] GT Agarose Gelelektrophorese-Systems (Bio-Rad, München) gegossen und der Geltaschenkamm eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen des mit TAE-Puffer überdeckten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V, bis die Bromphenolblau-Bande $\frac{3}{4}$ der maximalen Laufstrecke erreicht hatte. Anschließend wurde die DNA mittels UV-Meter (Gel Doc[®] Geldokumentationssystem und QuantityOne[®]-Software, Bio-Rad, München) detektiert.

<u>TAE-Puffer</u>	4,84 g Tris
	1,14 ml Essigsäure
	2 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0
	ad 1 l Aqua purificata
<u>6x DNA-Ladepuffer</u>	30 % Glycerin
	0,25 % Bromphenolblau

2.9 Statistik

Allgemeine Anmerkungen: Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel[®] 2002 und SPSS[®] for Windows 10.01. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben.

Western Blots: Die densitometrische Analyse der Bandenstärken erfolgte mit der Software QuantityOne[®] (Biorad, München). Die Bandenstärke des Zielproteins (PKG-1, Synapsin 2b oder Rabphilin) wurde durch die Bandenstärke der Ladungskontrolle ERK-2 dividiert und das Ergebnis prozentual zu dem Quotienten des unbehandelten Kontrolltiers ausgedrückt. Die so ermittelten Werte wurden mit einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) auf Signifikanz getestet.

Realtime RT-PCR: Die Bestimmung der relativen mRNA-Menge in jeder Probe erfolgte mit der in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Methode. Die so ermittelten Zahlenwerte wurden in Prozent im Verhältnis zu unbehandelten Kontrolltieren umgerechnet und einer univariaten ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) unterzogen.

Formalintest bei Ratten: Für die Darstellung des Zeitverlaufs des Flinchverhaltens nach Formalininjektion wurde zunächst die Anzahl der Flinches jeder einzelnen Ratte in fünfminütigen Intervallen summiert und der resultierende Mittelwert als Flinches pro Minute berechnet. Tiere, die die gleiche Prüfsubstanz in der gleichen Dosis erhielten, wurden als Gruppe zusammengefasst und der Gruppen-Mittelwert der Flinches pro Minute \pm SEM gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich wurden mittels Boxplot oder Säulendiagramm die Gesamtsummen der Flinches jeder Gruppe im Beobachtungszeitraum von 60 min miteinander verglichen. Die Gesamtsummen der Flinches wurden mit einer univariaten ANOVA mit nachfolgender Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) auf Signifikanz getestet.

Formalintest bei Mäusen: Die Leckzeiten jeder Maus nach Formalininjektion wurde in fünfminütigen Intervallen summiert und der Mittelwert \pm SEM gleich behandelter Tiere gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Zum Vergleich der nozizeptiven Antwort verschiedener Gruppen wurden die Leckzeit über einen Zeitraum von 45 min summiert und einer univariaten ANOVA unterzogen. Anschließend wurden die Gruppen untereinander mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) verglichen.

Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion: Der dekadische Logarithmus des Druckwertes, bei dem das Versuchstier nach Testung zunehmender Haarstärken die Hinterpfote anhub, wurde als mechanische Schwelle gewertet. Die mechanischen Schwellen nach Zymosaninjektion wurden in Prozentwerte im Verhältnis zur mechanischen Schwelle vor Zymosaninjektion (Leerwert) umgerechnet und die resultierenden Mittelwerte \pm SEM gegen die Zeit dargestellt. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde die Einzel-AUC zweier benachbarter Messpunkte mit der Formel:

$$\text{Einzel-AUC} = (y_1 + y_2) / 2 * (x_2 - x_1)$$

und die Gesamt-AUC als Summe der Einzel-AUC berechnet. Die Gesamt-AUC beider Gruppen (Knockout, Wildtyp) wurden mittels T-Test nach Student miteinander verglichen. Die Prüfung der Einzelwerte erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit Messwiederholung.

Hot-Plate-Test: Die Latenzzeiten beider Gruppen wurden mittels T-Test nach Student miteinander verglichen.

2.10 Chemikalien und Reagenzien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose NEE0	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumthiocyanat	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
APS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
EDTA (Idranal [®] III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Formalin 5%	Apotheke der Universitätsklinik, Frankfurt am Main
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magermilchpulver (Nutaflor [®])	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Pefabloc [®] SC	Qbiogene-Alexis GmbH, Grünberg
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
PMSF	Perbio Science GmbH, Bonn
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Substanz

Trichloressigsäure

Tris

Triton X-100

Tween[®] 20

Zymosan A

Hersteller, Ort

AppliChem GmbH, Darmstadt

AppliChem GmbH, Darmstadt

Merck KGaA, Darmstadt

AppliChem GmbH, Darmstadt

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze

3 Ergebnisse

3.1 Formalintest nach pharmakologischer Beeinflussung bekannter cGMP-Targets

Im Folgenden werden die Effekte beschrieben, die bei Ratten im Formalintest nach Applikation verschiedener Prüfsubstanzen (Rp-8-Br-cGMPS, 8-Br-cGMP, L-cis-Diltiazem, EHNA, Milrinon) beobachtet werden konnten. Die Verabreichung der Prüfsubstanzen erfolgte intrathekal in das lumbale Rückenmark mit Hilfe eines zuvor implantierten Katheters.

3.1.1 Rp-8-Br-cGMPS

Rp-8-Br-cGMPS ist ein cGMP-Analogon, das inhibierend auf die cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (PKG-1) wirkt. Die i.t. Applikation dieser Substanz führte zu einer dosisabhängigen Reduktion des Formalin-induzierten nozizeptiven Verhaltens (Abbildung 3-1 A). In niedriger Dosis (0,1 μmol) wurde nur die 2. Phase des Formalintests beeinflusst, höhere Dosen (0,25 und 0,5 μmol) bewirkten in beiden Phasen eine Abnahme der nozizeptiven Antwort. Die Verabreichung von 1,0 μmol verursachte eine Beeinträchtigung der Motorik der Hinterpfoten, so dass bei dieser Dosis eine Untersuchung der antinozizeptiven Effekte nicht möglich war. Mittels ANOVA konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Gesamtsumme der Flinches belegt werden. Die Ergebnisse der Post-hoc-Tests sind in Abbildung 3-1 B dargestellt.

3.1.2 8-Br-cGMP

8-Br-cGMP ist ein cGMP-Analogon, das PKG-1 und PKG-2 aktiviert. In einer Dosis von 2,5 μmol i.t. steigerte diese Substanz die Anzahl der Flinches in beiden Phasen des Formalintests (Abbildung 3-2 A). Bei dieser Dosis waren die Ratten sehr erregt, kratzten sich und zeigten auch einzelne Flinches an der kontralateralen, unbehandelten Hinterpfote. Nach Applikation von 1 μmol 8-Br-cGMP war die Variabilität der beobachteten Effekte im Formalintest sehr hoch, jedoch unterschied sich der Gruppen-Mittelwert nicht vom Mittelwert der Kontrolltiere. Überraschenderweise hemmten niedrigere Dosen (0,1 und 0,25 μmol) signifikant die nozizeptive Antwort. Das Ergebnis der statistischen Auswertung ist in Abbildung 3-2 B gezeigt. Zu erkennen ist ein glockenförmiger Verlauf der antinozizeptiven Wirkung von 8-Br-cGMP.

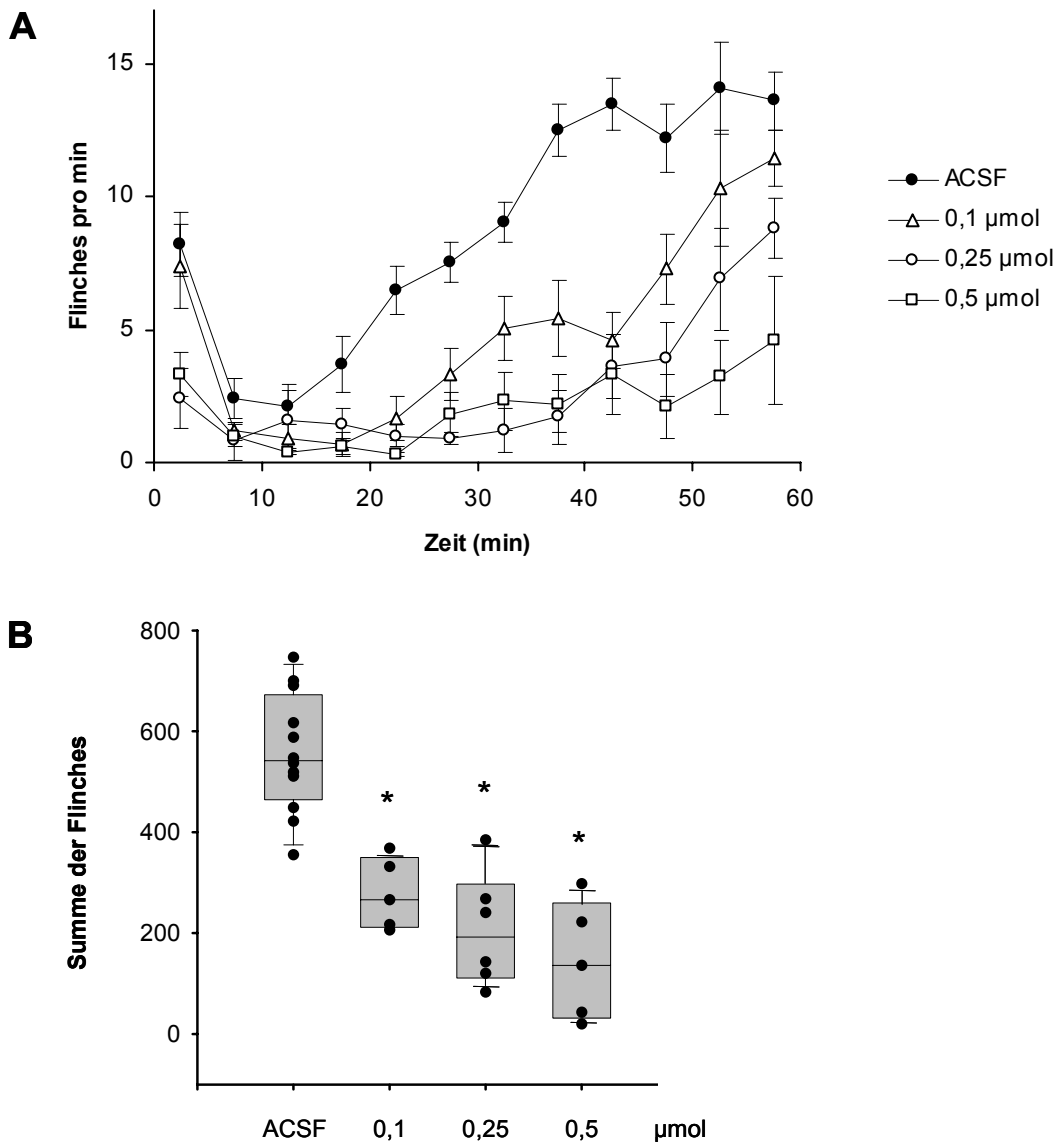


Abbildung 3-1: Formalintest bei Ratten nach Applikation verschiedener Dosen des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS. Kontrolltieren wurde künstlicher Liquor (ACSF) verabreicht. Die Applikation erfolgte intrathekal ins Lumbalmark über einen zuvor implantierten Katheter. 10 min danach wurde Formalin in eine Hinterpfote injiziert und die Anzahl der Flinches in fünfminütigen Intervallen gezählt. (A) Mittelwerte der Flinches pro Minute \pm SEM im Zeitverlauf. (B) Boxplot der Summe der Flinches in 60 min. Die Punkte repräsentieren die Flinchsummen der einzelnen Tiere. * Statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren, $p < 0,05$.

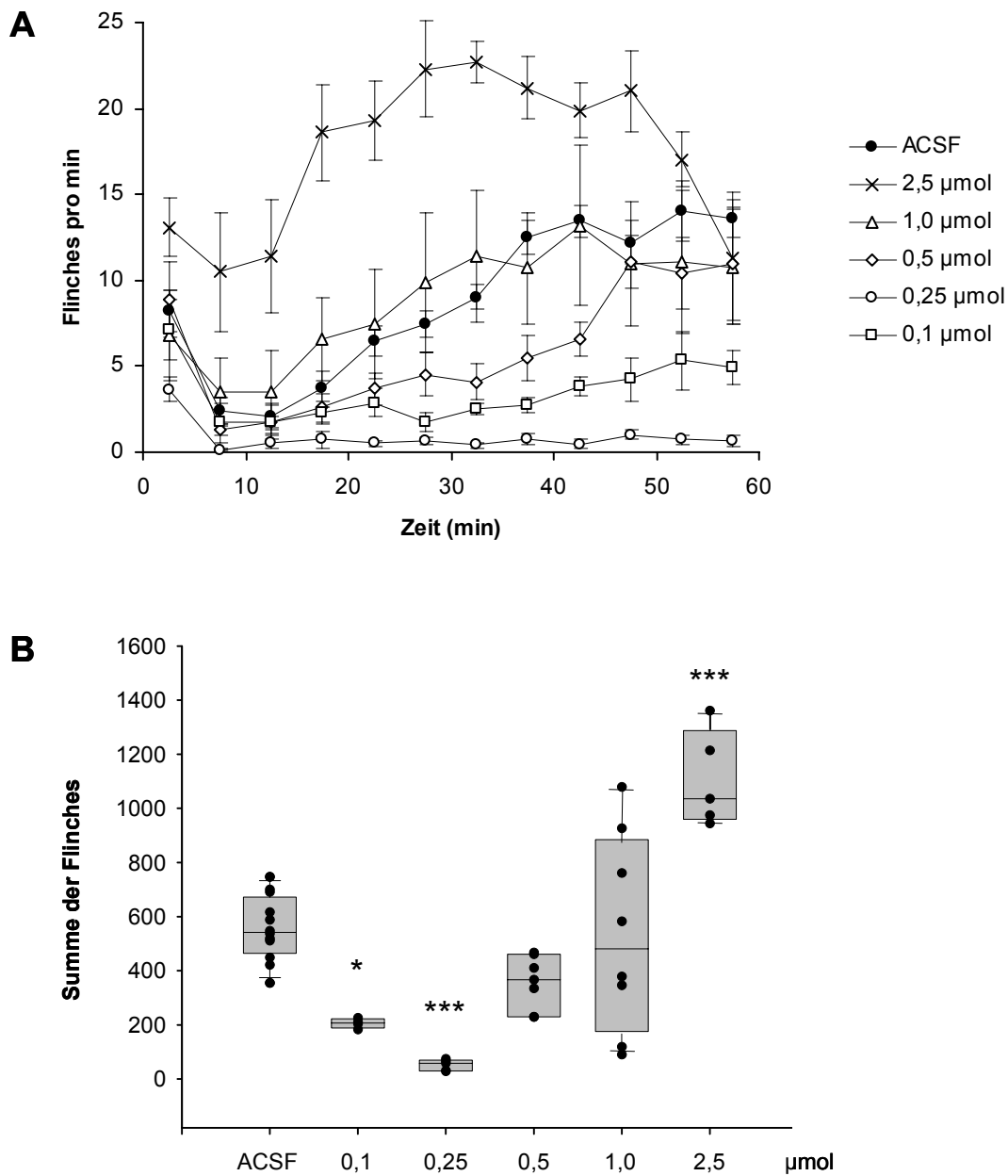


Abbildung 3-2: Formalintest bei Ratten nach i.t. Applikation verschiedener Dosen des PKG-Aktivators 8-Br-cGMP. Kontrolltieren wurde ACSF verabreicht. (A) Mittelwerte der Flinches pro Minute \pm SEM im Zeitverlauf. (B) Boxplot der Summe der Flinches in 60 min. Die Punkte repräsentieren die Flinchsummen der einzelnen Tiere. Statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.1.3 Kombination 8-Br-cGMP + Rp-8-Br-cGMPS

Da sowohl der PKG-1-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS als auch der PKG-1-Aktivator 8-Br-cGMP in niedriger Dosis die nozizeptive Antwort im Formalintest hemmten, wurden die Effekte beider Substanzen bei gleichzeitiger Applikation untersucht. Dabei wurde die antinozizeptive Wirkung von 0,1 μmol Rp-8-Br-cGMPS nicht durch 0,1 μmol 8-Br-cGMP antagonisiert. Die Kombination beider Substanzen war sogar stärker wirksam als eine Substanz allein und bewirkte eine fast vollständige Hemmung der nozizeptiven Antwort (Abbildung 3-3).

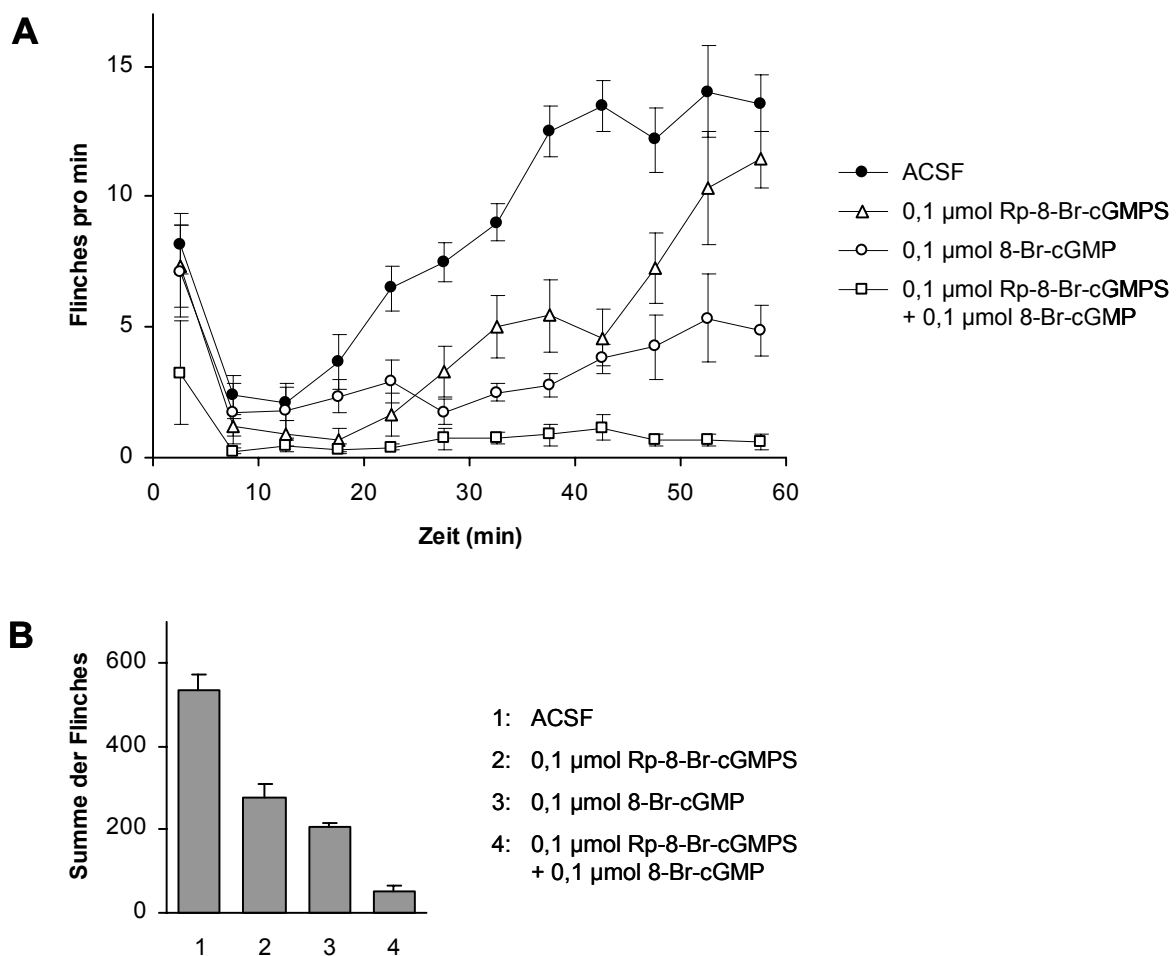


Abbildung 3-3: Formalintest bei Ratten nach i.t. Applikation von je 0,1 μmol des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS, des PKG-1-Aktivators 8-Br-cGMP, sowie der Kombination beider Substanzen ($n = 3$ pro Gruppe). Kontrolltiere ($n = 6$) erhielten ACSF. (A) Mittelwerte der Flinches pro Minute \pm SEM im Zeitverlauf (B) Summe der Flinches in 60 min \pm SEM.

3.1.4 L-cis-Diltiazem, EHNA und Milrinon

Die Experimente mit der Kombination von 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS ließen vermuten, dass 8-Br-cGMP seine antinozizeptiven Effekte durch cGMP-regulierte, aber PKG-1-unabhängige Targets bewirkt. Daher wurden auch Inhibitoren weiterer cGMP-Zielstrukturen hinsichtlich möglicher pro- oder antinozizeptiver Effekte im Formalintest untersucht. Neben PKG beeinflusst cGMP die Aktivität von Phosphodiesterasen (PDE-2 und -3) und zyklisch-Nukleotid gesteuerten Kationenkanälen (CNG-Kanäle, CNG = cyclic nucleotide gated). Die Existenz dieser Targets im lumbalen Rückenmark der Ratte wurde mittels RT-PCR bestätigt (Tegeder et al. 2002). Die Auswahl der Dosis der applizierten Substanzen basierte auf Experimenten mit Mäusen (Caro et al. 1988), umgerechnet auf das ca. zehnfach höhere Körpergewicht der Ratten.

Die Applikation des CNG-Kanal-Inhibitors L-cis-Diltiazem veränderte in der untersuchten Dosis (0,5 mg i.t.) im Vergleich zu Kontrolltieren das Formalin-induzierte Flinchverhalten nicht (Abbildung 3-4 A). Außerdem wurde der antinozizeptive Effekt von 0,25 μ mol 8-Br-cGMP durch Vorbehandlung mit 0,5 mg L-cis-Diltiazem 10 min vor der Applikation von 8-Br-cGMP nicht beeinflusst (Abbildung 3-4 A). Eine Hemmung der PDE zeigte ebenfalls keinen Effekt auf das Formalin-induzierte Flinchverhalten: Weder der PDE-2-Inhibitor EHNA (0,25 μ mol i.t.), noch der PDE-3-Inhibitor Milrinon (5 - 10 mg/kg i.p.) veränderten die Zahl der Flinches signifikant (Abbildung 3-4 B). Ein Vergleich der Summen der Flinches in 60 min ist in Abbildung 3-4 C zu sehen.

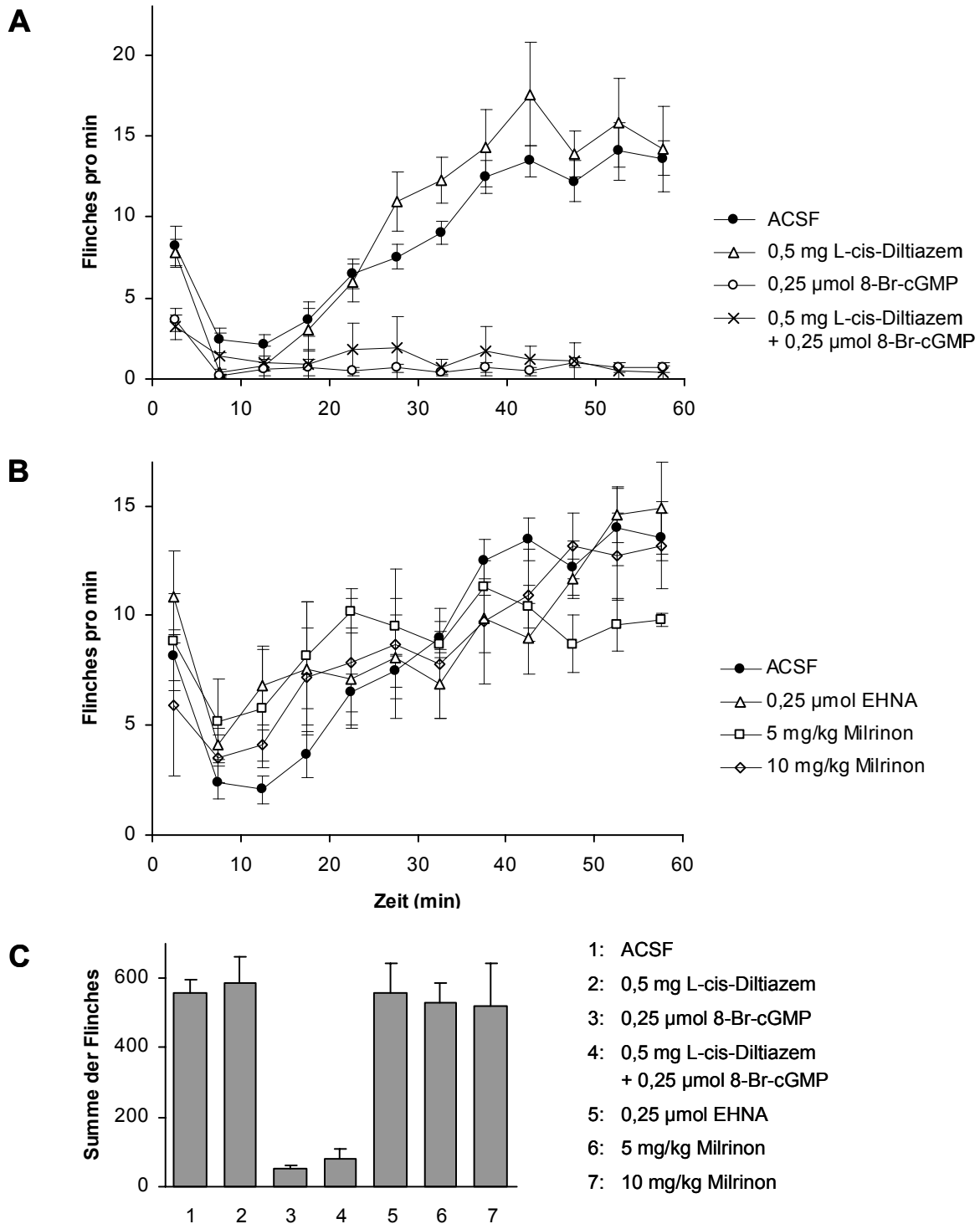


Abbildung 3-4: Formalintest bei Ratten nach Applikation des CNG-Kanal-Inhibitors L-cis-Diltiazem, des PDE-2-Hemmers EHNA oder des PDE-3-Hemmers Milrinon ($n = 3$ pro Gruppe). Kontrolltiere erhielten künstlichen Liquor (ACSF, $n = 6$). Die Applikation erfolgte entweder i.t. ins Lumbalmark (ACSF, L-cis-Diltiazem, 8-Br-cGMP, EHNA) oder i.p. (Milrinon). 10 min danach (bei Milrinon 20 min) wurde Formalin in eine Hinterpfote injiziert und die Anzahl der Flinches in fünfminütigen Intervallen gezählt. (A) und (B) Mittelwerte der Flinches pro Minute \pm SEM im Zeitverlauf. (C) Summe der Flinches in 60 min \pm SEM.

3.2 PKG-1-Expression im Lumbalmark

Da die Ergebnisse der Formalintests (Kapitel 3.1) auf eine Beteiligung der PKG-1 an der Verarbeitung nozizeptiver Signale hindeuteten, wurde auch die PKG-1-Proteinexpression im Lumbalmark nach nozizeptiver Stimulation und nach Verabreichung von Morphin, 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS untersucht.

3.2.1 PKG-1-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation

Mit Western-Blot-Analysen konnte bei unbehandelten Ratten die in der Literatur beschriebene Expression der PKG-1 im Lumbalmark (Tao et al. 2000) bestätigt werden. Die Formalininjektion in eine Hinterpfote bewirkte im Zeitverlauf eine zunehmende Steigerung der PKG-1-Proteinkonzentration im Lumbalmark mit maximalen Werten nach 48 und 96 Stunden (Abbildung 3-5). Im Gegensatz dazu war PKG-2 nicht nachweisbar.

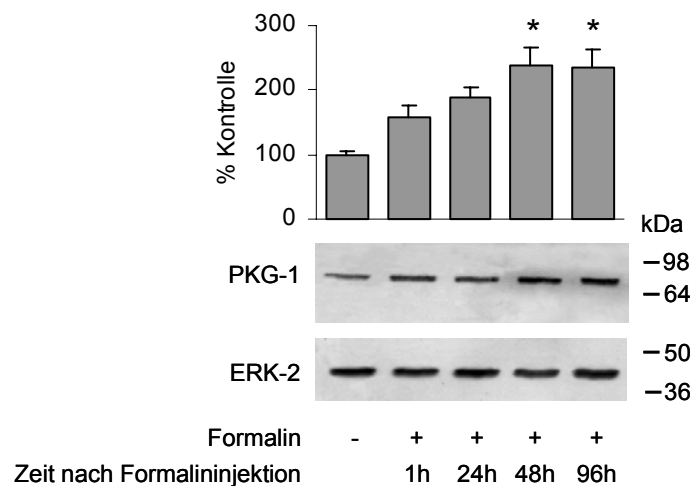


Abbildung 3-5: Western Blot von PKG-1 im Lumbalmark der Ratte nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Stärke des PKG-1-Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle ERK-2, die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Die T-Linien stellen die SEM dar, die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.2.2 Beeinflussung der PKG-1-Proteinexpression durch Morphin, Rp-8-Br-cGMPS und 8-Br-cGMP

Die Formalin-induzierte Hochregulation der PKG-1 im Lumbalmark trat nicht auf, wenn die Versuchstiere vor der Formalininjektion mit dem Opioidanalgetikum Morphin (2,5 oder 5 mg/kg i.p.) behandelt wurden. Die Verabreichung einer hohen Dosis des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS (0,5 μ mol i.t.) konnte die Hochregulation der PKG-1 ebenfalls verhindern (Abbildung 3-6).

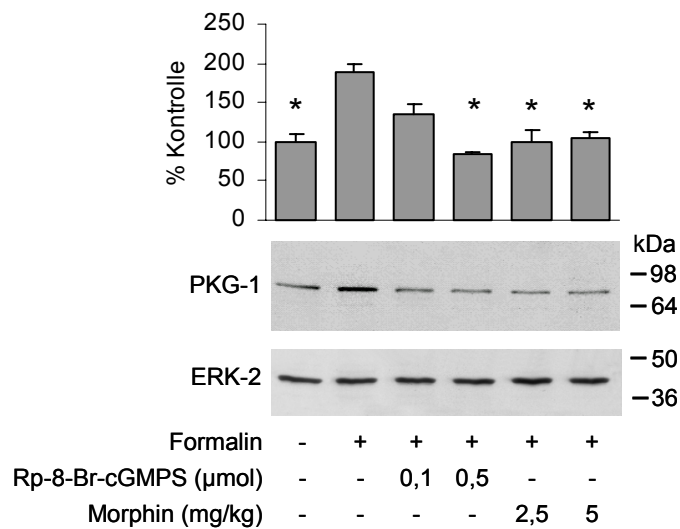


Abbildung 3-6: Western Blot von PKG-1 im Lumbalmark von Ratten, denen ACSF i.t. (1. und 2. Bande von links), Rp-8-Br-cGMPS i.t. oder Morphin i.p. in den angegebenen Dosierungen appliziert wurde. 10 min (Rp-8-Br-cGMPS) bzw. 20 min (Morphin) nach der Applikation der Prüfsubstanzen wurde Formalin in eine Hinterpfote injiziert und 48 h danach das Lumbalmark entnommen. Das Diagramm zeigt die Stärke des PKG-1-Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle ERK-2, die Bande des nicht mit Formalin behandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu Kontrolltieren nach Formalininjektion. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Der PKG-1-Aktivator 8-Br-cGMP beeinflusste die Formalin-induzierte Hochregulation der PKG-1 je nach applizierter Dosis unterschiedlich: Hoch dosiertes 8-Br-cGMP bewirkte eine zusätzliche Steigerung der PKG-1-Expression im Lumbalmark und die Bildung einer zweiten Bande von ca. 65 kDa (Abbildung 3-7). Dieser Effekt war 1 h nach Formalininjektion am stärksten ausgeprägt und hielt über 48 h an. Eine niedrige Dosis 8-Br-cGMP (0,25 µmol) reduzierte dagegen die Formalin-induzierte Hochregulation der PKG-1 (Abbildung 3-7).

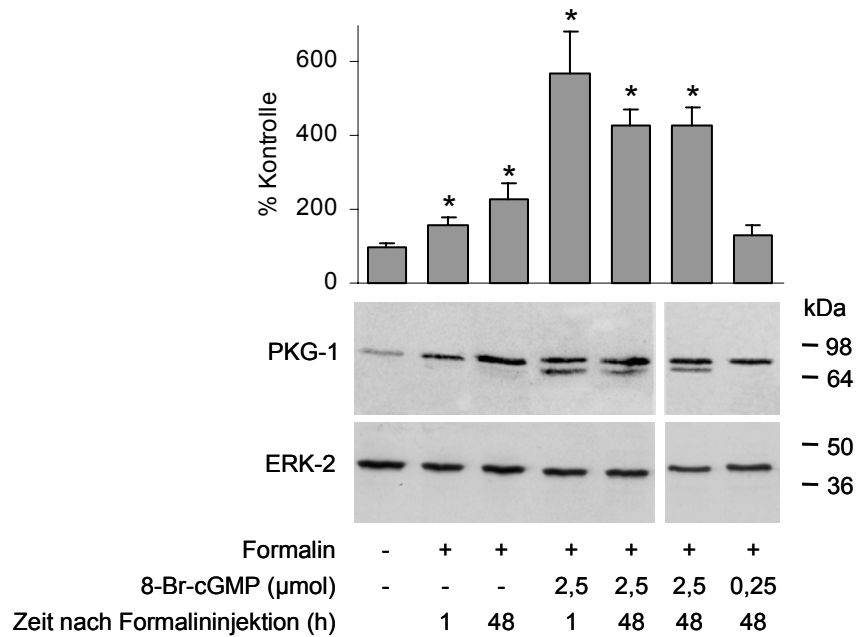


Abbildung 3-7: Western Blot von PKG-1 im Lumbalmark von Ratten nach i.t. Applikation von 8-Br-cGMP in den angegebenen Dosierungen und anschließender Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Lumbalmark wurde zu den aufgeführten Zeiten nach der Formalininjektion entnommen. Das Diagramm zeigt die Stärke des PKG-1-Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle ERK-2 ± SEM, die Bande des nicht mit Formalin behandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Bei den PKG-1-Doppelbanden wurde die Summe beider Banden gewertet. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu nicht mit Formalin behandelten Kontrolltieren.

Auch ohne Formalininjektion beeinflusste sowohl der PKG-1-Inhibitor als auch der PKG-1-Aktivator die PKG-1-Proteinkonzentration im Lumbalmark: 24 h nach Applikation von 2,5 μmol 8-Br-cGMP war die PKG-1-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren erhöht, während nach Applikation von 0,5 μmol Rp-8-Br-cGMPS der gegenteilige Effekt beobachtet wurde (Abbildung 3-8).

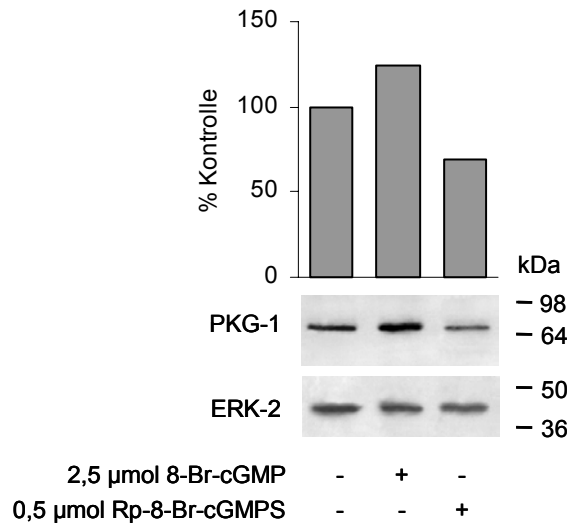


Abbildung 3-8: Western Blot von PKG-1 im Lumbalmark von Ratten nach i.t. Applikation von 2,5 μmol 8-Br-cGMP oder 0,5 μmol Rp-8-Br-cGMPS ohne anschließende Formalininjektion. Das Lumbalmark wurde 24 h nach der Applikation entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

Neben den bekannten Targets der NO/cGMP-Kaskade wurden in der vorliegenden Arbeit auch die synaptischen Vesikelproteine Synapsin 2 und Rabphilin hinsichtlich einer Beteiligung an der nozizeptiven Transmission im Rückenmark untersucht. Im Anschluß werden die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

3.3 Synapsin 2b-Expression im Lumbalmark

Mit Western Blot-Analysen konnte die Expression von Synapsin 2 im Lumbalmark bestätigt werden, jedoch war nur die b-Isoform (Synapsin 2b) nachweisbar (Abbildung 3-9).

3.3.1 Synapsin 2b-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation

Die Injektion von Formalin in eine Hinterpfote bewirkte eine rasche Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration im Lumbalmark. Dieser Effekt trat bereits 10 min nach der Formalininjektion auf und hielt über einen Zeitraum von 8 h an. Nach 48 h war jedoch der Synapsin 2b-Proteingehalt im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren gesteigert, was eine gegenregulatorische Zunahme der Synapsin 2b-Synthese vermuten ließ (Abbildung 3-9).

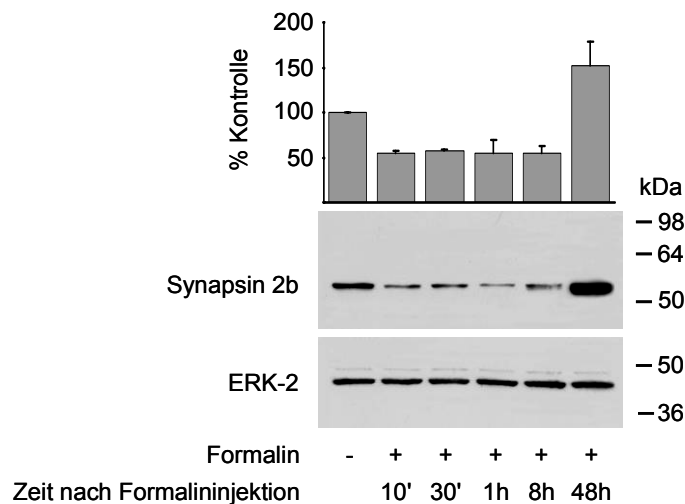


Abbildung 3-9: Western Blot von Synapsin 2b (54 kDa) im Lumbalmark der Ratte nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und mit dem Detergenz CHAPS solubilisiert. Das Diagramm zeigt die Stärke des Synapsin 2b-Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle ERK-2 (43 kDa), die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Synapsin 2a (74 kDa) konnte nicht detektiert werden.

3.3.2 Synapsin 2b-mRNA-Expression nach nozizeptiver Stimulation

Um herauszufinden, ob die nach Formalininjektion beobachteten Änderungen des Synapsin 2b-Proteingehaltes im Lumbalmark mit einer veränderten Synapsin 2b-Transkription verbunden waren, wurde die Expression der Synapsin 2b-mRNA mittels quantitativer Realtime RT-PCR untersucht. Die Konzentration der Synapsin 2b-mRNA im Lumbalmark blieb innerhalb der ersten 8 h nach Formalininjektion unverändert (Abbildung 3-10). 24, 36 und 48 h nach Formalininjektion war jedoch eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Synapsin 2b-mRNA zu beobachten, welche die Steigerung der Synapsin 2b-Proteinkonzentration 48 h nach Formalininjektion erklären kann.

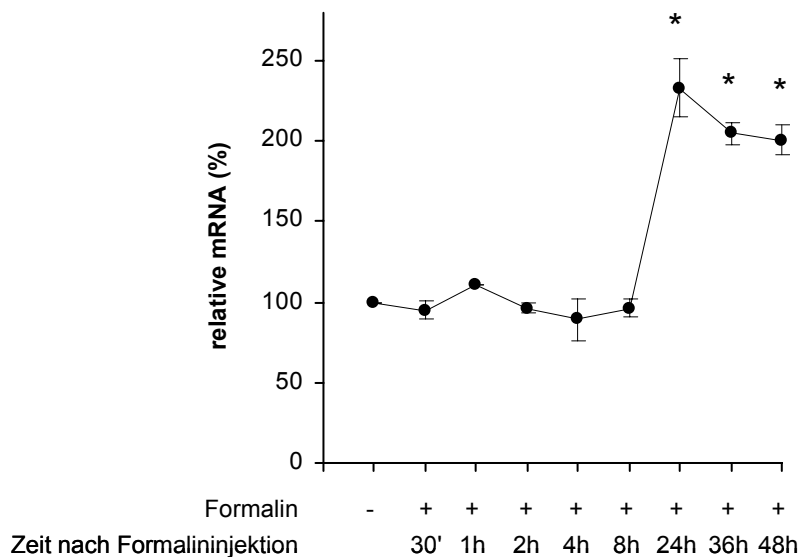


Abbildung 3-10: Konzentration der Synapsin 2b-mRNA im Lumbalmark der Ratte nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Bestimmung erfolgte mit quantitativer Realtime RT-PCR, bei der Synapsin 2b und das Housekeeping-Gen GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Die relative mRNA-Menge von unbehandelten Kontrolltieren wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,001$.

3.3.3 Synapsin 2b-Proteingehalt in CHAPS-unlöslichen Fraktionen

Die beobachtete rasche Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration in Verbindung mit unveränderten mRNA-Konzentrationen innerhalb der ersten 8 h nach Formalininjektion ließen vermuten, dass das Protein entweder abgebaut oder so modifiziert wurde, dass es bei der Probenaufbereitung mit dem Detergenz CHAPS aus der CHAPS-löslichen Fraktion entfernt und in die CHAPS-unlösliche Fraktion überführt wurde. Eine solche Modifikation könnte durch stärkere Bindung von Synapsin 2b an Bestandteile des Zytoskeletts, z.B. Actin (Chilcote et al. 1994), zu erklären sein. Zur Bestimmung der Synapsin 2b-Proteinkonzentration in der CHAPS-unlöslichen Fraktion wurde diese weiter aufbereitet mit Detergenzien, die sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften von CHAPS unterscheiden und somit ein anderes Solubilisierungsmuster zeigen. Zunächst erfolgte eine Solubilisierung mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100, anschließend wurde der verbliebene Rückstand mit dem ionischen Detergenz Desoxycholat solubilisiert.

Im Gegensatz zur CHAPS-löslichen Fraktion (Abbildung 3-9) war in den beiden CHAPS-unlöslichen Fraktionen 1 h nach Formalininjektion keine Veränderung der Synapsin 2b-Proteinkonzentration zu beobachten (Abbildung 3-11). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die beobachtete Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration durch Überführung in die CHAPS-unlösliche Fraktion zu erklären ist.

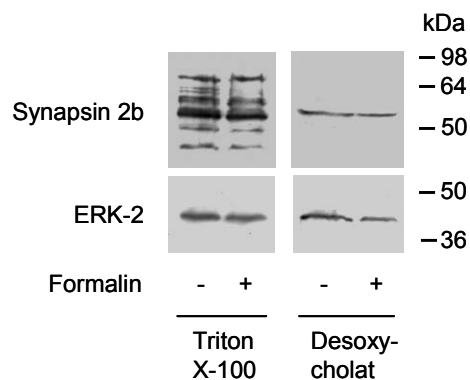


Abbildung 3-11: Western Blot von Synapsin 2b nach Aufbereitung der in CHAPS nicht löslichen Fraktion. Der in CHAPS unlösliche Rückstand wurde zunächst mit Triton X-100 (links) solubilisiert, anschließend wurde der in Triton X-100 unlösliche Rückstand mit Desoxycholat (rechts) solubilisiert. Untersucht wurde das Lumbalmark von einem unbehandelten Kontrolltier und 1 h nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

3.3.4 Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit Analgetika

Zur Überprüfung, ob die Formalin-induzierten Veränderungen der Synapsin 2b-Proteinkonzentration an die nozizeptive Signalübertragung gebunden sind, wurden 20 min vor der Formalininjektion drei Analgetika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus (Morphin, Diclofenac und Metamizol) verabreicht. Die Applikation des Opioidanalgetikums Morphin (10 mg/kg i.p.) verhinderte im Lumbalmark sowohl die rasche Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration innerhalb der ersten 8 h nach Formalininjektion als auch die Steigerung der Proteinexpression nach 48 h (Abbildung 3-12). Auch die nicht-opioiden Analgetika Diclofenac (10 mg/kg) und Metamizol (1 g/kg) beeinflussten die Formalin-induzierten Veränderungen der Synapsin 2b-Konzentration: 1 h nach der Formalininjektion war die Abnahme der Synapsin 2b-Konzentration bei den mit Analgetika vorbehandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich geringer (Abbildung 3-13).

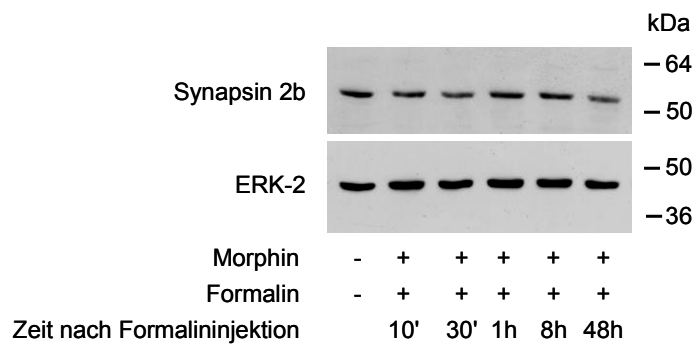


Abbildung 3-12: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark der Ratte nach Applikation von 10 mg/kg Morphin i.p. 20 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeiten entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

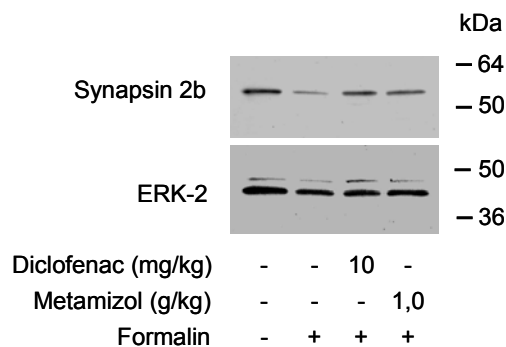


Abbildung 3-13: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark der Ratte nach Applikation von Diclofenac oder Metamizol in den angegebenen Dosierungen i.p. 20 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

3.3.5 Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit NOS-Modulatoren

Da Synapsin 2b über ein Adapterprotein an die neuronale NO-Synthase (nNOS) gebunden werden kann (Jaffrey et al. 2002), wurde eine mögliche Beteiligung von NO an den Formalin-induzierten Veränderungen der Synapsin 2b-Konzentration durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem NOS-Inhibitor und einem NOS-Aktivator untersucht. Die Applikation des NOS-Inhibitors L-NAME (10 und 100 mg/kg i.p.) 20 min vor der Formalininjektion verhinderte ebenso wie Morphin die rasche Senkung der Synapsin 2b-Proteinkonzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-14 A). Im Gegensatz dazu wurde durch Vorbehandlung mit dem NO-Donor NOC-5 (4 und 20 µg i.t.) die Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration dosisabhängig verstärkt (Abbildung 3-9 B). Dies lässt vermuten, dass NO an der Regulation der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark beteiligt ist. Darüber hinaus wurden nach der Applikation des NO-Donors zusätzliche Banden (ca. 46 und 52 kDa) detektiert, was auf eine Spaltung von Synapsin 2b in kleinere Fragmente hinweist.

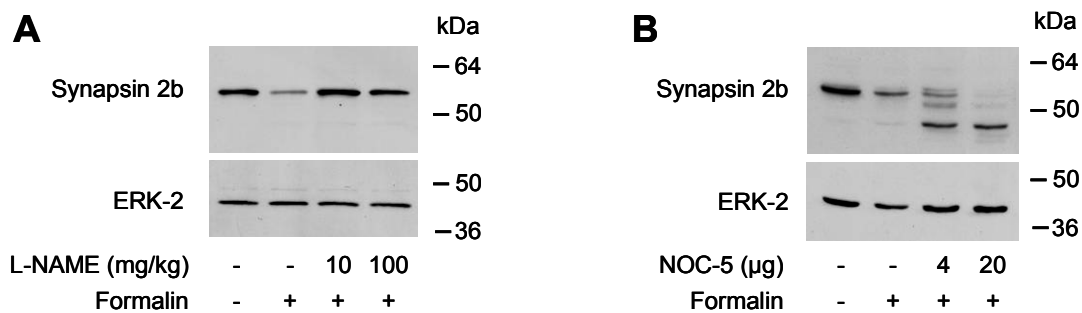


Abbildung 3-14: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark der Ratte nach Vorbehandlung der Tiere mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (A) oder dem NO-Donor NOC-5 (B) in den angegebenen Dosierungen. L-NAME wurde i.p. appliziert, NOC-5 i.t. über einen zuvor implantierten Lumbalkatheter. 20 min (L-NAME) bzw. 10 min (NOC-5) später erfolgte die Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

3.3.6 Synapsin 2b-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit cGMP-Analoga

Da NO im Rahmen der nozizeptiven Transmission eine Steigerung der cGMP-Synthese bewirkt (Ferreira et al. 1999; Tao et al. 2002), wurden auch cGMP-Analoga hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark getestet. Die Verabreichung des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP führte nach 1 h in allen applizierten Dosierungen (0,1 bis 2,5 μmol i.t.) – ebenso wie der NO-Donor – zu einer im Vergleich zur alleinigen Formalininjektion stärkeren Senkung der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-15 A, links). 48 h nach der Formalininjektion war die Synapsin 2-Konzentration auch bei den mit 8-Br-cGMP vorbehandelten Tieren wieder angestiegen, jedoch nicht so stark wie nach alleiniger Formalininjektion (Abbildung 3-15 A, rechts). Darüber hinaus wurden ebenfalls im Bereich von ca. 46 und 52 kDa zusätzliche Banden detektiert, die Spaltungsprodukte von Synapsin 2b darstellen könnten.

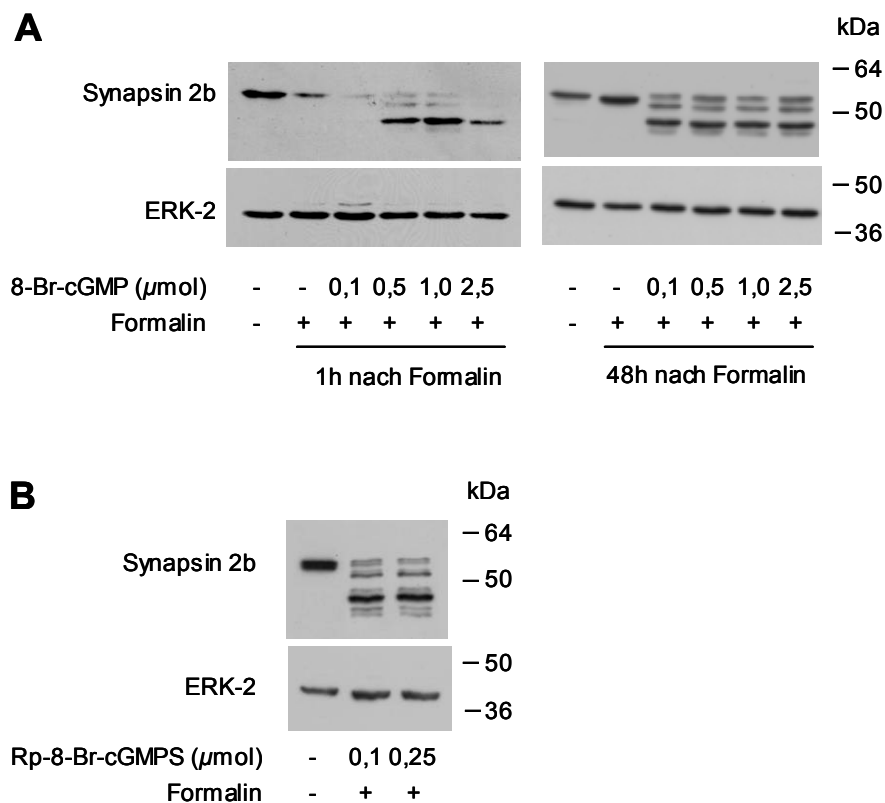


Abbildung 3-15: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark der Ratte nach Vorbehandlung der Tiere mit dem PKG-1-aktivierenden cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (A) oder dem PKG-1-inhibierenden cGMP-Analogon Rp-8-Br-cGMPS (B) in den angegebenen Dosierungen. Die Applikation erfolgte i.t. über einen zuvor implantierten Lumbalkatheter 10 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeiten (A) bzw. 1 h (B) nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

Ein weiteres cGMP-Analogon, Rp-8-Br-cGMPS, zeigte die gleichen Effekte wie 8-Br-cGMP bzw. NOC-5: Die Synapsin 2b-Proteinkonzentration im Lumbalmark wurde nach i.t. Applikation von 0,1 oder 0,25 μmol Rp-8-Br-cGMPS stärker gesenkt als durch alleinige Formalininjektion, außerdem traten die oben beschriebenen Zusatzbanden auf (Abbildung 3-15 B). Beide cGMP-Analoga führten auch in den CHAPS-unlöslichen Fraktionen (vgl. Kapitel 3.3.3) zu einer Senkung der Synapsin 2b-Proteinkonzentration (Abbildung 3-16). Die Effekte der cGMP-Analoga werden somit nicht durch eine Überführung von Synapsin 2b aus der CHAPS-löslichen in die CHAPS-unlösliche Fraktion bedingt.

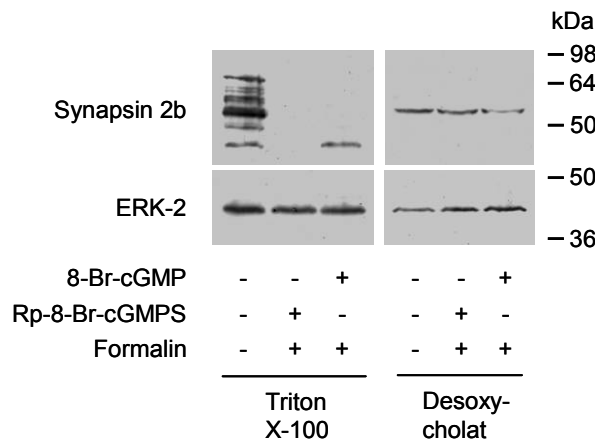


Abbildung 3-16: Western Blot von Synapsin 2b nach Aufbereitung der in CHAPS nicht löslichen Fraktion. Die Solubilisierung erfolgte zunächst mit Triton X-100 (links) und anschließend mit Desoxycholat (rechts). Untersucht wurde das Lumbalmark von einem unbehandelten Kontrolltier, sowie nach i.t. Applikation von 8-Br-cGMP (1,0 μmol) oder Rp-8-Br-cGMPS (0,25 μmol) und nachfolgender Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Lumbalmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS sind cGMP-Analoga mit struktureller Ähnlichkeit zu cGMP. Bezüglich der Beeinflussung der PKG-1 verhalten sich beide Substanzen jedoch unterschiedlich: 8-Br-cGMP bewirkt eine Stimulation der PKG-1, Rp-8-Br-cGMPS eine Hemmung. Da beide Prüfsubstanzen die gleichen Veränderungen der Synapsin 2b-Proteinkonzentrationen im Lumbalmark hervorrufen, sind die beobachteten Effekte vermutlich cGMP-abhängig, jedoch PKG-1-unabhängig. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Synapsin 2b-Proteinkonzentrationen nach gleichzeitiger Applikation beider Prüfsubstanzen, sowie bei PKG-1-Knockout-Mäusen untersucht.

Nach Applikation der Kombination beider Prüfsubstanzen in jeweils gleicher Dosis (0,1 bzw. 0,5 μmol i.t.) konnte Synapsin 2b mit der üblichen Detektionsmethode nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3-17). 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS wirken somit eher additiv als antagonistisch auf die Synapsin 2b-Proteinkonzentrationen im Lumbalmark. Darüber hinaus gab es bei PKG-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede in der Synapsin 2b-Expression im Lumbalmark (Abbildung 3-18). Sowohl bei unbehandelten Tieren als auch 24 h nach Formalininjektion waren bei beiden Gruppen gleiche Proteinmengen detektierbar. Die Formalininjektion führte wie im Lumbalmark der Ratte jeweils zu einem späten Anstieg der Synapsin 2b-Konzentrationen.

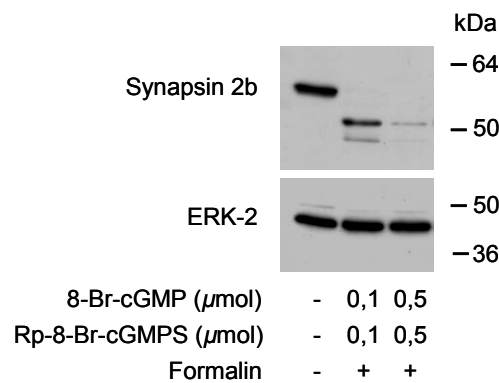


Abbildung 3-17: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark nach gleichzeitiger Applikation von 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS in den angegebenen Dosierungen. Die Applikation erfolgte i.t. über einen zuvor implantierten Lumbalkatheter 10 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

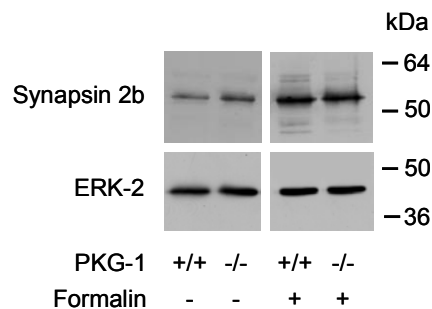


Abbildung 3-18: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark von PKG-1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Das Rückenmark wurde unbehandelten Tieren oder 24 h nach Formalininjektion in eine Hinterpfote entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

3.4 Formalintest mit Ratten nach Unterdrückung der Synapsin 2-Expression

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen deuteten darauf hin, dass Synapsin 2b an der Übertragung nozizeptiver Signale im Lumbalmark beteiligt ist. Zur Klärung der funktionellen Relevanz dieser Beobachtungen wurden nozizeptive Tests mit Synapsin 2-Knockout-Mäusen (Kapitel 3.5), sowie mit Ratten nach Unterdrückung der Synapsin 2-Expression durchgeführt. Bei den Ratten erfolgte die Unterdrückung der Synapsin 2-Expression durch eine fünftägige, kontinuierliche Infusion von Antisense-Oligonukleotiden i.t. über einen Lumbalkatheter. Je drei Tiere erhielten Antisense-Oligonukleotide (Antisense 1 oder 2), die entsprechenden Sense-Oligonukleotide (Sense 1 oder 2), oder eine Einzelinjektion ACSF (20 μ l) zur Kontrolle. Anschließend wurde ein Formalintest durchgeführt.

Die Infusion beider Antisense-Oligonukleotide bewirkte im Gegensatz zu den Sense-Oligonukleotiden wie erwartet eine Senkung der Synapsin 2-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-19). Im Formalintest zeigten die mit den Antisense-Oligonukleotiden behandelten Tiere eine deutliche Reduktion der nozizeptiven Antwort (Abbildung 3-20). Die Gesamtzahl der Flinches war nach Applikation der Antisense-Oligonukleotide im Vergleich zu Kontrolltieren, die Sense-Oligonukleotide oder ACSF erhielten, statistisch signifikant reduziert (bei beiden Antisense-Oligonukleotiden war $p < 0,001$). Die Infusion der Sense-Oligonukleotide beeinflusste dagegen die Gesamt-Flinchzahl im Vergleich zu ACSF-Kontrollen nicht.

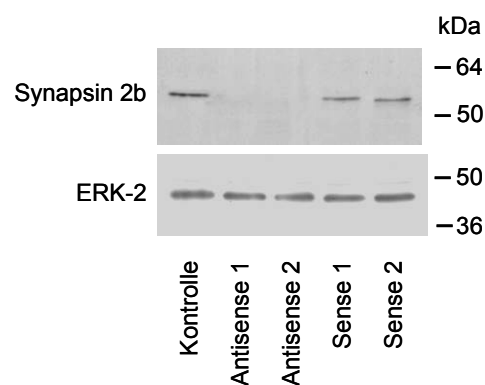


Abbildung 3-19: Western Blot von Synapsin 2b im Lumbalmark nach Applikation der Synapsin 2-Antisense- bzw. Sense-Oligonukleotide. Das Rückenmark wurde unmittelbar nach Beendigung des Formalintests entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

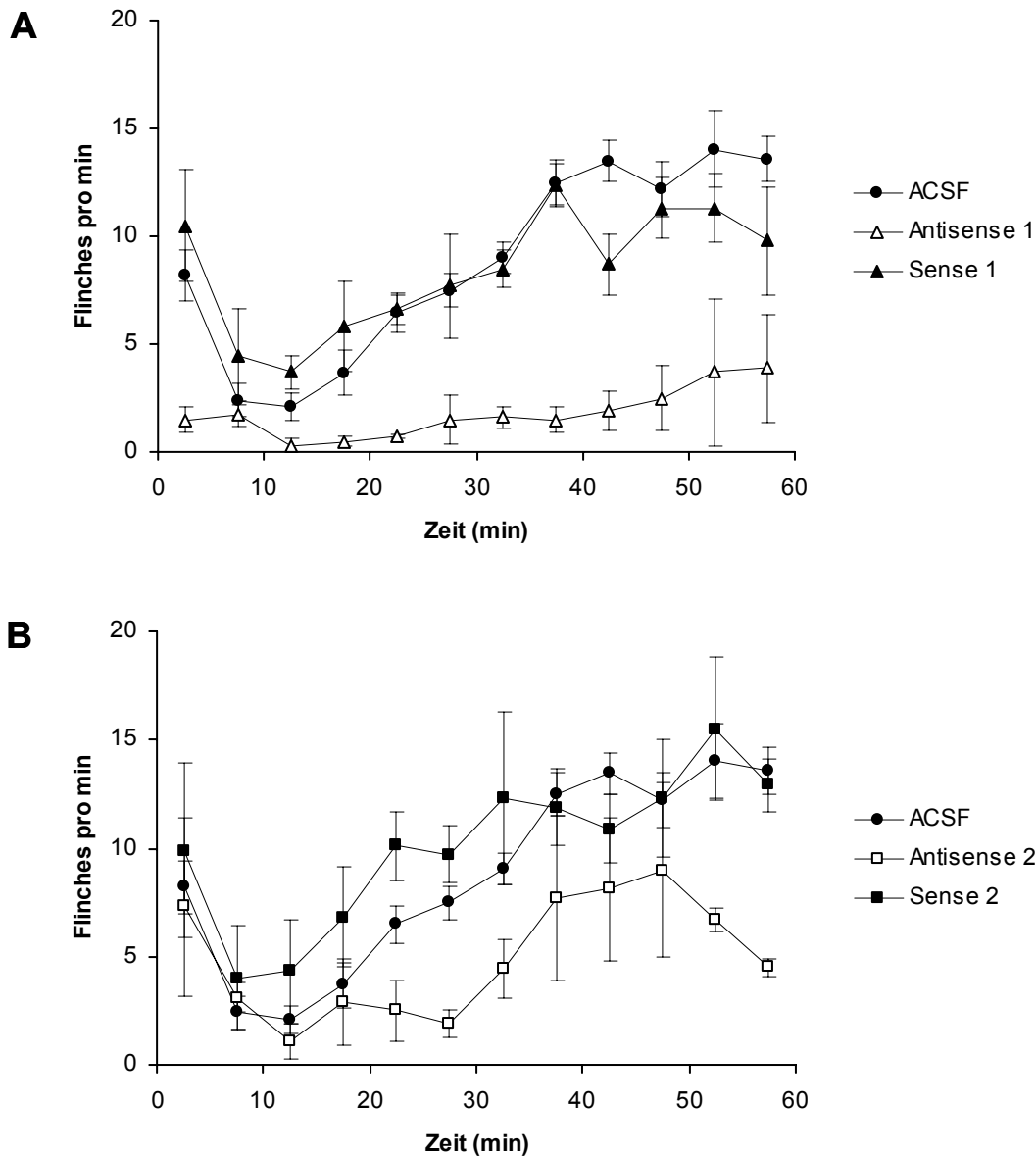


Abbildung 3-20: Formalintest mit Ratten nach Applikation von Synapsin 2-Antisense-Oligonukleotiden bzw. den entsprechenden Sense-Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide (2,5 mg/ml in ACSF) wurden mit einer Mikroinfusionspumpe fünf Tage kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,03 μ l/min über einen zuvor implantierten Katheter ins Lumbalmark infundiert. In der letzten Stunde der Infusionszeit wurde Formalin in eine Hinterpfote injiziert und die Anzahl der Flinches in fünfminütigen Intervallen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Flinches pro Minute \pm SEM von je 3 Tieren nach Applikation der Oligonukleotide Synapsin 2-Antisense 1 bzw. -Sense 1 (A) oder Synapsin 2-Antisense 2 bzw. -Sense 2 (B). 6 Kontrolltiere erhielten eine Einzelinjektion künstlichen Liquor (ACSF) ohne Oligonukleotide 10 min vor dem Formalintest.

3.5 Nozizeptive Tests mit Synapsin 2-Knockout-Mäusen

Zur weiteren Abklärung der funktionellen Bedeutung von Synapsin 2b bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale wurden Tests mit Synapsin 2-Nullmutanten durchgeführt und das Verhalten der Tiere mit den entsprechenden Wildtyp-Mäusen verglichen. Das jeweilige Prinzip der angewendeten nozizeptiven Tests ist im Kapitel 2.5 beschrieben.

3.5.1 Formalintest

Ebenso wie die mit Synapsin 2-Antisense-Oligonukleotiden behandelten Ratten zeigten die Synapsin 2-Knockout-Mäuse im Formalintest eine verminderte nozizeptive Antwort: Die Leckzeit war im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abbildung 3-21). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Abbildung 3-22 gezeigt.

Eine weitere Gruppe von Knockout- und Wildtyp-Mäusen erhielt vor der Formalininjektion eine niedrige Dosis des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP. Diese Substanz war im Formalintest bei Ratten in niedriger Dosis antinozizeptiv wirksam (Kapitel 3.1.2), jedoch wurde dieser Effekt vermutlich nicht über PKG-1 vermittelt (Kapitel 3.1.3). Andererseits zeigten die Western Blot-Analysen, dass 8-Br-cGMP bereits in niedriger Dosis die Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark beeinflussen kann (Kapitel 3.3.6), so dass Synapsin 2b theoretisch als Vermittler der antinozizeptiven Wirkung in Frage kam. Die Applikation von 50 nmol 8-Br-cGMP i.t. in das Lumbalmark führte bei den Wildtyp-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtleckzeit im Formalintest (Abbildung 3-22, 2. und 4. Boxplot von links), bei den Synapsin 2-Knockout-Mäusen verursachte 8-Br-cGMP jedoch keine signifikanten Veränderungen (1. und 3. Boxplot von links). Eine Reduktion der Leckzeit war bei den Knockout-Mäusen allerdings prinzipiell möglich, da nach Applikation von Morphin (15 mg/kg i.p.) bei beiden Gruppen die Leckzeit im Formalintest stark vermindert bzw. aufgehoben war (Gesamtleckzeit: 0,12 min (Wildtyp) bzw. 0,00 min (Knockout)).

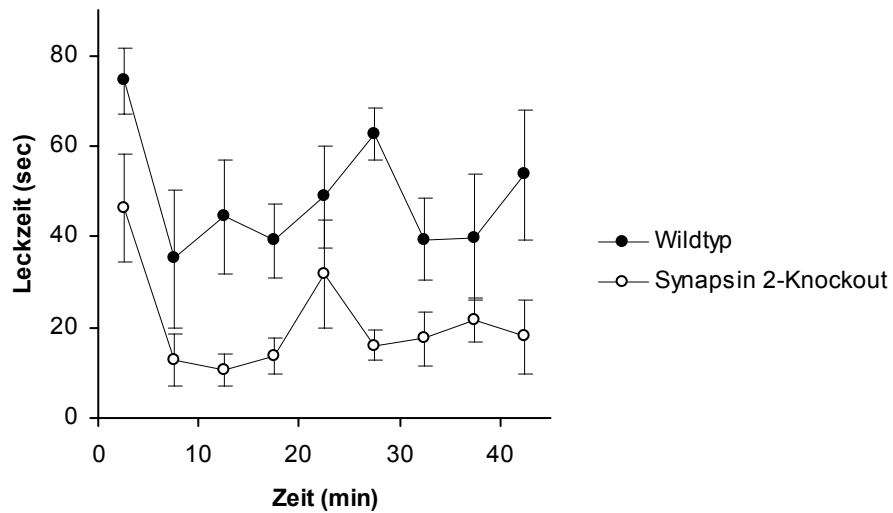


Abbildung 3-21: Formalintest mit Synapsin 2-Knockout-Mäusen im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Nach Formalininjektion in eine Hinterpfote wurde die Leckzeit in fünfminütigen Intervallen gemessen. Dargestellt sind die Leckzeiten \pm SEM von je 8 Tieren.

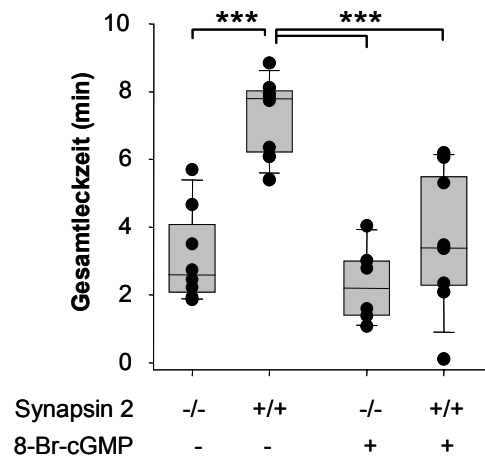


Abbildung 3-22: Gesamtleckzeit von Synapsin 2-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Formalintest. Die beiden linken Boxplots geben die Gesamtleckzeit von unbehandelten Tieren wieder (gleiches Experiment wie in Abbildung 3-21), die beiden rechten Boxplots zeigen die Gesamtleckzeit von Tieren, denen 10 min vor der Formalininjektion 50 nmol 8-Br-cGMP intrathekal verabreicht wurde. Die Punkte repräsentieren die Gesamtleckzeiten der einzelnen Tiere. Die Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$.

3.5.2 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion

Zur Testung der mechanischen Hyperalgesie wurde in einer Hinterpfote durch Injektion einer Zymosanlösung eine Entzündung induziert und mit von Frey-Haaren die mechanische Schwelle im Zeitverlauf (0 - 8 h) bestimmt. Bei unbehandelten Tieren ergab der Vergleich der mechanischen Schwellen keine signifikanten Unterschiede (Synapsin 2-Knockout-Mäuse: $3,123 \pm 0,174$; Wildtyp-Mäuse: $2,892 \pm 0,037$; $p = 0,242$). Nach Induktion der Entzündung war innerhalb der ersten 8 Stunden bei den Wildtyp-Mäusen eine Senkung der mechanischen Schwelle zu beobachten. Demgegenüber blieb die mechanische Schwelle bei den Synapsin 2-Knockout-Mäusen nahezu unverändert (Abbildung 3-23). Ab der dritten Stunde nach Zymosaninjektion unterschieden sich die mechanischen Schwellen der Nullmutanten signifikant von denen der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,05$). Die Gesamt-AUC (% Leerwert der mechanischen Schwelle versus Zeit (0 – 8 h) nach Zymosan) betrug $701,35 \pm 26,52$ (Knockout) bzw. $429,41 \pm 6,51$ (Wildtyp), $p < 0,001$.

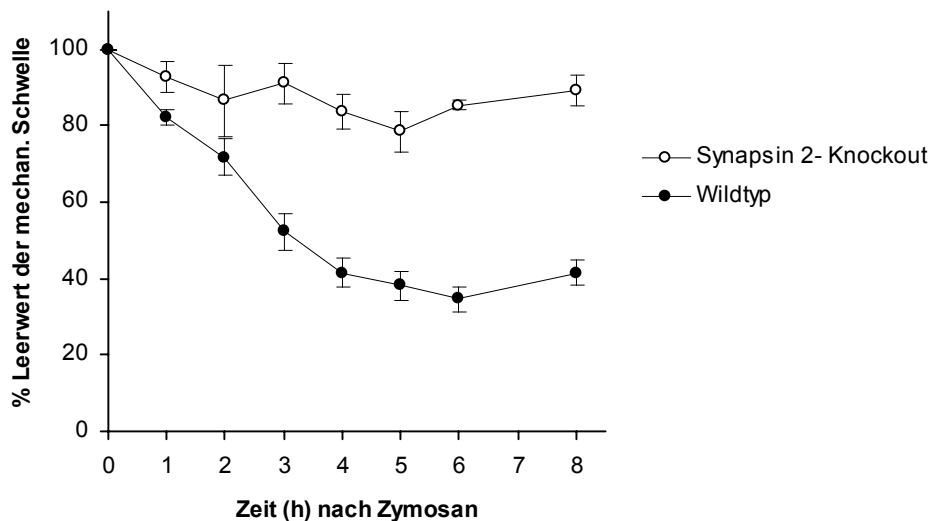


Abbildung 3-23: Mechanische Hyperalgesie von Synapsin 2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die mechanische Schwelle der unbehandelten Tiere (Leerwert) wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der mechanischen Schwellen \pm SEM im Verhältnis zum Leerwert innerhalb der ersten 8 h nach Injektion einer Zymosanlösung in die untersuchte Hinterpfote. $n = 4$ bei beiden Gruppen.

3.5.3 Hot-Plate-Test

Im Hot-Plate-Test, einem Modell zur Erfassung von akuten, durch thermische Stimuli ausgelösten Schmerzen waren auf einer $52,5 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Platte die mittleren Latenzzeiten bis zum Pfotenlecken oder Hochspringen bei den Synapsin 2-Knockout-Mäusen signifikant kürzer als bei den Wildtyp-Mäusen: $14,34 \pm 0,78 \text{ sec}$ (Knockout) versus $22,46 \pm 2,13 \text{ sec}$ (Wildtyp), $p = 0,004$, $n = 7$ in beiden Gruppen.

3.6 Rabphilin-Expression im Lumbalmark

Neben Synapsin 2 wurde auch Rabphilin, ein weiteres synaptisches Vesikelprotein, hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der nozizeptiven Signaltransduktion im Lumbalmark untersucht.

3.6.1 Rabphilin-Proteinexpression nach nozizeptiver Stimulation

Mittels Western Bot konnte die von Li (1996) beschriebene Expression des Rabphilins im Lumbalmark der Ratte bestätigt werden. Im Gegensatz zu Synapsin 2b (vgl. Kapitel 3.3.1) wurde die Rabphilin-Konzentration im Lumbalmark durch eine nozizeptive Stimulation mittels Formalininjektion in eine Hinterpfote innerhalb eines Zeitraumes von 48 h nicht beeinflusst (Abbildung 3-24). Jedoch war bei Versuchstieren, denen vor der Formalininjektion Analgetika verabreicht wurden, die Rabphilin-Konzentration im Rückenmark verändert. Verwendet wurden drei Analgetika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus (Metamizol, Diclofenac und Morphin). Die i.p. Verabreichung dieser Analgetika 20 min vor der Formalininjektion führte nach 1 h zu einer Zunahme der Rabphilin-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-25). Die statistische Auswertung ergab für Metamizol und Diclofenac einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Anschließend wurde mit quantitativer Realtime RT-PCR untersucht, ob die Analgetika-induzierten Veränderungen der Rabphilin-Proteinexpression im Lumbalmark durch eine Steigerung der mRNA-Expression des Rabphilins bedingt waren. Wie in Abbildung 3-26 zu sehen ist, bewirkte keines der applizierten Analgetika signifikante Veränderungen der Rabphilin-mRNA-Expression.

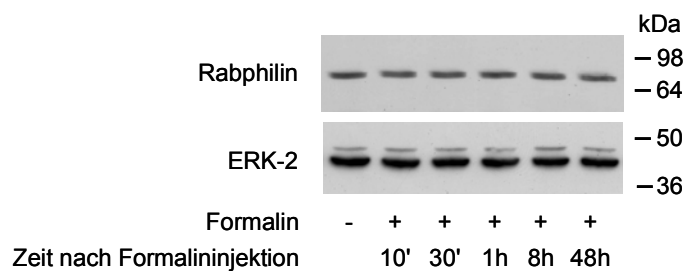


Abbildung 3-24: Western Bot von Rabphilin (78 kDa) im Lumbalmark der Ratte nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Lumbalmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

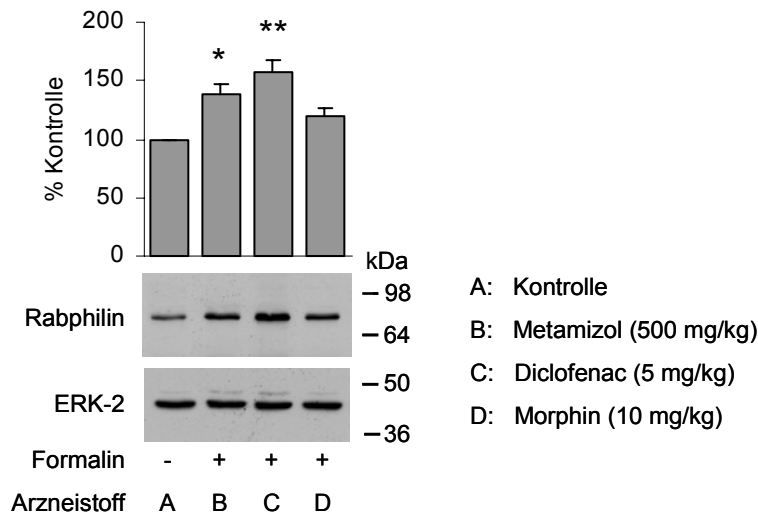


Abbildung 3-25: Western Bot von Rabphilin im Lumbalmark der Ratte nach i.p. Applikation der aufgeführten Analgetika 20 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. Das Diagramm zeigt die Stärke des Rabphilin-Signals \pm SEM im Verhältnis zur Ladungskontrolle ERK-2, die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

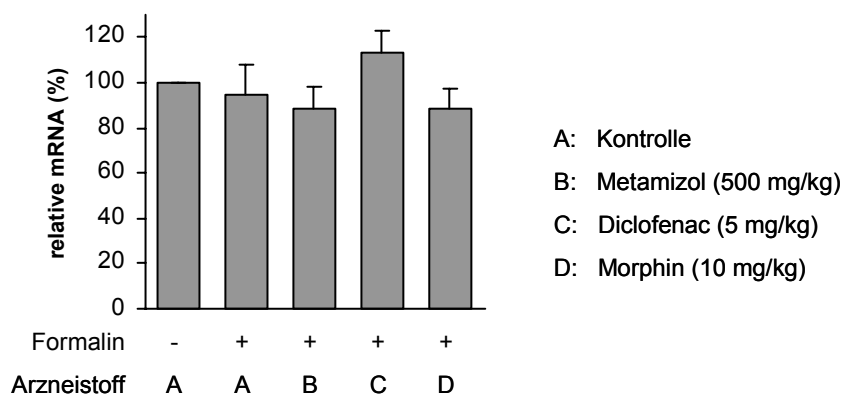


Abbildung 3-26: Konzentration der Rabphilin-mRNA im Lumbalmark der Ratte nach i.p. Verabreichung der aufgeführten Analgetika 20 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Realtime RT-PCR, bei der Rabphilin und das Housekeeping-Gen GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten.

3.6.2 Rabphilin-Proteinexpression nach Vorbehandlung mit NOC-5 oder cGMP-Analoga

Bei Versuchstieren, die mit Aktivatoren der NO/cGMP-Kaskade vorbehandelt wurden, waren die Rabphilin-Proteinkonzentrationen im Lumbalmark in gleicher Weise verändert wie die Synapsin 2b-Konzentrationen (vgl. Kapitel 3.3.5 und 3.3.6). Der NO-Donor NOC-5 (4 - 20 µg i.t.) bewirkte dabei dosisabhängig eine moderate Senkung der Rabphilin-Konzentration (Abbildung 3-27 A). Einen stärkeren Effekt zeigte sowohl das PKG-aktivierende cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (0,5 - 2,5 µmol i.t.; Abbildung 3-27 B) als auch das PKG-inhibierende cGMP-Analogon Rp-8-Br-cGMPS (0,1 - 0,25 µmol i.t.; Abbildung 3-27 C). Somit kann vermutlich im Lumbalmark die Rabphilin-Konzentration ebenso wie die Synapsin 2b-Konzentration durch NO- und cGMP-abhängige, jedoch PKG-unabhängige Mechanismen moduliert werden.

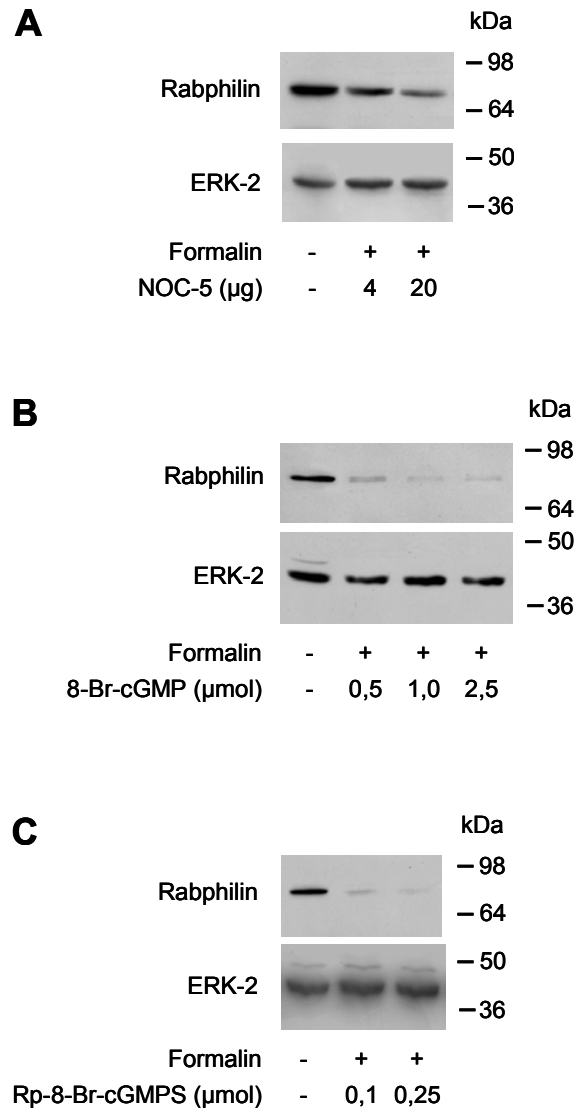


Abbildung 3-27: Western Blot von Rabphilin im Lumbalmark der Ratte nach Vorbehandlung der Tiere mit (A) dem NO-Donor NOC-5, (B) dem PKG-aktivierenden cGMP-Analogon 8-Br-cGMP oder (C) dem PKG-inhibierenden cGMP-Analogon Rp-8-Br-cGMPS in den angegebenen Dosierungen. Die Applikation erfolgte i.t. über einen zuvor implantierten Lumbalkatheter 10 min vor der Formalininjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde 1 h nach der Formalininjektion entnommen. ERK-2 diente als Ladungskontrolle.

4 Diskussion

4.1 PKG-1 als Target der NO-vermittelten Nozizeption

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die NO/cGMP-Kaskade im Hinterhorn des Rückenmarkes bei der nozizeptiven Transmission eine wichtige Rolle spielt. Zu diesem Schluss führten v.a. Experimente mit Substanzen, welche die Bildung von NO oder cGMP hemmen und nach i.t. Applikation in verschiedenen Tiermodellen die nozizeptive Antwort verringerten. Beispielsweise wirkten im Formalintest sowohl die NOS-Inhibitoren L-NAME, 7-NI und TRIM als auch der sGC-Inhibitor ODQ antinozizeptiv (Malmberg et al. 1993; Moore et al. 1991; Moore et al. 1993; Handy et al. 1996; Tao et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Hemmung der PKG-1 die nozizeptive Antwort vermindert: Die i.t. Verabreichung des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS reduzierte dosisabhängig die Anzahl der Flinches im Formalintest (Abbildung 3-1). Während die niedrige Dosis (0,1 μmol) nur die 2. Phase des Formalintests beeinflusste, bewirkten höhere Dosen (0,25 und 0,5 μmol) eine Reduktion der nozizeptiven Antwort in beiden Phasen. Allgemein wird die Antwort in der 1. Phase des Formalintests auf eine direkte Stimulation von A δ -Fasern zurückgeführt, für die Ausbildung der 2. Phase spielt v.a. eine durch die lokale Entzündung und zentrale Veränderungen hervorgerufene anhaltende C-Faser-Aktivierung eine Rolle. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Tao et al. (2000), welche während der Durchführung dieser Studie veröffentlicht wurden. Dort bewirkte die i.t. Applikation eines anderen PKG-1-Inhibitors (Rp-8-p-CPT-cGMPS) ebenfalls eine Reduktion der nozizeptiven Antwort im Formalintest, wobei eine niedrige Dosis (20 μg) nur die 2. Phase und eine höhere Dosis (30 μg) beide Phasen beeinflusste.

Die antinozizeptive Wirkung des PKG-1-Inhibitors lässt den Schluss zu, dass PKG-1 im Hinterhorn die Übertragung nozizeptiver Signale fördert. Dementsprechend sollte eine Aktivierung der PKG-1 pronozizeptive Effekte zeigen. Diese Erwartung wurde jedoch nur teilweise erfüllt, denn die Verabreichung des PKG-1-Aktivators 8-Br-cGMP führte nur in einer hohen Dosis (2,5 μmol) zu einer Verstärkung der nozizeptiven Antwort im Formalintest (Abbildung 3-2). Überraschenderweise bewirkte die Applikation niedriger Dosen des PKG-1-Aktivators (0,1 und 0,25 μmol) sogar eine Verminderung der nozizeptiven Antwort. Somit können im Formalintest mit 8-Br-cGMP in Abhängigkeit von der Dosierung gegensätzliche Effekte erzielt werden.

Ähnliche gegensätzliche Wirkungen sind auch nach Applikation von NO-Donoren beobachtet worden. In einem Tiermodell für neuropathische Schmerzen (chronische Ligatur des N. Ischiadicus)

verminderten niedrige Dosen des i.t. applizierten NO-Donors 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) die mechanische Allodynie, während hohe Dosen zum gegenteiligen Effekt führten (Sousa et al. 2001). Darüber hinaus bewirkte in der gleichen Studie 8-Br-cGMP in niedriger Dosis (0,3 – 1,1 μmol i.t.) eine Abschwächung der mechanischen Allodynie, was mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Reduktion der nozizeptiven Antwort durch niedrig dosiertes 8-Br-cGMP in Einklang steht. Nach lokaler, kutaner Applikation des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) wurden in Abhängigkeit von der Dosis ebenfalls duale Effekte erzielt: Niedrig dosiertes SNAP verminderte, hoch dosiertes SNAP verstärkte das durch Hautinzision hervorgerufene nozizeptive Verhalten der Versuchstiere (Prado et al. 2002).

Der antinozizeptive Effekt von niedrig dosiertem 8-Br-cGMP wird anscheinend nicht durch PKG-1 vermittelt, denn die gleichzeitige Applikation des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS bewirkte keine Antagonisierung. Vielmehr verursachte die Kombination beider Substanzen eine stärkere Hemmung der nozizeptiven Antwort als die Einzelsubstanzen (Abbildung 3-3). 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS verhalten sich bezüglich der Interaktion mit PKG-1 zwar gegensätzlich, jedoch sind beide Substanzen cGMP-Strukturanaloga, die an anderen cGMP-Targets identische Effekte hervorrufen können. Beispielsweise wirken 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS als Agonisten an CNG-Kanälen des Photorezeptors (Wei et al. 1998). Dementsprechend könnte der antinozizeptive Effekt von niedrig dosiertem 8-Br-cGMP theoretisch durch Stimulation von CNG-Kanälen zustande kommen, denn auch im Rückenmark werden CNG-Kanäle exprimiert (Tegeder et al. 2002). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine relativ hohe Dosis (0,5 mg i.t.) des CNG-Kanal-Inhibitors L-cis-Diltiazem auf eine mögliche Beeinflussung der nozizeptiven Antwort im Formalintest untersucht. Dabei führte die Applikation des CNG-Kanal-Inhibitors zu keiner Veränderung des Flinchverhaltens im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 3-4 A + C). Darüber hinaus beeinflusste die Verabreichung von L-cis-Diltiazem 10 min vor der Applikation von 0,25 μmol 8-Br-cGMP dessen antinozizeptive Wirkung nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CNG-Kanäle an der Vermittlung der antinozizeptiven Wirkung von niedrig dosiertem 8-Br-cGMP nicht beteiligt sind. Anzumerken ist jedoch die geringe Spezifität des L-cis-Diltiazems und die Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von der Expression und Funktion der regulatorischen β -Untereinheit der CNG-Kanäle (Chen et al. 1993; Wei et al. 1998). Im Lumbalmark konnte die Expression der β -Untereinheit CNG4 zwar mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Tegeder et al. 2002), jedoch ist deren Funktion bisher unbekannt. Andere spezifische CNG-Kanal-Inhibitoren stehen derzeit nicht zur Verfügung.

Neben PKG und CNG-Kanälen stellen Phosphodiesterasen weitere klassische cGMP-Targets dar. Zu den Phosphodiesterasen, deren Aktivität durch cGMP reguliert wird, zählen PDE-2 und -3 (Juilfs et al. 1999) (Anmerkungen zur PDE-5: siehe nächster Absatz). Mittels RT-PCR konnte bestätigt werden, dass sowohl PDE-2 als auch PDE-3 im Rückenmark der Ratte exprimiert werden (Tegeder et al.

2002). Die Hemmung dieser beiden Enzyme zeigte jedoch keine Beeinflussung der nozizeptiven Antwort im Formalintest: Weder der PDE-2-Inhibitor EHNA, noch der PDE-3-Inhibitor Milrinon veränderte die Zahl der Flinches im Vergleich zu den mit ACSF behandelten Kontrolltieren signifikant (Abbildung 3-4 B und C). Demzufolge spielen PDE-2 und -3 für die Verarbeitung nozizeptiver Signale im Lumbalmark wahrscheinlich keine Rolle. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalwege der nozizeptiven Transmission im Rückenmark sind in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt.

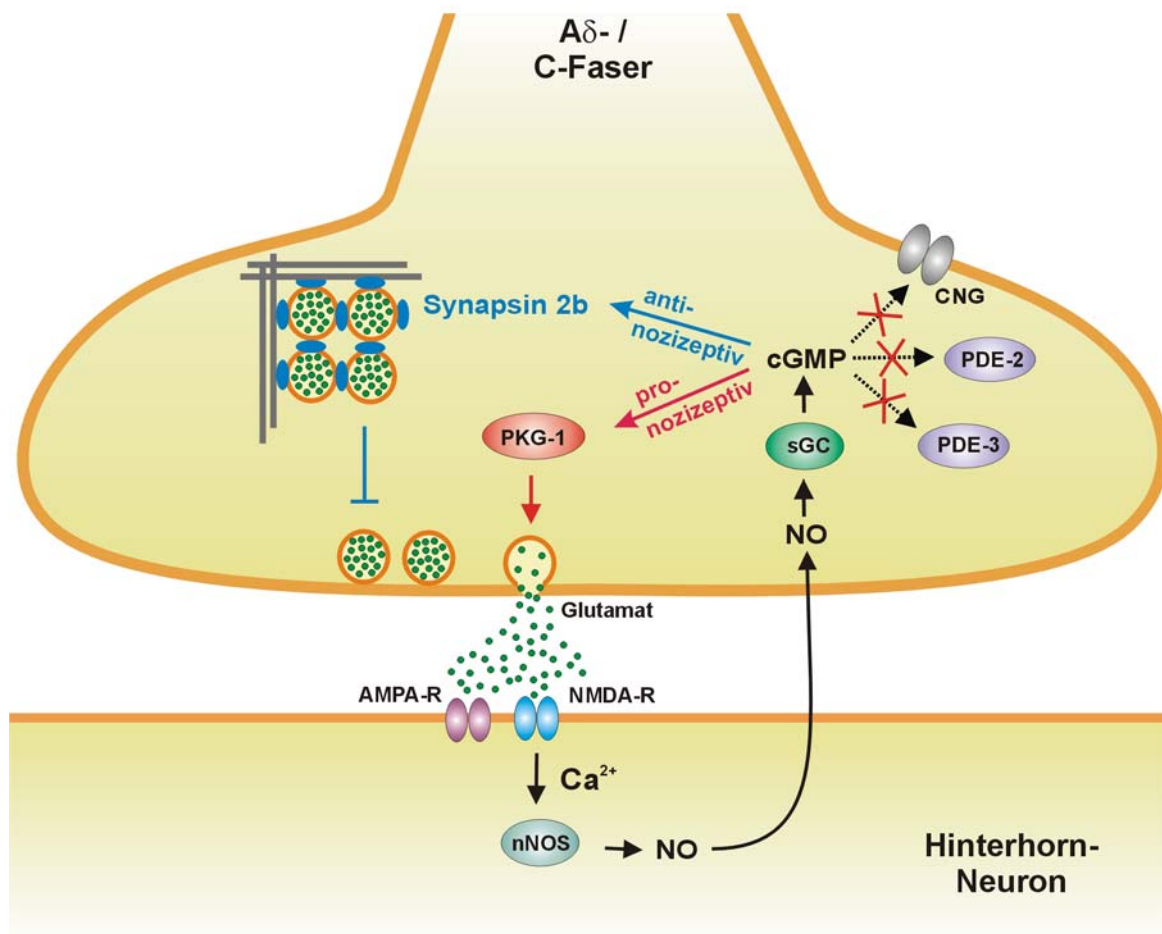


Abbildung 4-1: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Mechanismen der NO-vermittelten nozizeptiven Transmission im Rückenmark (vereinfacht). Stickstoffmonoxid (NO) wird nach Erregung von NMDA-Rezeptoren (NMDA-R) und Aktivierung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in der Postsynapse gebildet und diffundiert zur Präsynapse. Dort bewirkt NO durch Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) die Bildung von cGMP. cGMP senkt die Konzentration des synaptischen Vesikelproteins Synapsin 2b, was zu einer Reduktion der Verfügbarkeit synaptischer Vesikel und einer antinozizeptiven Wirkung führt (siehe Kapitel 4.2). Eine pronozizeptive Wirkung kommt erst bei höheren cGMP-Konzentrationen durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase 1 (PKG-1) zustande. Zyklisch-Nukleotid gesteuerte (CNG) Kationenkanäle sowie die Phosphodiesterasen (PDE) 2 und 3 werden im Rückenmark zwar exprimiert, sind jedoch für die nozizeptive Transmission vermutlich ohne Bedeutung.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde berichtet, dass auch PDE-5 im Lumbalmark der Ratte exprimiert wird (Nakamizo et al. 2003). PDE-5 hydrolysiert cGMP mit hoher Affinität und wird daher, ebenso wie die in der Retina lokalisierte PDE-6, als „cGMP-spezifisch“ bezeichnet. Interessanterweise kann PDE-5 sowohl direkt durch cGMP als auch über eine PKG-1-vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden (Corbin et al. 2000; Mullershausen et al. 2003). Dies führt zu einem lang anhaltenden negativen Feedback der NO-induzierten cGMP-Antwort. Diesen aktuellen Befunden zufolge könnte PDE-5 theoretisch auch an der nozizeptiven Transmission im Lumbalmark beteiligt sein. Nach peripherer Applikation des PDE-5-Hemmers Sildenafil sind bereits in mehreren Tiermodellen antinozizeptive Effekte beobachtet worden. So führte die Injektion einer Sildenafil-Lösung in eine Hinterpfote bei Ratten u.a. zu einer Reduktion der 2. Phase des Formalintests und der Carrageenan-induzierten mechanischen Hyperalgesie (Asomoza-Espinosa et al. 2001; Jain et al. 2003; Mixcoatl-Zecuatl et al. 2000). Darüber hinaus senkte Sildenafil nach intraperitonealer Applikation bei Mäusen die nozizeptive Antwort im Writhing-Test (Jain et al. 2003). Andererseits kann die orale Verabreichung von Sildenafil bei gesunden Probanden Kopfschmerzen verursachen und bei Migräne-Patienten einen Migräneanfall auslösen, ohne dass dafür vaskuläre Mechanismen verantwortlich sind (Kruuse et al. 2002; Kruuse et al. 2003). Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der PDE-5 für die nozizeptive Transmission im Rückenmark liegen bisher noch nicht vor.

In vielen Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine anhaltende nozizeptive Stimulation die Genexpression im Rückenmark beeinflusst (Woolf et al. 1999). Auch die Proteine der NO/cGMP-Kaskade sind davon betroffen, denn eine Formalininjektion in eine Hinterpfote hat im Rückenmark eine Expressionssteigerung sowohl der nNOS als auch der sGC zur Folge (Herdegen et al. 1994; Tao et al. 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Formalininjektion auch PKG-1 im Rückenmark hochreguliert wird, wobei die höchsten Proteinkonzentrationen nach 48 und 96 Stunden gemessen wurden (Abbildung 3-5). Die Zunahme des PKG-1-Proteins ist offenbar mit der Verarbeitung der nozizeptiven Signale eng verbunden, denn nach Applikation des Opioid-Analgetikums Morphin, welches die nozizeptive Antwort im Formalintest deutlich reduziert, trat die Formalin-induzierte PKG-1-Hochregulation nicht mehr auf (Abbildung 3-6). Ebenso verhinderte der antinozizeptiv wirkende PKG-1-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS dosisabhängig die PKG-1-Hochregulation, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren nur in der höheren Dosis (0,5 μmol) zu beobachten war (Abbildung 3-6). Der PKG-Aktivator 8-Br-cGMP beeinflusste die PKG-1-Expression je nach Dosis unterschiedlich: In einer niedrigen, antinozizeptiven Dosis (0,25 μmol) wurde die Formalin-induzierte PKG-1-Hochregulation abgeschwächt, während durch Applikation einer hohen, pronozizeptiv wirkenden Dosis (2,5 μmol) die Formalin-induzierte PKG-1-Hochregulation verstärkt wurde (Abbildung 3-7). Darüber hinaus war nach Verabreichung der hohen Dosis im Western Blot eine zusätzliche Bande detektierbar, die einem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa entspricht. Dabei könnte es sich um das 65 kDa schwere,

katalytisch aktive PKG-1-Fragment handeln, das auch nach Einwirkung geringer Mengen Trypsin gebildet wird (Heil et al. 1987). Das in der zitierten Arbeit gebildete Fragment zeigt eine spontane katalytische Aktivität, die nicht der Regulation durch cGMP unterliegt. Somit könnte die pronozizeptive Wirkung der hohen Dosis von 8-Br-cGMP teilweise auch auf der Bildung eines ständig aktiven PKG-1-Fragmentes beruhen, welches über einen langen Zeitraum eine hohe PKG-1-Aktivität gewährleistet.

Die Beeinflussung der PKG-1-Genexpression durch Rp-8-Br-cGMPS oder 8-Br-cGMP erfolgte auch ohne begleitende Formalininjektion (Abbildung 3-8). Offenbar wirkt sich die Aktivität der PKG-1 auf ihre eigene Genexpression aus. Auch die Expression anderer Gene kann durch PKG-1 reguliert werden. Beispielsweise wurde in der glatten Muskulatur u.a. eine Beeinflussung der Expression von c-fos, junB oder sGC in Abhängigkeit von der PKG-1-Aktivität nachgewiesen (Lincoln et al. 2001; Gudi et al. 2002).

Zusammenfassend zeigen die bisher genannten Ergebnisse, dass PKG-1 bei der nozizeptiven Transmission im Lumbalmark anscheinend eine wichtige Rolle spielt. Dafür sprechen (1) die antinozizeptiven Effekte des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS, (2) die Hochregulation der PKG-1 nach nozizeptiver Stimulation, (3) die Verhinderung der Hochregulation durch Morphin oder den PKG-1-Inhibitor, (4) die pronozizeptiven Effekte des hochdosierten PKG-1-Aktivators 8-Br-cGMP und (5) die damit einhergehende Verstärkung der PKG-1-Expression. In niedriger Dosis wirkt 8-Br-cGMP jedoch antinozizeptiv, und dieser Effekt wird vermutlich nicht über PKG-1 vermittelt.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch kürzlich durchgeführte Untersuchungen mit PKG-1-Nullmutanten (Tegeder et al., submitted). Bei diesen Tieren war im Formalintest die Leckzeit im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Darüber hinaus führte die intrathekale Applikation des PKG-1-Inhibitors Rp-8-Br-cGMPS bei den Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch bei den PKG-1-Knockout-Mäusen, zu einer deutlichen Abnahme der nozizeptiven Antwort. Damit konnten auch diese Untersuchungen die Beteiligung der PKG-1 an der nozizeptiven Transmission unterstreichen. Interessanterweise bewirkte die Verabreichung einer niedrigen Dosis 8-Br-cGMP sowohl beim Wildtyp als auch bei den Nullmutanten eine Reduktion der nozizeptiven Antwort. Diese Beobachtung stützt die o.g. Hypothese, dass die antinozizeptive Wirkung von niedrig dosiertem 8-Br-cGMP nicht über PKG-1 vermittelt wird.

Somit stellt sich die Frage, über welche Mechanismen diese antinozizeptive Wirkung zustande kommt. In mehreren Zellsystemen konnte eine direkte Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung durch 8-Br-cGMP nachgewiesen werden. In cerebrocortikalen Neuronen bewirkt 8-Br-cGMP z.B. eine Hemmung der Glutamat-Freisetzung (Sistiaga et al. 1997). Da dieser Effekt auch in Gegenwart eines

Proteinkinase-Inhibitors auftritt, ist PKG-1 offenbar nicht beteiligt. Darüber hinaus wurde in derselben Arbeit auch durch ein weiteres cGMP-Analogon (dbcGMP) die Glutamat-Freisetzung inhibiert. Interessanterweise war bei hohen Konzentrationen des cGMP-Analogons eine Hemmung der Glutamat-Freisetzung nicht mehr zu beobachten, was zu dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen dualen Effekt des 8-Br-cGMP passt. In Hippocampus-Neuronen wurde ebenfalls eine Inhibition der Glutamat-Ausschüttung durch 8-Br-cGMP beschrieben (Sequeira et al. 1999). Auch für das Ratten-Rückenmark liegen Berichte über eine Hemmung der Neurotransmitter-Ausschüttung durch 8-Br-cGMP vor (Kamisaki et al. 1995).

Möglicherweise wirkt 8-Br-cGMP im Hinterhorn des Rückenmarkes in niedriger Dosis direkt inhibierend auf die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, wodurch die antinozizeptive Wirkung erklärt werden könnte. Theoretische Angriffspunkte wären dabei die Proteine, die den Zyklus der mit Neurotransmitter beladenen Vesikel in der Präsynapse und die Neurotransmitter-Ausschüttung regulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese untersucht, wobei Synapsin 2b und Rabphilin als Targets der NO/cGMP-Kaskade im Rückenmark identifiziert werden konnten.

4.2 Synapsin 2b als Target der NO-vermittelten Nozizeption

Synapsine sind neuronale Proteine, die an der Regulation des Zyklus der synaptischen Vesikel in der Präsynapse beteiligt sind. Sie werden in allen Neuronen exprimiert, jedoch sind die Expressionsmuster der Synapsin-Isoformen je nach ZNS-Region unterschiedlich (Sudhof et al. 1989). Eine pathologisch veränderte Expression der Synapsine ist mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht worden. Bei Patienten, die relativ früh an Morbus Alzheimer erkrankten, wurde beispielsweise post mortem eine verminderte Expression der Isoformen Synapsin 1a, 2a und 3a im entorhinalen Kortex beschrieben (Ho et al. 2001). Außerdem wurden in einem Tiermodell der Epilepsie gesteigerte Synapsin 1 mRNA-Konzentrationen im Gyrus dentatus des Hippocampus gemessen (Morimoto et al. 1998). Über eine mögliche Beteiligung der Synapsine an der nozizeptiven Transmission liegen bisher noch keine Untersuchungen vor. Kürzlich wurde berichtet, dass Synapsine über das Adapterprotein CAPON eine Bindung mit nNOS eingehen können (Jaffrey et al. 2002). Damit wird Stickstoffmonoxid (NO) zum potentiellen Interaktionspartner der Synapsine. Da NO bei der nozizeptiven Transmission vermehrt gebildet wird, und v.a. Synapsin 2 mit exzitatorischen Synapsen assoziiert ist (Mandell et al. 1992), wurde in dieser Arbeit Synapsin 2 hinsichtlich einer möglichen Rolle bei der nozizeptiven Transmission untersucht.

Im Western Blot konnte die Existenz von Synapsin 2 im Lumbalmark bestätigt werden. Allerdings wurde nur die b-Isoform (Synapsin 2b) detektiert, obwohl der verwendete Antikörper auch Synapsin 2a nachweisen kann (Abbildung 3-9). Die Konzentration des Synapsin 2b-Proteins im Lumbalmark veränderte sich rasch nach nozizeptiver Stimulation: Bereits 10 min nach der Injektion von Formalin in eine Hinterpfote war die Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren reduziert (Abbildung 3-9). Die Abnahme der Synapsin 2b-Konzentration war über einen Zeitraum von 8 h zu beobachten, nach 48 h kam es jedoch zu einem Anstieg der Synapsin 2b-Konzentration. Diese durch Formalin induzierten Veränderungen waren ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Synapsin 2b an der nozizeptiven Transmission im Rückenmark.

Der späte Anstieg der Synapsin 2b-Proteinkonzentration war auf eine vermehrte Genexpression zurückzuführen, denn mit quantitativer Realtime RT-PCR wurden 24 bis 48 h nach Formalininjektion erhöhte mRNA-Konzentrationen gemessen (Abbildung 3-10). Möglicherweise wird die Steigerung der Synapsin 2-Genexpression durch den Transkriptionsfaktor *zif268/egr* (auch *Krox24* genannt) vermittelt, der in den Hinterhornneuronen infolge einer Formalininjektion vermehrt exprimiert wird (Pertovaara et al. 1993) und an die Promotorregion des Synapsin 2-Gens binden kann (Petersohn et al. 1995). Innerhalb der ersten 8 h nach Formalininjektion ergaben sich jedoch keine Veränderungen der mRNA-Konzentration (Abbildung 3-10), so dass die rasche Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration nicht durch Änderungen der Gentranskription zu erklären sind.

Ein möglicher Grund für die Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration im Western Blot könnte die Bindung von Synapsin 2b an Bestandteile des Zytoskeletts infolge der Formalininjektion sein. Derartige Interaktionen sind mehrfach beschrieben worden, z.B. die Bindung an Actin, Mikrotubuli, Neurofilamente und Spectrin (Bahler et al. 1987; Goldenring et al. 1986; Iga et al. 1997; Baines et al. 1985). Durch diesen Vorgang könnte Synapsin 2b möglicherweise nicht mehr mit dem Detergenz CHAPS solubilisiert werden und sich so dem Nachweis im Western Blot entziehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine Aufbereitung des unlöslichen Rückstandes der CHAPS-Solubilisierung mit zwei weiteren Detergenzien (Triton X-100 und Desoxycholat), deren Solubilisierungsmuster aufgrund unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften von CHAPS abweichen. Die Formalininjektion bewirkte jedoch in beiden CHAPS-unlöslichen Fraktionen keine Steigerung der Synapsin 2b-Konzentration, sondern ebenfalls eine leichte Abnahme (Abbildung 3-11). Somit sind veränderte Solubilisierungseigenschaften von Synapsin 2b für die rasche Konzentrationsabnahme nach Formalininjektion vermutlich nicht verantwortlich. Vielmehr ist von einem Abbau des Synapsin 2b-Proteins auszugehen, was bei anderen synaptischen Vesikelproteinen schon beschrieben wurde. Beispielsweise werden Synaptobrevin und Synaptotagmin von einer Ca^{2+} -abhängigen endogenen Protease innerhalb von 10 min nach Inkubationsbeginn gespalten (Hausinger et al. 1995), und

Synaptophysin kann ubiquitiniert und mittels Proteasomen-Lyse degradiert werden (Wheeler et al. 2002). Untersuchungen bezüglich des Mechanismus, über den Synapsin 2b abgebaut werden kann, liegen bisher noch nicht vor.

Die Formalin-induzierten Veränderungen der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark gehen offenbar mit der Verarbeitung der nozizeptiven Signale einher, denn die Applikation dreier etablierter Analgetika verhinderte diese Veränderungen. Das Opioid-Analgetikum Morphin inhibierte sowohl die rasche Abnahme als auch die späte Zunahme der Synapsin 2b-Konzentration vollständig (Abbildung 3-12). Auch Diclofenac, ein unspezifischer COX-Hemmer, und Metamizol, ein Analgetikum mit bisher unbekanntem Wirkmechanismus, wirkten den Veränderungen der Synapsin 2b-Konzentration infolge der Formalininjektion entgegen (Abbildung 3-13). Vermutlich ist dieser einheitliche Effekt der drei unterschiedlich wirkenden Analgetika auf eine allgemeine Hemmung der nozizeptiven Übertragung im Lumbalmark zurückzuführen.

Die Veränderungen der Synapsin 2b-Konzentration werden wahrscheinlich durch NO vermittelt, denn die Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem NOS-Inhibitor L-NAME verhinderte ebenfalls die rasche Konzentrationsabnahme des Synapsin 2b-Proteins nach der Formalininjektion (Abbildung 3-14 A). Die Hemmung der NO-Synthese könnte auch der Wirkmechanismus sein, mit dem die o.g. Analgetika die Synapsin 2b-Veränderungen inhibieren, denn mit Mikrodialyse-Untersuchungen konnte eine Hemmung der Formalin-induzierten Freisetzung von NO im Rückenmark durch Morphin belegt werden (Malmberg et al. 1995). Für die Beteiligung von NO an der Modulation der Synapsin 2b-Konzentration spricht auch die Verstärkung des Formalin-Effektes bei Versuchstieren, die mit dem NO-Donor NOC-5 vorbehandelt wurden (Abbildung 3-14 B). Neben einer im Vergleich zur alleinigen Formalininjektion gesteigerten Abnahme der Synapsin 2b-Konzentration traten nach Applikation des NO-Donors jedoch auch zusätzliche Banden auf, die Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 52 und 46 kDa entsprechen. Interessanterweise wird durch Kollagenase-Verdau von Synapsin 1 ein 46 kDa schweres Fragment gebildet, das wahrscheinlich den Domänen A-C entspricht und als „Kopffregion“ bezeichnet wird (Ueda et al. 1977). Somit könnte es sich bei einer der durch den NO-Donor gebildeten Banden um die Kopffregion des Synapsin 2b-Proteins handeln. Über mögliche funktionelle Konsequenzen der Abspaltung der Kopffregion liegen allerdings keine Berichte vor.

NO beeinflusst die Synapsin 2b-Konzentration vermutlich durch eine sGC-Stimulation mit nachfolgender Produktion von cGMP. Dafür spricht, dass nach Applikation von cGMP-Analoga im Western Blot die gleichen Effekte auftraten, welche auch nach Verabreichung des NO-Donors beobachtet wurden: 8-Br-cGMP verstärkte 1 h nach der Formalininjektion die Senkung der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-15 A). Dies hielt über einen längeren Zeitraum an, denn nach 48 h waren die Synapsin 2b-Konzentrationen zwar im Vergleich zu den 1 h-Werten leicht

erhöht, jedoch kam es nicht zu einer so starken Steigerung wie nach alleiniger Formalininjektion. Außerdem wurden die gleichen zusätzlichen Banden von ca. 46 und 52 kDa detektiert, welche auch nach Applikation des NO-Donors erschienen sind. Die Senkung der Synapsin 2b-Konzentration in der CHAPS-löslichen Fraktion (Abbildung 3-15 A) war nicht verbunden mit einer Zunahme in der CHAPS-unlöslichen Fraktion (Abbildung 3-16), so dass eine Änderung der Solubilisierungseigenschaften infolge einer stärkeren Bindung von Synapsin 2b an Bestandteile des Zytoskeletts als Grund für die Konzentrationssenkung ausscheidet. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die Applikation des cGMP-Analogons den raschen Formalin-induzierten Abbau des Synapsin 2b-Proteins verstärkt.

Das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP wirkt stimulierend auf PKG-1. Somit könnten die beschriebenen Effekte bezüglich der Synapsin 2b-Konzentration durch Stimulation der PKG-1 und nachfolgender Phosphorylierung weiterer Zielproteine zustande kommen. PKG-1 scheint jedoch nicht beteiligt zu sein, denn das PKG-1 inhibierende cGMP-Analogon Rp-8-Br-cGMPS veränderte die Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark in gleicher Weise wie 8-Br-cGMP, inklusive der Bildung zusätzlicher Banden (Abbildung 3-15 B). Außerdem hatte die gleichzeitige Applikation des PKG-Aktivators und des PKG-1-Inhibitors keine Antagonisierung, sondern eher eine Verstärkung des Effektes zur Folge (Abbildung 3-17). Die Untersuchung des Lumbalmarks von PKG-1-Knockout-Mäusen bestätigte schließlich die Hypothese, dass PKG-1 an der cGMP-vermittelten Beeinflussung der Synapsin 2b-Konzentration nicht beteiligt ist: Sowohl bei unbehandelten Mäusen als auch 24 h nach Formalininjektion waren bei PKG-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede in der Synapsin 2b-Konzentration zu erkennen (Abbildung 3-18). Über welchen Mechanismus cGMP die Synapsin 2b-Regulation beeinflusst, konnte in dieser Arbeit letzten Endes nicht geklärt werden. Jedoch wurde mit Synapsin 2b ein neues, bisher unbekanntes Target der NO/cGMP-Kaskade im Rahmen der nozizeptiven Transmission im Rückenmark identifiziert. In Abbildung 4-1 (Seite 67) ist die Bedeutung von Synapsin 2b für die nozizeptive Transmission schematisch dargestellt.

Die funktionelle Relevanz dieser Befunde wurde in mehreren nozizeptiven Tiermodellen bei Ratten und Mäusen überprüft. Die Ratten erhielten eine kontinuierliche i.t. Infusion zweier nicht-überlappender Synapsin 2-Antisense-Oligonukleotide, die nach fünf Tagen die Synapsin 2-Expression im Lumbalmark der Versuchstiere erfolgreich unterdrückten (Abbildung 3-19). Im anschließend durchgeführten Formalintest zeigten die Tiere mit supprimierter Synapsin 2-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren eine Reduktion der nozizeptiven Antwort (Abbildung 3-20 A und B). Im Gegensatz dazu beeinflussten die entsprechenden Sense-Oligonukleotide das Flinchverhalten nicht.

Die intrathekale Applikation von Antisense-Oligonukleotiden stellt eine neue Methode zur selektiven Expressionshemmung *in vivo* dar. Durch die gezielte Synthesehemmung von Proteinen, welche an der

Verarbeitung nozizeptiver Signale beteiligt sind, konnten bereits in einigen Studien antinozizeptive Wirkungen erzielt werden. Beispielsweise wurde durch Applikation von Antisense-Oligonukleotiden gegen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors (Garry et al. 2000; Yukhananov et al. 2002; Rydh-Rinder et al. 2001), c-fos (Hou et al. 1997) oder den Glutamat-Transporter GLT-1 (Niederberger et al. 2003) die nozizeptive Antwort im Formalintest gesenkt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antisense-Oligonukleotide, welche bereits in Zellkultur-Experimenten die Synapsin 2-Proteinsynthese inhibierten (Ferreira et al. 1994), erweitern somit die Optionen bei der Suche nach neuen analgetischen Wirkprinzipien.

Des Weiteren wurden verschiedene nozizeptive Tests mit Synapsin 2-Knockout-Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Im Formalintest ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Ratten nach Infusion der Synapsin 2-Antisense-Oligonukleotide: Die Leckzeit, welche bei Untersuchung von Mäusen als Maß für die nozizeptive Antwort gilt (Hunskar et al. 1985), war bei den Synapsin 2-Nullmutanten deutlich geringer als beim Wildtyp (Abbildung 3-21). Offenbar führt die Abwesenheit von Synapsin 2 zu einer ausgeprägten Hemmung der synaptischen Übertragung nozizeptiver Signale.

Einer Gruppe von Synapsin 2-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurde vor der Formalininjektion 8-Br-cGMP in niedriger Dosis (50 nmol i.t.) appliziert. Hintergrund dieses Experimentes war die antinozizeptive Wirkung von niedrig dosiertem 8-Br-cGMP, welche vermutlich nicht über PKG-1 vermittelt wird (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3), und die bereits in geringer Dosis beobachtete Beeinflussung der Synapsin 2b-Konzentration durch 8-Br-cGMP (Kapitel 3.3.6). Bei den Wildtyp-Mäusen bewirkte die Verabreichung von 8-Br-cGMP wie erwartet eine Reduktion der Gesamtleckzeit im Sinne einer antinozizeptiven Wirkung, jedoch trat dieser Effekt bei den Synapsin 2-Nullmutanten nicht auf (Abbildung 3-22). Demzufolge könnte 8-Br-cGMP bei Wildtyp-Mäusen bzw. bei Ratten in niedriger Dosis durch Senkung der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark antinozizeptiv wirken. Bei steigender Dosis wird möglicherweise diese Wirkkomponente zunehmend durch die Aktivierung der PKG-1 überlagert, so dass 8-Br-cGMP in hoher Dosis einen pronozizeptiven Effekt besitzt. Diese Hypothese würde die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen gegensätzlichen Wirkungen von 8-Br-cGMP in Abhängigkeit von der applizierten Dosis erklären. Gestützt werden diese Vermutungen durch die kürzlich durchgeführten nozizeptiven Tests mit PKG-1-Knockout-Mäusen: Nach Verabreichung einer niedrigen Dosis 8-Br-cGMP war die nozizeptive Antwort sowohl bei PKG-1-Nullmutanten als auch beim Wildtyp reduziert. Die Applikation einer hohen Dosis 8-Br-cGMP steigerte dagegen nur beim Wildtyp die nozizeptive Antwort (Tegeder et al., submitted).

In einem weiteren nozizeptiven Test wurde nach Induktion einer Pfotenentzündung mittels Zymosaninjektion die resultierende mechanische Hyperalgesie mit von Frey-Haaren untersucht. Ausgehend von vergleichbaren mechanischen Schwellen unbehandelter Tiere nahm nach Injektion der Zymosanlösung in die untersuchte Hinterpfote die mechanische Schwelle bei den Synapsin 2-Nullmutanten nur geringfügig ab, während bei den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Senkung der mechanischen Schwelle auftrat (Abbildung 3-23). Offenbar werden in einem entzündeten Gewebe mechanische Reize in Abwesenheit von Synapsin 2 weniger stark empfunden, d.h. die mechanische Hyperalgesie ist reduziert.

Bei der Überprüfung der Reaktion auf akute thermische Reize mit dem Hot-Plate-Test waren die Reaktionszeiten der Synapsin 2-Knockout-Mäuse kürzer als die der Wildtyp-Mäuse (Kapitel 3.5.3). Daraus kann zum einen gefolgert werden, dass die Abwesenheit von Synapsin 2 nicht zu offensichtlichen motorischen Beeinträchtigungen führt. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass bei kurzen thermischen Reizen ein Fehlen von Synapsin 2 im Gegensatz zu lang-anhaltenden entzündlichen Stimuli (Formalin, Zymosan) nicht in einer geringeren Empfindlichkeit resultiert.

Zusammenfassend lassen die Tests mit den Knockout-Mäusen und den Ratten mit supprimierter Synapsin 2-Expression vermuten, dass Synapsin 2 an der nozizeptiven Transmission funktionell beteiligt ist. Insbesondere die Abnahme der Flinchzahl in der 2. Phase des Formalintestes und die reduzierte nozizeptive Antwort in der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung veranlassen zu der Hypothese, dass das Vesikelprotein Synapsin 2 v.a. bei anhaltender Erregung und dem damit verbundenen hohen Bedarf an exzitatorischen Neurotransmittern eine Rolle spielt.

Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen, denn dort bewirkte die durch Formalin hervorgerufene nozizeptive Stimulation eine rasche Senkung der Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-9). Es könnte sich dabei jedoch um eine sinnvolle Gegenregulation handeln, die über NO und cGMP vermittelt wird und durch die Senkung der Synapsin 2b-Konzentration zunächst vor einer zu hohen Glutamatausschüttung schützt. Dieser Vermutung entsprechend würde die nach 48 h gemessene Zunahme der Synapsin 2b-Expression zu einer unerwünschten Steigerung der Glutamatausschüttung führen. Somit stellt die Senkung der Synapsin 2b-Konzentration bzw. die Verhinderung der Synapsin 2b-Hochregulation vermutlich ein neues, bisher nicht beschriebenes antinozizeptives Wirkprinzip dar.

4.3 Rabphilin als Target der NO-vermittelten Nozizeption

Rabphilin ist ein Protein, das ebenso wie Synapsin 2b mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist. Es wird vermutlich über Rab3A an synaptische Vesikel gebunden und im Rahmen der Neurotransmitterausschüttung reversibel von den Vesikeln entfernt (siehe Kapitel 1.2.4). Neben der Assoziation mit synaptischen Vesikeln besitzen Rabphilin und Synapsin 2b weitere Gemeinsamkeiten: Beide Proteine sind Substrate mehrerer Proteinkinasen (darunter PKA), außerdem können Bindungen mit Bestandteilen des Zytoskeletts eingegangen werden (Fykse et al. 1995; Lonart et al. 1998; Miyazaki et al. 1994; Kato et al. 1996). Im Gegensatz zu Synapsin 2b existieren jedoch noch keine einheitlichen Hypothesen bezüglich der physiologischen Funktionen des Rabphilins.

Möglicherweise spielt Rabphilin eine Rolle bei der Vermittlung der antinozizeptiven Wirkung verschiedener Arzneistoffe: Während eine alleinige nozizeptive Stimulation, hervorgerufen durch eine Formalininjektion in eine Hinterpfote, keine Auswirkungen auf die Rabphilin-Proteinkonzentration im Lumbalmark hatte (Abbildung 3-24), führte die i.p. Applikation von Metamizol, Diclofenac oder Morphin 20 min vor der Formalininjektion zu einem Anstieg der Rabphilin-Konzentration (Abbildung 3-25). Diese Konzentrationsänderung des Rabphilin-Proteins ist nicht durch Änderungen der Genexpression zu erklären, denn nach Verabreichung der Analgetika waren die mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren unverändert (Abbildung 3-26). Somit sind vermutlich posttranskriptionale Modifikationen für die Zunahme der Rabphilin-Proteinkonzentration verantwortlich.

Aufgrund der bisher veröffentlichten Literatur kann davon ausgegangen werden, dass eine Änderung der Rabphilinkonzentration Auswirkungen auf die Exozytoseleistung der Neuronen hat. Dieser Einfluss scheint jedoch je nach untersuchtem Zellsystem unterschiedlich zu sein, denn in Mäuse-Eizellen und Tintenfisch-Synapsen führte die Injektion von Rabphilin-Fragmenten zu einer Hemmung der Exozytose (Masumoto et al. 1996; Burns et al. 1998), während in adrenergen chromaffinen Zellen, PC12-Zellen und β -Zellen des Pankreas die Exozytose verstärkt wurde (Komuro et al. 1996; Chung et al. 1995; Arribas et al. 1997). Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung der Exozytose in glutamatergen Synapsen des Rückenmarks liegen nicht vor, so dass über die Folgen der Konzentrationserhöhung des Rabphilins nach Applikation von Analgetika nur spekuliert werden kann. Da die verabreichten Analgetika ihre analgetische Wirkung über unterschiedliche Wirkmechanismen entfalten, handelt es sich bei der Konzentrationsänderung des Rabphilins anscheinend um einen generellen Aspekt einer antinozizeptiven Wirkung.

Neben den o.g. Analgetika können offenbar auch NO und cGMP die Rabphilin-Konzentration beeinflussen: Sowohl der NO-Donor NOC-5 als auch die cGMP-Analoga 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-

cGMPS bewirkten nach i.t. Applikation eine Senkung der Rabphilin-Konzentration im Lumbalmark (Abbildung 3-27). Da 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS den gleichen Effekt hervorrufen, sich bezüglich der Beeinflussung der PKG-1 jedoch gegensätzlich verhalten, ist vermutlich ein PKG-1-unabhängiger Mechanismus für die Abnahme der Rabphilin-Konzentration verantwortlich. Diese Befunde entsprechen den Beobachtungen, die auch bei der Untersuchung der Synapsin 2b-Konzentrationen gemacht wurden, denn dort bewirkte die Verabreichung von NOC-5, 8-Br-cGMP oder Rp-8-Br-cGMPS ebenfalls eine Senkung der Proteinkonzentration (vgl. Kapitel 3.3.5 und 3.3.6). Somit scheint NO über die Bildung von cGMP die Konzentration verschiedener synaptischer Vesikelproteine beeinflussen zu können und so einen Einfluss auf den Zyklus synaptischer Vesikel bzw. die Exozytose von Neurotransmittern zu nehmen.

Insgesamt kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, ob Rabphilin auch eine funktionelle Bedeutung bei der nozizeptiven Transmission im Rückenmark hat. Dazu wären z.B. nozizeptive Tests mit Rabphilin-Knockout-Mäusen hilfreich, die aber zur Zeit nicht verfügbar sind. Allerdings zeigen die durch Analgetika bzw. NO/cGMP hervorgerufenen Konzentrationsänderungen des Rabphilins, dass neben Synapsin 2b auch weitere Proteine synaptischer Vesikel als Zielstrukturen nozizeptiver Signaltransduktionskaskaden in Frage kommen und somit vielversprechende Kandidaten bei der Suche nach potentiellen analgetischen Wirkprinzipien darstellen.

5 Zusammenfassung

Die NO/cGMP-Kaskade spielt bei der nozizeptiven Transmission im Hinterhorn des Rückenmarks eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden bekannte cGMP-Targets (PKG-1, CNG-Kanäle, PDE-2 und -3) sowie synaptische Vesikelproteine (Synapsin 2, Rabphilin) als potentielle Targets der NO/cGMP-Kaskade mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden und nozizeptiven Verhaltensstudien hinsichtlich einer Beteiligung an der nozizeptiven Transmission im Rückenmark untersucht. Im Formalintest reduzierte der PKG-1-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS (0,1 – 0,5 $\mu\text{mol i.t.}$) die nozizeptive Antwort, während der PKG-1-Aktivator 8-Br-cGMP in hoher Dosis (2,5 $\mu\text{mol i.t.}$) einen gegenteiligen Effekt zeigte. Überraschenderweise wirkte 8-Br-cGMP in niedriger Dosis (0,1 – 0,25 $\mu\text{mol i.t.}$) antinozizeptiv, was durch die gleichzeitige Applikation des PKG-Inhibitors weiter verstärkt wurde. Im Gegensatz zu Rp-8-Br-cGMPS oder 8-Br-cGMP beeinflussten weder der CNG-Kanal-Inhibitor L-cis-Diltiazem (0,5 mg *i.t.*), noch die PDE-Inhibitoren EHNA (0,25 $\mu\text{mol i.t.}$) oder Milrinon (5 – 10 mg/kg *i.p.*) die nozizeptive Antwort im Formalintest. Mit Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Formalininjektion in eine Hinterpfote im Lumbalmark nach 48 – 96 h eine Steigerung der PKG-1-Proteinkonzentration zur Folge hat. Dies wurde durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Rp-8-Br-cGMPS (0,1 – 0,5 $\mu\text{mol i.t.}$) oder Morphin (2,5 – 5 mg/kg *i.p.*) verhindert, während 8-Br-cGMP (2,5 $\mu\text{mol i.t.}$) die Formalin-induzierte Steigerung der PKG-1-Konzentration im Lumbalmark verstärkte. Die Formalininjektion in eine Hinterpfote veränderte auch die Synapsin 2b-Konzentration im Lumbalmark: 10 min bis 8 h nach der Injektion wurde die Synapsin 2b-Proteinkonzentration gesenkt, nach 48 h war jedoch eine Zunahme zu beobachten. Diese späte Zunahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration wurde durch eine Steigerung der Genexpression hervorgerufen, denn mit quantitativer Realtime RT-PCR wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen 24 – 48 h nach der Formalininjektion gemessen. Die rasche Formalin-induzierte Abnahme der Synapsin 2b-Proteinkonzentration ging jedoch weder mit Änderungen der mRNA-Konzentration, noch mit veränderten Solubilisierungseigenschaften bei der Proteinaufbereitung einher, und wurde durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Morphin (10 mg/kg *i.p.*), Diclofenac (10 mg/kg *i.p.*), Metamizol (1 g/kg *i.p.*) oder dem NOS-Inhibitor L-NAME (10 – 100 mg/kg *i.p.*) verhindert. Demgegenüber führte die Vorbehandlung mit dem NO-Donor NOC-5 (4 – 20 $\mu\text{g i.t.}$), 8-Br-cGMP (0,1 – 2,5 $\mu\text{mol i.t.}$), Rp-8-Br-cGMPS (0,1 – 0,25 $\mu\text{mol i.t.}$) oder der Kombination von 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-cGMPS (0,1 + 0,1 und 0,5 + 0,5 $\mu\text{mol i.t.}$) zu einer Verstärkung der Formalin-induzierten raschen Senkung der Synapsin 2b-Konzentration. Die funktionelle Relevanz dieser Befunde wurde in mehreren nozizeptiven Tiermodellen überprüft. Durch eine kontinuierliche *i.t.* Infusion von Antisense-Oligonukleotiden wurde die Synapsin 2-Konzentration im Lumbalmark der Ratte gesenkt, was eine Reduktion der nozizeptiven Antwort im Formalintest zur Folge hatte. Bei Synapsin 2-Knockout-Mäusen war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte nozizeptive Antwort im Formalintest

und eine Reduktion der mechanischen Hyperalgesie bei Zymosan-induzierter Pfotenentzündung zu beobachten. Im Hot-Plate-Test zeigten die Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kürzere Latenzzeiten. Im Gegensatz zu Synapsin 2b wurde die Rabphilin-Konzentration im Lumbalmark durch Formalininjektion in eine Hinterpfote nicht beeinflusst. Allerdings führte die Verabreichung von Metamizol (500 mg/kg i.p.) oder Diclofenac (5 mg/kg i.p.) nach 1 h zu einer Steigerung der Rabphilin-Proteinkonzentration, welche nicht von Änderungen der mRNA-Expression begleitet war. Eine Senkung der Rabphilin-Proteinkonzentration wurde durch Applikation von NOC-5 (4 – 20 µg i.t.), 8-Br-cGMP (0,5 – 2,5 µmol i.t.), oder Rp-8-Br-cGMPS (0,1 – 0,25 µmol i.t.) hervorgerufen. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass im Rückenmark PKG-1 einen Effektor der NO-induzierten Hyperalgesie darstellt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO/cGMP über noch unbekannte Mechanismen die Verfügbarkeit bestimmter synaptischer Vesikelproteine moduliert, die vor allem bei starker oder anhaltender nozizeptiver Erregung für die Transmitterausschüttung und damit für die nozizeptive Transmission notwendig sind. Interessanterweise führt NO/cGMP über diese Mechanismen eher zur Hemmung der Nozizeption, was die bei niedrigen intrathekalen Dosen beobachteten antinozizeptiven Effekte von 8-Br-cGMP erklären kann. Die These der NO-induzierten Hyperalgesie kann aufgrund der Untersuchungen in dieser Arbeit und früherer Studien um eine insbesondere in niedriger Dosis auftretende NO/cGMP-vermittelte Antinozizeption erweitert werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cGMP	8-Bromo-cycloguanosin-3',5'-monophosphat
ACSF	künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimehylammonio)-1-propansulfonat
CNG	von zyklischen Nukleotiden gesteuert (cyclic nucleotide gated)
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EHNA	Erythro-hydroxy-nonyl-adenin
ERK-2	Extracellular-signal-regulated protein kinase 2
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
kDA	Kilo-Dalton
L-NAME	L-Nitro-arginin-methylester
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NK1	Neurokinin 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOC-5	3-(2-Hydroxy-1-(1-methylethyl)-2-nitroso)-1-propanamin
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C

PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Proteinkinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
q.s.	quantum satis (soviel wie nötig)
RNA	Ribonukleinsäure
Rp-8-Br-cGMPS	8- Bromo-cycloguanosin-3',5'-monophosphorothioat, Rp-Isomer
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
sGC	lösliche Guanylatcyclase (soluble guanylylcyclase)
sog.	sogenannt
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WDR	wide-dynamic range
z.T.	zum Teil

7 Literaturverzeichnis

- Arancio, O., E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1995). "Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons." *Nature* 376(6535): 74-80.
- Arribas, M., R. Regazzi, E. Garcia, C. B. Wollheim and P. De Camilli (1997). "The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by Rab 3." *Eur J Cell Biol* 74(3): 209-16.
- Asomoza-Espinosa, R., R. Alonso-Lopez, T. Mixcoatl-Zecuatl, P. Aguirre-Banuelos, J. E. Torres-Lopez and V. Granados-Soto (2001). "Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test." *Eur J Pharmacol* 418(3): 195-200.
- Bahler, M. and P. Greengard (1987). "Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner." *Nature* 326(6114): 704-7.
- Baines, A. J. and V. Bennett (1985). "Synapsin I is a spectrin-binding protein immunologically related to erythrocyte protein 4.1." *Nature* 315(6018): 410-3.
- Bellach, B. M., U. Ellert and M. Radoschewski (2000). "Epidemiologie des Schmerzes - Ergebnisse des Bundes-Gesundheitssurveys 1998." *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 43: 424-431.
- Benfenati, F., P. Neyroz, M. Bahler, L. Masotti and P. Greengard (1990). "Time-resolved fluorescence study of the neuron-specific phosphoprotein synapsin I. Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes." *J Biol Chem* 265(21): 12584-95.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brenman, J. E. and D. S. Bredt (1997). "Synaptic signaling by nitric oxide." *Curr Opin Neurobiol* 7(3): 374-8.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Burns, M. E., T. Sasaki, Y. Takai and G. J. Augustine (1998). "Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic." *J Gen Physiol* 111(2): 243-55.
- Calabresi, P., P. Gubellini, D. Centonze, G. Sancesario, M. Morello, M. Giorgi, A. Pisani and G. Bernardi (1999). "A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression." *J Neurosci* 19(7): 2489-99.
- Caro, G., M. Barrios and J. M. Baeyens (1988). "Dose-dependent and stereoselective antagonism by diltiazem of naloxone-precipitated morphine abstinence after acute morphine-dependence in vivo and in vitro." *Life Sci* 43(19): 1523-7.
- Castillo, P. E., R. Janz, T. C. Sudhof, T. Tzounopoulos, R. C. Malenka and R. A. Nicoll (1997). "Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 388(6642): 590-3.
- Chen, T. Y., Y. W. Peng, R. S. Dhallan, B. Ahamed, R. R. Reed and K. W. Yau (1993). "A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods." *Nature* 362(6422): 764-7.
- Chi, P., P. Greengard and T. A. Ryan (2001). "Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity." *Nat Neurosci* 4(12): 1187-93.
- Chilcote, T. J., Y. L. Siow, E. Schaeffer, P. Greengard and G. Thiel (1994). "Synapsin IIa bundles actin filaments." *J Neurochem* 63(4): 1568-71.

- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* 15(3): 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Chung, S. H., W. J. Song, K. Kim, J. J. Bednarski, J. Chen, G. D. Prestwich and R. W. Holz (1998). "The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance." *J Biol Chem* 273(17): 10240-8.
- Chung, S. H., Y. Takai and R. W. Holz (1995). "Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells." *J Biol Chem* 270(28): 16714-8.
- Coderre, T. J. and R. Melzack (1992). "The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury." *J Neurosci* 12(9): 3665-70.
- Coderre, T. J. and R. Melzack (1992). "The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury." *J Neurosci* 12(9): 3671-5.
- Coderre, T. J., A. L. Vaccarino and R. Melzack (1990). "Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection." *Brain Res* 535(1): 155-8.
- Corbin, J. D., I. V. Turko, A. Beasley and S. H. Francis (2000). "Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities." *Eur J Biochem* 267(9): 2760-7.
- Czernik, A. J., D. T. Pang and P. Greengard (1987). "Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7518-22.
- Davis, K. L., E. Martin, I. V. Turko and F. Murad (2001). "Novel effects of nitric oxide." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 203-36.
- De Camilli, P., F. Benfenati, F. Valtorta and P. Greengard (1990). "The synapsins." *Annu Rev Cell Biol* 6: 433-60.
- De Camilli, P., S. M. Harris, Jr., W. B. Huttner and P. Greengard (1983). "Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes." *J Cell Biol* 96(5): 1355-73.
- Dubuisson, D. and S. G. Dennis (1977). "The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats." *Pain* 4(2): 161-74.
- Eddy, W. B. and D. Leimbach (1953). "Synthetic analgesics. II. Dithenylbutenyl and dithenylbutylamines." *J Pharmacol Exp Ther* 107: 385-393.
- Esser, L., C. R. Wang, M. Hosaka, C. S. Smagula, T. C. Sudhof and J. Deisenhofer (1998). "Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes." *Embo J* 17(4): 977-84.
- Fernandez-Chacon, R. and T. C. Sudhof (1999). "Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle." *Annu Rev Physiol* 61: 753-76.
- Ferreira, A., K. S. Kosik, P. Greengard and H. Q. Han (1994). "Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency in synapsin II-depleted neurons." *Science* 264(5161): 977-9.
- Ferreira, J., A. R. Santos and J. B. Calixto (1999). "The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice." *Neuropharmacology* 38(6): 835-42.

- Foletti, D. L. and R. H. Scheller (2001). "*Developmental regulation and specific brain distribution of phosphorabphilin.*" J Neurosci 21(15): 5461-72.
- Fon, E. A. and R. H. Edwards (2001). "*Molecular mechanisms of neurotransmitter release.*" Muscle Nerve 24(5): 581-601.
- Fykse, E. M., C. Li and T. C. Sudhof (1995). "*Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca²⁺/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro.*" J Neurosci 15(3 Pt 2): 2385-95.
- Garry, M. G., S. Malik, J. Yu, M. A. Davis and J. Yang (2000). "*Knock down of spinal NMDA receptors reduces NMDA and formalin evoked behaviors in rat.*" Neuroreport 11(1): 49-55.
- Garthwaite, J. and C. L. Boulton (1995). "*Nitric oxide signaling in the central nervous system.*" Annu Rev Physiol 57: 683-706.
- Geppert, M., V. Y. Bolshakov, S. A. Siegelbaum, K. Takei, P. De Camilli, R. E. Hammer and T. C. Sudhof (1994). "*The role of Rab3A in neurotransmitter release.*" Nature 369(6480): 493-7.
- Goldenring, J. R., R. S. Lasher, M. L. Vallano, T. Ueda, S. Naito, N. H. Sternberger, L. A. Sternberger and R. J. DeLorenzo (1986). "*Association of synapsin I with neuronal cytoskeleton. Identification in cytoskeletal preparations in vitro and immunocytochemical localization in brain of synapsin I.*" J Biol Chem 261(18): 8495-504.
- Gudi, T., J. C. Chen, D. E. Casteel, T. M. Seasholtz, G. R. Boss and R. B. Pilz (2002). "*cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions.*" J Biol Chem 277(40): 37382-93.
- Haley, J. E., A. F. Sullivan and A. H. Dickenson (1990). "*Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat.*" Brain Res 518(1-2): 218-26.
- Handy, R. L., H. L. Harb, P. Wallace, Z. Gaffen, K. J. Whitehead and P. K. Moore (1996). "*Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects.*" Br J Pharmacol 119(2): 423-31.
- Handy, R. L. and P. K. Moore (1998). "*Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia.*" Neuropharmacology 37(1): 37-43.
- Hartell, N. A. (1994). "*cGMP acts within cerebellar Purkinje cells to produce long term depression via mechanisms involving PKC and PKG.*" Neuroreport 5(7): 833-6.
- Hartmann, G., M. Bidlingmaier, K. Tschöp, A. Eigler, U. Hacker and S. Endres (1998). "*Antisense-Oligonukleotide.*" Dt Arztebl 95(24): 1524-1530.
- Hausinger, A., W. Volkandt and H. Zimmermann (1995). "*Calcium-dependent endogenous proteolysis of the vesicle proteins synaptobrevin and synaptotagmin.*" Neuroreport 6(4): 637-41.
- Heil, W. G., W. Landgraf and F. Hofmann (1987). "*A catalytically active fragment of cGMP-dependent protein kinase. Occupation of its cGMP-binding sites does not affect its phosphotransferase activity.*" Eur J Biochem 168(1): 117-21.
- Herdegen, T., S. Rudiger, B. Mayer, R. Bravo and M. Zimmermann (1994). "*Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw.*" Brain Res Mol Brain Res 22(1-4): 245-58.
- Hilfiker, S., V. A. Pieribone, A. J. Czernik, H. T. Kao, G. J. Augustine and P. Greengard (1999). "*Synapsins as regulators of neurotransmitter release.*" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354(1381): 269-79.
- Hirokawa, N., K. Sobue, K. Kanda, A. Harada and H. Yorifuji (1989). "*The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I.*" J Cell Biol 108(1): 111-26.

- Ho, L., Y. Guo, L. Spielman, O. Petrescu, V. Haroutunian, D. Purohit, A. Czernik, S. Yemul, P. S. Aisen, R. Mohs and G. M. Pasinetti (2001). "Altered expression of a-type but not b-type synapsin isoform in the brain of patients at high risk for Alzheimer's disease assessed by DNA microarray technique." *Neurosci Lett* 298(3): 191-4.
- Hosaka, M., R. E. Hammer and T. C. Sudhof (1999). "A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles." *Neuron* 24(2): 377-87.
- Hosaka, M. and T. C. Sudhof (1998). "Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca²⁺." *J Biol Chem* 273(22): 13371-4.
- Hosaka, M. and T. C. Sudhof (1998). "Synapsins I and II are ATP-binding proteins with differential Ca²⁺ regulation." *J Biol Chem* 273(3): 1425-9.
- Hosaka, M. and T. C. Sudhof (1999). "Homo- and heterodimerization of synapsins." *J Biol Chem* 274(24): 16747-53.
- Hou, W. Y., B. C. Shyu, T. M. Chen, J. W. Lee, J. Y. Shieh and W. Z. Sun (1997). "Intrathecaly administered c-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases formalin-induced nociceptive behavior in adult rats." *Eur J Pharmacol* 329(1): 17-26.
- Hunskar, S., O. B. Fasmer and K. Hole (1985). "Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics." *J Neurosci Methods* 14(1): 69-76.
- Huttner, W. B. and P. Greengard (1979). "Multiple phosphorylation sites in protein I and their differential regulation by cyclic AMP and calcium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10): 5402-6.
- Hylden, J. L. and G. L. Wilcox (1980). "Intrathecal morphine in mice: a new technique." *Eur J Pharmacol* 67(2-3): 313-6.
- Iadarola, J. M. and R. M. Caudle (1997). "Good pain, bad pain." *Science* 278(5336): 239-40.
- Iga, M., M. Inui and K. Sobue (1997). "Characterization of the interaction between synapsin I and caldesmon (brain spectrin or fodrin)." *Biochem Biophys Res Commun* 231(3): 852-5.
- Inoue, T., T. Mashimo, S. Shibuta and I. Yoshiya (1997). "Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat." *J Neurol Sci* 153(1): 1-7.
- Jaffrey, S. R., F. Benfenati, A. M. Snowman, A. J. Czernik and S. H. Snyder (2002). "Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON." *Proc Natl Acad Sci U S A* 26: 26.
- Jain, N. K., C. S. Patil, A. Singh and S. K. Kulkarni (2003). "Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine." *Pharmacology* 67(3): 150-6.
- Juilfs, D. M., S. Soderling, F. Burns and J. A. Beavo (1999). "Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs)." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 67-104.
- Kamisaki, Y., K. Nakamoto, K. Wada and T. Itoh (1995). "Nitric oxide regulates substance P release from rat spinal cord synaptosomes." *J Neurochem* 65(5): 2050-6.
- Kao, H. T., B. Porton, A. J. Czernik, J. Feng, G. Yiu, M. Haring, F. Benfenati and P. Greengard (1998). "A third member of the synapsin gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4667-72.
- Kato, M., T. Sasaki, T. Ohya, H. Nakanishi, H. Nishioka, M. Imamura and Y. Takai (1996). "Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin." *J Biol Chem* 271(50): 31775-8.
- Komuro, R., T. Sasaki, S. Orita, M. Maeda and Y. Takai (1996). "Involvement of rabphilin-3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 219(2): 435-40.

- Kruuse, C., L. L. Thomsen, S. Birk and J. Olesen (2003). "*Migraine can be induced by sildenafil without changes in middle cerebral artery diameter.*" *Brain* 126(Pt 1): 241-7.
- Kruuse, C., L. L. Thomsen, T. B. Jacobsen and J. Olesen (2002). "*The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil has no effect on cerebral blood flow or blood velocity, but nevertheless induces headache in healthy subjects.*" *J Cereb Blood Flow Metab* 22(9): 1124-31.
- Kürten, L. (2001). Chronischer Schmerz - Ergebnisse der Forschung verbessern die Versorgung der Patienten, Broschüre des Bundesministeriums für Bildung und Forschung.
- Laemmli, U. K. (1970). "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*" *Nature* 227(259): 680-5.
- Lam, H. H., D. F. Hanley, B. D. Trapp, S. Saito, S. Raja, T. M. Dawson and H. Yamaguchi (1996). "*Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw.*" *Neurosci Lett* 210(3): 201-4.
- Le Bars, D., M. Gozariu and S. W. Cadden (2001). "*Animal models of nociception.*" *Pharmacol Rev* 53(4): 597-652.
- Leonard, A. S. and J. W. Hell (1997). "*Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites.*" *J Biol Chem* 272(18): 12107-15.
- Li, J. Y. (1996). "*Rabphilin-3A is transported with fast anterograde axonal transport and associated with synaptic vesicles.*" *Synapse* 23(2): 79-88.
- Li, L., L. S. Chin, O. Shupliakov, L. Brodin, T. S. Sihra, O. Hvalby, V. Jensen, D. Zheng, J. O. McNamara, P. Greengard and et al. (1995). "*Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9235-9.
- Lincoln, T. M., N. Dey and H. Sellak (2001). "*Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression.*" *J Appl Physiol* 91(3): 1421-30.
- Liu, Y. and R. H. Edwards (1997). "*The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration.*" *Annu Rev Neurosci* 20: 125-56.
- Lonart, G., K. L. Cassels and K. M. Johnson (1993). "*Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices.*" *J Neurosci Res* 35(2): 192-8.
- Lonart, G. and T. C. Sudhof (1998). "*Region-specific phosphorylation of rabphilin in mossy fiber nerve terminals of the hippocampus.*" *J Neurosci* 18(2): 634-40.
- Machelska, H., R. Przewlocki, M. W. Radomski and B. Przewlocka (1998). "*Differential effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation.*" *Pol J Pharmacol* 50(6): 407-15.
- Maihofner, C., C. Euchenhofer, I. Tegeder, K. F. Beck, J. Pfeilschifter and G. Geisslinger (2000). "*Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation.*" *Neurosci Lett* 290(1): 71-5.
- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1993). "*Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats.*" *Pain* 54(3): 291-300.
- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1995). "*The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats.*" *Br J Pharmacol* 114(5): 1069-75.
- Mandell, J. W., A. J. Czernik, P. De Camilli, P. Greengard and E. Townes-Anderson (1992). "*Differential expression of synapsins I and II among rat retinal synapses.*" *J Neurosci* 12(5): 1736-49.

- Masumoto, N., T. Sasaki, M. Tahara, A. Mammoto, Y. Ikebuchi, K. Tasaka, M. Tokunaga, Y. Takai and A. Miyake (1996). "Involvement of Rabphilin-3A in cortical granule exocytosis in mouse eggs." *J Cell Biol* 135(6 Pt 2): 1741-7.
- Meffert, M. K., N. C. Calakos, R. H. Scheller and H. Schulman (1996). "Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions." *Neuron* 16(6): 1229-36.
- Messlinger, K. (1997). "Was ist ein Nozizeptor?" *Anaesthesist* 46(2): 142-53.
- Messlinger, K. (2002). "Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentscheidung." *Manuelle Medizin* 40(1): 13-21.
- Mixcoatl-Zecuatl, T., P. Aguirre-Banuelos and V. Granados-Soto (2000). "Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test." *Eur J Pharmacol* 400(1): 81-7.
- Miyazaki, M., H. Shirataki, H. Kohno, K. Kaibuchi, A. Tsugita and Y. Takai (1994). "Identification as beta-adducin of a protein interacting with rabphilin-3A in the presence of Ca²⁺ and phosphatidylserine." *Biochem Biophys Res Commun* 205(1): 460-6.
- Moore, P. K., R. C. Babbedge, P. Wallace, Z. A. Gaffen and S. L. Hart (1993). "7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure." *Br J Pharmacol* 108(2): 296-7.
- Moore, P. K., A. O. Oluyomi, R. C. Babbedge, P. Wallace and S. L. Hart (1991). "L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse." *Br J Pharmacol* 102(1): 198-202.
- Morimoto, K., K. Sato, S. Sato, S. Suemaru, T. Sato, N. Yamada and T. Hayabara (1998). "Increases in mRNA levels for synapsin I but not synapsin II in the hippocampus of the rat kindling model of epilepsy." *Seizure* 7(3): 229-35.
- Mullershausen, F., A. Friebe, R. Feil, W. J. Thompson, F. Hofmann and D. Koesling (2003). "Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling." *J Cell Biol* 160(5): 719-27.
- Nakamizo, T., J. Kawamata, K. Yoshida, Y. Kawai, R. Kanki, H. Sawada, T. Kihara, H. Yamashita, H. Shibasaki, A. Akaike and S. Shimohama (2003). "Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons." *J Neurosci Res* 71(4): 485-95.
- Nayak, A. S., C. I. Moore and M. D. Browning (1996). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of the presynaptic protein synapsin I is persistently increased during long-term potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15451-6.
- Nestler, E. J. and P. Greengard (1982). "Nerve impulses increase the phosphorylation state of protein I in rabbit superior cervical ganglion." *Nature* 296(5856): 452-4.
- Nickel, R. and H. H. Raspe (2001). "Chronischer Schmerz: Epidemiologie und Inanspruchnahme." *Der Nervenarzt* 72(12): 897-906.
- Niederberger, E., A. Schmidtko, J. D. Rothstein, G. Geisslinger and I. Tegeder (2003). "Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1." *Neuroscience* 116(1): 81-7.
- Ohya, T., T. Sasaki, M. Kato and Y. Takai (1998). "Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5." *J Biol Chem* 273(1): 613-7.
- Okuda, K., C. Sakurada, M. Takahashi, T. Yamada and T. Sakurada (2001). "Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats." *Pain* 92(1-2): 107-15.
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, C. J. Quaipe and S. D. Findley (1996). "ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14934-9.

- Pertovaara, A., R. Bravo and T. Herdegen (1993). "*Induction and suppression of immediate-early genes in the rat brain by a selective alpha-2-adrenoceptor agonist and antagonist following noxious peripheral stimulation.*" *Neuroscience* 54(1): 117-26.
- Petersohn, D., S. Schoch, D. R. Brinkmann and G. Thiel (1995). "*The human synapsin II gene promoter. Possible role for the transcription factor zif268/egr-1, polyoma enhancer activator 3, and AP2.*" *J Biol Chem* 270(41): 24361-9.
- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G. X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K. E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler and F. Hofmann (1998). "*Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice.*" *Embo J* 17(11): 3045-51.
- Prado, W. A., V. F. Schiavon and F. Q. Cunha (2002). "*Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats.*" *Eur J Pharmacol* 441(1-2): 57-65.
- Pyle, J. L., E. T. Kavalali, E. S. Piedras-Renteria and R. W. Tsien (2000). "*Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses.*" *Neuron* 28(1): 221-31.
- Qian, Y., D. S. Chao, D. R. Santillano, T. L. Cornwell, A. C. Nairn, P. Greengard, T. M. Lincoln and D. S. Brecht (1996). "*cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons.*" *J Neurosci* 16(10): 3130-8.
- Rosahl, T. W., D. Spillane, M. Missler, J. Herz, D. K. Selig, J. R. Wolff, R. E. Hammer, R. C. Malenka and T. C. Südhof (1995). "*Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation.*" *Nature* 375(6531): 488-93.
- Ruth, P. (1999). "*Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting.*" *Pharmacol Ther* 82(2-3): 355-72.
- Rydh-Rinder, M., O. G. Berge and T. Hokfelt (2001). "*Antinociceptive effects after intrathecal administration of phosphodiester-, 2'-O-allyl-, and C-5-propyne-modified antisense oligodeoxynucleotides targeting the NMDAR1 subunit in mouse.*" *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2): 23-33.
- Saito, S., G. J. Kidd, B. D. Trapp, T. M. Dawson, D. S. Brecht, D. A. Wilson, R. J. Traystman, S. H. Snyder and D. F. Hanley (1994). "*Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase.*" *Neuroscience* 59(2): 447-56.
- Santschi, L., M. Reyes-Harde and P. K. Stanton (1999). "*Chemically induced, activity-independent LTD elicited by simultaneous activation of PKG and inhibition of PKA.*" *J Neurophysiol* 82(3): 1577-89.
- Sasaki, T., H. Shirataki, H. Nakanishi and Y. Takai (1997). "*Rab3A-rabphilin-3A system in neurotransmitter release.*" *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31: 279-94.
- Schluter, O. M., E. Schnell, M. Verhage, T. Tzonopoulos, R. A. Nicoll, R. Janz, R. C. Malenka, M. Geppert and T. C. Südhof (1999). "*Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release.*" *J Neurosci* 19(14): 5834-46.
- Sequeira, S. M., A. P. Carvalho and C. M. Carvalho (1999). "*Both protein kinase G dependent and independent mechanisms are involved in the modulation of glutamate release by nitric oxide in rat hippocampal nerve terminals.*" *Neurosci Lett* 261(1-2): 29-32.
- Shibuta, S., T. Mashimo, P. Zhang, A. Ohara and I. Yoshiya (1996). "*A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model.*" *J Neurol Sci* 141(1-2): 1-5.
- Shirataki, H., K. Kaibuchi, T. Sakoda, S. Kishida, T. Yamaguchi, K. Wada, M. Miyazaki and Y. Takai (1993). "*Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin.*" *Mol Cell Biol* 13(4): 2061-8.
- Sihra, T. S., E. Bogonez and D. G. Nicholls (1992). "*Localized Ca²⁺ entry preferentially effects protein dephosphorylation, phosphorylation, and glutamate release.*" *J Biol Chem* 267(3): 1983-9.

- Sistiaga, A., M. T. Miras-Portugal and J. Sanchez-Prieto (1997). "Modulation of glutamate release by a nitric oxide/cyclic GMP-dependent pathway." *Eur J Pharmacol* 321(2): 247-57.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* 113 Pt 2: 183-92.
- Sousa, A. M. and W. A. Prado (2001). "The dual effect of a nitric oxide donor in nociception." *Brain Res* 897(1-2): 9-19.
- Stahl, B., J. H. Chou, C. Li, T. C. Sudhof and R. Jahn (1996). "Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras." *Embo J* 15(8): 1799-809.
- Sudhof, T. C. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." *Nature* 375(6533): 645-53.
- Sudhof, T. C. (2000). "The synaptic vesicle cycle revisited." *Neuron* 28(2): 317-20.
- Sudhof, T. C., A. J. Czernik, H. T. Kao, K. Takei, P. A. Johnston, A. Horiuchi, S. D. Kanazir, M. A. Wagner, M. S. Perin, P. De Camilli and et al. (1989). "Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins." *Science* 245(4925): 1474-80.
- Sugiyama, T., T. Shinoe, Y. Ito, H. Misawa, T. Tojima, E. Ito and T. Yoshioka (2000). "A novel function of synapsin II in neurotransmitter release." *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 133-43.
- Suzuki, T., K. Nakajima, K. Fujimoto, T. Fujii and K. Kawashima (1997). "Nitric oxide increases stimulation-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices by a cyclic GMP-independent mechanism." *Brain Res* 760(1-2): 158-62.
- Svensson, C. I. and T. L. Yaksh (2002). "The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 553-83.
- Takei, Y., A. Harada, S. Takeda, K. Kobayashi, S. Terada, T. Noda, T. Takahashi and N. Hirokawa (1995). "Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system." *J Cell Biol* 131(6 Pt 2): 1789-800.
- Tao, Y. X., A. Hassan, E. Haddad and R. A. Johns (2000). "Expression and action of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha in inflammatory hyperalgesia in rat spinal cord." *Neuroscience* 95(2): 525-33.
- Tao, Y. X. and R. A. Johns (2000). "Activation of cGMP-dependent protein kinase Ialpha is required for N-methyl-D-aspartate- or nitric oxide-produced spinal thermal hyperalgesia." *Eur J Pharmacol* 392(3): 141-5.
- Tao, Y. X. and R. A. Johns (2002). "Activation and up-regulation of spinal cord nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, after formalin injection into the rat hind paw." *Neuroscience* 112(2): 439-46.
- Tegeder, I., D. Del-Turco, A. Schmidtko, M. Sausbier, R. Feil, F. Hofmann, T. Deller, P. Ruth and G. Geisslinger (submitted). "Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase-I."
- Tegeder, I., A. Schmidtko, E. Niederberger, P. Ruth and G. Geisslinger (2002). "Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats." *Neurosci Lett* 332(2): 146-50.
- Tjolsen, A., O. G. Berge, S. Hunnskaar, J. H. Rosland and K. Hole (1992). "The formalin test: an evaluation of the method." *Pain* 51(1): 5-17.
- Ubach, J., J. Garcia, M. P. Nittler, T. C. Sudhof and J. Rizo (1999). "Structure of the Janus-faced C2B domain of rabphilin." *Nat Cell Biol* 1(2): 106-12.

- Ueda, T. and P. Greengard (1977). "*Adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein system of neuronal membranes. I. Solubilization, purification, and some properties of an endogenous phosphoprotein.*" J Biol Chem 252(14): 5155-63.
- Verhaak, P. F., J. J. Kerssens, J. Dekker, M. J. Sorbi and J. M. Bensing (1998). "*Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature.*" Pain 77(3): 231-9.
- Vetter, G., G. Geisslinger and I. Tegeder (2001). "*Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation.*" Pain 92(1-2): 213-8.
- Wang, X. and P. J. Robinson (1997). "*Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system.*" J Neurochem 68(2): 443-56.
- Wang, Y., M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann and T. C. Sudhof (1997). "*Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion.*" Nature 388(6642): 593-8.
- Wei, J. Y., E. D. Cohen, H. G. Genieser and C. J. Barnstable (1998). "*Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel.*" J Mol Neurosci 10(1): 53-64.
- Wei, J. Y., D. S. Roy, L. Leconte and C. J. Barnstable (1998). "*Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system.*" Prog Neurobiol 56(1): 37-64.
- Wheeler, T. C., L. S. Chin, Y. Li, F. L. Roudabush and L. Li (2002). "*Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia.*" J Biol Chem 277(12): 10273-82.
- Wolosker, H., M. Reis, J. Assreuy and L. de Meis (1996). "*Inhibition of glutamate uptake and proton pumping in synaptic vesicles by S-nitrosylation.*" J Neurochem 66(5): 1943-8.
- Woolf, C. J. and M. Costigan (1999). "*Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain.*" Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7723-30.
- Yaksh, T. L., X. Y. Hua, I. Kalcheva, N. Nozaki-Taguchi and M. Marsala (1999). "*The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input.*" Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7680-6.
- Yaksh, T. L. and T. A. Rudy (1976). "*Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics.*" Science 192(4246): 1357-8.
- Yukhananov, R., J. Guan and G. Crosby (2002). "*Antisense oligonucleotides to N-methyl-D-aspartate receptor subunits attenuate formalin-induced nociception in the rat.*" Brain Res 930(1-2): 163-9.
- Zhuo, M., Y. Hu, C. Schultz, E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1994). "*Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation.*" Nature 368(6472): 635-9.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Schmidtko, A., O. Coste, E. Niederberger, P. Ruth, G. Geisslinger and I. Tegeder (2003). "*Synapsin II is involved in ongoing nociceptive transmission.*" (submitted).

Schmidtko, A., E. Niederberger, I. Tegeder and G. Geisslinger (2003). „*The Dual Role of the NO/cGMP Pathway in Spinal Nociception.*“ (submitted).

Schmidtko, A., P. Ruth, G. Geisslinger and I. Tegeder (2003). "*Inhibition of cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation.*" Nitric Oxide 8(2): 89-94.

Tegeder, I., A. Schmidtko, E. Niederberger, P. Ruth and G. Geisslinger (2002). "*Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats.*" Neurosci Lett 332(2): 146-50.

Schmidtko, A., E. Niederberger, S. Grösch, P. Ruth, G. Geisslinger and I. Tegeder (2002). „*Role of Synapsin II as a potential target of the NO/cGMP pathway in nociceptive transmission in the spinal cord.*“ Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 365 (Suppl 1) R 38.

8.2 Sonstige Veröffentlichungen

Tegeder, I., D. Del-Turco, A. Schmidtko, M. Sausbier, R. Feil, F. Hofmann, T. Deller, P. Ruth and G. Geisslinger (2003). „*Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase-I.*“ (submitted).

Ehnert, C., I. Tegeder, S. Pierre, K. Birod, V. Ngyuen, A. Schmidtko, G. Geisslinger and K. Scholich (2003). „*Protein Associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing.*“ (submitted).

Kunz, S., E. Niederberger, C. Ehnert, A. Pfenninger, J. Kruij, T.M. Wendrich, A. Schmidtko, I. Tegeder and G. Geisslinger (2003). „*The calpain inhibitor MDL 28170 prevents inflammation-*

induced neurofilament light chain (NFL) breakdown in the spinal cord and reduces thermal hyperalgesia.“ (submitted).

Niederberger, E., A. Schmidtko, JD Rothstein, G. Geisslinger and I. Tegeder (2003). „*Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1.*“ Neuroscience 116(1): 81-7.

Tegeder, I., S. Grosch, A. Schmidtko, A. Haussler, H. Schmidt, E. Niederberger, K. Scholich and G. Geisslinger (2003). „*G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation.*“ Cancer Res. 63(8): 1846-52.

Tegeder, I., A. Schmidtko, L. Brautigam, A. Kirschbaum, G. Geisslinger and J. Lotsch (2002). „*Tissue distribution of imipenem in critically ill patients.*“ Clin Pharmacol Ther. 71(5): 325-33.

Niederberger, E., I. Tegeder, G. Vetter, A. Schmidtko, H. Schmidt, C. Euchenhofer, L. Brautigam, S. Grosch and G. Geisslinger (2001). „*Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB.*“ FASEB J. 15(9): 1622-4.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Achim Schmidtko

Merianstrasse 40
60316 Frankfurt am Main

geboren am 08.07.1972 in Saarbrücken
ledig

Schulbildung und Zivildienst

1978 – 1982	Grundschule in Theley
1982 – 1991	Arnold Janssen-Gymnasium in St. Wendel Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
1991 – 1992	Zivildienst auf der Rettungswache in St. Wendel

Hochschulausbildung

1992 – 1997	Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
1997 – 1998	Pharmaziepraktikum in Frankfurt am Main
1998	Approbation als Apotheker
1998 – 2002	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
2002 – 2003	Praktisches Jahr der Humanmedizin im Universitätsklinikum Frankfurt am Main
2000 – 2003	Naturwissenschaftliche Promotion im Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger