

Redox-basierte Mechanismen der Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Wiebke Kallenborn-Gerhardt

aus Wiesbaden

Frankfurt am Main 2011

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger

Prof. Dr. Holger Stark

Datum der Disputation:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nozizeption	1
1.1.1	Schmerzarten	2
1.1.2	Periphere und zentrale Sensibilisierung	4
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies und deren Rolle in der Signaltransduktion	8
1.2.1	Die Funktion reaktiver Sauerstoffspezies als Signalmoleküle	11
1.2.2	Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Schmerzverarbeitung	15
1.3	Eigenschaften, Expression und Funktion der NADPH Oxidasen	17
1.4	Das Peroxiredoxin-Sestrin/Sulfiredoxin-System	21
1.4.1	Eigenschaften und Funktion der Peroxiredoxine	21
1.4.2	Eigenschaften und Funktion der Sulfiredoxine und Sestrine	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Tierexperimentelle Methoden	27
2.1.1	Versuchstiere	27
2.1.2	Genotypisierung	27
2.1.3	Rota-Rod-Test	29
2.1.4	Nozizeptive Tiermodelle	29
2.1.4.1	Hot-Plate-Test	29
2.1.4.2	Cold-Plate-Test	30
2.1.4.3	Formalin-Test	30
2.1.4.4	Modelle der inflammatorischen Hyperalgesie	31
2.1.4.5	Neuropathische Schmerzmodelle	32
2.1.5	Tamoxifen-induzierter Nox4-Knockout	34
2.1.6	Intrathekale Applikation von Prüfsubstanzen	35
2.1.7	Gewebeentnahme	35
2.2	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1	RNA Isolierung	36
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.3	Real-time quantitative RT-PCR	37
2.2.3.1	Reverse Transkription	37
2.2.3.2	PCR	38
2.2.3.3	Quantifizierung	40
2.2.4	In-situ-Hybridisierung	42
2.2.4.1	One-Step RT-PCR	43
2.2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.4.3	Elution von DNA aus Agarosegelen	44
2.2.4.4	Klonierung	44
2.2.4.5	Transformation	44
2.2.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA	45
2.2.4.7	Restriktionsverdau	45
2.2.4.8	Sequenzierung	46
2.2.4.9	In vitro Transkription	46
2.2.4.10	In-situ-Hybridisierung	47

2.3	Microarray-Analyse	49
2.3.1	RNA-Extraktion und Analyse	49
2.3.2	Proben-Markierung und Array-Hybridisierung	49
2.3.3	Array-Scan und Datenanalyse	50
2.4	Proteinanalytik	50
2.4.1	Western Blot	50
2.4.1.1	Proteinextraktion	50
2.4.1.2	Konzentrationsbestimmung	50
2.4.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.4.1.4	Western Blot und Antikörper-Inkubation	52
2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten	53
2.4.2.1	Gewebepräparation	53
2.4.2.2	Analytische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	54
2.5	Amplex Red Assay	55
2.6	Statistik und graphische Darstellung	55
2.7	Chemikalien und Reagenzien	56
3	ERGEBNISSE	59
3.1	Charakterisierung der Expression und Funktion der NADPH Oxidase 4 im nozizeptiven System	59
3.1.1	Expression der NADPH Oxidasen im Rückenmark und in Spinalganglien	59
3.1.2	Expression der NADPH Oxidasen nach nozizeptiver Stimulation	60
3.1.3	Zelluläre Lokalisation von Nox4 in Spinalganglien und im Rückenmark	63
3.1.4	Basale Charakteristika von Nox4 ^{-/-} -Mäusen	67
3.1.4.1	Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien	67
3.1.4.2	Expression der Nox-Isoformen im Rückenmark und DRGs	68
3.1.4.3	Motorische Koordination	69
3.1.5	Nozizeptives Verhalten von Nox4 ^{-/-} -Mäusen	70
3.1.5.1	Nozizeptives Verhalten in Modellen für akute Schmerzen	70
3.1.5.2	Formalin-Test	70
3.1.5.3	Mechanische Hyperalgesie in inflammatorischen Schmerzmodellen	71
3.1.5.4	Mechanische Allodynie in neuropathischen Schmerzmodellen	73
3.1.6	Mechanische Allodynie von ERT-Cre ^{+/-} Nox4 ^{fl/fl} -Mäusen	75
3.1.7	Effekte von Fulvene-5 auf die SNI-induzierte mechanische Allodynie	77
3.1.8	Spinale Mikroglia-Reaktion nach peripherer Nervenschädigung	78
3.1.9	Genexpressionsprofile von Nox4 ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen nach SNI	79
3.1.10	Myelinisierungs-Zustand peripherer Nerven nach Schädigung	82
3.2	Charakterisierung der Expression und Funktion von Sestrin 2 im nozizeptiven System	85
3.2.1	Expression von Sestrin 2 im nozizeptiven System	85
3.2.2	Expression von Sestrin 2 nach nozizeptiver Stimulation	86
3.2.3	Basale Charakteristika von Sesn2 ^{-/-} -Mäusen	88
3.2.3.1	Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien	88
3.2.3.2	Untersuchungen der motorischen Koordination	89
3.2.4	Nozizeptives Verhalten von Sesn2 ^{-/-} -Mäusen	90
3.2.4.1	Nozizeptives Verhalten in Modellen für akute Schmerzen	90
3.2.4.2	Formalin-Test	91
3.2.4.3	Mechanischen Hyperalgesie nach Zymosan-Injektion	92
3.2.4.4	Mechanische Allodynie im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen	93

3.2.5	Messung reaktiver Sauerstoffspezies nach peripherer Nervenverletzung	93
4	DISKUSSION	95
4.1	Nox4 bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale	96
4.2	Weitere ROS-generierende Systeme in nozizeptiven Signalwegen	107
4.3	Sestrin 2 und andere antioxidative Systeme bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale	111
4.4	Reaktive Sauerstoffspezies als potentielle Targets zur Therapie neuropathischer Schmerzen	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	119
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
7	LITERATURVERZEICHNIS	127
8	ANHANG	143
8.1	Danksagung	143
8.2	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	144
8.3	Lebenslauf	146

1 EINLEITUNG

1.1 Nozizeption

Als Nozizeption wird der Prozess bezeichnet, durch den intensive periphere Reize in Form von thermischen, mechanischen oder chemischen Stimuli von einer Gruppe primär afferenter Neuronen, den Nozizeptoren, detektiert und weitergeleitet werden. Prinzipiell unterscheidet man zwei Klassen primär afferenter nozizeptiver Fasern: die A δ -Fasern und die C-Fasern. Während die A δ -Fasern dünn-myelinisiert sind, einen mittleren Durchmesser aufweisen und eine mittlere bis schnelle Reizantwort (5-30 m/s) vermitteln, sind die C-Fasern nicht-myelinisiert, haben einen kleinen Durchmesser und vermitteln eine langsamere Reizantwort (0,5-2 m/s). Die meisten C-Faser Nozizeptoren können sowohl auf chemische, mechanische als auch auf thermische Reize ansprechen und sind damit polymodal. Des Weiteren werden sie durch molekulare Charakterisierung in peptiderge und nicht-peptiderge Subpopulationen untergliedert (Basbaum u. a., 2009). Bei ausreichender Stimulation senden die primär afferenten Neurone den Schmerzreiz in Form von Aktionspotentialen zum Dorsalhorn des Rückenmarks, wo die erste synaptische Verschaltung stattfindet (Abbildung 1 A). Das Dorsalhorn des Rückenmarks kann anatomisch und funktionell in verschiedene Laminae untergliedert werden. A δ -Nozizeptoren werden beispielsweise in den Laminae I und V verschaltet, während C-Faser-Nozizeptoren in die Laminae I und II projizieren. A β -Fasern hingegen, welche normale Berührungsreize weiterleiten, projizieren überwiegend in Lamina V (Abbildung 1 B und Basbaum u. a., 2009).

Einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter der Schmerztransduktion ist Glutamat, welches postsynaptische AMPA-, NMDA- und metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu-Rezeptoren) aktiviert und somit die Depolarisation der postsynaptischen Membran induziert. Darüber hinaus spielen aber auch Neuropeptide wie Substanz P und ‚calcitonin-gene-related peptid‘ (CGRP) eine Rolle, die, wenn sie zusammen mit Glutamat ausgeschüttet werden, die postsynaptische Antwort verstärken (D’Mello und Dickenson, 2008). Vom Dorsalhorn des Rückenmarks wird das Schmerzsignal zu verschiedenen Gehirnregionen weitergeleitet, unter anderem zur Formatio reticularis, dem Thalamus und dem cerebralen Cortex. Darüber hinaus kommt es auch zur Aktivierung inhibitorischer Interneurone, die die Schmerzverarbeitung modulieren (Julius und Basbaum, 2001; Woolf, 2004; Basbaum u. a., 2009; Schmidtke u. a., 2009).

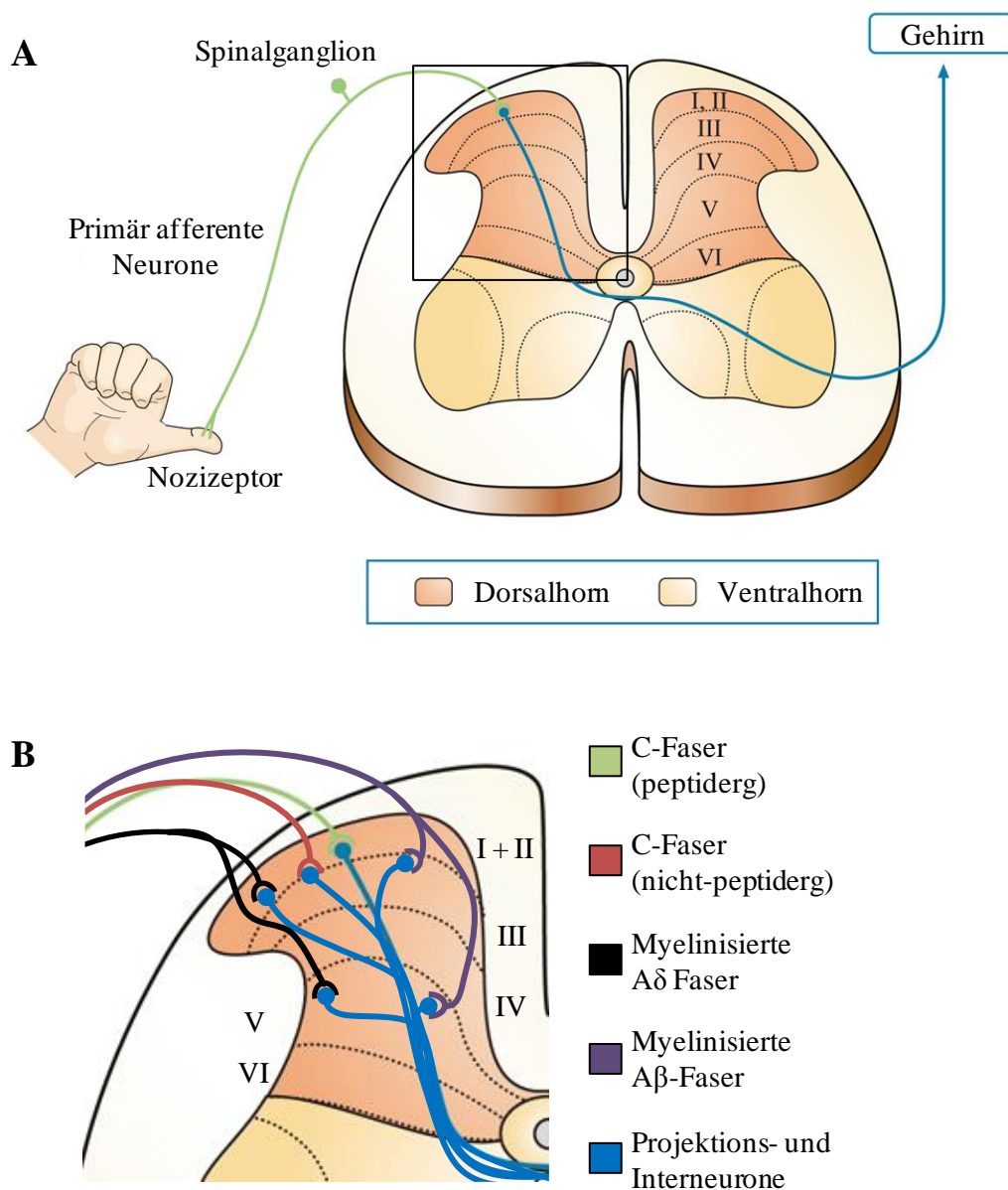


Abbildung 1. Vereinfachte schematische Darstellung des nozizeptiven Systems. A. Schematische Darstellung des nozizeptiven Systems. Primär afferente Neurone der Nozizeptoren projizieren in das Dorsalhorn des Rückenmarks, wo die erste synaptische Verschaltung stattfindet. Von dort wird das Signal über Projektionsneurone in Bereiche des Gehirns weitergeleitet. B. Organisation der Verschaltung der primär afferenten Fasern im Rückenmark. Peptiderge (grün) und nicht-peptiderge (rot) Fasern projizieren in die Laminae I und II des Dorsalhorns. Leicht myelinisierte A δ -Fasern (schwarz) projizieren in Laminae I und V. Stark myelinisierte A β -Fasern (violett) werden in dem innersten Bereich der Lamina II sowie in Lamina V verschaltet. Verändert nach Schmidtke u. a., (2009).

1.1.1 Schmerzarten

Das Gefühl „Schmerz“ wird von der ‚International Association for the Study of Pain‘ (IASP) als „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben

wird“ definiert. Schmerzen können sehr vielseitig sein und in der Intensität, in der Qualität und in der Dauer variieren (Woolf, 2004). Auf der einen Seite dienen Schmerzen als frühes Warnsystem, um den Körper vor potentieller Gewebsschädigung zu schützen. Schmerzen dieser Art treten beispielsweise bei der Berührung einer heißen Oberfläche, wie einer Herdplatte, auf. Sie führen dazu, dass das betroffene Organ von der Herdplatte entfernt und somit vor weiterer Gewebsschädigung geschützt wird. Diese Warnfunktion ist lebensnotwendig, da ihr Verlust zu schwerwiegenden Gewebsschädigungen führen kann und sogar die Lebenserwartung reduziert (Woolf, 2004).

Kommt es jedoch zu chronischen Schmerzen in Form von einem Dauerschmerz oder immer wiederkehrenden Schmerzen, kann es zu pathologischen Veränderungen im schmerzleitenden System kommen. Der Eindruck „Schmerz“ ist nicht länger essentiell an nozizeptive Stimuli gekoppelt. Vielmehr können auch leichte Stimuli, die von Gesunden nicht als schmerzhaft wahrgenommen werden, Schmerzen auslösen. Ferner kann das Gefühl „Schmerz“ durch eine Hyperaktivität des nozizeptiven Systems selbst vermittelt werden. Der Schmerz wird zur Krankheit und muss therapiert werden. Eine europäische Schmerzstudie zeigte, dass 19 % der europäischen Bevölkerung an chronischen Schmerzen leiden, die mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität einhergehen und die Suizidgefahr der betroffenen Patienten erhöhen (Breivik u. a., 2006). Die Behandlung chronischer Schmerzen ist jedoch oft nur unzureichend, da die molekularen Mechanismen, die der Schmerzverarbeitung zugrunde liegen, noch nicht vollständig verstanden sind. Die Aufklärung dieser Mechanismen ist Voraussetzung für die rationale Entwicklung neuer Analgetika, die in der Schmerztherapie eingesetzt werden können.

Pathologische Schmerzen können, je nach primärer Ursache, in zwei Gruppen untergliedert werden: (1) Inflammatorische Schmerzen entstehen durch Verletzungen oder Entzündungen peripherer Gewebe. Es kommt zur Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren. Die Mediatoren bewirken nicht immer eine Aktivierung der Nozizeptoren selbst, vielmehr induzieren sie verschiedene Signalwege, die zu Veränderungen des Nozizeptors und damit des sensorischen Systems führen (Woolf und Costigan, 1999; Basbaum u. a., 2009).

(2) Neuropathische Schmerzen entstehen nach Verletzung des peripheren oder zentralen Nervensystems. Dabei können Neuropathien durch direkte Verletzung der Nerven, metabolische Erkrankungen, Virus-Infektionen, neurotoxische Chemikalien, einen Schlaganfall, Tumorerkrankungen aber auch durch Chemotherapie-Behandlungen entstehen (Costigan u. a., 2009; Gosselin u. a., 2010). Die Therapie neuropathischer Schmerzen ist schwierig. Häufig werden Antidepressiva, Antikonvulsiva, Natrium-Kanalblocker, NMDA-

Rezeptor-Antagonisten oder Opiode eingesetzt (Gosselin u. a., 2010). Ein typisches Merkmal neuropathischer Schmerzen im Tiermodell ist die Aktivierung von Gliazellen im Rückenmark. Sie schütten Cytokine aus, die zur Induktion einer Hypersensitivität beitragen. Des Weiteren kommt es zur ektopischen Aktivität nozizeptiver Neurone; zum einen an der Stelle der Nervenverletzung selbst, zum anderen im Bereich der Spinalganglien und bei intakten primär afferenten Neuronen, die in unmittelbarer Nähe der Nervenverletzung liegen (Costigan u. a., 2009).

Obwohl inflammatorische und neuropathische Schmerzen sehr unterschiedliche Ursachen haben, kommt es in beiden Fällen zu Modifikationen des nozizeptiven Systems. Stimuli, die im Normalfall das Gefühl „Schmerz“ nicht auslösen, werden fortan als schmerzhaft empfunden (Allodynie) und nozizeptive Reize führen zu einem verstärkten und lang anhaltenden Schmerzempfinden (Hyperalgesie) (Costigan u. a., 2009). Die molekularen Mechanismen dieser Veränderungen werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.1.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Bei Dauerstimulation primär afferenter Neurone kann es zur Sensibilisierung des nozizeptiven Systems kommen. Die dadurch bedingten Änderungen modulieren die Antworten auf periphere Stimuli und führen zur Hyperalgesie und Allodynie. Sensibilisierungsvorgänge können sowohl peripher, am Ort der Gewebsschädigung (periphere Sensibilisierung), aber auch im Rückenmark oder Gehirn (zentrale Sensibilisierung) auftreten (Woolf, 2004). Die Sensibilisierung basiert auf funktionalen, chemischen aber auch strukturellen Änderungen des nozizeptiven Systems.

Als periphere Sensibilisierung wird die Veränderung der Eigenschaften peripherer Nerven bezeichnet, die mit einer Reduktion des Schwellenwerts auf einen nozizeptiven Stimulus oder mit einer verstärkten Reizantwort der Nozizeptoren einhergeht. Sie entsteht infolge einer Gewebsschädigung oder Entzündung, durch die es zur Freisetzung verschiedener Entzündungs- und Schmerzfactoren kommt und sich das Milieu, das die Nozizeptoren umgibt, verändert. Es entsteht ein inflammatorisches Umfeld, das verschiedenste Signalmoleküle wie Neurotransmitter, Eicosanoide, Neutrophine, Cytokine, Chemokine, extrazelluläre Proteasen und Protonen enthält (Basbaum u. a., 2009). Eine besonders wichtige Rolle in der peripheren Sensibilisierung kann den ‚transient receptor potential‘ (TRP) Kanälen TRPV1, TRPA1 sowie den ‚voltage-gated sodium‘ (VGS) Kanälen, Nav1.7-, Nav1.8- und Nav1.9-Kanälen zugesprochen werden, die von den Nozizeptoren exprimiert werden. Dauerstimulation der Nozizeptoren induziert verschiedene intrazelluläre Signalwege, die unter anderem eine Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC), der Protein-Kinase A (PKA),

der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), der ‚extracellular-signal regulated‘ Kinase (ERK), p38 und der c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) bewirken. Die Induktion dieser Signalkaskaden führt unter anderem zur Phosphorylierung von TRP-Kanälen oder spannungsabhängigen Natrium-Kanälen, was in einer Reduktion der Aktivierungsschwelle, in Änderungen der Kinetik oder in einer gesteigerten Einlagerung der entsprechenden Kanäle in die Zellmembran resultiert. Es kommt aber auch zu einer erhöhten Synthese von TRP-Kanälen im peripheren Nozizeptor-Terminal und damit zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber peripheren Stimuli (Woolf, 2004; Woolf und Ma, 2007). Darüber hinaus kann es, insbesondere bei Verletzung peripherer Nerven, zur Änderung der molekularen Identität und damit zur Änderung des Phänotyps der betroffenen Nozizeptoren kommen.

Zusätzlich zur Peripherie kommt es auch im zentralen Nervensystem zu Sensibilisierungsvorgängen. Die zentrale Sensibilisierung wird durch verschiedene Prozesse vermittelt, wie der Glutamat/NMDA-Rezeptor-Signaltransduktion, transkriptionsabhängigen Veränderungen, Disinhibition, Glia-Neuron-Interaktionen und struktureller Reorganisation (Basbaum u. a., 2009; Latremoliere und Woolf, 2009). Ein gut verstandener Mechanismus der zentralen Sensibilisierung ist die Glutamat/NMDA-Rezeptor-abhängige Sensibilisierung, die der Langzeit-Potenzierung sehr ähnlich ist. Das Schmerzsignal wird durch die Ausschüttung von Transmittern wie Glutamat, Substanz P, CGRP oder ATP an Projektions- und Interneurone des Dorsalhorns weitergegeben. Postsynaptisch induziert Glutamat exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP), hauptsächlich durch die Bindung an AMPA- und ionotrope Glutamat-Rezeptoren. Der NMDA-Rezeptor ist unter normalen Bedingungen durch ein Mg^{2+} -Ion, das in der Kanalpore sitzt, blockiert. Kommt es jedoch zur verstärkten Transmitterausschüttung aus dem primär afferenten Neuron, ist die resultierende Depolarisation der Postsynapse stark genug, um die Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors aufzuheben und diesen zu aktivieren, was zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einfluss in die Zelle führt (Latremoliere und Woolf, 2009). Durch den Ca^{2+} -Einstrom aktivierte Signalwege führen unter anderem zur Aktivierung von Proteinkinasen, die die Phosphorylierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren bewirken. Dies induziert zum einen deren Freisetzung aus intrazellulären Speichern und erhöht damit ihre Präsentation an der Zelloberfläche, steigert aber zum anderen auch ihre Empfindlichkeit für Glutamat und somit ihre Aktivität. AMPA- und NMDA-Rezeptoren werden somit schon bei geringen peripheren Stimulationen aktiviert, die unter normalen Bedingungen den Schwellenwert der Aktivierung nicht erreichen (Scholz und Woolf, 2002; Latremoliere und Woolf, 2009).

Die Ausschüttung von Glutamat, Substanz P oder BDNF und die Aktivierung ihrer entsprechenden Rezeptoren führt zur Induktion verschiedener Proteinkinasen. Hierzu gehören PKA, PKC und ERK, die die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren steuern und damit Einfluss auf die Expression von Genen wie *c-Fos*, *Cox-2*, *NK-1* oder *TrkB* nehmen (Latremoliere und Woolf, 2009) und so die Schmerzverarbeitung langfristig modulieren können (Abbildung 2 A).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der zentralen Sensibilisierung besteht in der Hemmung inhibitorischer nozizeptiver Signalwege. Die sogenannte Disinhibition führt zu einer verstärkten Antwort des nozizeptiven Systems. GABAerge und glycinerge inhibitorische Interneurone sind in großer Dichte im oberflächlichen Dorsalhorn des Rückenmarks lokalisiert. Die Hemmung dieser Interneurone durch Applikation von Rezeptor-Antagonisten führt zu einer Hypersensitivität gegenüber nozizeptiven Stimuli. Durch Verletzungen in der Peripherie kommt es zu einer Reduktion inhibitorischer postsynaptischer Potentiale in den oberflächlichen Laminae des Rückenmarks (Abbildung 2 C). Unter anderem scheint hier der K^+ - Cl^- -Ko-Transporter KCC2 essentiell beteiligt zu sein. Nach peripherer Nervenverletzung wird dessen Expression herab reguliert, so dass es zu einer Änderung des Cl^- -Gradienten kommt und eine Aktivierung der GABA-A Rezeptoren nicht mehr zu einer Hyperpolarisation führt. Des Weiteren führt die Prostaglandin E₂ (PGE₂) vermittelte Aktivierung des cAMP-PKA Signalwegs zur Phosphorylierung des Glycinrezeptors alpha 3 (GlyR α 3), welcher fortan nicht länger durch Glycin aktiviert werden kann (Woolf, 2004; Zeilhofer, 2005; Basbaum u. a., 2009).

An Sensibilisierungsprozessen nach peripherer Nervenverletzung spielen insbesondere Glia-Neuron-Interaktionen eine wichtige Rolle. Es kommt zur Aktivierung und Akkumulation von Mikroglia in den oberflächlichen Laminae des Dorsalorns sowie im Bereich der Motoneurone im Ventralhorn. Ein charakteristisches Merkmal aktivierter Mikroglia ist die Induktion verschiedener Mitogen-induzierter Protein Kinasen (MAPK), die zur Synthese proinflammatorischer Mediatoren führen (Ji u. a., 2009a; Gosselin u. a., 2010). Aktivierte Mikroglia schütten verschiedene Signalmoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), NO, Prostaglandine, Wachstumsfaktoren, Eicosanoide oder Cytokine aus, die neuronale Funktionen modulieren und zentrale Sensibilisierungsprozesse verstärken (Abbildung 2 B; Watkins u. a., 2001; Basbaum u. a., 2009). Bei der Aktivierung spinaler Mikroglia spielt unter anderem der Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 eine wichtige Rolle, der von Mikroglia exprimiert und nach peripherer Nervenläsion durch neuronales Fraktalkin aktiviert und hochreguliert wird (Verge u. a., 2004; Lindia u. a., 2005), was zur Schmerzsensibilisierung beiträgt

(Milligan u. a., 2004). Des Weiteren wurde auch eine Beteiligung von ATP und den ATP-bindenden P2-Typ purinergen Rezeptoren demonstriert (Tsuda u. a., 2003; Basbaum u. a., 2009). Neben der Mikroglia-Aktivierung kann auch eine Aktivierung von Astrozyten nach Verletzung peripherer Nerven beobachtet werden. Welche Mechanismen hier beteiligt sind, ist jedoch weitestgehend ungeklärt (Basbaum u. a., 2009).

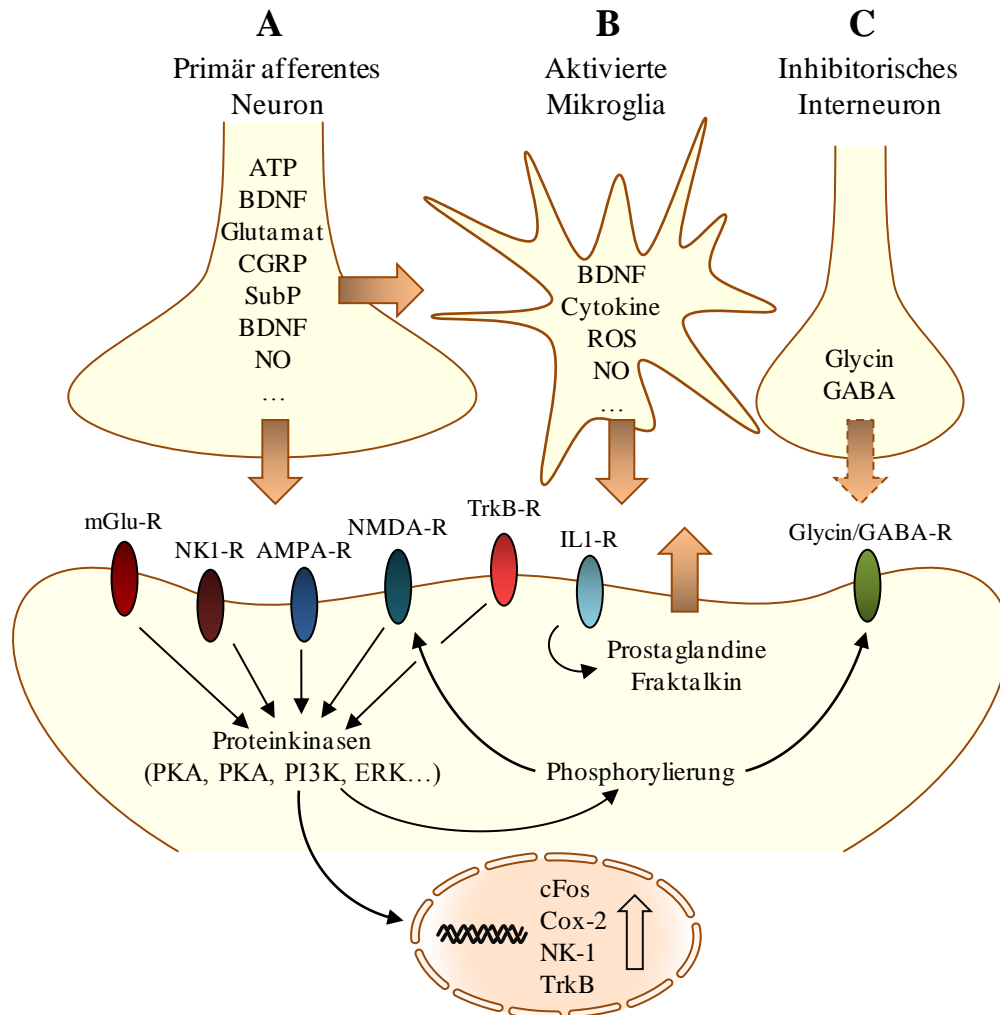


Abbildung 2. Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung im Dorsalhorn des Rückenmarks. A. Sensibilisierung nach Aktivierung primär afferenter Neurone. Nach Stimulation primär afferenter Neurone kommt es zur verstärkten Ausschüttung von Signalmolekülen in der ersten nozizeptiven Synapse. Sie binden an ihre Rezeptoren und führen zur Aktivierung diverser Proteinkinasen, die einerseits die Transkription verschiedener schmerzrelevanter Gene induzieren. Zum anderen kommt es zur Phosphorylierung und damit Veränderung der Sensitivität von Neurotransmitter-Rezeptoren. B. Aktivierung von Gliazellen im nozizeptiven System. Gliazellen werden durch Signalmoleküle primär afferenter Neurone sowie durch Signalmoleküle, die von Projektionsneuronen ausgeschüttet werden, aktiviert. Sie schütten ihrerseits Signalmoleküle aus, die Signalkaskaden aktivieren, welche zur verstärkten nozizeptiven Antwort beitragen. C. Disinhibition. Inhibitorische Interneurone modulieren normalerweise nozizeptive Signalwege, indem sie die nozizeptive Antwort in den Projektionsneuronen abschwächen. Bei der zentralen Sensibilisierung kommt es zu einer Hemmung inhibitorischer Interneurone bzw. deren Rezeptoren. Die negative Modulation nozizeptiver Signale ist reduziert.

Neben den oben beschriebenen Mechanismen wird aber auch die strukturelle Organisation des nozizeptiven Systems verändert. Wie eingangs beschrieben, projizieren die nozizeptiven Fasern in die äußeren Laminae des Dorsalhorns, während die Axone der A β -Fasern, die nicht-schmerzhafte mechanische Stimuli weiterleiten, in tieferen Laminae des Dorsalhorns verschaltet sind. Nach periphererer Nervenverletzung kommt es zu Umstrukturierungen dieser A β -Fasern, die dann auch in oberflächlichen Laminae des Dorsalhorns verschaltet werden und zur nozizeptiven Transmission beitragen (Woolf, 2004).

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und deren Rolle in der Signaltransduktion

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Radikal-Derivate des molekularen Sauerstoffs (O_2), die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen tragen. Hierzu gehören neben dem Superoxid-Radikal (O_2^-) auch das Hydroxyl-Radikal (HO^\bullet), Peroxyl-Radikale (ROO^\bullet) und Alkoxy-Radikale (RO^\bullet). Oft werden jedoch auch die nicht-radikalischen Derivate wie Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2), Hypochlorsäure ($HOCl$) oder Peroxynitrit ($ONOO^-$) dazu gezählt (Hurd und Murphy, 2009).

Die Quellen reaktiver Sauerstoffspezies sind vielseitig. Sie entstehen oft als Nebenprodukte des normalen Metabolismus (Abbildung 3; Afonso u. a., 2007). Eine der wichtigsten Quellen der O_2^- -Produktion ist die mitochondriale Elektronentransportkette (Halliwell, 1992). Elektronen werden hier über eine Reihe von Membranproteinen auf den terminalen Elektronenakzeptor weitergegeben. Es kann jedoch zu Leckstellen in diesem System kommen, wodurch Elektronen die Atmungskette nicht komplett durchlaufen, sondern schon vorher auf molekularen Sauerstoff übertragen werden und somit O_2^- gebildet wird (Hurd und Murphy, 2009). An der mitochondrialen O_2^- -Entstehung sind hauptsächlich die Komplexe I und III der Elektronentransportkette beteiligt. Während bei dem Komplex I das an der Matrix-Seite gebundene Flavin zur O_2^- Entstehung beiträgt, wird O_2^- an dem Komplex III an der Ubichinol-Oxidierungs-Stelle gebildet und in den Intermembranraum abgegeben. Die Menge des produzierten O_2^- hängt von vielen Faktoren ab. So spielen beispielsweise die lokalen Konzentrationen des molekularen Sauerstoffs, die ATP- und Succinat-Konzentration sowie die Protonen-Antriebskraft eine wichtige Rolle (Maher und Schubert, 2000; Dröse und Brandt, 2008; Hurd und Murphy, 2009).

Eine weitere wichtige Enzymfamilie, die an der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist, ist die Familie der NADPH Oxidasen, die im Abschnitt 1.3 noch weiter erläutert wird. NADPH Oxidasen (Nox) wurden zuerst in aktivierten Phagozyten beschrieben, in denen

sie durch die Reduktion von O_2 große Mengen an O_2^- produzieren können, das wiederum der Immunabwehr dient. Neben der ursprünglich beschriebenen NADPH Oxidase 2 (Nox2) sind bis heute viele weitere Isoformen beschrieben (Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1/2), die alle unterschiedliche Expressionsmuster und eine Isoform-spezifische Aktivierung aufweisen (Bedard und Krause, 2007).

Darüber hinaus sind auch noch andere Proteinkomplexe an der O_2^- -Produktion beteiligt. Dazu gehören beispielsweise die Peroxidasen, verschiedene Oxidasen oder Phospholipasen. Wie auch in der Elektronentransportkette der Mitochondrien wird hier O_2^- als Nebenprodukt gebildet (Hurd und Murphy, 2009).

Superoxid gilt als pro-inflammatorisches Produkt, das Zellen sowie die extrazelluläre Matrix schädigt. Durch seine Polarität kann es keine biologischen Membranen passieren und somit nur Einfluss auf Moleküle in der Nähe seines Entstehungsorts ausüben. Darüber hinaus kann O_2^- zu weitaus aggressiveren ROS umgeformt werden. Kommt es beispielsweise zu einer Reaktion mit NO, entsteht Peroxinitrit (Afonso u. a., 2007). Die Stabilität von O_2^- in einer wässrigen Lösung ist kurzlebig. Dies basiert auf der schnellen Umwandlung in H_2O_2 . Bei pH 7,0 liegt die Dismutationsrate bei $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) noch um das 10^4 -fache beschleunigt wird (Thannickal und Fanburg, 2000). Die Produktion von O_2^- resultiert somit oft in einer Erhöhung der H_2O_2 Konzentrationen. Eine weitere Konsequenz hieraus ist, dass O_2^- kaum als Signalmolekül zum Einsatz kommt, sondern eher eine Vorstufe der H_2O_2 -Synthese darstellt (Forman u. a., 2010).

Wasserstoff-Peroxid weist Eigenschaften eines sekundären Messengers auf. Es kann sowohl im Zytoplasma diffundieren als auch Zellmembranen passieren und somit als Messenger zwischen verschiedenen Zellen fungieren (Afonso u. a., 2007). Die Bildung von H_2O_2 basiert zum einen auf der Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 , es wurden aber auch Enzyme beschrieben, die H_2O_2 direkt synthetisieren. Hierzu gehören beispielsweise Monoaminoxidase 1 und 2 (Sandri u. a., 1990). Streng genommen gehört H_2O_2 nicht zu den Radikalen, da es keine ungepaarten Elektronen trägt. Da es jedoch oft das unmittelbare Produkt des Superoxid ist, werden die eigentlichen Redox-Modifikationen in Signalmolekülen häufig durch H_2O_2 getätigt. Der Abbau von H_2O_2 erfolgt entweder über Katalasen oder über Glutathion-Peroxidasen (Halliwell, 1992). In biologischen Systemen kann es aber auch zu einer Ein-Elektron-Reduktion kommen, bei denen H_2O_2 über ein Metall-Ion reduziert wird (Abbildung 3; Forman u. a., 2010). Hierbei kommt es zur Entstehung des Hydroxyl-Radikals (HO^\bullet), das aufgrund seines starken Oxidationspotentials mit allen biologischen Molekülen in Diffusionsnähe reagiert.

Die H_2O_2 -vermittelte Beteiligung an Signaltransduktionswegen basiert überwiegend auf Modifikationen an Aminosäureresten von Proteinen oder Enzymen. Die Redox-Modifikationen entstehen oft an Cystein-Resten, bei denen die Thiolgruppe durch H_2O_2 zum Sulfensäurerest, oder weiter zum Sulfinsäurerest bzw. Sulfonsäurerest oxidiert wird. Hierdurch können Aktivitätszustände von Proteinen verändert und Signalkaskaden aktiviert, inhibiert oder umgeleitet werden.

Eine ausgeglichene Balance zwischen der Entstehung und dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies ist besonders wichtig. Sie können, wenn sie in zu hohen Konzentrationen vorliegen, schwerwiegende Defekte bei Proteinen in Zellen oder Geweben bewirken. Daher haben sich verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um reaktive Sauerstoffspezies abzubauen und die Schädigung von Proteinen und Lipiden zu reduzieren. Man unterscheidet zwischen dem enzymatischen und dem nicht-enzymatischen Abbau. Der nicht-enzymatische Abbau reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt durch Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin C, Vitamin E, Carotenoide, Harnsäure usw. Daneben sind auch viele enzymatische Mechanismen bekannt wie die Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidasen und Katalasen, die zur Reduzierung von ROS beitragen (Abbildung 3; Maher und Schubert, 2000; Apel und Hirt, 2004; Afonso u. a., 2007).

Das Superoxid-Radikal kann beispielsweise durch die Superoxid-Dismutase in H_2O_2 und O_2 neutralisiert werden. Im Menschen sind bisher drei Isoformen der SOD (SOD1 bis 3) bekannt, die zum einen andere Lokalisationen in der Zelle aufweisen, zum anderen auch andere Kofaktoren benötigen. Studien an Knockout-Tieren der verschiedenen SOD-Isoformen haben gezeigt, dass diese Enzyme eine zentrale Rolle in der Regulation von Apoptose und Zellzyklus haben und ihnen vor allem eine schützende Rolle vor neurodegenerativen Erkrankungen zukommt (Afonso u. a., 2007).

Peroxide werden durch Glutathion-Peroxidasen (GPx) oder Katalasen abgebaut. Die Katalase wurde als erstes Enzym entdeckt, das zur Reduktion von H_2O_2 beiträgt. Sie liegt intrazellulär vor und ist meist an Peroxisomen lokalisiert (Paravicini und Touyz, 2008). Die Katalase reduziert Peroxide zu Wasser oder organischen Alkohol und scheint somit der SOD nachgeschaltet zu sein (Maher und Schubert, 2000; Hurd und Murphy, 2009). Anders als die Katalase benötigt GPx Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel, um den Abbau von H_2O_2 oder Lipidperoxiden zu Wasser bzw. Lipidalkoholen zu katalysieren (Maher und Schubert, 2000; Hurd und Murphy, 2009). Bei der GPx-katalysierten Reaktion von Peroxiden zu Wasser oder Lipidalkoholen wird GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert. GSSG kann anschließend

durch die Glutathion-Disulfid-Reduktase (GR) zu GSH reduziert werden. Die für diese Reaktion benötigten Elektronen werden von NADPH gestellt (Hurd und Murphy, 2009).

Eine weitere Gruppe von Enzymen, die zum Abbau hoher ROS-Level in der Zelle beiträgt, sind die Peroxiredoxine, die später noch genauer erläutert werden (siehe 1.4). Sie katalysieren eine ähnliche Reaktion wie GPx, jedoch verwenden Peroxiredoxine meist Thioredoxin (Trx) statt GSH (Hurd und Murphy, 2009). Oxidiertes Trx wird, ähnlich wie GSSG, durch die Thioredoxin-Reduktase (TR) reduziert und steht so wieder für den Peroxiredoxin-katalysierten Abbau von H_2O_2 zur Verfügung.

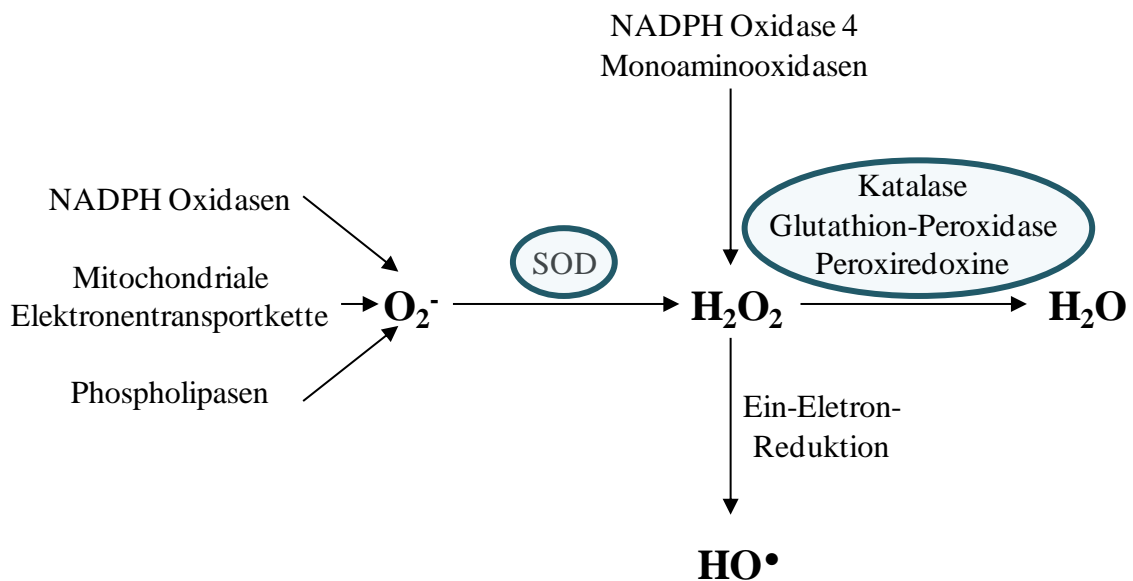


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Produktion und des Abbaus reaktiver Sauerstoffspezies. Superoxid wird durch Enzymkomplexe wie NADPH Oxidasen, der mitochondrialen Elektronentransportkette, Phospholipasen usw. gebildet und durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoff-Peroxid abgebaut. Weitere ROS-generierende Enzyme wie NADPH Oxidase 4 oder Monoaminoxidasen können auch direkt H_2O_2 produzieren. Wasserstoff-Peroxid wird durch Katalasen, Glutathion-Peroxidasen oder Peroxiredoxine zu Wasser reduziert. Kommt es jedoch zu einer Ein-Elektronen-Reduktion, entsteht das Hydroxyl-Radikal.

1.2.1 Die Funktion reaktiver Sauerstoffspezies als Signalmoleküle

Die Funktionen reaktiver Sauerstoffspezies können sehr vielseitig sein. Sie regulieren einerseits wichtige zelluläre Mechanismen wie Proliferation oder Apoptose, andererseits können sie, wenn sie in zu hohen Konzentrationen vorliegen, zu schwerwiegenden Schädigungen von DNA, Lipiden und Matrix-Komponenten führen (Afonso u. a., 2007). Obwohl schon sehr früh erkannt wurde, dass die exogene Gabe von H_2O_2 ähnliche Effekte wie Wachstumsfaktoren auslösen kann, haben reaktive Sauerstoffspezies als Signalmoleküle erst nach der Entdeckung der NADPH Oxidasen das Interesse der Forschung geweckt. Wie bereits oben erläutert, ist die Halbwertszeit von O_2^- relativ kurz, so dass es wahrscheinlich

scheint, dass sich seine Funktion als Signalmolekül eher als Vorläufermolekül von H_2O_2 darstellt (Forman u. a., 2010). Die direkte Beteiligung der ROS in zellulären Signalwegen basiert auf der Modifizierung von Proteinen an wichtigen Aminosäureresten, welche über die Oxidation von freien SH-Gruppen zu Sulfensäure-, Sulfinsäure- oder Sulfonsäureresten bis hin zu Dimerisierung zweier Cystein-Reste oder S-Glutathionylierungen führt (Thannickal und Fanburg, 2000). Dies kann beispielsweise zur Änderung des Aktivitätszustandes des Proteins führen, wodurch nachstehende Interaktionen und die damit zusammenhängende Signalkaskade verändert werden. Darüber hinaus greifen ROS auch indirekt in Signalwege ein, indem sie Einfluss auf die Aktivität redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren nehmen und somit Genexpression modulieren können.

Wie bereits oben beschrieben, ist die Aktivität einiger Proteine abhängig von ihrem Redox-Zustand (Abbildung 4). Eine Enzymgruppe, an der die Redox-Regulation gut untersucht ist, sind die Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP). Der überwiegende Anteil der PTPs trägt einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum, welches unter physiologischen Bedingungen als Thiol vorliegt und daher anfällig für Oxidationen ist (Hertog, 2009). Oxidation des katalytischen Cystein-Rests führt zur Inaktivierung des Enzyms. Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) beispielsweise kann im katalytischen Zentrum reversibel oxidiert und damit inaktiviert werden. Neben Phosphatasen werden auch viele Kinasen durch Redox-Modifikationen reguliert. An der Insulin-Rezeptor Kinase befinden sich beispielsweise mehrere Cystein-Reste, die zu Sulfensäure-Resten oxidiert werden. Oxidierung begünstigt die Autophosphorylierung des Proteins und damit dessen Aktivierung (Thannickal und Fanburg, 2000). Ein weiteres wichtiges Enzym, dessen Aktivität durch Redox-Modifikationen reguliert werden kann, ist die zyklisches-Guanosin-3', 5'-monophosphat (cGMP) abhängige Proteinkinase (PKG) I α . Erhöhte Konzentrationen an H_2O_2 führen zur Bildung einer Disulfidbrücke zwischen benachbarten Ketten des Homodimers, wodurch dieses, unabhängig von cGMP, aktiviert wird (Burgoyne u. a., 2007).

Des Weiteren kann auch die Aktivität von Ionenkanälen durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert werden. Eine direkte Regulation durch ROS wurde für den Ca^{2+} -durchlässigen, rezeptorgesteuerten Ionenkanal TRPC5 demonstriert. Hier spielt die S-Nitrosylierung von Cystein-Resten eine wichtige Rolle, die eine Aktivierung des Kanals bewirkt (Yamamoto u. a., 2010). Darüber hinaus kann der TRPA1-Kanal, der in C-Faser-Nozizeptoren exprimiert ist und eine wichtige Rolle in der Schmerzsignaltransduktion spielt (Bautista u. a., 2006; Kwan u. a., 2006), durch NO oder H_2O_2 aktiviert werden (Takahashi u. a., 2008).

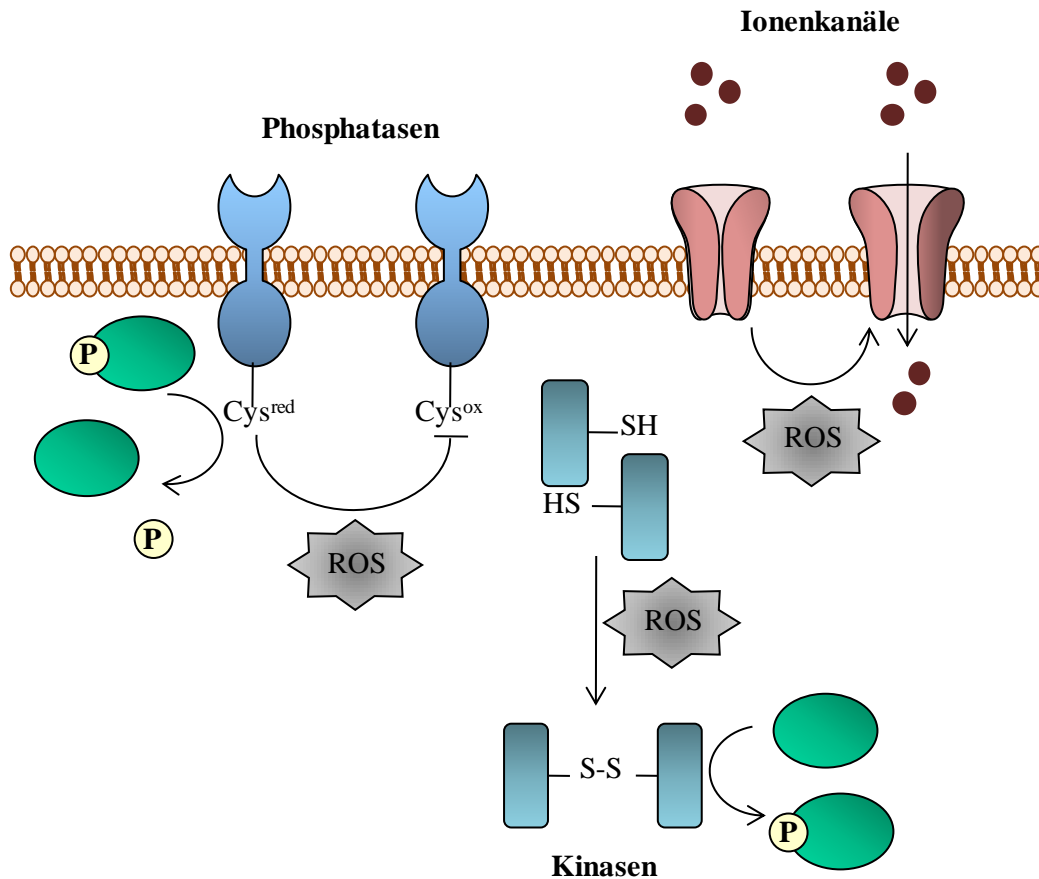


Abbildung 4. ROS-vermittelte Aktivierung und Inaktivierung von Signalmolekülen. ROS oxidieren Cysteinreste in Phosphatasen und führen somit zu deren Inaktivierung. Des Weiteren können Sie zur Aktivierung von Kinasen beitragen, indem Sie beispielsweise die Dimerisierung über Cysteinreste begünstigen. Ferner können ROS zur Aktivierung von Ionenkanälen führen und so den Einstrom von Ionen in die Zelle bewirken.

Eine weitere wichtige Gruppe ROS-abhängiger Moleküle sind bestimmte Transkriptionsfaktoren, die entweder durch ROS direkt oder über Zwischenmoleküle in der Signalkaskade aktiviert werden (Abbildung 5). In Bakterien ist beispielsweise der Transkriptionsfaktor OxyR beschrieben, der die Transkription von Genen stimuliert, die zur Resistenz gegen Oxidantien beitragen. Die Aktivierung dieses Faktors basiert auf der H₂O₂-vermittelten Oxidation eines Cystein-Rests zu einem Sulfensäurerest, der dann mit einem weiteren Cystein eine Disulfidbrücke bildet. Diese Oxidationsvorgänge innerhalb des Moleküls ziehen eine Konformationsänderung mit sich, durch die eine Interaktion mit der DNA möglich wird und die Transkription bestimmter Gene angeregt werden kann (Forman u. a., 2010).

Auch eine indirekte ROS-Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist möglich, wie beispielsweise bei ‚NF-E2-related factor 2‘ (Nrf2). Im Zytoplasma ist Nrf2 an das Kelch Domain Protein Keap1 gebunden, welches den eigentlichen Redox-Sensor darstellt. In dem normalen reduzierenden Milieu der Zelle ist die Nrf2:Keap1 Bindung stabil und wird durch

die Cullen-Familie Ubiquitin E3 Ligase vermittelte Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut (Chen u. a., 2009). Kommt es zur Oxidation von Cystein-Resten des Keap1 Proteins kann Nrf2 nicht länger an Keap1 gebunden werden, Nrf2 wird in den Zellkern transportiert und steuert dort die Expression vieler Gene, die das ‚antioxidant response element‘ (ARE) tragen (Abbildung 5 A).

In eukaryotischen Zellen wurde NF- κ B als erster redox-regulierter Transkriptionsfaktor beschrieben. NF- κ B Transkriptionsfaktoren sind eine Gruppe von Proteinen (RelA, RelB, cRel, NF- κ B1, NF- κ B2), die aus zwei Untereinheiten p50 und p65 bestehen und als Homo- oder Heterodimere in den Zellen vorliegen. Im nicht aktivierten Zustand liegen NF- κ B Proteine im Zytoplasma vor, wo sie an I κ B-Proteine gebunden sind. Nach Aktivierung der Zellen kommt es zur Degradation der I κ B-Proteine und NF- κ B kann in den Nukleus wandern und dort die Transkription steuern. Die Redox-Regulation der NF- κ B Transkriptionsfaktoren kann in den verschiedenen Zwischenschritten der NF- κ B-Aktivierung erfolgen. Der Redox-Zustand von p50 ist beispielsweise entscheidend für eine richtige Bindung des Proteins an die DNA (Abbildung 5 B; Giles, 2009; Gloire und Piette, 2009). Auch die NO vermittelte S-Nitrosylierung führt zur Inhibition der DNA-Bindung und stellt einen negativen Regulationsmechanismus dar. Des Weiteren scheint auch die Degradation von I κ B redox-reguliert zu sein (Gloire und Piette, 2009).

Der Transkriptionsfaktor ‚Aktivator Protein 1‘ (AP1) besteht aus zwei Untereinheiten cFos und Jun, deren Hochregulation bei zellulärem Stress beobachtet wird. Ähnlich wie NF- κ B ist auch der Redox-Zustand von AP1 entscheidend für seine Aktivität (Giles, 2009). Es wurde beobachtet, dass Reduktionsmittel die Aktivierung von AP1 begünstigen, während die Oxidierung von AP1 die Bindung an die DNA inhibiert (Abbildung 5 C; Giles, 2009).

Insgesamt lässt sich somit feststellen, dass die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an Signalwegen sehr vielseitig sein kann. Es ist daher verständlich, dass der Ort der Synthese von reaktiver Sauerstoffspezies und die Lokalisation ihrer Reaktionspartner von zentraler Bedeutung sind, um die ROS-vermittelte Signaltransduktion zu verstehen.

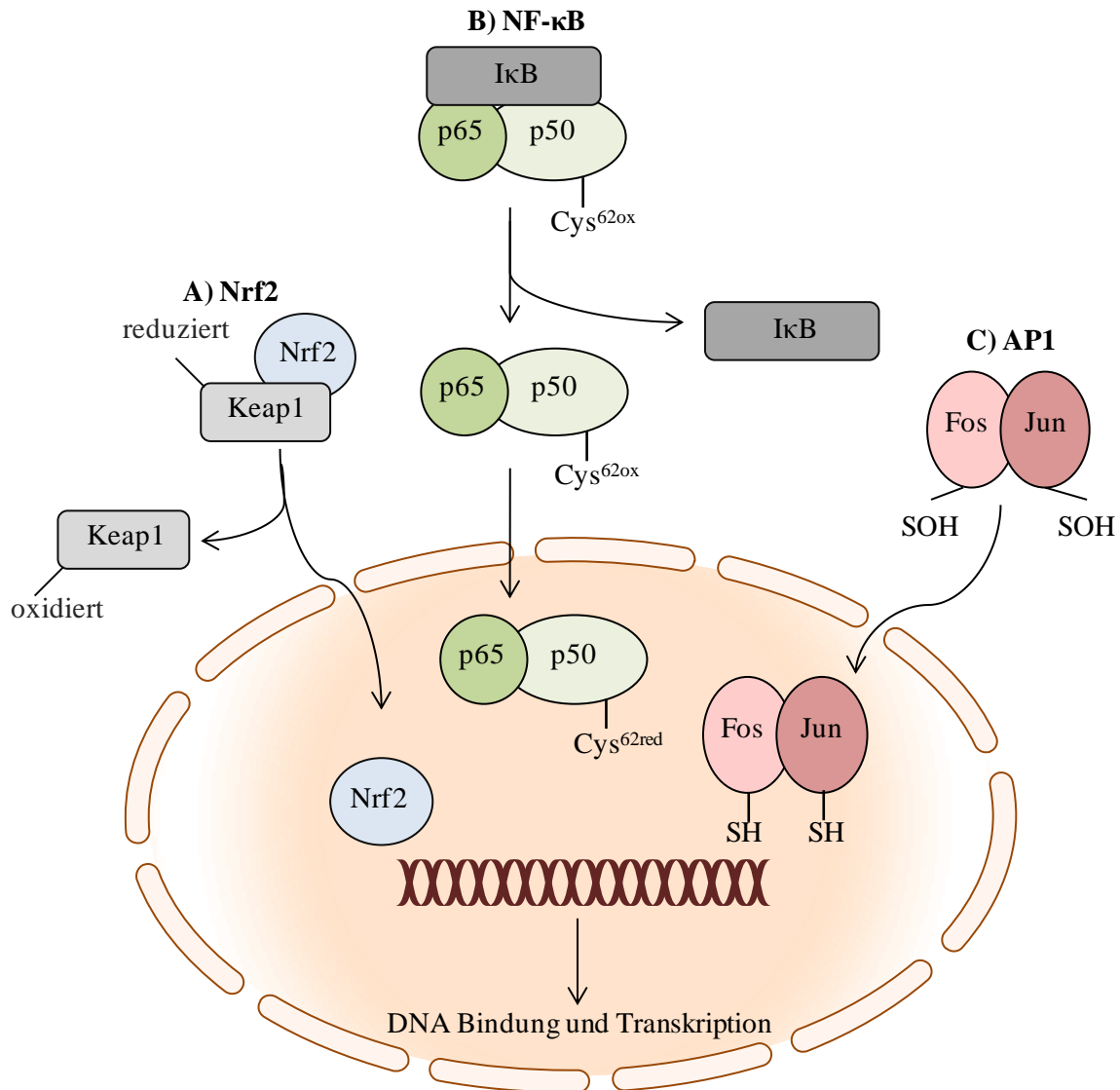


Abbildung 5. ROS-vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. A. Redox-Regulation von Nrf2. Nrf2 ist im nicht-aktiven Zustand an Keap1 gebunden. Kommt es zur Oxidation von Keap1 wird Nrf2 freigesetzt und kann in den Zellkern einwandern. Dort steuert es die Expression verschiedener Gene. B. Redox-Regulation von NF-κB. Der Aminosäurerest Cys62 muss reduziert sein, damit der Transkriptionsfaktor an die entsprechenden DNA-Sequenzen binden kann. C. Redox-Regulation von AP1. Durch die Reduktion der Untereinheiten cFos und Jun wird der Transkriptionsfaktor AP1 aktiviert.

1.2.2 Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Schmerzverarbeitung

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies auch bei der Schmerzverarbeitung eine Rolle spielen (Little u. a., 2010; Salvemini u. a., 2011). Ein Großteil der beschriebenen Studien basiert auf Applikation von Radikalfängern an Versuchstieren, wodurch inflammatorisches als auch neuropathisches Schmerzverhalten reduziert werden kann. So führte beispielsweise die systemische und intrathekale Applikation von 4-Hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl (TEMPOL), M40403, Phenyl-N-tert-

butyl Nitron (PBN) oder N-Acetyl-Cystein (NAC) zur Reduktion des nozizeptiven Verhaltens in verschiedenen Tests für inflammatorische Schmerzen, wie dem Formalin-Test (Hacimuftuoglu u. a., 2006), der Capsaicin-induzierten Hyperalgesie (Lee u. a., 2007; Schwartz u. a., 2008) oder der Carrageenan-induzierten Hyperalgesie (Wang u. a., 2004). Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Schmerzverarbeitung ist jedoch nicht auf das Rückenmark und die Spinalganglien beschränkt. Reaktive Sauerstoffspezies sind offenbar auch an dem Entzündungsgeschehen in der Peripherie und der damit verbundenen peripheren Sensibilisierung beteiligt (Wang u. a., 2004; Khattab, 2006). So waren z.B. nach intravenöser Applikation von SOD-Mimetika, wie M40403, Parameter der Carrageenan-induzierten peripheren Entzündungsreaktion reduziert (Wang u. a., 2004).

Auch in Studien zu neuropathischen Schmerzen wurden bereits verschiedene Radikalfänger im Tiermodell eingesetzt und deren Wirkung auf das nozizeptive Verhalten untersucht. PBN reduzierte beispielsweise das Schmerzverhalten in dem ‚Spinal nerve ligation‘ (SNL) Modell für neuropathische Schmerzen (Kim u. a., 2004). Des Weiteren können analgetische Effekte auch Vitamin E sowie einer Kombination aus Vitamin C und E zugesprochen werden (Kim u. a., 2006; Lu u. a., 2011).

Neben O_2^- ist auch eine Beteiligung von H_2O_2 in der Schmerzweiterleitung beschrieben. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass O_2^- , wie oben erläutert, sehr schnell zu H_2O_2 dismutiert wird und somit ein Vorläufermolekül der H_2O_2 -Synthese darstellen könnte. Im Carrageenan-Modell für entzündliche Schmerzen sind H_2O_2 -Level in der Pfote erhöht. Darüber hinaus kann eine intraplantare Injektion von H_2O_2 sowohl thermische als auch mechanische Hyperalgesie in der behandelten Hinterpfote induzieren (Keeble u. a., 2009).

Neben den genauen Wirkweisen von reaktiven Sauerstoffspezies ist über deren Quellen im nozizeptiven System bisher wenig bekannt. In der Tat gibt es Hinweise, die auf eine mitochondriale Beteiligung der ROS-vermittelten Schmerzsignaltransduktion deuten (Kim u. a., 2008; Schwartz u. a., 2009). Ferner wurde jedoch auch eine Beteiligung der NADPH Oxidasen 1 und 2 demonstriert: Während für Nox1 gezeigt wurde, dass es eine Rolle in der Verarbeitung entzündlicher Schmerzen spielt (Ibi u. a., 2008), wurde Nox2 eine Funktion in der Vermittlung neuropathischer Schmerzen zugesprochen (Kim u. a., 2010a).

1.3 Eigenschaften, Expression und Funktion der NADPH Oxidasen

Die Nox Familie der NADPH Oxidasen bildet eine Enzymfamilie, bei der die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies offenbar die Hauptaufgabe darstellt. Obwohl eine Beteiligung von ROS bei der Immunantwort schon Mitte des 20. Jahrhunderts demonstriert wurde, konnte erst in den 1970ern das Enzym beschrieben werden, das hierbei eine Rolle spielt: gp91^{phox}, nach der heutigen Nomenklatur auch bekannt als Nox2 (Segal und Jones, 1978; Segal u. a., 1978; Bedard und Krause, 2007). Kurze Zeit später wurde das erste Nox2-homologe Enzym beschrieben: Mox1 (Suh u. a., 1999), das nach der neuen Terminologie als Nox1 bezeichnet wird. Es folgten weitere Beschreibungen von Proteinen, die eine Nox2-Homologie aufweisen, wie Nox3 (Kikuchi u. a., 2000), Nox4 (Geiszt u. a., 2000; Shiose u. a., 2001), Nox5 (Bánfi u. a., 2001), Duox1 und Duox2 (Dupuy u. a., 1999; De Deken u. a., 2000). Nox-Enzyme sind Transmembranproteine, die Elektronen von NADPH über die Membran auf molekularen Sauerstoff übertragen. Alle Nox-Proteine weisen bestimmte strukturelle Gemeinsamkeiten auf (Abbildung 6). Sie tragen, mit Ausnahme der Duox-Enzyme, sechs transmembrane Helices. Die Bindestelle für NADPH befindet sich am C-terminalen Ende und die Region zur Bindung von FAD ist in nächster Nähe zu der C-terminalen Transmembrandomäne lokalisiert. Des Weiteren weisen alle Proteine konservierte Histidin-Reste auf, die für die Bindung des Häms verantwortlich sind (Bedard und Krause, 2007). Obwohl die Nox-Enzyme strukturell ähnlich aufgebaut sind, zeigen sie sehr unterschiedliche Expressionsmuster in den Geweben und werden durch verschiedene Mechanismen aktiviert.

Nox2, der Prototyp der Nox Familie der NADPH Oxidasen, wurde ursprünglich in Phagozyten beschrieben (Segal und Jones, 1978; Segal u. a., 1978; Royer-Pokora u. a., 1986; Teahan u. a., 1987). Darüber hinaus konnte eine Nox2-Expression auch in vielen anderen Zelltypen nachgewiesen werden, wie in B-Lymphozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Skelettmuskelzellen, glatten Muskelzellen, Kariomyozyten, Hepatozyten und im Endothelium (Bedard und Krause, 2007). Interessanterweise wurde eine Nox2-Expression auch in verschiedenen Bereichen des Nervensystems beschrieben. So wurde gezeigt, dass Nox2 in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert ist, es konnte aber auch im Rückenmark und in Spinalganglien detektiert werden (Sorce und Krause, 2009). Die Aktivität von Nox2 ist von verschiedenen Untereinheiten abhängig: p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und Rac. Während es sich bei p22^{phox} um ein membranständiges Protein handelt, das vor allem zur Stabilisierung und für die Bindung der anderen Untereinheiten wichtig ist (Bedard und Krause, 2007), liegen die anderen regulatorischen Untereinheiten im nicht aktivierten Zustand zytosolisch vor. Die Aktivierung von Nox2 erfolgt über p47^{phox}. Wird diese Untereinheit

phosphoryliert, ermöglicht die hieraus resultierende Konformationsänderung die Interaktion mit dem p22^{phox}-Nox2-Komplex (Groemping u. a., 2003). Die anderen zytosolischen Untereinheiten können rekrutiert werden und den funktionellen Nox2-Komplex bilden (Diebold und Bokoch, 2001; Han u. a., 1998). Nox2 spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Mutationen in dem *Nox2*-Gen führen zur chronischen granulomatösen Erkrankung (CGD) (Berendes u. a., 1957; Schäppi u. a., 2008).

Nox1 wurde als erstes Nox2-homologes Protein beschrieben. Auf Proteinebene zeigen Nox1 und Nox2 eine 60 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (Suh u. a., 1999; Bánfi u. a., 2001). Eine sehr hohe Nox1-Expression ist für den Dickdarm beschrieben, darüber hinaus kann Nox1 aber auch in glatten Muskelzellen, in Endothelzellen, im Uterus, in der Placenta, in der Prostata, in Osteoclasten und in Perizyten detektiert werden (Bedard und Krause, 2007). Ähnlich wie bei Nox2 bedarf die Aktivierung von Nox1 mehrerer Untereinheiten. Auch hier ist die membranständige Untereinheit p22^{phox} essentiell (Ambasta u. a., 2004; Kawahara u. a., 2005). Des Weiteren sind andere zytosolische Untereinheiten an der Aktivierung von Nox1 beteiligt: NOX Organizer 1 (NOXO1), welches das Homolog zu p47^{phox} darstellt, und NOX Aktivator 1 (NOXA1), welches homolog zu p67^{phox} ist (Bánfi u. a., 2003; Geiszt u. a., 2003). Im Tiermodell wurde gezeigt, dass Nox1 bei der Angiotensin-vermittelten Erhöhung des Blutdrucks beteiligt ist (Matsuno u. a., 2005; Gavazzi u. a., 2006). Nox3 zeigt eine sehr hohe Expression im Innenohr, wo es vor allem in der Cochlea, im Vestibulum und dem Spiral-Ganglion exprimiert wird (Bánfi u. a., 2004); es wurde aber auch in der fötalen Milz, in fötalen Nieren, im Schädelknochen und Gehirn detektiert (Bedard und Krause, 2007). Defekte im Gen, das für Nox3 kodiert, führen zu Störungen des Gleichgewichtssinnes (Paffenholz u. a., 2004). Die Regulation der Nox3-Aktivität durch die zytosolischen Untereinheiten ist umstritten. Nur die Beteiligung von p22^{phox} und NOXO1 scheint ausreichend belegt zu sein (Kiss u. a., 2006; Ueno u. a., 2005; Bedard und Krause, 2007).

Die NADPH Oxidase Nox4 wurde ursprünglich in der Niere entdeckt und als Renox beschrieben (Geiszt u. a., 2000; Shiose u. a., 2001). Anders als die bisher beschriebenen Nox-Proteine weist Nox4 nur eine 39 %ige Homologie zu Nox2 auf. Neben der Niere kann Nox4 auch in Osteoclasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, hämatopoetischen Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Myelomzellen und Neuronen gefunden werden (Bedard und Krause, 2007). Die Nox4-Aktivität scheint nur von der membranständigen Untereinheit p22^{phox} abhängig zu sein, während die zytosolischen Untereinheiten keinen Einfluss auf die Aktivität von Nox4 nehmen (Kawahara u. a., 2005; Martyn u. a., 2006). Ferner wird

diskutiert, ob Nox4 als konstitutiv aktives Enzym zu betrachten ist (Nisimoto u. a., 2010), wobei eine Regulation der Nox4-Aktivität auch durch andere Proteine plausibel scheint (Diaz u. a., 2009; Lyle u. a., 2009). Eine weitere Besonderheit des Nox4-Enzyms besteht darin, dass primär H_2O_2 anstelle O_2^- detektiert wird (Martyn u. a., 2006; Takac u. a., 2011). Die Funktionen von Nox4 werden nur ansatzweise verstanden. Studien in Endothelzellen deuten darauf hin, dass Nox4 an Alterungsprozessen der Zelle und dem Zelltod beteiligt sein könnte, jedoch wurde dem Enzym auch eine Funktion in der Zellmigration zugesprochen (Montezano u. a., 2011). In vaskulären glatten Muskelzellen wurde Nox4 mit Differenzierungsprozessen der Zellen in Verbindung gebracht, auf der anderen Seite jedoch auch mit einer TGF- β -induzierten Hyperplasie der Zellen (Montezano u. a., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine Ischämie die kortikale Expression von Nox4 induziert (Vallet u. a., 2005). Ferner wurde demonstriert, dass sich sowohl der Knockout von Nox4 als auch die pharmakologische Hemmung mit einem NADPH-Oxidase-Inhibitor günstig auf oxidativen Stress, Störungen der Blut-Hirn Schranke und neuronale Apoptose auswirken (Kleinschnitz u. a., 2010).

Nox5 wurde erstmalig 2001 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Bánfi u. a., 2001; Cheng u. a., 2001) und kann in den Hoden, in der Milz, in Lymphknoten, in vaskulären Muskelzellen, im Knochenmark, im Pankreas, in der Placenta, im den Eierstöcken, im Uterus und in vielen fötalen Geweben detektiert werden (Bedard und Krause, 2007). Im Gegensatz zu den anderen Nox-Isoformen scheint Nox5 unabhängig von $\text{p}22^{\text{phox}}$ und den bisher identifizierten zytosolischen Untereinheiten zu fungieren, jedoch abhängig von Ca^{2+} zu sein (Bánfi u. a., 2004b). Da Nagetiere keine kodierende Sequenz für das *Nox5*-Gen tragen (Kawahara u. a., 2007), erweisen sich Studien zu der physiologischen Bedeutung des Proteins als schwierig, da die häufig verwendeten Mausmodelle nicht verwendet werden können. Jedoch konnte Nox5 mit der koronaren Arterienerkrankung in Zusammenhang gebracht werden. Koronararterien von Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung litten, zeigten eine deutlich erhöhte Nox5-Expression im Vergleich zu Proben von Patienten, die nicht von dieser Erkrankung betroffen waren (Guzik u. a., 2008).

Die beiden Duox-Proteine (Duox1 und Duox2) wurden zuerst als Thyroid-Oxidasen beschrieben (De Deken u. a., 2000; Dupuy u. a., 1999). Wie ihr ursprünglicher Name sagt, werden sie überwiegend in der Schilddrüse exprimiert, sind aber auch in anderen Geweben zu finden. Duox1 wird beispielsweise auch im Lungenepithel, im Epithel der Zunge, im Cerebellum und in den Hoden exprimiert; Duox2 ist in Speicheldrüsen, im gastrointestinalem Epithel, im Lungenepithel, im Uterus, in der Galle, in der Blase und in den Langerhans-Inseln des Pankreas zu finden (Bedard und Krause, 2007). Die Proteine zeigen eine 50 %ige

Homologie zu Nox2 und weisen außerdem strukturelle Besonderheiten auf: Sie besitzen eine EF-Hand-Region und eine siebte Transmembrandomäne am N-Terminus (De Deken u. a., 2000). Wie Nox5 werden die Duox-Proteine direkt durch Ca^{2+} aktiviert, während auch hier die zytosolischen Untereinheiten nicht von Bedeutung zu sein scheinen (De Deken u. a., 2002; Ameziane-El-Hassani u. a., 2005). Stattdessen wurden sogenannte Reifungsfaktoren für Duox1/2 beschrieben: DUOXA1 und DUOXA2, die zum einen den Austritt aus dem endoplasmatischen Retikulum ermöglichen und zum anderen den ROS-Typ spezifizieren (Grasberger und Refetoff, 2006; Morand u. a., 2009).

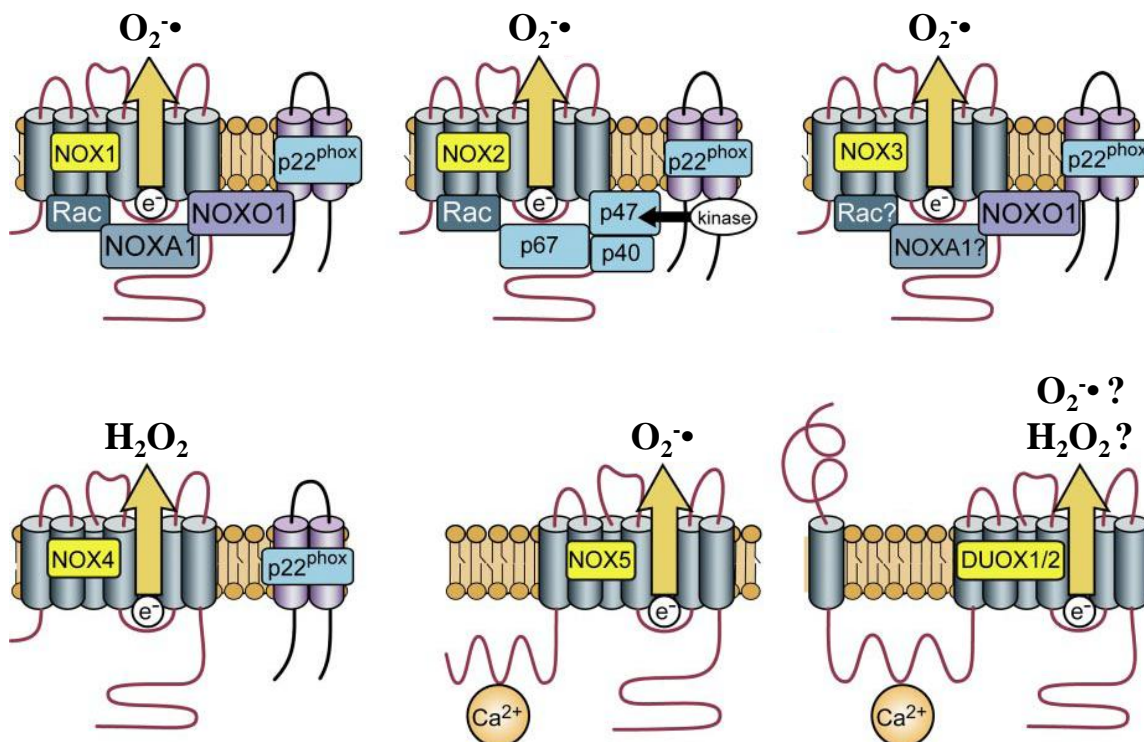


Abbildung 6. Strukturelle Übersicht der Nox Familie der NADPH Oxidasen mit den entsprechenden Untereinheiten. Verändert nach Bedard und Krause, 2007.

Nox-Enzyme sind somit ubiquitär exprimiert und steuern verschiedenste physiologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose oder die Immunabwehr. Misregulation von Nox-Proteinen oder Mutationen in den kodierenden Gensequenzen können zu schwerwiegenden pathologischen Erscheinungen wie der granulomatösen Erkrankung, Morbus Alzheimer, Bluthochdruck, Rheumatoider Arthritis oder Diabetes Mellitus führen (Brown und Griendling, 2009). Daher ist es durchaus denkbar, dass Nox-Proteine auch an der Schmerzverarbeitung beteiligt sind.

1.4 Das Peroxiredoxin-Sestrin/Sulfiredoxin-System

1.4.1 Eigenschaften und Funktion der Peroxiredoxine

Die Peroxiredoxine bilden eines der wichtigsten Systeme zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies. Das erste Peroxiredoxin-Protein, das im Zusammenhang mit seinen antioxidativen Eigenschaften beschrieben wurde, wurde Ende des 20. Jahrhunderts bei *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt: ein 25 kDa großes Thiol-spezifisches antioxidatives Protein (TSA) (Kim u. a., 1988; Rhee u. a., 2005). Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wurden viele weitere Proteine beschrieben, die der TSA-Proteinfamilie zugeordnet werden konnten. Ferner konnte gezeigt werden, dass alle Mitglieder dieser Familie einen konservierten Cysteinrest tragen und dass bei vielen Mitgliedern der TSA-Proteinfamilie auch ein zweiter konservierter Cysteinrest zu finden ist (Chae u. a., 1994). Ursprünglich als TSA-Proteine beschrieben, werden diese Enzyme heute als Peroxiredoxine (Prdx) bezeichnet, benannt nach dem eigentlichem Substrat, den Peroxiden, und in Anlehnung an die Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme (Rhee u. a., 2005). In Säugetierzellen sind bis heute sechs Peroxiredoxine beschrieben (Prdx I bis VI), die in drei Gruppen unterteilt werden können: Die 2-Cystein Prdx-Enzyme tragen sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende konservierte Cystein-Reste, die für ihre katalytische Funktion benötigt werden. Hierzu gehören die Peroxiredoxine I bis IV (Rhee u. a., 2001; Rhee u. a., 2005). Als atypische 2-Cys Peroxiredoxine werden die Proteine bezeichnet, die den N-terminalen konservierten Cystein-Rest tragen, jedoch noch einen weiteren nicht-konservierten Cystein-Rest für ihre katalytische Aktivität benötigen. Dieser Gruppe kann Prdx V zugeordnet werden (Knoops u. a., 2010). Die dritte Gruppe der Peroxiredoxine trägt nur den N-terminalen konservierten Cystein-Rest, der für die katalytische Aktivität ausreichend ist. Sie werden als 1-Cystein-Peroxiredoxine bezeichnet, zu denen Prdx VI gezählt werden kann (Rhee u. a., 2005).

Wie auch die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase tragen Peroxiredoxine zum Abbau von H_2O_2 in der Zelle bei. Prdx I und II machen beispielsweise einen hohen Anteil der Gesamtproteine im Zytosol aus und zeigen auch eine hohe Affinität für H_2O_2 im Vergleich zu anderen H_2O_2 -abbauenden Enzymen (Chae u. a., 1999; Rhee u. a., 2005). Demnach ist die Beteiligung von Peroxiredoxinen an H_2O_2 -vermittelten Signalwegen denkbar, da sie lokale H_2O_2 -Konzentrationen in der Zelle steuern können. Die Aktivität von Peroxiredoxinen kann wiederum durch Phosphorylierung an bestimmten Aminosäureresten reguliert werden, was zur Hemmung der katalytischen Aktivität führt und somit H_2O_2 -Level erhöhen kann (Chang u. a., 2002). Peroxiredoxine werden durch H_2O_2 an ihrem N-terminalen Cystein-Rest oxidiert.

2-Cys Peroxiredoxine bilden dann mit dem oxidierten konservierten C-terminalen Cystein-Rest des zweiten Peroxiredoxins der Dimerstruktur eine intermolekulare Disulfidbrücke, die durch Trx wieder reduziert werden kann (Abbildung 7). In atypischen 2-Cys Peroxiredoxinen hingegen wird eine intramolekulare Disulfidbrücke ausgebildet, die ebenfalls durch Trx reduziert wird. Bei 1-Cystein Peroxiredoxinen wird der konservierte Cysteinrest zur Sulfensäure oxidiert und dann wieder reduziert. Eine Disulfidbrücke wird hier, im Gegensatz zu den anderen Prdx, nicht ausgebildet (Abbildung 7; Rhee u. a., 2001). Welche Moleküle bei der Reduktion und damit dem Recyclen der 1-Cystein Peroxiredoxine beteiligt sind, ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch gibt es Hinweise, dass hierbei Vitamin C beteiligt sein könnte (Monteiro u. a., 2007). Kommt es lokal zu sehr hohen Konzentrationen an Peroxiden in der Zelle, kann eine Hyperoxidation der Peroxiredoxine beobachtet werden. Der oxidierte Sulfensäure-Rest wird dann weiter zur Sulfinsäure oxidiert und kann nicht wieder durch Thioredoxin (Trx) reduziert werden (Rhee u. a., 2005). Die Reduktion und damit Aktivierung der überoxidierten Peroxiredoxine erfolgt über Sulfiredoxine und Sestrine, die im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

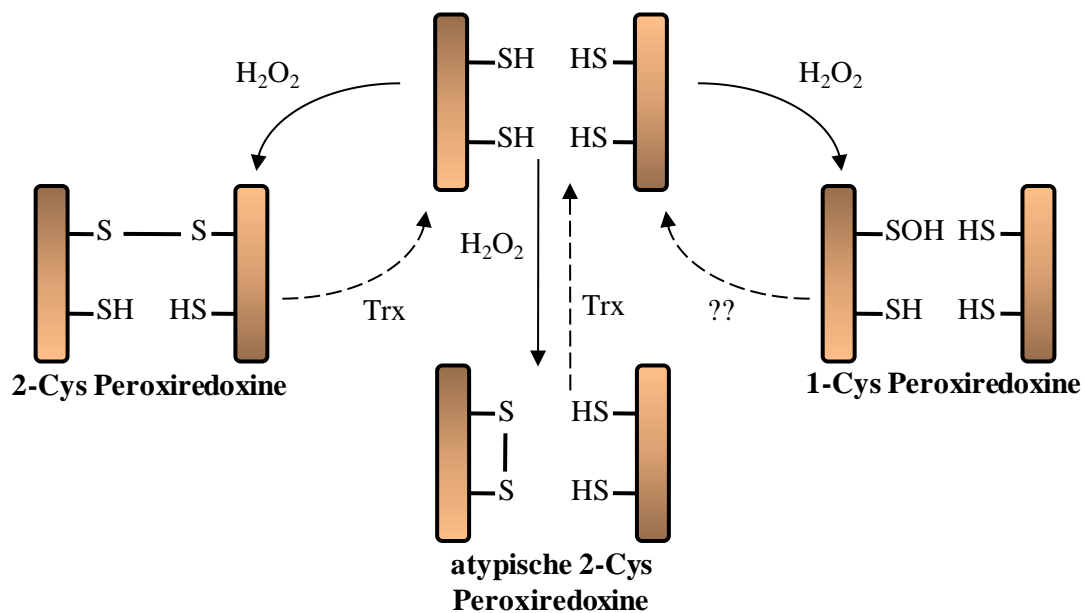


Abbildung 7. Strukturelle Übersicht der Peroxiredoxine. Während bei 2-Cys-Peroxiredoxinen eine intermolekulare Disulfidbrücke nach Reduktion gebildet wird, entsteht bei atypischen 2-Cys-Peroxiredoxinen eine intramolekulare Disulfidbrücke. Bei 1-Cys Peroxiredoxinen wird der konservierte Cystein-Rest nur bis zur Sulfensäure reduziert. Verändert nach Rhee u. a., 2001.

1.4.2 Eigenschaften und Funktion der Sulfiredoxine und Sestrine

Obwohl etwa ein bis zwei Prozent der Cystein-Reste der löslichen Proteine in der Zelle zur Sulfinsäure oxidiert sind (Hamann u. a., 2002), dachte man für lange Zeit, dass es sich hierbei um einen irreversiblen Redox-Zustand handelt (Claiborne u. a., 1999). Sowohl Sulfiredoxin (Srx) wie auch Sestrine (Sesn) sind in der Lage überoxidierte Peroxiredoxine zu reduzieren und damit für den Abbau von Peroxiden in den Zellen zu reaktivieren (Abbildung 8; Biteau u. a., 2003; Budanov u. a., 2004).

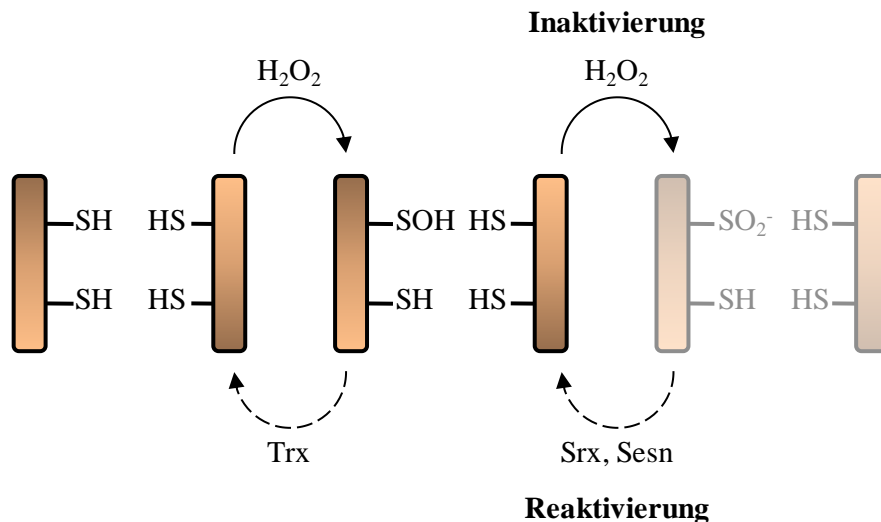


Abbildung 8. Darstellung der Inaktivierung und Reaktivierung von Peroxiredoxinen. Peroxiredoxine werden bei sehr hohen Peroxid-Konzentrationen überoxidiert und damit inaktiviert. Die Reaktivierung erfolgt über Sulfiredoxine (Srx) und Sestrine (Sesn). Verändert nach Rhee u. a., 2001.

Sulfiredoxin wurde erstmals in 2003 von Biteau u. a. beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein ca. 15 kDa großes Protein, das überoxidierte Peroxiredoxin-Reste der 2-Cystein-Peroxiredoxine reduzieren und damit recyceln kann (Biteau u. a., 2003). Interessanterweise scheint Sulfiredoxin nur in Eukaryoten und Cyanobakterien vorzukommen, nicht aber in Prokaryoten, in denen bisher auch keine Überoxidation der Peroxiredoxine beschrieben wurde (Chang u. a., 2004b). Die Reduktion der Sulfinsäurereste durch Srx von Prdx scheint abhängig von ATP, Mg^{2+} und einem Thiol als Elektronendonator zu sein. Ferner ist davon auszugehen, dass die Reduktion der Sulfinsäurereste durch Srx für 2-Cystein Peroxiredoxine spezifisch ist, während atypische 2-Cystein Prdx, 1-Cystein Prdx oder andere überoxidierte Proteine wie GAPDH nicht durch Srx reduziert werden (Chang u. a., 2004b; Woo u. a., 2005). Wie auch die Peroxiredoxine trägt die Proteinfamilie der Sulfiredoxine einen hoch konservierten Cystein-Rest. Darüber hinaus ist die komplette Sequenz um diesen Cysteinrest stark konserviert (Rhee u. a., 2007). Die Reduktion der Peroxiredoxine verläuft vermutlich über die Phosphorylierung des Sulfinsäurerestes. Der konservierte Cysteinsäurerest dient hier

als Phosphatträger von ATP auf das Peroxiredoxin. Der hierbei entstehende Phosphoryl-Ester kann anschließend durch andere Thiole weiter reduziert und damit das Peroxiredoxin recycelt werden (Rhee u. a., 2007). Deglutathiolisierung von Proteinen durch Srx wurde beispielsweise für Aktin beschrieben, was die Bildung der Filamente zu verbessern scheint (Findlay u. a., 2006). Sulfiredoxine scheinen ubiquitär exprimiert zu werden. Hohe Konzentrationen dienen als Indikator für oxidativen Stress, jedoch sind sie generell verstärkt im Gehirn, im Rückenmark, im Dickdarm, in der Leber und in der Milz zu finden (Jönsson und Lowther, 2007).

Dass Sestrine ebenfalls an dem Recycling überoxidiertes Peroxiredoxine beteiligt sind, wurde erstmals 2004 von Budanov u. a. postuliert. Auch hier ist die Reduktion der Sulfinsäurereste ATP-abhängig, sie zeigen jedoch keinerlei Sequenzhomologie zu Sulfiredoxinen (Budanov u. a., 2004; Jönsson und Lowther, 2007). Anders als die Sulfiredoxine scheinen sie nur in mehrzelligen Organismen vorzukommen (Jönsson und Lowther, 2007). Bisher wurden drei humane Isoformen der Sestrine beschrieben: Sestrin 1 (Sesn1), auch als p53 reguliertes Protein 26 (PA26) bekannt; Sestrin 2 (Sesn2), erstmals als Hi95 beschrieben, und Sestrin 3 (Sesn3). Die Expression aller Sestrine wird durch p53 reguliert (Jönsson und Lowther, 2007). Ferner wurde eine Induktion der Sesn1-Expression durch GADD (Growth Arrest and DNA Damage) beschrieben (Velasco-Miguel u. a., 1999). Sestrin 1 scheint in drei verschiedenen Transkriptionsvarianten (T1 bis T3) vorzukommen, wobei die T2-Transkriptionsvariante vermutlich die am häufigsten vertretene ist (Velasco-Miguel u. a., 1999). Wie die anderen Sestrine trägt auch Sesn1 maßgeblich zur Reduktion von oxidativem Stress bei, jedoch konnte kürzlich auch eine redox-unabhängige Funktion von Sesn1 und Sesn2 beschrieben werden: Sesn1 und Sesn2 führen zur Hemmung des mTORC1-Signalwegs, indem sie zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der Inhibitoren dieses Signalwegs beitragen (Budanov und Karin, 2008). Eine Induktion von Sesn2 wurde nach Hypoxie, oxidativem Stress und durch Schädigungen der DNA beobachtet (Budanov u. a., 2002; Essler u. a., 2009). Über die physiologische Bedeutung von Sestrin 3 ist bisher nur wenig bekannt. Jedoch wurde die Inhibierung der Sesn3-Expression, wie auch die Hemmung von Sesn1, mit erhöhten ROS-Level und einer erhöhten Mutationsrate in Verbindung gebracht (Kopin u. a., 2007). Darüber hinaus konnte eine erhöhte Methylierung in dem Sequenzbereich des *Sesn3*-Gens bei Endometriumkarzinomen festgestellt werden (Zigelboim u. a., 2007). Daher lässt sich vermuten, dass Sesn3 als Tumorsupressor fungiert.

Zur Rolle der Sestrine im zentralen oder peripheren Nervensystem ist nur sehr wenig bekannt. Interessanterweise wurde aber die Expression der Isoform Sesn2 mehrmals in neuronalen

Gewebe nachgewiesen. So konnte beispielsweise eine Induktion der Sesn2-Expression in verschiedenen Gehirnregionen in PTTG-Knockout Mäusen, einem Mausmodell, bei dem keine Expression des Mitoseregulators Securin stattfindet, beobachtet werden (Pemberton u. a., 2007). Des Weiteren wurde eine Sesn2-Expression in der sich entwickelnden Retina von Ratten beobachtet (O'Connor u. a., 2008). Ferner konnten in einer kortikalen Neuronenkultur gezeigt werden, dass die Expression von Sesn2 durch den Aktivitätszustand der Neuronen gesteuert werden kann (Papadia u. a., 2008), wobei die Induktion von Sesn2 vermutlich auf Histon-Acetylierungen der Promotorregion beruht (Soriano u. a., 2009). Es ist daher anzunehmen, dass Sestrin 2 in neuronalen Geweben entscheidende antioxidative Funktionen einnimmt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, ihre Funktion als Signalmoleküle und ihr Abbau sehr vielseitig sind. Neben der mitochondrialen ROS-Entstehung sind insbesondere NADPH Oxidasen an der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt, während an dem enzymatischen ROS-Abbau überwiegend das Peroxiredoxin/Sestrin-System, Superoxid-Dismutasen, Katalasen aber auch Glutathion-Peroxidasen beteiligt sind. Um die Funktion reaktiver Sauerstoffspezies als Signalmoleküle zu verstehen ist es daher von zentraler Bedeutung ihre vielseitigen enzymatischen Synthesewege, deren Lokalisation sowie den enzymatischen Abbau zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Systemische oder intrathekale Applikation von Radikalfängern führt zu einem reduzierten nozizeptiven Verhalten in Tiermodellen für persistierende Schmerzen und suggeriert eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Verarbeitung nozizeptiver Signale. Die Verabreichung von Radikalfängern, die gezielte Hemmung ROS-generierender Systeme oder die gezielte Stimulation ROS-abbauender Systeme könnten somit neue Ansatzpunkte zur Schmerztherapie darstellen. Welche ROS-generierenden Enzyme an der Schmerzverarbeitung beteiligt sind, ist jedoch nur ansatzweise bekannt. Auch ist bisher kaum verstanden welche antioxidativen Systeme den Abbau von ROS im nozizeptiven System vermitteln.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Expression der H₂O₂-generierenden NADPH Oxidase Nox4 im nozizeptiven System und deren Funktion bei der Schmerzverarbeitung geklärt werden. Zum anderen sollte die Expression und Funktion des Peroxid-abbauenden Enzyms Sestrin 2 (Sesn2) im nozizeptiven System charakterisiert

werden. Hierzu wurde die Nox4-/Sesn2-Expression in schmerzrelevanten Geweben sowohl basal als auch nach peripherer Entzündung bzw. Nervenverletzung untersucht. Zur Klärung der funktionellen Bedeutung wurde das nozizeptive Verhalten von Nox4^{-/-}- und Sesn2^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute, inflammatorische und neuropathische Schmerzen charakterisiert. Um den molekularen Mechanismus der Nox4-vermittelten Schmerzverarbeitung in Modellen für neuropathische Schmerzen zu untersuchen, wurde eine Gesamtgenom Microarray-Analyse des lumbalen Rückenmarks von Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach peripherer Nervenverletzung durchgeführt und der Myelinisierungszustand von peripheren Nerven nach Verletzung untersucht. Die erarbeiteten Ergebnisse sollen als Grundlage für die Entwicklung neuer, innovativer Arzneistoffe für die Schmerztherapie dienen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Versuchstiere

Um den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Schmerzverarbeitung zu untersuchen, wurden verschiedene Knockout-Maus-Linien verwendet. Zum einen wurde die Rolle der NADPH-Oxidase 4 untersucht. Hierzu wurden Tiere verwendet, bei denen das *Nox4*-Gen basal ausgeknockt (*Nox4*^{-/-}) ist (Zhang u. a., 2010). Des Weiteren wurden Tiere verwendet, bei denen ein *Nox4*-Knockout durch Gabe von Tamoxifen induziert werden kann (*Cre-ERT2*^{+/+}*Nox4*^{fl/fl}) (Feil u. a., 1996). Diese Tiere wurden von Prof. Brandes (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Goethe Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Sestrin 2 auf das Schmerzverhalten untersucht. Hierfür wurden *Sesn2*^{-/-}-Mäuse verwendet, die von Prof. von Melchner (Medizinische Klinik II/ Molekulare Hämatologie, Goethe Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden. Die Verhaltensversuche wurden an den entsprechenden Knockout-Tieren sowie deren wildtypischen Wurfgeschwistern durchgeführt. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts im Alter von sechs bis zwölf Wochen verwendet. Um die RNA- und/oder Proteinexpression in wildtypischen Geweben zu untersuchen, wurden vier bis acht Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden von Harlan-Winkelmann bezogen.

Alle Versuchstiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22 ± 0,5 °C; Hell-/ Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und mit Trockenfutter und Wasser ad libitum versorgt. Während der Durchführung der nozizeptiven Verhaltensversuche war der Beobachter bzgl. des Genotyps der Tiere verblindet. Die Versuche wurden von der zuständigen Tierethikkommission (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt.

2.1.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien der Tiere durchgeführt und die Biopsie bei 4 °C gelagert. Die DNA wurde mit Hilfe des REExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) extrahiert. Basierend auf der alkalischen Lyse wurde 100 µl Extraktions-Lösung sowie 25 µl Gewebe-Präparations-Lösung auf eine Schwanzspitze gegeben, um die Zellen und Zellkerne aufzuschließen. Der Ansatz wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend drei Minuten bei 95 °C erhitzt. Um potentielle Hemmstoffe der

Polymerasekettenreaktion (PCR) zu neutralisieren wurde 100 µl Neutralisations-Lösung zu dem Ansatz gegeben und bis zur PCR bei -20 °C gelagert.

Verwendete Primer: Nox4-Genotypisierung

Nox4-880 5'-ggt gct ggc ttc tgc ttc tt-3'

Nox4-882 5'-aag ctt ccg att ccc att ct-3'

Nox4-883 5'-ctt tgt gtg gtt gct tag gaga-3'

Sesn2-Genotypisierung

RRJ141.se 5'-gga caa gtt ctg aca ctc aag ga-3'

RRJ141.as 5'-gct tat gtg gcg cta agg gtc t-3'

pGTOlxf.as1 5'-ctc aaa cct gaa ccc cga ctt c-3'

Zur Genotypisierung wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Durch Einsatz spezifischer Primer wurde der ausgewählte DNA-Abschnitt flankiert und durch zyklisches Denaturieren des Doppelstranges, Hybridisierung der Primer und anschließende Verlängerung der DNA-Oligonukleotide mit Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) durch eine thermostabile DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert. Für die Genotypisierung wurde der FastREExtract-N-Amp Reaction Mix des REExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) verwendet, der bereits eine thermostabile DNA-Polymerase sowie dNTPs enthält.

Genotypisierungsansatz:	10 µl	FastREExtract-N-Amp-Reaction Mix
	je 1,5 µl	Primer (10 µM)
	4 µl	DNA-Extraktionsansatz
	ad 20 µl	H ₂ O

Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind oben aufgelistet. Die Schmelztemperaturen der jeweiligen Primer bestimmen die Hybridisierungstemperatur, die Polymerisationszeit wird durch die Länge der erwarteten PCR-Produkte bestimmt. Die verwendeten Programme für die jeweiligen Genotypisierungen sind im Anschluss aufgeführt. Zur Analyse der Polymerasekettenreaktion wurden die Ansätze auf ein 1,5 % bis 2 % iges Agarosegel aufgetragen.

PCR-Programm für Nox4:

5 min 95 °C
30 s 95 °C }
30 s 60 °C } 30x
30 s 72 °C }
10 min 72 °C
4 °C

PCR-Programm für Sesn2:

5 min 95 °C
30 s 95 °C }
30 s 62 °C } 35x
30 s 72 °C }
10 min 72 °C
4 °C

2.1.3 Rota-Rod-Test

Zur Überprüfung der motorischen Koordination wurde der Rota-Rod-Test durchgeführt. Hierzu wurden Versuchstiere auf eine mit der Geschwindigkeit von 32 rpm konstant rotierende Stange (Rotarod Treadmill für Mäuse; Ugo Basile) gesetzt und das Laufverhalten der Tiere beobachtet. Es wurde die Zeit ermittelt, die sich die Tiere auf der Stange halten konnten. Nach maximal 120 s wurde die Messung abgebrochen (Cutoff). Die Tiere wurden mit einigen Trainingsläufen an die Apparatur gewöhnt, bevor die eigentlichen Messungen gestartet wurden. Jedes Tier wurde vier- bis fünfmal getestet. Die Zeiten der Trainingsläufe sowie der Messungen wurden notiert, um einen Trainingseffekt der Tiere zu charakterisieren.

2.1.4 Nozizeptive Tiermodelle

Schmerzen sind „unangenehme Sinnes- und Gefühlserlebnisse“ und somit mit subjektiven Erfahrungen und Erlebnissen verbunden. Daher können Schmerzen im Tiermodell nur indirekt erfasst werden. Dies geschieht durch Beobachtung zuvor definierter Verhaltensänderungen des Versuchstiers (z.B. das Rückziehen oder Lecken der Hinterpfote nach Stimulation). Das Maß der nozizeptiven Antwort wird durch das Ausmaß der Verhaltensänderung oder der Latenzzeit bis zum Auftreten der Verhaltensänderung bestimmt. Zu den etablierten nozizeptiven Tiermodellen gehören unter anderem der Hot-Plate-Test, der Cold-Plate-Test, der Formalin-Test, die mechanische Hyperalgesie nach Zymosan- oder CFA-Injektion sowie die mechanische Allodynie in neuropathischen Modellen. Diese Modelle werden im Folgenden näher erläutert.

2.1.4.1 Hot-Plate-Test

Um akutes Schmerzverhalten nach thermischer Stimulation zu untersuchen, wurde der Hot-Plate-Test nach Eddy und Leimbach durchgeführt (Eddy und Leimbach, 1953). In diesem Versuch wurden Tiere auf eine 48 °C bis 54 °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion bestimmt. Als nozizeptive Reaktion wird das Lecken einer Hinterpfote oder Hochspringen des Tieres gewertet. Zeigte ein Tier keine Reaktion, wurde der

Versuch nach 80 s (für 48 °C), nach 60 s (für 50 °C), nach 40 s (für 52 °C) bzw. nach 20 s (für 54 °C) beendet, um Gewebeschäden zu verhindern. Um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen, wurde jedes Tier nur einmal pro Temperatur gemessen (Mogil u. a., 1999). Zwischen den Messungen der verschiedenen Temperaturen lag eine Zeitspanne von mindestens zwei Stunden. Das nozizeptive Verhalten wurde für maximal zwei verschiedene Temperaturen pro Tag untersucht.

2.1.4.2 Cold-Plate-Test

Neben dem „Hitzeschmerz“ wurde auch der „Kälteschmerz“ untersucht. Hierzu wurde ein Tier auf eine 5 °C, 10 °C oder 15 °C kalte Platte gesetzt und die Zeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion ermittelt. Als Reaktion wurde das Lecken einer Hinterpfote, das Hochhalten einer Hinterpfote sowie das Hochspringen des Tieres gewertet. Zeigte ein Tier keine Reaktion, wurde der Versuch nach 120 s beendet. Des Weiteren wurde der Kälteschmerz auch bei 0 °C nach der Methode von Zimmermann u. a., (2007) bestimmt. Hierfür wurde ein Tier auf eine 0 °C kalte Platte gesetzt und die Anzahl der Reaktionen innerhalb von fünf Minuten ermittelt.

2.1.4.3 Formalin-Test

Der Formalin-Test wurde 1977 bei Ratten und 1985 bei Mäusen eingeführt (Dubuisson und Dennis, 1977; Hunskar u. a., 1985). Bei diesem Test wird dem Versuchstier eine verdünnte Formaldehyd-Lösung (Formalin) subkutan in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert, wodurch es bei Mäusen zu einer nozizeptiven Antwort in Form von Lecken der injizierten Pfote kommt. Nach Formalin-Injektion können zwei Phasen starker nozizeptiver Reaktion beobachtet werden, die vor allem auf die Stimulation der TRPA1 Kanäle im Nozizeptor zurückzuführen sind (Macpherson u. a., 2007). Die erste Phase des Pfotenleckens beginnt unmittelbar nach der Injektion. Sie dauert etwa zehn bis 15 Minuten an und ist auf die direkte Stimulation der Nozizeptoren, insbesondere der A δ -Fasern, zurückzuführen. Nach der ersten Phase kommt es zu kleinen Ruhephasen von fünf bis zehn Minuten, in der die nozizeptive Antwort nur gering ist. Anschließend kommt es zu einer zweiten Phase des intensiven Pfotenleckens. Im Unterschied zu der ersten Phase sind hier aber neben der Nozizeptoren-Stimulation auch die entstehende Entzündung der Pfote sowie zentrale Veränderungen beteiligt. Diese führen zu einer anhaltenden Aktivierung der C-Fasern (Coderre u. a., 1990; Tjølsen u. a., 1992) und machen daher den Formalin-Test zu einem Tiermodell für die Simulation anhaltender tonischer Schmerzen.

Die Tiere wurden mindestens eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn in einen Zylinder aus Plexiglas gesetzt. Nach der Eingewöhnungszeit wurden 15 µl einer 5 %igen Formaldehyd-Lösung subkutan in die Dorsalseite der rechten Hinterpfote injiziert. Unmittelbar nach der Formalin-Injektion wurde das Tier in einem Zeitraum von 60 Minuten beobachtet und es wurde die Zeit ermittelt, die das Tier mit dem Lecken der Hinterpfote verbrachte (Leckzeit). Die Leckzeit wurde in fünf-minütigen Intervallen mit Hilfe einer Stoppuhr gemessen.

2.1.4.4 Modelle der inflammatorischen Hyperalgesie

Um Entzündungsschmerzen in den oben genannten Knockout-Linien zu charakterisieren, wurde zum einen die Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie (Meller und Gebhart, 1997) sowie die Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induzierte mechanische Hyperalgesie (Ferreira u. a., 2001) untersucht. Durch Injektion einer Zymosan- bzw. CFA-Lösung in eine Hinterpfote kommt es zu einer Entzündung der Pfote und einer damit verbundenen Überempfindlichkeit gegenüber mechanischen Stimuli (Hyperalgesie). Das Ausmaß der Hyperalgesie kann quantitativ mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Comerico, Italien) bestimmt werden. Hierzu wird die Latenzzeit gemessen, nach der das Tier nach mechanischer Druckstimulation die Pfote wegzieht. Der Unterschied in den Modellen liegt in der Dauer der Hyperalgesie. Während die Zymosan-induzierte Hyperalgesie nach zwei bis drei Tagen abklingt, dauert die CFA-induzierte Hyperalgesie mehrere Tage an.

Die Mäuse wurden in einen Käfig gesetzt, dessen Boden aus einem engmaschigen Draht besteht. Zur Gewöhnung der Tiere an die Versuchsausrüstung wurden die Tiere vor dem Versuchstag für mindestens zwei Stunden an die Messapparatur gewöhnt. An den jeweiligen Versuchstagen wurden die Tiere mindestens eine Stunde vor Versuchsbeginn in den Käfig gesetzt. Um die basalen Latenzwerte (Baseline) zu ermitteln, wurde am Tag vor dem eigentlichen Versuch sowie am Versuchstag selbst die Baseline bestimmt. Hierzu wurde der dünne Stahlstab des Dynamic Plantar Aesthesiometers gegen die Hinterpfote gedrückt und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote gemessen. Die Druckstärke wurde innerhalb der ersten zehn Sekunden von 0 auf 5 g gesteigert und anschließend für weitere zehn Sekunden bei 5 g konstant gehalten. Zeigte ein Tier nach 20 Sekunden keine Reaktion, wurde die Messung abgebrochen. Die Latenzzeit wurde bei jedem Tier pro Pfote zwischen drei- und fünfmal bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet. Dieser Baseline-Wert galt als Orientierung für die nachfolgenden Werte nach Zymosan- bzw. CFA-Injektion.

Nach Ermittlung der Baseline wurden jedem Tier 15 µl einer 5 mg/ml Zymosansuspension subkutan in die Plantarseite der rechten Hinterpfote injiziert. Anschließend wurden in den folgenden acht Stunden stündlich sowie 24 und 48 Stunden nach Zymosan-Injektion die

Latenzzeiten beider Hinterpfoten bestimmt. Im CFA-Modell wurden ebenfalls nach Ermittlung der Baseline 20 µl einer unverdünnten CFA-Lösung in die Plantarseite der rechten Hinterpfote injiziert und die Latenzzeiten zwei, vier, sechs und acht Stunden sowie nach ein, zwei, drei, vier, sechs, acht, zehn, zwölf und 14 Tagen bestimmt.

2.1.4.5 Neuropathische Schmerzmodelle

Zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen wurden zum einen das Modell der ‚Spared nerve injury‘ (Decosterd und Woolf, 2000), zum anderen das Modell des ‚Chronic constriction injury‘ (Bennett und Xie, 1988) angewandt. Beiden Modellen liegt die Verletzung der *Nervus ischiadicus* zugrunde. Die beiden neuropathischen Schmerzmodelle werden im Folgenden weiter erläutert.

‚Chronic constriction injury‘

Im Modell der ‚Chronic constriction injury‘ (CCI) (Bennett und Xie, 1988) wird der komplette *N. ischiadicus* mit drei Fäden an dicht zusammen- und untereinanderliegenden Stellen ligiert (Abbildung 9). Dies führt zu einer Hypersensitivität in der betroffenen Hinterpfote. Das Ausmaß der Allodynie kann mit Hilfe des Dynamic Plantar Aesthesimeters bestimmt werden.

Nach Ermittlung der basalen Latenzzeiten wurden die Tiere unter tiefer Isofluran-Narkose operiert. Das linke Hinterbein des Tieres wurde rasiert und anschließend die Haut sowie die Muskulatur im Bereich des Hüftansatzes geöffnet. In diesem Bereich haben sich noch keine Äste des *N. ischiadicus* abgezweigt. Der Nerv wurde mit einem 0,08 mm Faden (FST 18020-60) an drei dicht zusammenliegenden Stellen ligiert, jedoch nicht durchtrennt. Die mechanischen Latenzzeiten wurden drei, sieben, zehn, 14, 17, 21, 24, 28 und 35 Tage nach der Operation bestimmt.

‚Spared nerve injury‘

Im Modell der ‚Spared nerve injury‘ (SNI) (Decosterd und Woolf, 2000) werden zwei Äste des *N. ischiadicus* ligiert und durchtrennt. Nur ein Ast, der *N. suralis*, bleibt intakt (Abbildung 9). Dies führt zu einer Hypersensitivität im lateralen Bereich der Hinterpfote, der durch den *N. suralis* innerviert wird. Es entwickelt sich eine Allodynie in der betroffenen Hinterpfote. Das Ausmaß dieser Allodynie kann mit Hilfe des Dynamic Plantar Aesthesimeters bestimmt werden.

Die basale mechanische Latenzzeit wurde, wie oben beschrieben, am Tag vor der Operation der Tiere bestimmt. Die Tiere wurden unter tiefer Isofluran-Narkose operiert. Die Tiefe der Narkose wurde mittels des Rückziehreflex der rechten Hinterpfote überprüft. Das linke Bein des Versuchstieres wurde rasiert und die Haut sowie die Muskulatur im Bereich des

Kniegelenks durchtrennt. In diesem Bereich ist der *N. ischiadicus* bereits teilweise verzweigt: Der *N. suralis* hat sich bereits abgezweigt, während der *N. peroneus communis* und der *N. tibialis* noch zusammen liegen, jedoch als separate Nervenstränge erkennbar sind. Diese wurden einzeln mit einem 0,08 mm Faden (FST 18020-60) abgebunden. Anschließend wurde im distalen Bereich zur Ligationsstelle ein Stück des Nervs entfernt, um eine Re-Ligation des distalen und proximalen Bereichs zu unterbinden. Die Muskulatur sowie die darüber liegende Haut wurden genäht und die Narkose beendet. Die mechanischen Latenzzeiten wurden drei, sieben, zehn, 14, 17, 21, 24, 28 und 35 Tage nach der Operation mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer bestimmt.

Im Gegensatz zu dem CCI Modell, in dem das Ausmaß der Schädigung schwer abschätzbar ist und eine Regeneration des peripheren Nervengewebes stattfindet, ist das Ausmaß der Gewebsschädigung im SNI Modell relativ konstant. Durch die komplette Durchtrennung des *N. peroneus communis* und des *N. tibialis* und die Entfernung des Nervengewebes wird eine Religation und damit eine komplette Regeneration des Gewebes weitestgehend verhindert.

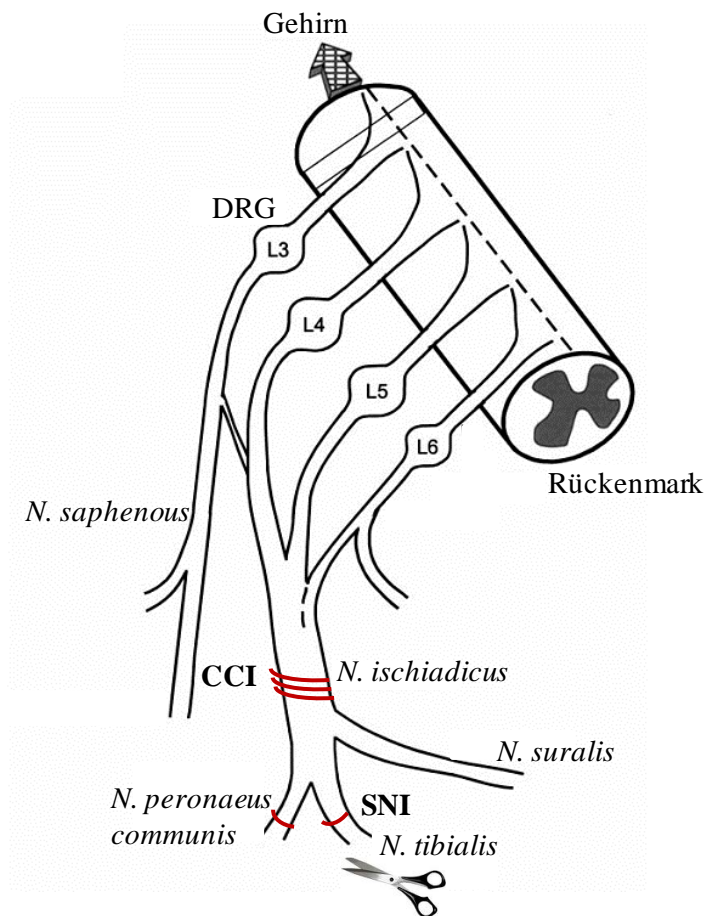


Abbildung 9. Schematische Darstellung der neuropathischen Schmerzmodelle. In dem Modell der ‚Chronic constriction injury‘ (CCI) wird der komplette *N. ischiadicus* an drei hintereinander liegenden Stellen ligiert. In dem Modell der ‚Spared nerve injury‘ (SNI) werden der *N. peroneus communis* sowie der *N. tibialis* ligiert und durchtrennt. Verändert nach Decosterd und Woolf, 2000.

2.1.5 Tamoxifen-induzierter Nox4-Knockout

Im Modell der in der SNI-induzierten mechanischen Allodynie wurden neben der globalen Nox4-Knockout-Linie auch Tiere der Linie CreERT2^{+/+}Nox4^{fl/fl} untersucht, in denen der Knockout des Nox4-Gens durch die Gabe von Tamoxifen gesteuert wird. Der Tamoxifen-induzierte Knockout basiert auf dem Cre- (cyclization recombination-) loxP- (locus of crossing over of bacteriophage PI-) System. Der auszuschaltende Bereich des *Nox4*-Gens wurde durch zwei loxP-Sequenzen flankiert und nach Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen ausgeschnitten (Abbildung 10; Feil u. a., 1996; Feil u. a., 2009). Als Kontrollen wurden Tiere verwendet, die keine Sequenz der Cre-Rekombinase trugen bzw. nur mit Vehikel behandelt wurden.

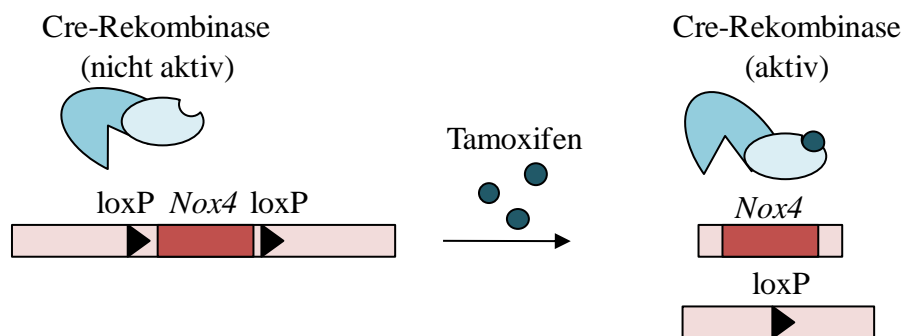


Abbildung 10. Prinzip des Tamoxifen-induzierten Knockouts des *Nox4*-Gens in CreERT2^{+/+}Nox4^{fl/fl} Mäusen. Der auszuschaltende Bereich des *Nox4*-Gens ist durch loxP-Sequenzen flankiert. Die Cre-Rekombinase ist an eine mutierte Hormon-binde-Domäne des Östrogen-Rezeptors fusioniert und kann durch Bindung von Tamoxifen aktiviert werden. Die aktivierte Cre-Rekombinase schneidet dann den flankierten Sequenzbereich aus.

Nach der Bestimmung der Baseline wurde an diesen Tieren die SNI-Operation durchgeführt und die Latenzzeiten sieben und zehn Tage nach der Operation bestimmt. Anschließend wurde am Tag zehn, elf und zwölf nach der Operation jedem Tier 1 mg Tamoxifen (gelöst in 10 % Ethanol und 90 % autoklaviertem Sonnenblumenöl) oder Vehikel intraperitoneal injiziert. Sieben, zehn, 14, 17 und 21 nach der Tamoxifen Applikation wurden die Latenzzeiten erneut gemessen.

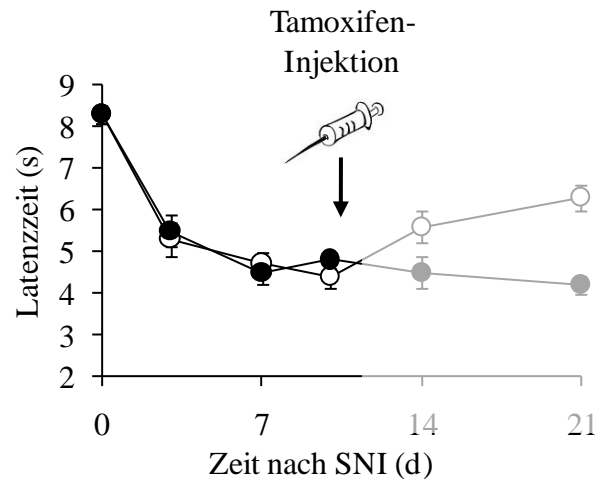


Abbildung 11. Schematische Darstellung des zeitlichen Designs der Studie. Die Tiere wurden zehn Tage nach der SNI-Operation mit Tamoxifen oder Vehikel i.p. behandelt um einen Knockdown von Nox4 zu induzieren. Anschließend wurde die mechanische Allodynie der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf weiter bestimmt.

2.1.6 Intrathekale Applikation von Prüfsubstanzen

Um den Effekt des nicht selektiven Nox-Inhibitors Fulvene-5 (Bhandarkar u. a., 2009) zu testen wurde dieser intrathekal in den Wirbelkanal appliziert und im SNI-Modell an Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen getestet. Nach Messung der basalen Latenzzeiten mit Hilfe des Dynamic Plantar Aesthesimeters wurde die SNI-Operation durchgeführt. 14 Tage nach der SNI-Operation wurden 0,1 mg sowie 0,2 mg Fulvene-5 in jeweils 5 µl 0,9 % sterilem NaCl gelöst und intrathekal verabreicht. Als Kontrolle diente 0,9 % NaCl. Die intrathekale Injektion erfolgte an wachen Tieren nach der Methode von Fairbanks (Fairbanks, 2003) und wurde von Dr. Ruirui Lu durchgeführt. Die Tiere wurden unter leichter Isofluran-Narkose im Bereich der Injektions-Stelle rasiert. Anschließend wurden die Tiere im Bereich des Hüftknochens gehalten, die Haut oberhalb des Beckenkamms gestrafft. Es wurde eine 10 µl Hamilton Spritze mit einer 0,5 inch sterilen Nadel verwendet. Die Injektion der Substanz erfolgt im Bereich des letzten Dornfortsatzes an der Mittellinie direkt zwischen den Hüftknochen. Die korrekte Injektionsstelle wurde durch einen Reflex des Schwanzes bei Berührung der Dura mater erkannt. Um einen Effekt von Fulvene-5 auf die Motor-Koordination auszuschließen wurde die hohe Dosis Fulvene-5 nicht operierten Tieren verabreicht und die motorische Koordination mit Hilfe des Rota-Rod-Tests getestet.

2.1.7 Gewebeentnahme

Zur Expressionsanalyse im Gewebe wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und mittels kardialer Punktion entblutet. Die Präparation der Gewebe erfolgte unmittelbar nach der

Tötung. Die Wirbelsäule frei präpariert und in Höhe des Zervikalmarks durchtrennt. Von hier aus wurden die kaudalen Wirbelbögen seitlich durchtrennt und so das Rückenmark vorsichtig frei gelegt. Der lumbale Bereich des Rückenmarks sowie die dazugehörigen Spinalganglien (DRGs L4-L6) wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Entnahme des Gehirns wurde der Schädel seitlich aufgetrennt und das Gehirn im Ganzen entnommen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Versuchstiere in tiefer Isofluran-Narkose perfundiert. Nach Öffnen des Brustraumes erfolgte zunächst eine Perfusion mit isotonischer NaCl-Lösung über den linken Herzventrikel um das Blut auszuspülen. Zur Fixierung des Gewebes erfolgte im Anschluss eine Perfusion mit einer 4 %igen Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung (gelöst in PBS, pH 7,4). Die Gewebeentnahme des lumbalen Rückenmarks sowie der lumbalen DRGs (L4-L6) erfolgte wie oben beschrieben. Das entnommene Gewebe wurde anschließend für zehn Minuten in 4 %igem PFA nachfixiert und über Nacht in einer 20 %iger D-Saccharose-Lösung entwässert. Das Gewebe wurde in Gefriermedium auf Trockeneis eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Von den eingebetteten Rückenmarks und DRG-Proben wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM3050 S) Gefrierschnitte angefertigt (Objekttemperatur: -19 °C, Kammertemperatur: -20 °C). Die Gewebe wurden in einer Dicke von 12 bis 16 µm geschnitten, anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Rückenmarks- und Gehirnproben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen) basierend auf der Chloroform-Phenol Fällung (Chomczynski, 1993). Das Gewebe wurde in 200 µl phenolhaltigem Qiazol-Reagenz homogenisiert und anschließend auf 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation entstand ein Drei-Phasen-System. Während sich Proteine überwiegend in der unteren organischen Phase lösen, ist die DNA in der mittleren Phase und die RNA in der oberen wässrigen Phase zu finden. Die RNA-haltige Phase wurde abpipettiert, mit Isopropylalkohol gefällt und auf die in dem Kit enthaltene Säule aufgetragen. Nach einigen Waschschritten mit den im Kit enthaltenen Puffern erfolgte ein DNase Verdau (Qiagen) auf der Säule. Nach weiteren Waschschritten wurde die RNA mit RNase freiem Wasser (Qiagen)

eluiert und die Konzentration bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Isolierung der RNA aus den DRGs wurde das RNAqueous Micro Kit (Ambion) verwendet. Dieses eignet sich besonders für kleinste Mengen an Gewebe, da hier eine spezielle RNA-bindende Glasfaser-Säule eingesetzt wird, die für kleinste Probengrößen entwickelt wurde. Die Aufbereitung basiert auf der chaotrophen Lyse des Gewebes mit einer Guanidiniumthiocyanat-Lösung, anschließender Ethanol-Fällung der Nukleinsäuren und Bindung der RNA an die spezielle Glasfilter-Säule. Die Spinalganglien wurden in Lysis Reagenz homogenisiert, mit Ethanol gefällt und auf eine im Kit enthaltenen Säule aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution mit der entsprechenden Elutionslösung bei 75 °C . Im Anschluss wurde ein DNase-Verdau mit dem im Kit enthaltenden Puffer und Enzym durchgeführt.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers (Thermo Scientific) bestimmt. Hierzu reichte der Einsatz von nur $1\text{ }\mu\text{l}$ Nukleinsäurelösung. Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ bestimmt. Dabei entspricht $A_{260} = 1$ einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Nukleinsäuren durch Überprüfung der des $A_{260/280}$ Verhältnisses untersucht. Dieses sollte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Werte oberhalb der angegebenen Verhältnisse zeigen Protein- bzw. Phenol-Verunreinigungen an.

2.2.3 Real-time quantitative RT-PCR

Zur quantitativen Analyse der RNA-Expression gewünschter Gene wurde die Real-time quantitative RT-PCR herangezogen. Zur reversen Transkription wurde das Verso-Kit (Thermo Fischer) verwendet. Die anschließende Real-time quantitative RT-PCR erfolgte mit Hilfe von Gen-Expression-Assays (Applied Biosystems) und dem dazu gehörigen Master-Mix.

2.2.3.1 Reverse Transkription

Um die RNA in cDNA umzuschreiben wurde das Verso-Kit (Thermo Scientific) verwendet. Der aus dem Kit verwendete Enzym-Mix besteht aus einer reversen Transkriptase sowie einer DNA-Polymerase, die eine reverse Transkription mit direkt anschließender PCR möglich macht.

Reverse Transkription

Reaktionsansatz:	200 ng	RNA
	4 µl	5 x Synthesis Buffer
	2 µl	dNTP Mix
	1 µl	Hexamer-Primer
	1 µl	RT-Enhancer
	1 µl	Verso-Enzyme-Mix
	Ad 20 µl	RNase freies H ₂ O

2.2.3.2 PCR

Die Methode der Real-time quantitativen RT-PCR ermöglicht es synthetisierte PCR-Produkte direkt und quantitativ zu erfassen. Die Quantifizierung beruht auf einer Fluoreszenzmessung, die in jedem Zyklus der PCR erfolgt. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei exponentiell zur Menge des PCR-Produkts. Die Berechnung der relativen mRNA Verhältnisse erfolgt mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode mittels der C_T -Werte der exponentiellen Phase der PCR (siehe Kapitel 2.2.3.3).

Die Untersuchung der relativen RNA-Expression der ausgewählten Gene erfolgte mit Genspezifischen Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Diese bestehen aus genspezifischen Primern und einer ebenfalls genspezifischen FAM-markierten Sonde. Diese bindet an eine Sequenz, die von den Primern flankiert wird. Der FAM- (Fluorochrom-Farbstoff) ist an das 5'-Ende der Sonde gekoppelt, am 3'-Ende trägt die Sonde den nicht-fluoreszierenden Quencher-Farbstoff (NFQ). Der FAM-Farbstoff fungiert als Reporter. Sein Signal ist unterdrückt, solange er in direkter Nähe des NFQ liegt. Die Sonde bindet an die Gensequenz, welche während der PCR amplifiziert wird, und wird dabei durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut. Hierbei wird der FAM-markierte Reporter von der Sonde gelöst und von dem NFQ-Farbstoff separiert. Die dadurch frei werdende Energie des Reporters kann detektiert werden und ist proportional zu der synthetisierten DNA-Menge (Abbildung 12). Grundlage hierbei ist der Förster- (oder Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer (FRET). Liegen Reporter und Quencher in Nähe zueinander gibt der FAM-markierte Reporter seine Energie an den nicht-fluoreszierenden Quencher ab. Der Reporter selbst kann in dieser Konstellation somit selbst kein fluoreszierendes Signal abgeben. Werden Quencher und Reporter aber im Laufe der Amplifikation voneinander getrennt, ist die Übertragung der Energie auf den Quencher nicht mehr möglich und das fluoreszierende Signal des Reporters kann detektiert werden. Der

Vorteil eines nicht fluoreszierenden Quenchers liegt im reduzierten Hintergrundsignal und somit in einer genaueren Quantifizierung.

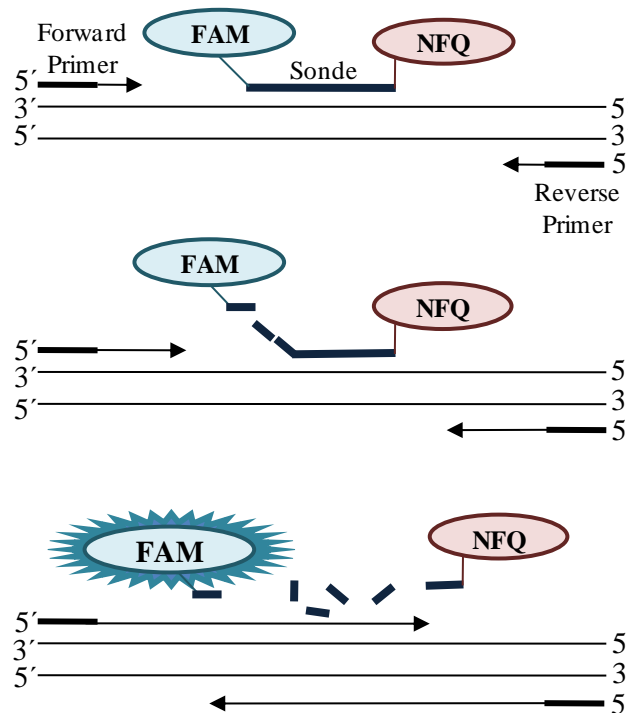


Abbildung 12. Prinzip der Real-time quantitativen RT-PCR. NFQ = nicht fluoreszierender Quencher. FAM = Reporter, der FAM-markiert ist. Erläuterungen im Text. Adaptiert aus TaqMan Gene Expression Assays Protokolls, Applied Biosystems (2008).

Folgende TaqMan[®] Assays wurden für die Genexpressionsanalyse eingesetzt:

Gen	Assay ID	Größe des Fragments (bp)
Egr2	Mm00456650_m1	73
Mpz	Mm01290519_m1	73
Nox1	Mm00549170_m1	84
Nox2	Mm01287742_m1	81
Nox3	Mm01339132_m1	103
Nox4	Mm01317086_m1	83
Pmp22	Mm00476978_m1	58
Prx	Mm00479826_m1	99
p22phox	Mm00514478_m1	74
Sesn2	Mm00460686_m1	76
GAPDH	Mm99999915_g1	107
β-Aktin	Mm00607939_s1	115

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt pipettiert:

TaqMan[®]-Reaktionsansatz: 0,5 µl 20x TaqMan[®] Gene Expression Assay
3,5 µl RNase-freies H₂O
1 µl cDNA (entspricht 10ng der Ausgangs-RNA)
5 µl 2x Taqman[®] Master-Mix

Jeder Ansatz wurde in zwei- bis dreifacher Bestimmung gemessen. Zusätzlich wurde für jeden Gen-Expression Assay eine „Non-Template Control“ bestimmt, die anstelle der cDNA RNase freies H₂O enthielt und als Kontrolle für eventuelle Verunreinigungen des Assays diente. Als endogene Kontrolle wurden jeweils die Gen-Expression Assays von β-Aktin und GAPDH eingesetzt. Die Real-time quantitative PCR erfolgte in einem 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) unter konstanten Bedingungen:

	PCR-Aktivierung	10 min 95 °C
40 Zyklen:	Denaturierung	15 s 95 °C
	Amplifizierung	1 min 60 °C

2.2.3.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Real-time quantitativen RT-PCR erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode. Als endogene Kontrolle dienten, wie oben beschrieben, β-Aktin und GAPDH. In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass sich die relative Expression dieser Gene unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht veränderten.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden C_T -Werte herangezogen, bei denen sich die DNA-Amplifikation in der exponentiellen Phase befand. C_T -Werte beschreiben den Zeitpunkt der PCR, an dem die Fluoreszenz signifikant über dem Hintergrundsignal ansteigt. Es wurde für jedes Experiment ein Schwellenwert festgelegt, bei dem sich die DNA-Amplifikation der verschiedenen Zielgene in der exponentiellen Phase befand. Um kleine Schwankungen der eingesetzten DNA-Menge auszugleichen, wurde der Mittelwert der gemessenen C_T -Werte der untersuchten Gene gebildet. Alle weiteren Berechnungen erfolgten mit den gemittelten Werten. Im ersten Schritt der Berechnung wurde der ermittelte C_T -Wert des zu untersuchenden Gens auf den C_T -Wert der endogenen Kontrolle normalisiert:

$$C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{endogene Kontrolle}) = \Delta C_T$$

Anschließend wurde die Differenz aus den ΔC_T -Werten der behandelten Tiere und den unbehandelten Proben (Kontrolltieren) gebildet. Der ΔC_T -Wert der unbehandelten Proben diente somit als Kalibrator:

$$\Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator} = \Delta\Delta C_T$$

Die relative Expressionsstärke wurde näherungsweise über folgende mathematische Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Allgemein gilt während der logarithmischen Phase der PCR:

$$X_n = X_0 * E^n$$

(X_n = DNA-Gehalt in Zyklus n ; X_0 = DNA-Ausgangsmenge; E = Effizienz der PCR; n = Zykluszahl)

An den Schnittpunkten zweier Fluoreszenzsignale mit horizontaler Linie gilt:

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

Beim Vergleich der Signale einer Probe (in diesem Fall Gewebe von einem behandelten Tier) und einer Kontrollprobe (Gewebe von einem unbehandelten Tier) gilt entsprechend für die Schnittpunkte:

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

Die relative DNA-Ausgangsmenge des Zielgens Z (beispielsweise einer Nox-Isoform) im Vergleich zu einem Referenzgen R (GAPDH oder β -Aktin) lässt sich aus der Zykluszahl n am Schnittpunkt mit der horizontalen Linie wie folgt berechnen:

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

Wenn die Effizienz $E = 2$ gesetzt wird (für eine maximale Effizienz), gilt:

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

Durch Einsetzen der C_T -Werte in die hergeleitete Formel erhält man: $Z / R = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Durch die Formel erhält man die n -fache Expression des Zielgens nach der Behandlung bezogen auf das Referenzgen.

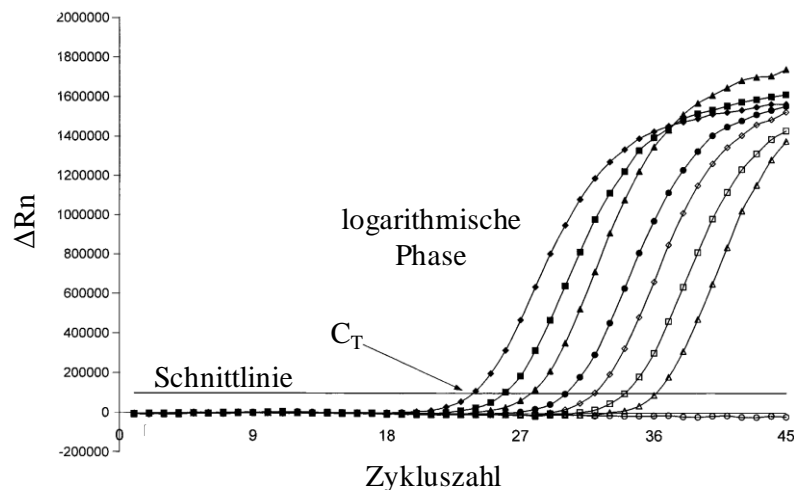


Abbildung 13. Quantifizierung der Real-time quantitativen RT-PCR. Die Schnittpunkte der Fluoreszenzsignale an der horizontalen Schnittlinie geben den C_T -Wert wider, der zur Berechnung der relativen RNA-Menge verwendet wird. Verändert nach Giulietti u. a., 2001.

2.2.4 In-situ-Hybridisierung

Die Sonden für die in-situ-Hybridisierung wurden mittels der in diesem Kapitel beschriebenen Methoden hergestellt. Folgende Primer wurden für die Herstellung der Nox4-Sonden verwendet:

Nox4-630 5'-aca cct ctg cct gct cat tt-3'
 5'-gcc agg agg gtg agt gtc ta-3'

Nox4-260 5'- tga gga gtc act gaa cta tga agt tag tc-3'
 5'- tga ctg agg tac agc tgg atg ttc aca -3'

Als Ausgangsmaterial wurde isolierte Rückenmarks-RNA wildtypischer Mäuse verwendet. Die ausgewählten RNA-Bereiche wurden mit Hilfe der One-Step RT-PCR (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Diese wurden mittels Gelelektrophorese gereinigt und mit dem Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert. Das gereinigte cDNA-Produkt wurde in den pCR[®]4-TOPO Vektor kloniert und das Plasmid in chemisch kompetenten TOP-10 *E. coli* Zellen amplifiziert. Nach Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid linearisiert und mittels *in vitro* Transkription eine DIG-markierte RNA-Sonde synthetisiert. Die Qualität der Sonde wurde auf einem Agarose-Gel überprüft.

2.2.4.1 One-Step RT-PCR

Die reverse Transkription von RNA mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Hilfe des One-Step RT-PCR-Kits (Qiagen). Hierzu wurden folgender Ansatz und Reaktionsbedingungen verwendet:

<u>Ansatz (50µl)</u>		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
5 x Buffer	10 µl	RT	30 min 50 °C
dNTP-Mix	2 µl	Initialisierung	15 min 94 °C
Primer 1 (10 µM)	1 µl	Schmelzen	1 min 94 °C
Primer 2 (10 µM)	1 µl	Primer-Anlagerung	1 min 50-65 °C
RT-Enzyme-Mix	2 µl	Polymerase-Reaktion	1 min 72 °C
RNA-Template	500 ng	Finale Extension	10 min 72 °C
H ₂ O	add 50 µl		

} 35x

Die One-Step RT-PCR wurde für die Herstellung der Nox4-Sonden verwendet.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Nukleinsäuren wandern in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit ist dabei sowohl von der Molekülgröße als auch von der Porengröße des Gels abhängig. Dadurch können Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Agarose wurde in den gewünschten Konzentrationen in TBE-Puffer aufgekocht und in die Gelkammern gegossen. Nach Aushärten der Agarose wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V in TBE-Puffer. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend für ca. 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und mit Hilfe des Gel-Doc Systems (Biorad) unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

TBE-Puffer (10 x):	108 g	Tris-Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	Ad 1 l	H ₂ O

2.2.4.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um aufgetrennte DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu eluieren, wurde das Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Reinigung basiert auf der Bindung der DNA an Kieselerde-Partikeln. Die DNA kann so gewaschen und von Agarose, Enzym-Partikeln oder Nukleotid-Resten gereinigt werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Überprüfung der Elution wurde ein Zehntel des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.4 Klonierung

Die Klonierung des isolierten cDNA-Fragments erfolgte in den pCR[®]4-TOPO Vektor (Invitrogen) mit Hilfe des TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing. Dieser enthält eine minimierte multiple Klonierungsstelle, die jedoch beiderseits von EcoRI-Schnittstellen flankiert wird, so dass das inserierte PCR-Produkt wieder herausgeschnitten werden kann. Darüber hinaus enthält er Bindungsstellen für die T3- und T7-Polymerase, die für die *in vitro* Transkription bei der Sondenherstellung benötigt werden. Die orientierungs-gerichtete Ligation ist jedoch ohne einen weiteren Verdau des Vektors nicht möglich. Daher ist die Überprüfung der Orientierung des Inserts im Anschluss notwendig. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

Ligationsansatz:	1 µl	Salzlösung
	1 µl	eluiertes PCR-Produkt
	1 µl	pCR [®] 4-TOPO Vektor
	3 µl	steriles H ₂ O

Der Ligationsansatz wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für die anschließende Transformation auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.4.5 Transformation

Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in One Shot[®] TOP10 chemisch-kompetente *E. coli* Zellen (Invitrogen). Es wurde ein Protokoll verwendet, welches für eine Selektion nach Ampicillin-Resistenz angewendet werden kann. Ampicillin-haltige Agarplatten (0,1 mg/ml Ampicillin) wurden bei 37 °C getrocknet und vorgewärmt. Die TOP10 chemisch-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 4 µl des Klonierungsansatzes zu den Zellen gegeben, der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden den Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Da der verwendete Vektor das Ampicillin-Resistenzgen trug, konnte so sichergestellt werden, dass nur transformierte Kolonien wuchsen.

2.2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Die hier verwendeten Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf alkalische Lyse der Bakterien und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an einen Anionen-Austauschfilter. Hierdurch können Proteine und andere Verunreinigungen leicht und ohne aufwändige Fällungsschritte von der Plasmid-DNA entfernt werden. Diese kann dann im letzten Schritt mit Wasser von der Säule eluiert werden. Für analytische Fragestellungen wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit verwendet. Je eine 5 ml LB^{amp}-Medium Kultur (1 mg/ml Ampicillin) wurde mit einer TOP10 *E. coli* Kolonie einer frischen Ampicillin-haltigen Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 117 rpm inkubiert. Anschließend wurde jeweils ein Kryostock angefertigt, indem je 250 µl der Kultur mit 250 µl sterilem Glycerol in CryoTM-Einfrierröhrchen gemischt und bei -80 °C gelagert wurden. Die restliche Kultur wurde durch Zentrifugation sedimentiert. Die Bakterienzellen wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über eine Säule aufgereinigt und eluiert. Die Plasmid-DNA bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiafilter Maxi Plasmid Purification Kit verwendet. Es wurde eine LB^{amp}-Medium Kultur mit einem Kryostock angeimpft und für sechs bis acht Stunden als Vorkultur bei 37 °C und 117 rpm inkubiert. Diese Vorkultur diente im Anschluss zum Animpfen einer 400 ml Ampicillin-selektiven Kultur. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 117 rpm inkubiert und am nächsten Tag durch Zentrifugation in einer Sorvall GSA Rotor Zentrifuge sedimentiert. Die Plasmidisolierung sowie Lagerung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.4.7 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau diente zum einen der Analyse der Klone, zum anderen zu Linearisierung der Plasmide für die anschließende *in vitro* Transkription (2.2.4.9). Zur analytischen Auswertung wurden nur geringe Mengen an DNA (1 bis 2 µg) eingesetzt und das Plasmid mit *EcoRI* verdaut. Diente der Restriktionsverdau als Schritt in der Sondenherstellung, wurden größere Mengen an DNA (5-10 µg) verwendet und die Restriktionsenzyme *NotI* bzw. *PmeI* eingesetzt.

Restriktionsansatz:	3 µl	10x Puffer (entsprechend für Restriktionsenzym)
	1 µl	BSA (falls benötigt)
	1-10 µg	Plasmid-DNA (je nach Fragestellung)
	1 U/µg DNA	Restriktionsenzym
	Add 30 µl	H ₂ O

Der Restriktionsansatz wurde auf Eis pipettiert, vorsichtig gemischt und bei 37 °C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Zur Überprüfung der enzymatischen Spaltung des Plasmids wurde ein Zehntel des Restriktionsansatzes vor weiterer Verwendung auf ein Agarosegel aufgetragen. Diente der Ansatz der Klonanalyse, wurde der restliche Ansatz verworfen. Andernfalls wurde der Ansatz mit 1/10 V 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 3 V Ethanol (abs.) über Nacht bei – 20 °C gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und anschließend in zehn bis 15 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.8 Sequenzierung

Nach erfolgreicher Klonanalyse wurden die Plasmide ausgewählter Klone durch Agowa (Berlin) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte aus jeweils 1 µg Plasmid-DNA mit von Agowa bereitgestellten M13 forward bzw. M13 reverse Primern. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe von Chromas und NCBI ausgewertet und die Orientierung des Inserts bestimmt.

2.2.4.9 *In vitro* Transkription

Die Digoxigenin (DIG)-markierten Nox4-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription der klonierten DNA Fragmente synthetisiert. Wie oben beschrieben, befindet sich sowohl eine Bindungsstelle für eine T3- als auch eine T7-RNA Polymerase, die gegensätzlich orientiert sind, so dass es möglich ist, eine „antisense“ sowie eine „sense“-Sonde herzustellen. Während die „antisense“-Sonde komplementär zur entsprechenden mRNA Sequenz ist und diese somit binden kann, entspricht die Sequenz der „sense“-Sonde der Sequenz der mRNA und kann diese daher nicht binden. Folglich dient die „sense“-Sonde als Negativkontrolle. Das Plasmid wurde zuvor stromabwärts der zu amplifizierenden Sequenz linearisiert (siehe oben) und somit sichergestellt, dass nur der Bereich des Inserts amplifiziert und markiert wurde. Für die *in vitro* Transkription wurden Substanzen und Enzyme der Firma Roche verwendet.

in vitro

Transkriptionsansatz: 2 µl	10 x Puffer
2 µl	10 x DIG Labeling Mix
1 µl	RNase Inhibitor
1-3 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	RNA-Polymerase (T3 bzw. T7)
Add 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde vier bis fünf Stunden bei 37 °C inkubiert und die RNA-Sonden anschließend über eine Säule mit Hilfe des RNeasy Mini Kit gereinigt. Zusätzlich wurde ein DNase Verdau durchgeführt und die Sonde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.10 In-situ-Hybridisierung

Vor Beginn des Versuches wurden die verwendeten Glasgefäße und Inkubationsschalen mit RNase Zap gereinigt. Alle Puffer und Lösungen wurden in RNase freiem H₂O hergestellt. Gefrierschnitte der Rückenmarksproben wurden mit einem Fettstift umrandet und dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein fünf-minütiger Bleichungsschritt mit 3 % H₂O₂ in Methanol. Die Schnitte wurden gewaschen und anschließend fünf Minuten in 4 % PFA nachfixiert. Anschließend wurden sie dreimal für zehn Minuten in PBS gewaschen und für ca. zwei Stunden bei 65 °C mit Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten in einer Hybridisierungskammer, die mit RNase freiem Wasser feucht gehalten wurde, um das Austrocknen der Schnitt zu verhindern. Die Sonden wurden in einer Konzentration von 1,3 ng/µl in der Hybridisierungslösung verdünnt und zehn Minuten bei 80 °C denaturiert. Die Schnitte wurden mit 200 µl der angesetzten Sonde für ein bis zwei Tage bei 65 °C hybridisiert. Um nicht gebundene Sonden sowie Bestandteile des Hybridisierungspuffers zu entfernen, wurden die Schnitte eine Stunde in 0,2 x SSC und weitere 30 Minuten in 0,2 x SSC bei 65 °C gewaschen. Es folgten ein weiterer Waschschrift von zehn Minuten in 0,2 x SSC bei Raumtemperatur sowie ein Waschschrift von zehn Minuten in PBS. Um unspezifische Bindungsstellen auf dem Gewebe zu blocken, wurden die Schnitte für zwei Stunden in 1 %iger Block-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-DIG Antikörper (1:1000) in Block-Lösung über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde am nächsten Tag in drei 15-minütigen Waschschriften in PBS entfernt. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift in PBS-Tween. Die Schnitte wurden für die enzymatische Färbereaktion in Alkalische-Phosphatase Puffer äquilibriert, mit dem Substrat inkubiert und die Färbereaktion gestartet. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde Fast Red/HNPP-Lösung (Roche) verwendet. Die Färbereaktionen wurden alle 15 Minuten mikroskopisch kontrolliert und bei gewünschter Färbeintensität die enzymatische Reaktion durch einen Waschschrift mit PBS-Tween abgestoppt. Die Schnitte wurden in Fluoromount G eingedeckelt und an einem Axio Observer Z1-Mikroskop (Zeiss) analysiert.

Verwendete Puffer der in-situ-Hybridisierung

Hybridisierungslösung :	50 %	Formamid
	5 x	SSC (20 x)
	5 x	Denhardt-Solution (50 x; Sigma-Aldrich)
	500 µg/ml	herring sperm DNA (10 mg/ml)
	250 µg/ml	yeast tRNA (10 mg/ml)
	Ad 50 ml	DEPC-H ₂ O
20 x SSC (pH 7,0):	3 M	Natriumchlorid
	300 mM	Trinatrium-Citrat x 2 H ₂ O
Maleinsäurepuffer (pH 7,5):	120 mM	Maleinsäure
	150 mM	Natriumchlorid
Block-Lösung:	1 % Blocking-Reagent (Roche) in Maleinsäurepuffer	
PBS:	1,7 M	Natriumchlorid
	34 mM	Kaliumchlorid
	111 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	18,4 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
(PBS-Tween):	0,1 %	Tween [®] 20
Alkalische- Phosphatase-Puffer:	100 mM	Tris-HCl (aus 1M Stock; pH 9,5)
	100 mM	Natriumchlorid
	50m M	Magnesiumchlorid
	1,2 mg/ml	Levamisol
	0,2 %	Tween [®] 20

2.3 Microarray-Analyse

Die Durchführung und Analyse der Microarrays erfolgte durch das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg).

2.3.1 RNA-Extraktion und Analyse

Für die Microarray-Analyse wurde lumbales Rückenmark (L4-L5) von Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen (naiv und sieben Tage nach der SNI-Operation) verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen), wie oben beschrieben. Die folgenden Schritte wurden anschließend von dem DKFZ durchgeführt. Die Qualität der RNA wurde mit einem RNA Nano Chip Assay mit einem Agilent 2100 Bioanalyser überprüft, der den Vorteil einer schnellen Analyse mit geringem Probenverbrauch hat. Nur Proben, die einen RNA-Index von 8,5 oder höher zeigten, wurden für die weitere Analyse verwendet. Die RNA-Konzentration wurde durch einen NanoDrop Spektrometer bestimmt.

2.3.2 Proben-Markierung und Array-Hybridisierung

Die Markierung der cRNA-Proben für die Hybridisierung des Illumina Mouse Sentrix-6 BeadChip Arrays wurde nach einem veränderten Protokoll nach Eberwine durchgeführt (Eberwine u. a., 1992). Für die cDNA-Synthese wurden 250-500 ng Gesamt-RNA eingesetzt und diese als Ausgangsmaterial für die Synthese der Biotin-markierte-cRNA verwendet. Hierzu wurde das MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion) sowie Biotin-16-UTP (Roche) verwendet. Die cRNA wurde über eine Säule unter Verwendung des Illumina[®] TotalPrepTM RNA Amplification Kit (Ambion) aufgereinigt und in 60-80 µl Wasser aufgenommen. Die Qualität der cRNA wurde mittels eines RNA Nano Chip Assays mit einem Agilent 2100 Bioanalyzers sowie mit einem NanoDrop Spektrometer überprüft.

Die Hybridisierung der cRNA auf den Illumina Mouse Sentrix-6 Bead Chip erfolgte bei 58 °C in dem GEX-HCB-Puffer (Illumina) bei einer Konzentration von 100 ng cRNA/µl in nicht-verschlossenen befeuchteten Kammern für 20 Stunden. Cy3-markierte Hybridisierungskontrollen mit einer geringen, einer mittleren und einer hohen Konzentration, Negativ-/Mismatch-Kontrollen sowie Positiv-/Biotin-Kontrollen wurden berücksichtigt. Anschließend folgte ein Waschschrift in ‚High Temp Wash‘-Puffer (Illumina) bei 55 °C und zwei weitere Waschschrte in E1BC-Puffer (Illumina) bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Die Microarrays wurden für fünf Minuten in 1 % (wt/vol) BlockerTM Casein in PBS Hammarsten-Grade (Pierce Biotechnology) blockiert und die Array-Signale durch Inkubation mit 1 µg/ml Cy3-Streptavidin-Lösung (Amersham Biosciences) und 1 % Block-Lösung für zehn

Minuten entwickelt. Die Arrays wurden ein weiteres Mal in E1BC-Puffer gewaschen, getrocknet und gescannt.

2.3.3 Array-Scan und Datenanalyse

Die Microarrays wurden per BeadStudio Array Scanner mit einem ‚Scaling‘-Faktor von eins und einem Photomultiplikator- (PMT) Setting von 430 gelesen. Die Daten-Extraktion erfolgte für alle Beads einzeln und Ausreißer mit einer absoluten Median-Abweichung größer als 2,5 wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. Alle verbleibenden Datenpunkte wurden für die Kalkulation des Durchschnittssignals für eine bestimmte Probe herangezogen und die Standardabweichung für jede Probe berechnet. Für die Normalisierung der Daten wurde der quantile Normalisierungs-Algorithmus ohne Hintergrund-Subtraktion verwendet. Die Genregulation wurde durch Kalkulation der unterschiedlichen Standard-Abweichung einer bestimmten Probe und einem eins-zu-eins Vergleich der Proben der verschiedenen Gruppen analysiert.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Western Blot

2.4.1.1 Proteinextraktion

Die Extraktion der Proteine aus murinen Rückenmark, DRGs oder dem *N. ischiadicus* erfolgte in PhosphoSafe™ (Novagen). Zur Hemmung der Proteasen wurde der Protease-Inhibitor Mix Complete (Roche) direkt vor Verwendung den Puffer zugegeben. Erfolgte die Aufbereitung in dem PhosphoSafe™-Puffer, wurden die Proben auf Eis gepottert und anschließend für eine Stunde bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Hierbei handelt es sich um eine photometrische Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Dieser Farbstoff bildet in saurer Lösung mit den Proteinseitenketten Komplexe. Dabei verschiebt sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm und kann zur photometrischen Bestimmung des Proteingehalts herangezogen werden. Die Messung erfolgte in einer 96-Well Mikrotiterplatte™. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden wurde eine verdünnte BSA-Lösung verwendet. Die Proteinproben wurden

mit H₂O 1:50 verdünnt und 50 µl der verdünnten Proben sowie die Standards der Eichgerade in die Mikrotiter-Platte gegeben und jeweils mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Messung der Absorption erfolgte nach fünf-minütiger Inkubation mit einem Spectrafluor Plus[®]-Instrument und der X-Fluor[®] Software.

2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PADE). In Gegenwart von SDS denaturieren Proteine und werden mit einer negativen Ladung versetzt, die proportional zur Molekülmasse ist. Somit ist eine Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße in Richtung Anode möglich. Die Auftrennung erfolgte in einem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean[®] Tetra System (BioRad). Hierzu wurden 1 mm dicke Gele angefertigt, die aus einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem feinporigen 10, 12 bzw. 14 %igem Trenngel (pH 8,8) bestanden. Je 20 bzw. 30 µg der Proteinproben wurden mit 4 x Lämmli-Puffer versetzt und 30 Minuten bei 37 °C in einem Thermomixer denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Precision Plus Protein[™] Dual Color (BioRad) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte die ersten zehn bis 15 Minuten bei einer Spannung von 80 V und anschließend bei einer konstanten Spannung von 120 V.

Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Lämmli-Puffer (4x):	0,2 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	10 %	SDS
	40 %	Glycerol
	0,004 %	Bromphenolblau
	20 %	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
SDS-Laufpuffer	25 mM	TrisBase
	0,2 M	Glycin
	0,1 %	SDS
Trenngel	10-14 %	Acrylamidlösung
	375 mM	TrisHCl (pH 8,8)
	0,1 %	SDS
	0,05 %	APS
	0,05 %	TEMED

Sammelgel	3 %	Acrylamidlösung
	125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	0,1 %	SDS
	0,05 %	APS
	0,05 %	TEMED

2.4.1.4 Western Blot und Antikörper-Inkubation

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran (PROTRAN[®]; Whatmen) transferiert. Die für das Blot-Sandwich benötigten Schwämme, Filterpapiere und die Membran wurden in dem Transferpuffer äquilibriert und das Blot-Sandwich wie folgt zusammen gesetzt: Kathode, Kunststoffgitter, ein Schwamm, ein Filterpapier, Membran, Gel, ein Filterpapier, ein Schwamm, Kunststoffgitter, Anode. Der Transfer erfolgte in einer MiniTrans-Blot[®] Blottingapparatur bei konstanter Spannung von 100 V für 65 Minuten. Direkt im Anschluss wurde der Proteintransfer mit Hilfe einer Ponceau-S Färbung kontrolliert. Hierzu wurden zurückgebliebene Gelreste auf der Membran mit H₂O entfernt und die Membran anschließend für zehn Minuten in einer Ponceau-Lösung inkubiert. Die Färbung wurde mittels Fotokopie dokumentiert und die Membran durch Waschen in PBS entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde in Odyssey-Blockpuffer geblockt und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern in der Odyssey-Antikörper-Lösung auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Membran wurde dreimal in PBS-Tween gewaschen und mit dem entsprechenden Infrarot-Farbstoff gekoppelten Sekundär-Antikörpern inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrte in PBS-Tween und ein Waschschrte in PBS. Die Membran wurde mit einem Odyssey[®] Infrared Scanner gescannt und so die entsprechenden Proteine detektiert.

Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot

Transferpuffer:	48 mM	TrisBase
	39 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,0037 %	SDS
Ponceau-Lösung:	3 %	Trichloressigsäure
	0,1 %	Ponceau-S
Odyssey-Blockpuffer:	50 %	Odyssey [®] Puffer in PBS

Odyssey-Antikörper-Puffer: 50 %

Odyssey® Puffer in PBS-Tween

Verwendete Antikörper im Western Blot

Antikörper		Verdünnung	Spezies	Hersteller
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	(GAPDH)	1/2000	ms	Ambion
Myelin Protein Zero	(MPZ)	1/500	ch	Neuromics
Neurofilament Light Chain	(NFL)	1/500	ms	Cell Signaling
Peripheral Myelin Protein 22	(Pmp22)	1/500	rb	Abcam
Sestrin 2	(Sens2)	1/200	rb	Protein Tech

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten**2.4.2.1 Gewebepräparation**

Um die Lokalisation von Proteinen in den untersuchten Geweben zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten angefertigt. Hierzu wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und fünf Minuten in PBS-TritonX-100 (0,1 %) permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Schnitte in Blockierungspuffer (3 % BSA, 10 % NGS bzw. NDS in PBS) für 30 Minuten geblockt. Die Primärantikörper wurden entsprechend in einer 3 %igen BSA-Lösung (in PBS) verdünnt und über Nacht auf den Gewebeschnitte inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte in PBS und eine fünf-minütige Inkubation in 0,06 % Sudanschwartz (in 70 % Ethanol), um die Lipofuszin-Eigenfluoreszenz des Gewebes zu reduzieren (Schnell u. a., 1999). Überschüssige Sudanschwartz-Lösung wurde durch mehrmaliges Waschen in PBS entfernt und die Schnitte schließlich in Fluoromount-G (Southern Biotech) eingedeckelt.

Einige der Schnitte wurden mit dem AF488-gekoppelten *Griffonia simplicifolia* Isolectin B4 (IB4) gefärbt. Die Inkubation von IB4 erfolgte zusammen mit den Sekundärantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper		Verdünnung	Spezies	Hersteller
Allograft inflammatory factor 1	(Iba1)	1/500	rb	Wako
Glial fibrillary acidic protein	(GFAP)	1/500	rb	Sigma
Myelin Protein Zero	(MPZ)	1/500	ch	Neuromics
Neurofilament 200	(NF200)	1/1000	ms	Sigma
Protein S100 a 10	(S100)	1/1000	rb	Sigma
Substanz P	(SubP)	1/200	rt	BD

2.4.2.2 Analytische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die analytische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem Axio Observer Z1-Mikroskop (Zeiss), das mit einer monochromen CCD-Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) und einem ZeissApoTome ausgestattet war, und der AxioVision 4.7.2-Software. Die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgte mit den entsprechenden Filtern. Bilder von doppelt gefärbten Schnitten wurden mit Hilfe der Software übereinander gelagert. Die Bearbeitung von Helligkeit und Kontrast erfolgte mittels der Adobe Photoshop CS-Software. Die weiteren Auswertungen erfolgten mit der Software ImageJ (MacBiophotonics).

Quantifizierung der Mikroglia-Reaktion

Zur Quantifizierung der Mikroglia-Reaktion nach peripherer Nervenverletzung wurden zum einen Iba1-positive Zellen manuell ausgezählt. Zum anderen erfolgte eine Quantifizierung über die ImageJ Software. Hierzu wurde für jedes Bild der ‚Color Threshold‘ angeglichen, indem der Bereich der ‚Brightness‘ auf 100-255 festgelegt wurde und die Bilder mit schwarzem Hintergrund angezeigt wurden. Anschließend erfolgte die Konvertierung der Bilder auf 8-bit. Die eigentliche Quantifizierung des Signals wurde mit Hilfe der ‚Plugin‘-Funktion ‚Particle Analysis/Nucleus Counter‘ durchgeführt. Hierzu wurde die ‚smallest Particle Size‘ auf 50, die ‚Largest Particle Size‘ auf 5000 gesetzt und die ‚Threshold Method‘ Otsu gewählt. Das durch die ausgewählten Parameter veränderte Bild gibt das Signal der Mikroglia-Reaktion wider. Zur Auswertung wurde nur die Anzahl der ‚Counts‘ gewertet.

Bestimmung der Zellgröße Nox4-positiver DRG Neurone

Die Zellgröße der Nox4-immunreaktiver DRG Neurone wurde mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt. Es wurde jeweils die Länge eines DRG Neurons mit Hilfe der ‚Straight line selection‘ gemessen, auf den Maßstab bezogen und anschließend in die entsprechende Größe in μm umgerechnet. Die Einteilung der Zellgröße erfolgte zwischen 10 und 25 μm in 5 μm Schnitten. Als Kontrolle wurde außerdem die Zellgröße der NF200 positiven Zellen bestimmt.

2.5 Amplex Red Assay

Zur Bestimmung von H_2O_2 im Gewebe wurde der Amplex-Red Assay (Zhou u. a., 1997; Molecular Probes[®]) verwendet. Die Messung beruht auf der H_2O_2 abhängigen, Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysierten Oxidation von dem nicht-fluoreszierenden N-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazine (Amplex Red) in das fluoreszierende Resorufin (Abbildung 14).

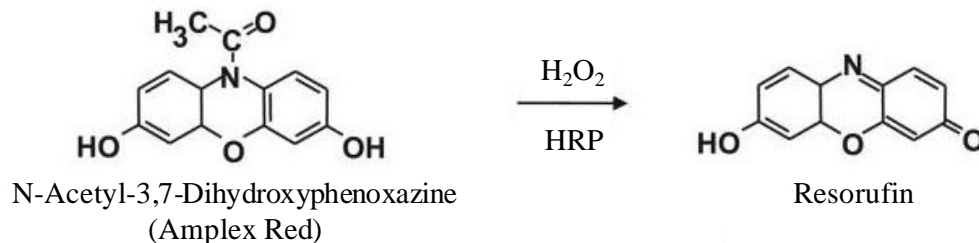


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Amplex Red Reaktion. Durch die HRP-katalysierte Reaktion wird Amplex Red zu Resorufin oxidiert; verändert nach Dikalov u. a., 2007.

Die Bestimmung des Resorufin-Signals erfolgte im Rückenmark, in lumbalen DRGs und im *N. ischiadicus*. Hierzu wurde das Gewebe unmittelbar nach Entnahme in 0,5 M Phosphat-Puffer (pH 7,4), versetzt mit 0,01 M Na-Azid, homogenisiert, zehn Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in eine 96-Well Platte gegeben. Als Standard wurde eine verdünnte H_2O_2 -Konzentrationsreihe von 0 bis 20 μM verwendet. Die ‚Amplex-Red Working Solution‘, bestehend aus 100 μM Amplex Red und 0,2 U HRP in Reaktions-Puffer, wurde auf die Proben gegeben, die Ansätze für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei einer Exzitation von 540 nm die Emission bei 595 nm gemessen. Die Absorptionswerte wurden auf die Proteinkonzentration der Überstandlösung bezogen, welche nach Bradford (siehe 2.4.1.2) bestimmt wurde.

2.6 Statistik und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS Statistics 17.0 für Windows. Um die Normalverteilung innerhalb einer Gruppe zu untersuchen, wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, anschließend erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz mit dem Student's t-Test oder bei einer Gruppenanzahl von größer als zwei mit der einfaktorischen ANOVA mit dem Fisher Post-hoc Test. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Latenzzeiten des Rota-Rod Test wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht und sind dargestellt als Median und Interquartilsabstand.

Die graphischen Darstellungen der Daten enthalten die Mittelwerte der Gruppen mit den jeweiligen Standardfehlern. Für einige Abbildungen der Einleitung und Diskussion wurden einzelne Elemente des Motifolio Biomedical Power Point Tool Kits verwendet.

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
100bp Leiter	Peqlab, Erlangen
1kB Plus-DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Amplex Red	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BM-Purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Carbogen	Linde Gas, Pullach
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Complete Freund's Adjuvant	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Denhardt's Solution (Lyophilized Powder)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
DIG Labeling Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
DNA herring sperm	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
DNase stock solution	Qiagen GmbH, Hilden
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Essigsäure 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fast Red/HNPP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, AL
Formalin (10% Formaldehyd)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gefriermedium	Jung, Leica Microsystems, Bensheim
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isofluran	Abbot GmbH und Co KG, Wiesbaden
Isopropanol 100%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kohlendioxid	Linde Gas, Pullach
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Levamisol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Odyssey Blocking Puffer	Li-COR Odyssey, Bad Homburg
Oligonukleotide	BioSpring, Frankfurt am Main
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
PBS ohne Calcium und Magnesium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphosafe™ Extraction Reagenz	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Precision Plus Protein™ Dual Color	BioRad Laboratories, Kalifornien
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RDD-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
REDExtract	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase Zap	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sudanschwarz B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
TrisBase	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TritonX-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Expression und Funktion der NADPH Oxidase 4 im nozizeptiven System

3.1.1 Expression der NADPH Oxidasen im Rückenmark und in Spinalganglien

Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung von NADPH Oxidasen an der Schmerzverarbeitung wurde die Expression der Isoformen Nox1 bis Nox4 in den „schmerzrelevanten“ Geweben Rückenmark und Spinalganglien von Mäusen mittels Real-time quantitativer RT-PCR untersucht. Wie in Abbildung 15 gezeigt, konnte die mRNA der Isoformen Nox2 und Nox4 sowie der Untereinheit p22^{phox} sowohl im Rückenmark (Abbildung 15 A) als auch in den Spinalganglien (Abbildung 15 B) detektiert werden. Im Rückenmark wurde die Untereinheit p22^{phox} am stärksten exprimiert. In den Spinalganglien wiesen Nox4 und p22^{phox} vergleichbare mRNA-Expressionsstärken auf (Abbildung 15 B). Sowohl im Rückenmark als auch in den Spinalganglien war die mRNA-Expression von Nox1 mit C_T-Werten größer als 35 an der Detektionsgrenze und konnte nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Die mRNA der Isoform Nox3 wurde weder im Rückenmark noch in den Spinalganglien detektiert. Daher wurden die Isoformen Nox1 und Nox3 in weiteren Versuchen nicht berücksichtigt.

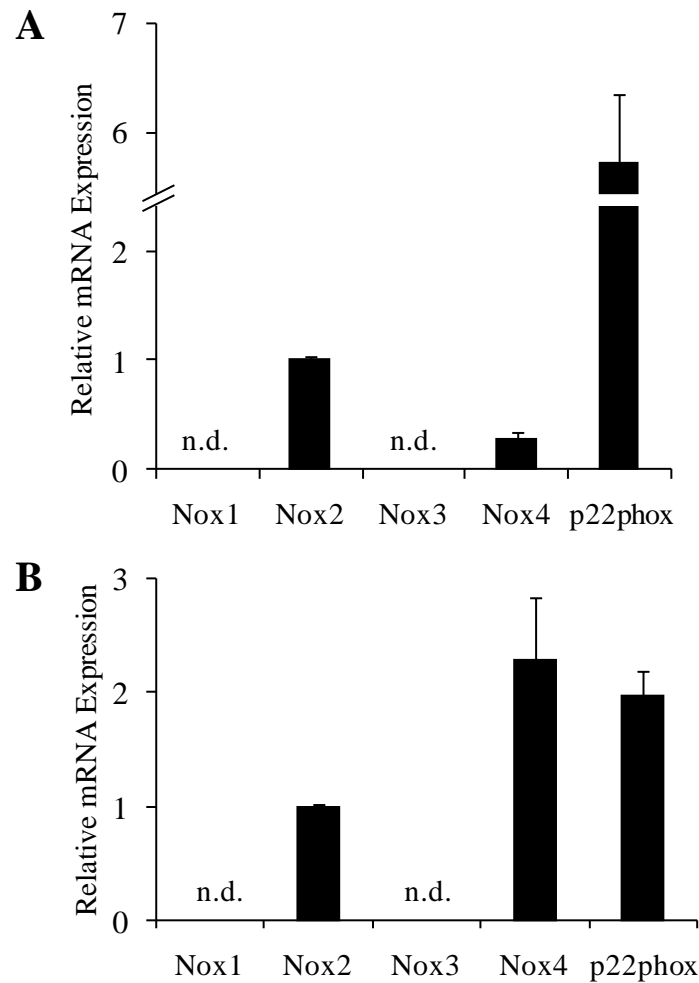


Abbildung 15. Basale relative mRNA-Expression der Nox-Isoformen im Rückenmark (A) und in den Spinalganglien (B). Dargestellt ist die relative Expressionsstärke bezogen auf GAPDH; n = 10 (Rückenmark) bzw. 7 (DRGs); n.d. = nicht detektiert.

3.1.2 Expression der NADPH Oxidasen nach nozizeptiver Stimulation

Um die Rolle der Nox-Isoformen bei der Schmerzverarbeitung genauer zu charakterisieren, wurde die relative mRNA-Expression von Nox2, Nox4 und p22^{phox} im Rückenmark und in den Spinalganglien von Mäusen in inflammatorische und neuropathische Schmerzmodellen untersucht. Als inflammatorisches Schmerzmodell wurde eine Lösung des Hefeextrakts Zymosan A in eine Hinterpfote injiziert und die Expression der Nox-Isoformen vier, acht und 24 Stunden nach der Injektion untersucht (Abbildung 16). Als Referenz wurde Gewebe un behandelter Tiere verwendet. Hierbei zeigte sich, dass im Rückenmark die mRNA der Isoform Nox4 zu allen untersuchten Zeitpunkten stark hochreguliert wurde, während die Nox2-mRNA nur zu einem späten Zeitpunkt (24 Stunden nach Zymosan-Injektion) eine leichte Hochregulation zeigte (Abbildung 16 A). Die relative mRNA-Expression der

Untereinheit p22^{phox} blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Zymosan-Injektion nahezu konstant.

In den Spinalganglien hingegen zeigten die Isoformen Nox2 und Nox4 nur einen leichten aber nicht signifikanten Anstieg in der mRNA-Expression (Abbildung 16 B). Das Level der p22^{phox}-mRNA war zu allen untersuchten Zeitpunkten leicht aber nicht signifikant runter reguliert.

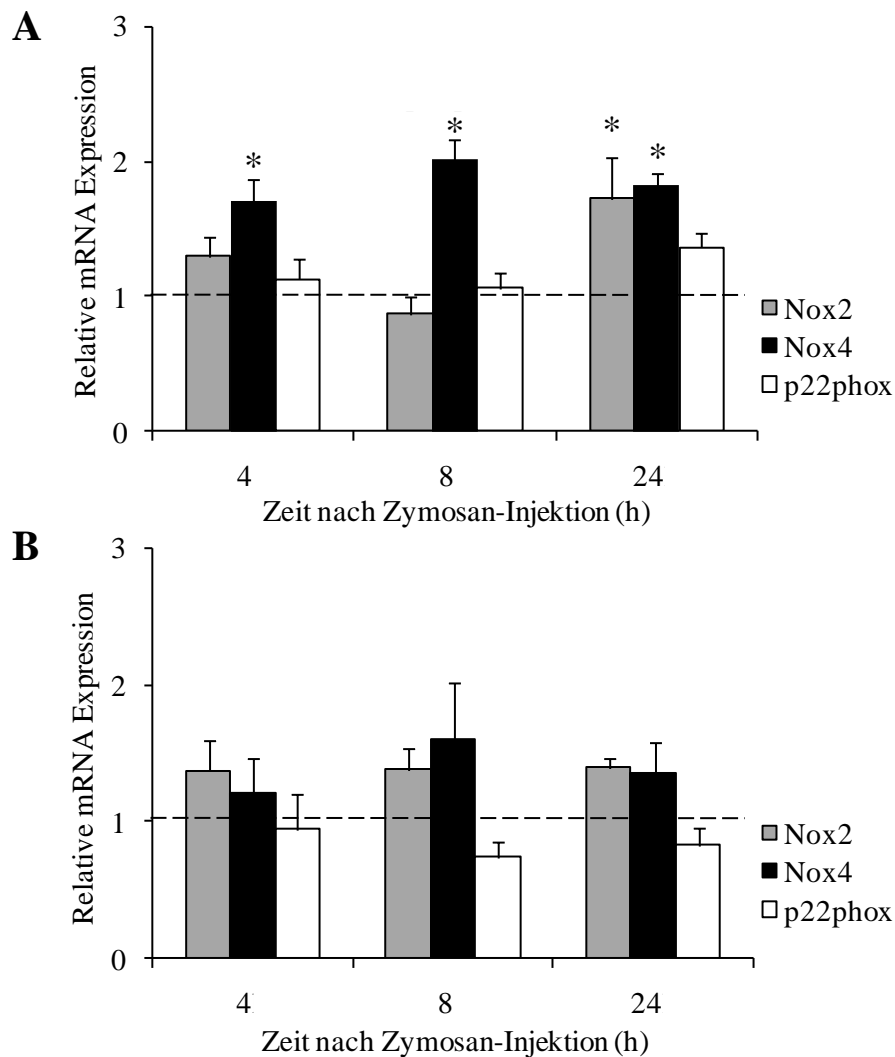


Abbildung 16. mRNA-Expression von Nox2, Nox4 und p22^{phox} im Rückenmark (A) und in den Spinalganglien (B) nach inflammatorischer Stimulation der Hinterpfote mittels Zymosan-Injektion. Die gewählten Zeitpunkte waren vier, acht und 24 Stunden nach Zymosan-Injektion (20 μ l, 10 mg/ml). Als Bezug diente die relative mRNA-Expression in unstimulierten Geweben, die auf „1“ gesetzt wurde (gestrichelte Linie). P < 0,05; n = 4; h = Stunden.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression der Nox-Isoformen in einem neuropathischen Schmerzmodell charakterisiert. Hierzu wurde das SNI-Modell (siehe 2.1.4.5) herangezogen und die relative mRNA-Expression drei, sieben, 14 und 21 Tage nach der SNI-Operation im Rückenmark und den Spinalganglien untersucht (Abbildung 17). Als Referenz wurde auch

hier Gewebe unbehandelter Tiere verwendet. Es zeigte sich, dass im Rückenmark die Nox2-mRNA drei und sieben Tage nach der Operation leicht erhöht war, während die Expression von Nox4 und p22^{phox} zu allen Zeitpunkten nahezu konstant blieb (Abbildung 17 A). In den Spinalganglien hingegen war die mRNA-Expression von Nox2 und p22^{phox} zu allen untersuchten Zeitpunkten stark erhöht, während die mRNA-Expression von Nox4 auch hier nicht reguliert wurde (Abbildung 17 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Nox2 als auch Nox4 an der Schmerzverarbeitung im Rückenmark und in den Spinalganglien beteiligt sein könnten.

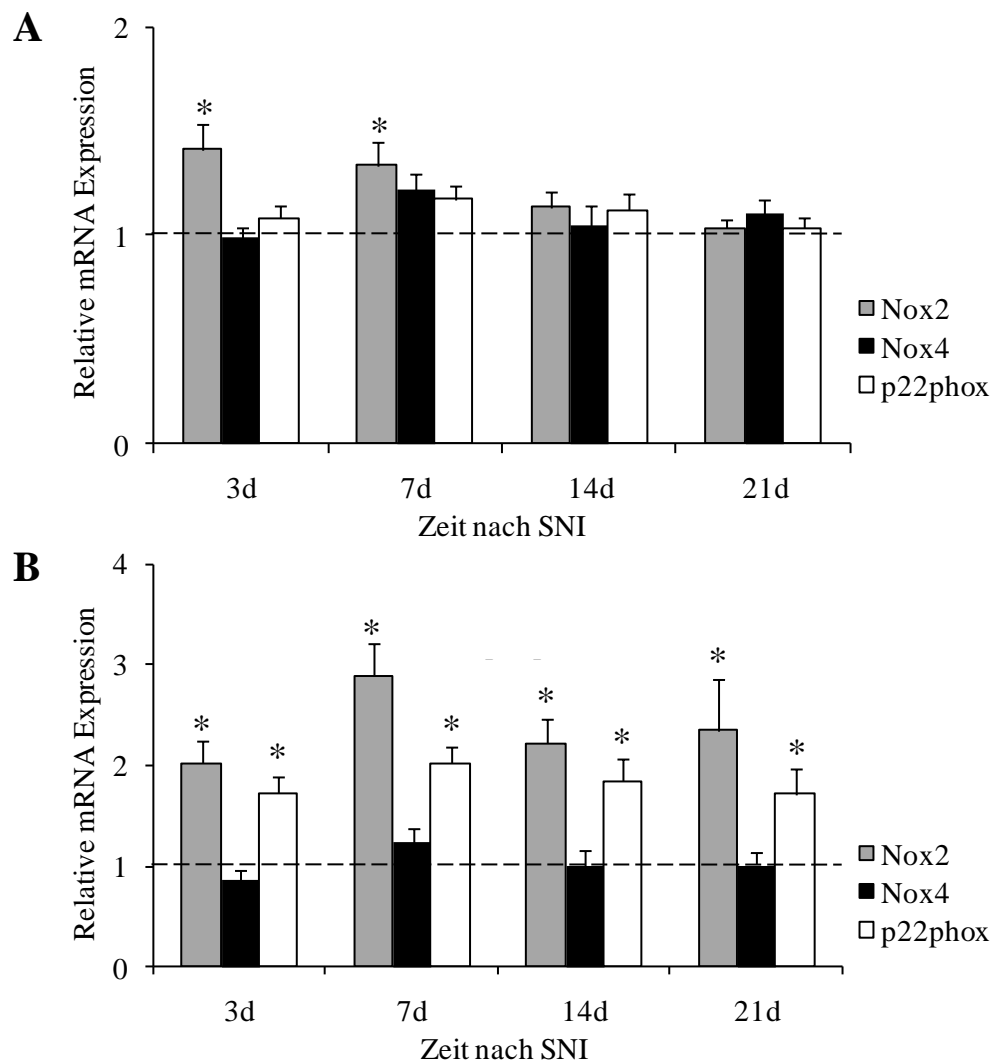


Abbildung 17. mRNA-Expression von Nox2, Nox4 und p22^{phox} im Rückenmark (A) und in Spinalganglien (B) im neuropathischen Schmerzmodell. Die gewählten Zeitpunkte waren drei, sieben, 14 und 21 Tage nach SNI-Operation. Als Bezug diente die relative mRNA-Expression in unstimulierten Geweben, die auf eins gesetzt wurde (gestrichelte Linie); p < 0,05.; n = 6 (Rückenmark) bzw. 4 (DRGs); d = Tage.

3.1.3 Zelluläre Lokalisation von Nox4 in Spinalganglien und im Rückenmark

Da eine Beteiligung von Nox2 in neuropathischen Schmerzen bereits beschrieben wurde (Kim u. a., 2010), wurde die Expression und Lokalisation von Nox4 genauer untersucht. Hierzu wurden zum einen in-situ-Hybridisierungen sowie Immunfluoreszenzfärbungen auf DRG- und Rückenmarksschnitten angefertigt. Immunfluoreszenzfärbungen mit einem spezifischen Nox4-Antikörper zeigten, dass etwa 13 % der Spinalganglien Nox4 exprimieren (Abbildung 18 A und B). Die Nox4-Expression wurde durch Ko-Immunfluoreszenzfärbungen genauer charakterisiert (Abbildung 18 C bis K). Es zeigte sich, dass 68 % der Nox4-positiven Zellen Isolectin B4 (IB4) binden konnten, einen Marker für nicht-peptiderge nicht-myelinisierte primär afferente Neurone. Darüber hinaus zeigten auch etwa 15 % der Nox4-positiven Zellen eine Expression von NF200, einen Marker für myelinisierte primär afferente Neurone. Es konnte jedoch praktisch keine Kollokalisierung von Nox4 und einem Marker für peptiderge primär afferente Neurone (Substanz P) festgestellt werden (Abbildung 18 L). Durch die Bestimmung der Zellgröße der Nox4-positiven Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es sich hierbei überwiegend um kleine bis mittelgroße primär afferente Neurone (10 bis 20 μm) handelt und nur ein geringer Teil der großen DRG-Neurone (ab 20 μm) Nox4 exprimiert (Abbildung 18 M).

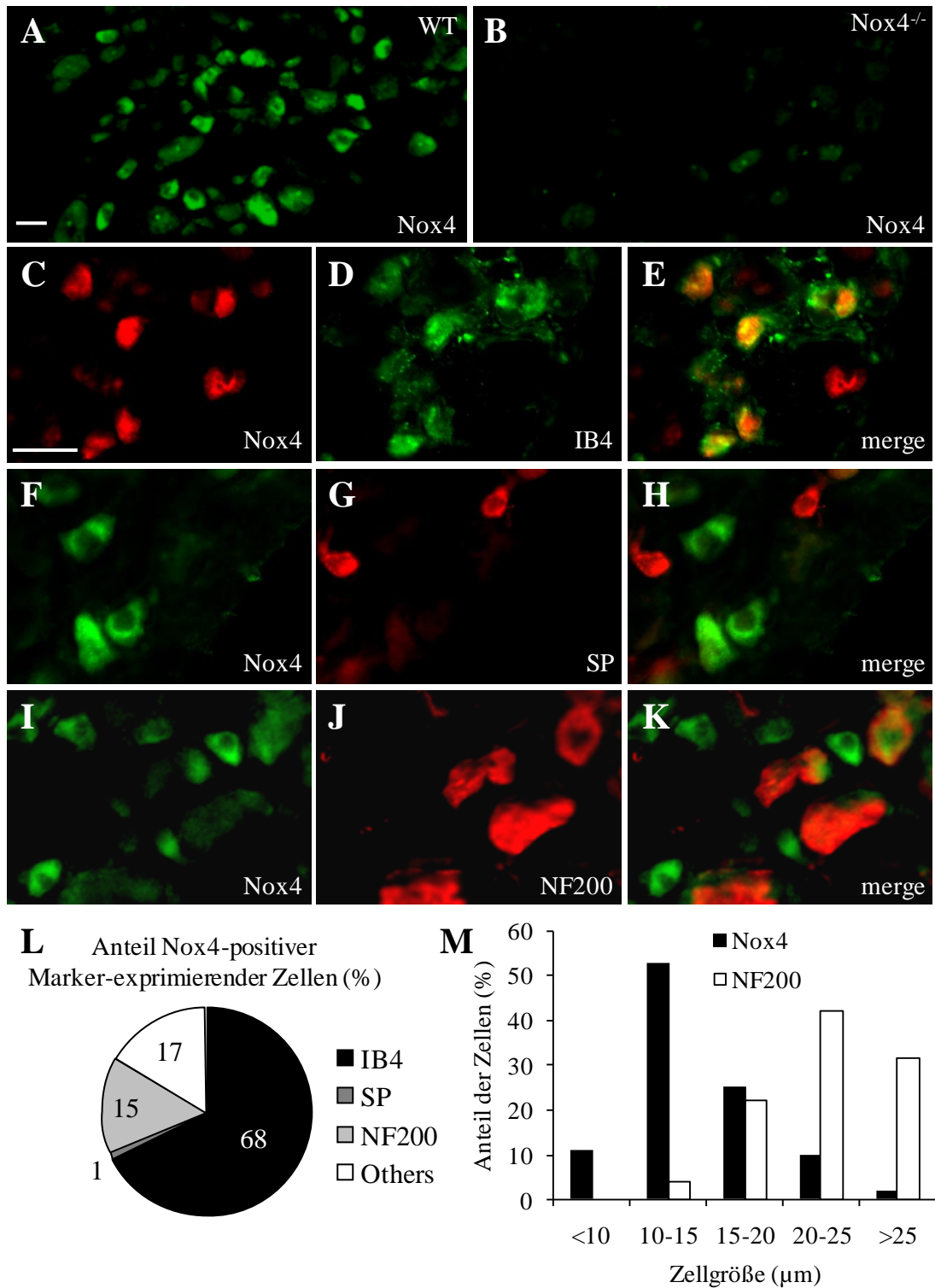


Abbildung 18. Immunhistochemie von Nox4 in Spinalganglien. A. Immunhistochemie mit einem gegen Nox4 gerichteten Primärantikörper auf wildtypischem Gewebe. B. Immunhistochemie von Nox4 auf $Nox4^{-/-}$ -Gewebe. C, F, I. Immunhistochemie mit einem gegen Nox4 gerichteten Primärantikörper. D, G, J. Färbungen mit Isolectin B4 (IB4, nicht peptiderge C-Faser Neurone) oder mit Antikörpern gegen Substanz P (SubP, peptiderge C-Faser Neurone) oder Neurofilament 200 (NF200, myelinisierte primär afferente Neurone). E, H, K. Überlagerung der Immunhistochemie von Nox4 und den jeweiligen Markerfärbungen (merge); eine Kolokalisation ist gelb dargestellt. L. Quantitative Zusammenfassung der Nox4-exprimierenden Zellpopulationen. L. Quantifizierung der Zellgröße Nox4-positiver und NF200-positiver DRG-Neurone. Die Bestimmung der Zellgröße erfolgte mittels der Software ImageJ; Maßstab: 25 μ m.

Immunfluoreszenzfärbungen auf Rückenmarksschnitten zeigten eine intensive Nox4-Immunfluoreszenz insbesondere im Dorsalhorn des Rückenmarks (Abbildung 19 A). Durch Kofärbungen mit Markern für die verschiedenen Laminae des Rückenmarks konnte die Lokalisation der Nox4-Färbung näher eingegrenzt werden (Abbildung 19 B bis K). Es zeigte sich, dass Nox4 insbesondere mit Isolectin B4-positiven Zellen in der Lamina II des Dorsalhorns kolokalisiert ist, passend zu der Beobachtung, dass die Mehrheit der Nox4-exprimierenden DRG-Neurone IB4-positiv ist. Eine Kolokalisation mit Substanz P oder Neurofilament 200 konnte jedoch nicht detektiert werden. Demnach scheint Nox4 im Rückenmark überwiegend in den zentralen Endigungen von primär-afferenten nicht-peptidergen Neuronen exprimiert zu sein, die in der inneren Lamina II terminieren.

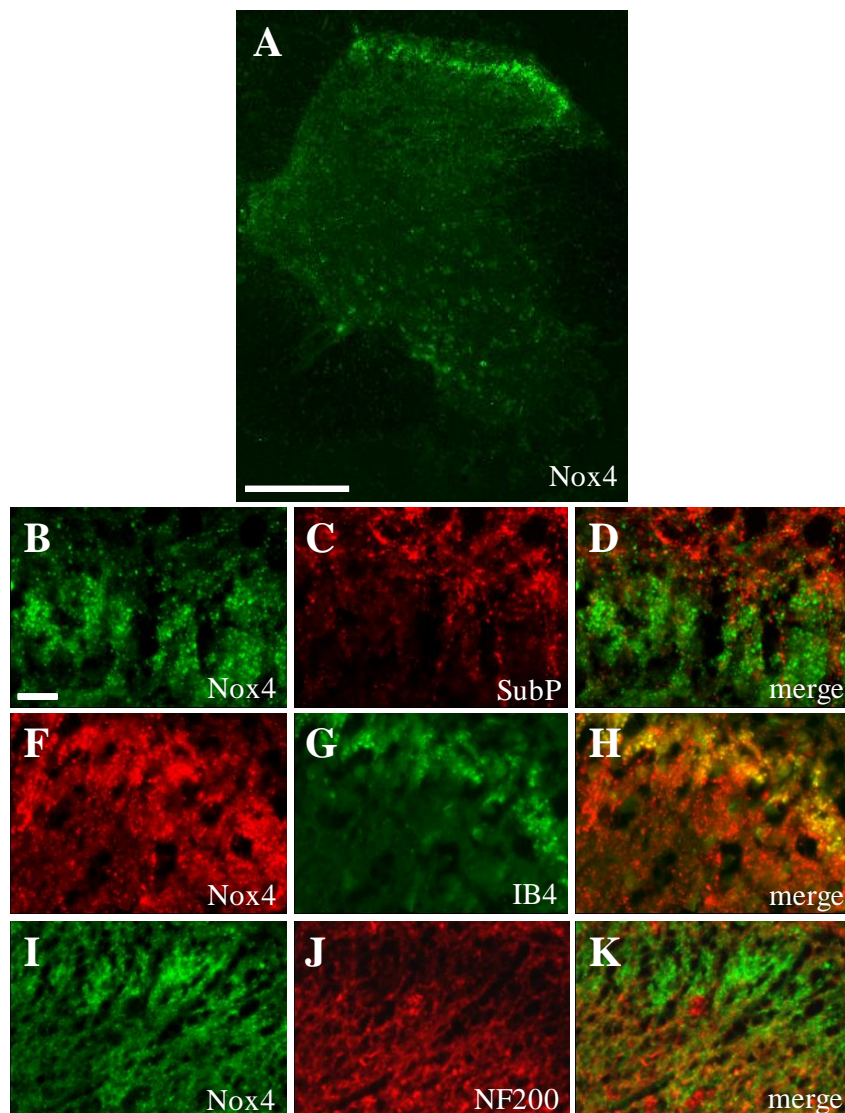


Abbildung 19. Immunfluoreszenzfärbungen von Nox4 mit Marker-Proteinen im Rückenmark. A, B, F, I. Immunhistochemie mit einem gegen Nox4 gerichteten Antikörper. C, G, J. Färbung mit Isolectin B4 (IB4) oder Antikörpern gegen Substanz P (SubP) bzw. Neurofilament 200 (NF200). D, H, K. Überlagerung der Nox4-Färbung mit den jeweiligen Markerfärbungen (merge); eine Kolokalisation ist gelb dargestellt. Maßstab A: 100 µm; B bis K: 20 µm.

Da mittels Real-time quantitativer RT-PCR auch eine Expression von Nox4-mRNA im Rückenmark nachgewiesen wurde, die Immunhistochemie jedoch Nox4-Protein überwiegend in zentralen Nervenendigungen primär afferenter Neurone detektierte, wurde auch die Lokalisation der Nox4-mRNA im Rückenmark mittels in-situ-Hybridisierung untersucht. Es stellte sich heraus, dass Nox4-mRNA im gesamten Rückenmark inklusive des „schmerzrelevanten“ Bereichs des Dorsalhorns exprimiert ist (Abbildung 20 A). Die entsprechende Sense-Sonde als Negativkontrolle zeigte keine Färbung (Abbildung 20 B). Durch Immunfluoreszenzfärbung im Anschluss an die in-situ-Hybridisierung mit einem Marker für Neurone (NeuN) konnte gezeigt werden, dass Nox4-mRNA in Neuronen exprimiert ist (Abbildung 20 C bis E). Die Muster von Doppelfärbungen mit einem Marker für Astroglia (GFAP), deuten darauf hin, dass Nox4 nicht in GFAP-positiven Zellen exprimiert ist (Abbildung 20 F bis H), so dass davon auszugehen ist, dass die Nox4-mRNA im Rückenmark vorwiegend neuronal vorliegt.

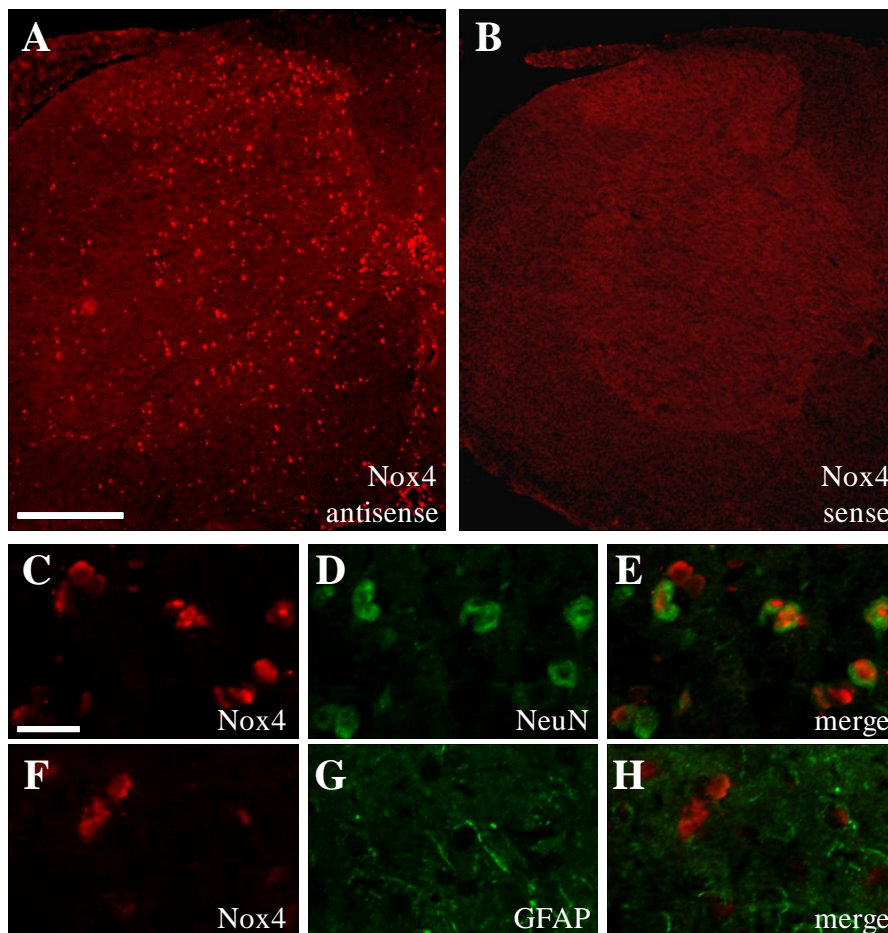


Abbildung 20. In-situ-Hybridisierung von Nox4 auf Rückenmarksschnitten. A. Antisense Sonde gegen Nox4-mRNA. B. Sense Sonde als Negativkontrolle. C bis E. In-situ-Hybridisierung gegen Nox4-mRNA und Immunhistochemie mit einem Antikörper, der gegen NeuN gerichtet ist und anschließender Überlagerung der Bilder (merge). F bis G. In-situ-Hybridisierung gegen Nox4-mRNA und Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen GFAP und anschließender Überlagerung der Bilder (merge). Maßstab A: 250 μ m, C: 20 μ m.

3.1.4 Basale Charakteristika von Nox4^{-/-}-Mäusen

Um die Rolle von Nox4 in der Schmerzverarbeitung weiter zu charakterisieren wurde das nozizeptive Verhalten von Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen untersucht. Nox4^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und vermehrungsfähig. Sie weisen eine normale Körpergröße auf und zeigen keine schwerwiegenden körperlichen oder verhaltenstechnischen Beeinträchtigungen (Zhang u. a., 2010).

3.1.4.1 Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien

Das Rückenmark von Nox4^{-/-}-Mäusen wies, im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern, keine erkennbaren morphologischen Veränderungen auf. Die Größe des Rückenmarks sowie die Größe und Struktur der verschiedenen „schmerzrelevanten“ Laminae des Dorsalhorns waren regelhaft. Des Weiteren schien auch die Verteilung von Neuronen zu Gliazellen im Rückenmark normal zu sein (Abbildung 21 A bis D).

Neben der morphologischen Betrachtung des Rückenmarks wurde auch die Verteilung verschiedener DRG-Neuronen-Populationen in Nox4^{-/-}-Mäusen untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der relativen Häufigkeit der Substanz P, Isolectin B4 und Neurofilament 200 positiven Population in Nox4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet werden (Abbildung 21 E).

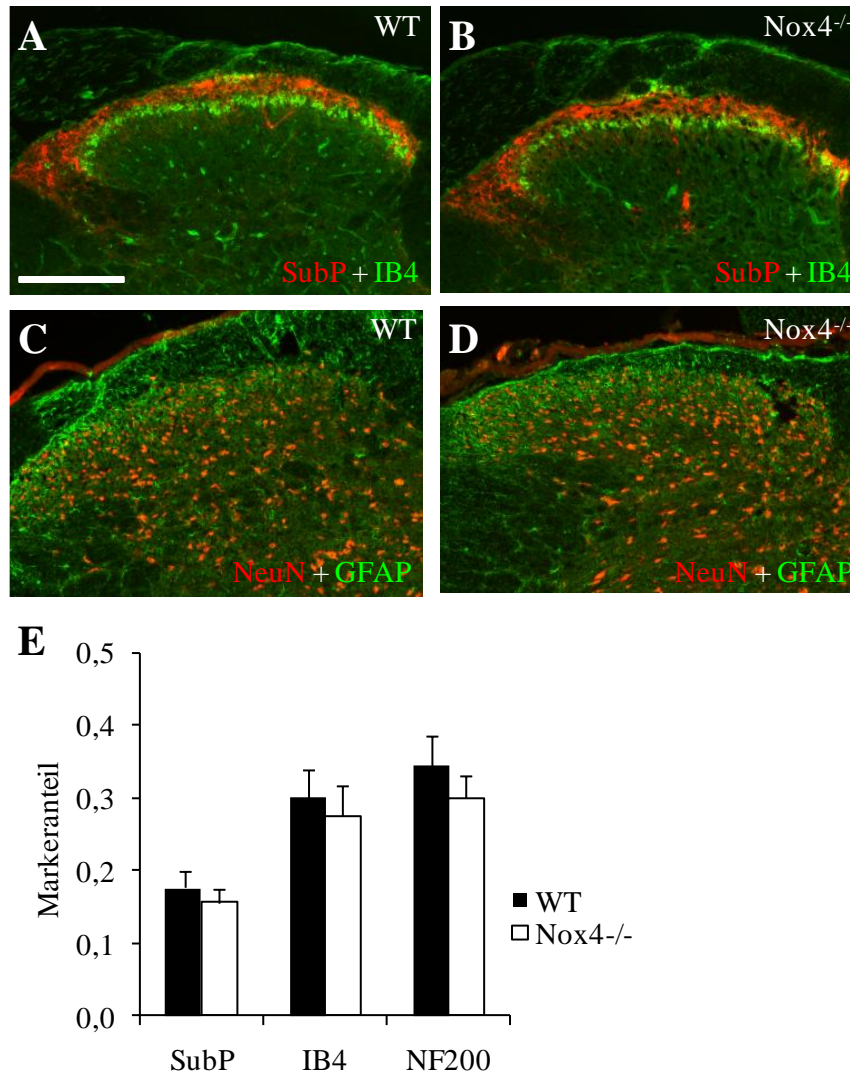


Abbildung 21. Charakterisierung des Rückenmarks und der DRG-Neuronen-Populationen in Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Die Charakterisierung erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen. A bis D. Färbungen des Rückenmarks mit den Markern Substanz P (SubP), Isolectin B 4 (IB4), Neuronal Nuclei (NeuN) und Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen; Maßstab: 200 µm. E. Quantifizierung der DRG-Neuronen-Populationen in Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Es wurde jeweils der Anteil SubP-, IB4- und NF200-positiver Zellen ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

3.1.4.2 Expression der Nox-Isoformen im Rückenmark und DRGs

Um eine mögliche kompensatorische Regulation der anderen Nox-Isoformen in Nox4^{-/-}-Mäusen auszuschließen, wurde die mRNA-Expression von Nox1, Nox2 und Nox3 in Nox4^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern untersucht. Es zeigte sich, dass die Nox2-mRNA-Expression bei Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen sowohl im Rückenmark, in den Spinalganglien als auch im Gehirn vergleichbar ist (Abbildung 22). Nox1- und Nox3-mRNA konnten weder bei Nox4^{-/-}- noch bei Wildtyp-Mäusen verlässlich detektiert werden.

Diese Daten zeigen, dass keine kompensatorische Regulation anderer NADPH Oxidasen in nozizeptiven Geweben von Nox4^{-/-}-Mäusen vorliegt.

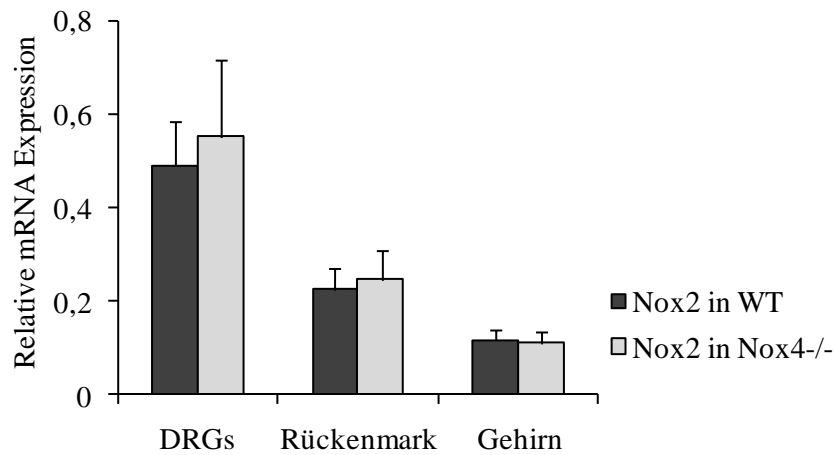


Abbildung 22. Relative Nox2-mRNA-Expression in Nox4^{-/-}-Mäusen. Es wurde die mRNA-Expression im Rückenmark, in Spinalganglien und im Gehirn untersucht; n = 3.

3.1.4.3 Motorische Koordination

Alle Untersuchungen des Schmerzverhaltens an Versuchstieren *in vivo* basieren auf motorischen Reaktionen. Daher ist eine intakte motorische Koordination der Tiere die wichtigste Voraussetzung, um diese in den weiteren Schmerzmodellen zu untersuchen. Die motorische Koordination der Nox4^{-/-}-Mäuse wurde mittels des Rota-Rod-Test (siehe 2.1.3) untersucht. Dieser Test zeigte, dass die motorische Koordination dieser Tiere intakt ist (p = 0,801; Abbildung 23).

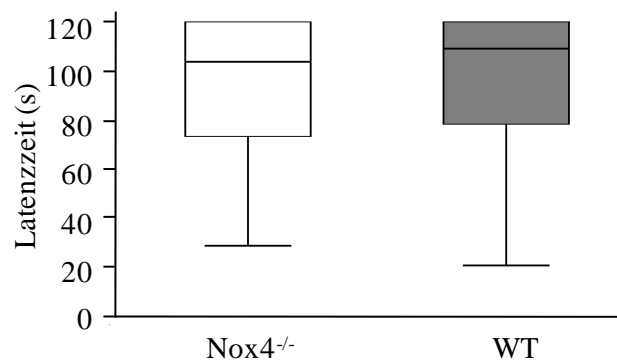


Abbildung 23. Rota-Rod-Test zur Untersuchung der motorischen Koordination von Nox4^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der Median der Latenzzeiten mit dem Interquartilsabstand. Der Cutoff-Wert lag bei 120 s. n = 12.

3.1.5 Nozizeptives Verhalten von Nox4^{-/-}-Mäusen

3.1.5.1 Nozizeptives Verhalten in Modellen für akute Schmerzen

Das akute nozizeptive Verhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse wurde in verschiedenen Modellen für Schmerzen nach thermischer und mechanischer Stimulation untersucht. Hierfür wurde zum einen der Hot-Plate-Test sowie der Cold-Plate-Test verwendet, bei denen die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Reaktion auf einen thermischen Reiz bestimmt wird. Die nozizeptive Reaktion wurde bei 5 °C, 48 °C, 50 °C und 52 °C untersucht. Zum anderen wurde der Dynamic Plantar Test als Modell für Schmerzen nach akuter mechanischer Stimulation verwendet, bei dem die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach einem mechanischen Stimulus bestimmt wird.

Weder in den Tests für Schmerzen nach akuter thermischer Stimulation noch in dem Test für Schmerzen nach akuter mechanischer Stimulation konnte ein Unterschied im nozizeptiven Verhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen festgestellt werden (Abbildung 24). Dementsprechend scheint Nox4 nicht an der Verarbeitung akuter thermischer oder mechanischer Stimulation beteiligt zu sein.

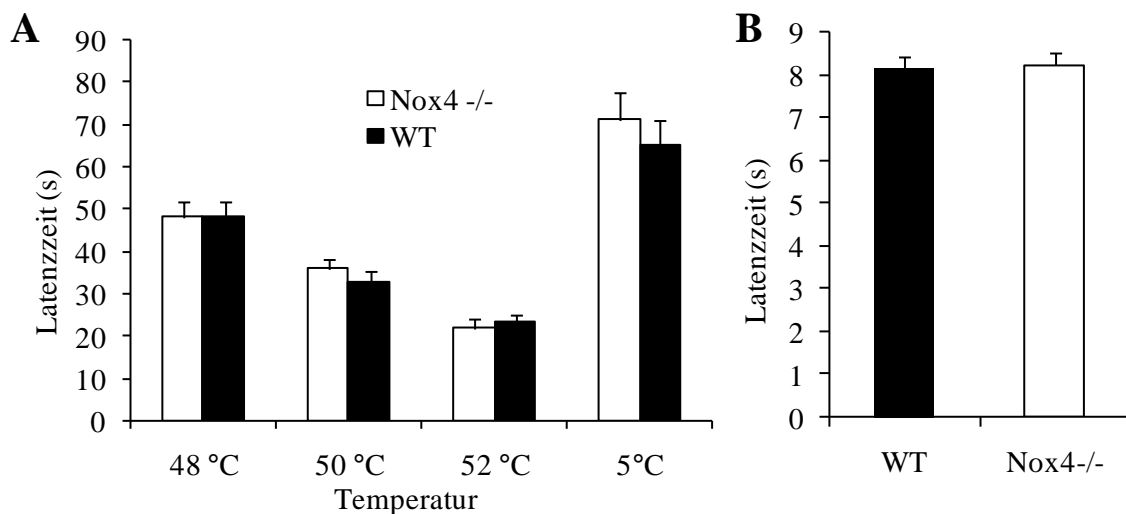


Abbildung 24. Nozizeptives Verhalten von Nox4^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute Schmerzen. A. Hot/Cold-Plate-Test zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption. Die untersuchten Temperaturen betragen 48 °C, 50 °C, 52 °C und 5 °C. n = 12-16. B. Dynamic Plantar Test zur Untersuchung der akuten Nozizeption auf mechanische Stimuli. n = 15-16; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

3.1.5.2 Formalin-Test

Um zu untersuchen, in welcher Weise Nox4 an der nozizeptiven Verarbeitung inflammatorischer Reize beteiligt ist, wurde zunächst der Formalin-Test durchgeführt. In diesem Test wird eine 5 %ige Formalin-Lösung in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert,

die eine zwei-phasische Leckreaktion des Tieres auslöst. Die erste Phase der verstärkten nozizeptiven Antwort (0-10 min) beinhaltet eine Aktivierung von TRPA1-Kanälen (McNamara u. a., 2007), jedoch werden durch relativ hohe Formalin-Konzentration auch andere Nozizeptoren aktiviert (Shields u. a., 2010). Diese erste Phase war in den Nox4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nicht verändert (Abbildung 25). Durch zusätzliche Sensibilisierungsvorgänge im Rückenmark kommt es etwa 15 Minuten nach Formalin-Injektion zu einer zweiten Phase starken Leckverhaltens (11-50 min). Auch in dieser Phase zeigten die Nox4^{-/-}-Mäuse ein sehr ähnliches Verhalten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 25). Es ergab sich kein statistischer Unterschied im Leckverhalten der beiden Genotypen. Diese Daten lassen vermuten, dass Nox4 keine Rolle bei der Sensibilisierungsvorgängen nach Formalin-Injektion spielt.

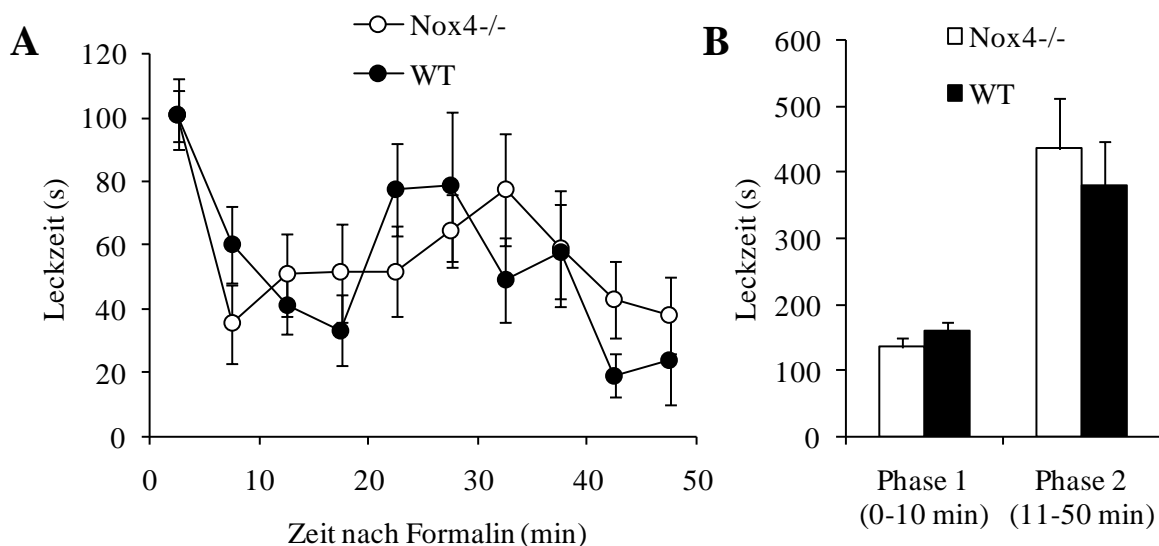


Abbildung 25. Formalin-Test bei Nox4^{-/-}-Mäusen. A. Graphische Darstellung des Zeitverlaufs nach Formalin-Injektion von 0-50 min. B. Darstellung der einzelnen Phasen des Formalin-Tests als Summe des Leckverhaltens. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM; n = 7-8.

3.1.5.3 Mechanische Hyperalgesie in inflammatorischen Schmerzmodellen

Die Rolle von Nox4 wurde in weiteren Modellen für inflammatorischen Schmerzen genauer charakterisiert. Hierzu wurde das Schmerzverhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse im Rahmen der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie untersucht. In diesem Modell wird eine Zymosan A-Lösung in die Plantarseite einer Hinterpfote injiziert. Dies führt zu einer sich langsam entwickelnden Entzündung in der Pfote und damit zu einer zunehmenden Sensibilisierung. Die mechanische Hyperalgesie ist nach fünf bis acht Stunden am stärksten ausgeprägt, danach ist die nozizeptive Antwort rückläufig. Mäuse beider Genotypen zeigten

eine vergleichbare mechanische Hyperalgesie (Abbildung 26 A). Es ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Das Nozizeptive Verhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse wurde in einem weiteren inflammatorischen Modell, der Complete Freund's Adjuvants- (CFA)-induzierten mechanischen Hyperalgesie, untersucht. Im Unterschied zu der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie hält das Schmerzverhalten nach CFA-Injektion in eine Hinterpfote über einen Zeitraum von fast zwei Wochen an. Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied im Schmerzverhalten der beiden Genotypen (Abbildung 26 B). Diese Daten zeigen, dass Nox4 vermutlich keine Rolle bei der Verarbeitung der mechanischen Hyperalgesie nach Zymosan- und CFA-Injektion in eine Hinterpfote spielt.

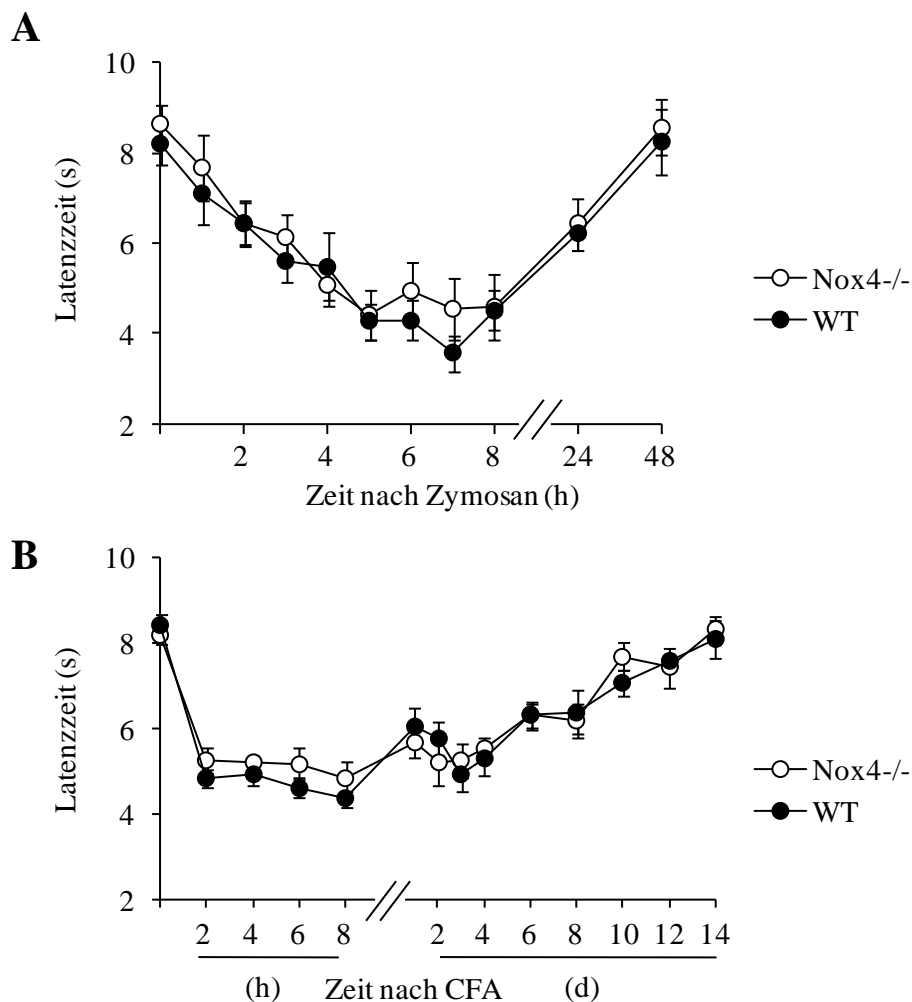


Abbildung 26. Nozizeptives Verhalten von Nox4^{-/-}-Mäusen in Modellen für mechanische Hyperalgesie. A. Test auf mechanische Hyperalgesie nach Injektion einer Zymosan-Lösung in eine Hinterpfote; n = 8. B. Test auf mechanische Hyperalgesie nach Injektion einer CFA-Lösung in eine Hinterpfote; n = 8. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM; h = Stunden, d = Tage.

3.1.5.4 Mechanische Allodynie in neuropathischen Schmerzmodellen

Neben dem Formalin-Test und der Charakterisierung der mechanische Hyperalgesie in inflammatorischen Modellen wurde auch das Schmerzverhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse in neuropathischen Modellen untersucht. Hierzu wurden zwei Modelle herangezogen. Zum einen wurde das Modell der ‚Spared nerve injury‘ (siehe 2.1.4.5) verwendet (Decosterd und Woolf, 2000), bei dem zwei Äste des *N. ischiadicus* durchtrennt werden und nur der *N. suralis* intakt bleibt. Dies führt zu einer Allodynie in der lateralen Seite der Pfote, die etwa zehn Tage nach der Operation zur vollen Ausprägung kommt. In beiden Genotypen entwickelte sich nach sieben bis zehn Tagen eine Hypersensitivität gegenüber mechanischen Stimuli. Interessanterweise war diese mechanische Allodynie bei den Nox4^{-/-}-Mäusen weniger stark ausgeprägt als bei den Wildtypen (Abbildung 27 A). Dieses reduzierte neuropathische Schmerzverhalten war für die Dauer des Versuchs konstant und signifikant ab dem zehnten Tag nach der Operation.

Um die Rolle von Nox4 in neuropathischen Schmerzmodellen zu bestätigen, wurden die Nox4^{-/-}-Mäuse in einem weiteren Neuropathie-Modell untersucht. Hierzu wurde das Modell der ‚Chronic constriction injury‘ verwendet (Bennett und Xie, 1988), bei dem der komplette *N. ischiadicus* im Bereich des Hüftknochens ligiert, jedoch nicht durchtrennt wird. Es kommt zu einer Allodynie, die ebenfalls nach sieben bis zehn Tagen voll ausgeprägt ist. Auch hier entwickelte sich eine Hypersensitivität gegenüber mechanischen Stimuli, die jedoch in den Nox4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen stark reduziert war (Abbildung 27 B). Das reduzierte neuropathische Schmerzverhalten der Nox4^{-/-}-Mäuse war ab Tag zehn nach der Operation bis zum Versuchsende (Tag 35) signifikant. Diese Daten deuten darauf hin, dass Nox4 eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen spielen könnte.

Neben der mechanischen Allodynie wurde auch die Kälteallodynie untersucht. Hier ließen sich jedoch keine reproduzierbaren Daten erzeugen, so dass diese Ergebnisse für die weitere Charakterisierung der Nox4^{-/-}-Mäuse ausgeschlossen wurden.

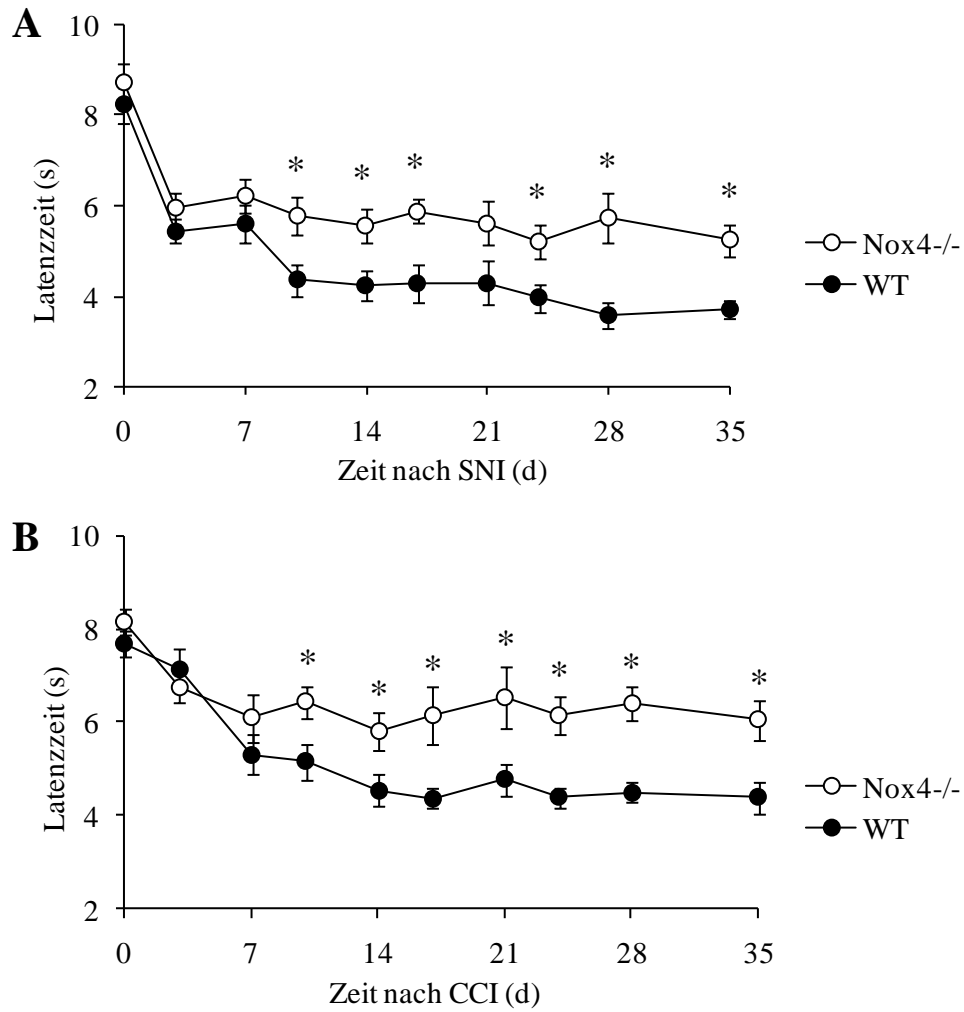


Abbildung 27. Mechanische Allodynie von Nox4^{-/-}-Mäusen. A. Mechanische Allodynie nach peripherer Nervenverletzung mittels ‚Spared nerve injury‘ (SNI); n = 12-15. B. Mechanische Allodynie nach peripherer Nervenverletzung mittels ‚Chronic constriction injury‘ (CCI); n = 12. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. p < 0,05.

3.1.6 Mechanische Allodynie von ERT-Cre^{+/-} Nox4^{fl/fl}-Mäusen

Um die Rolle von Nox4 bei neuropathischen Schmerzen weiter zu charakterisieren, wurde das Schmerzverhalten nach peripherer Nervenverletzung auch in ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäusen untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Nox4-Knockout-Linie, bei der ein Teil des *Nox4*-Gens gefloxed ist und durch Aktivierung der Cre-Rekombinase ausgeknockt wird. Die Cre-Rekombinase ist an eine mutierte Estrogen-bindende Domäne fusioniert und kann durch Gabe von Tamoxifen induziert werden. Die Tiere sind somit bis zur Behandlung mit Tamoxifen wildtypisch. Vorteil dieses Modells ist, dass Störungen während der embryonalen Entwicklung, die in den Knockout-Mäusen eventuell vorliegen, nicht auftreten. Des Weiteren kann durch den Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe die Rolle von Nox4 in neuropathischen Schmerzen genauer charakterisiert werden.

Hierzu wurden ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäuse und ERT-Cre^{-/-}Nox4^{fl/fl}-Mäuse (im Folgenden als Kontrolltiere bezeichnet, da keine Cre-Rekombinase vorliegt) in dem SNI-Modell untersucht. Alle Tiere wurden der SNI-Operation unterzogen und zeigten eine typische Allodynie gegenüber mechanischen Stimuli zehn Tage nach der Operation. Die Tamoxifen-Gabe (1 mg pro Tag) erfolgte anschließend einmal täglich intraperitoneal an den post-operativen Tagen zehn, elf und zwölf, und die mechanische Allodynie wurde weiter charakterisiert. Zwei Wochen nach der ersten Tamoxifen-Applikation zeigten mit Tamoxifen behandelte ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäuse eine Reduktion des neuropathischen Schmerzverhaltens gegenüber den Kontrollgruppen (Abbildung 28 A). Diese Reduktion des Schmerzverhaltens nahm im Laufe des Versuchs weiter zu und war an den Tagen 17 und 21 nach der ersten Tamoxifen-Behandlung signifikant. Als Kontrollgruppen dienten zum einen ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäuse, die mit Vehikel behandelt wurden, zum anderen Kontrolltiere, die mit Tamoxifen behandelt wurden.

Im Anschluss an den Versuch wurden Rückenmark, DRGs und Nieren der Tiere entnommen und die Effizienz des Nox4-Knockouts untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression der Nox4-mRNA im Rückenmark nur leicht reduziert war. In den Spinalganglien hingegen war die Expression der Nox4-mRNA auf etwa 50 % und signifikant zur Vehikel-behandelten Gruppe reduziert. Untersuchungen von Nierengewebe der behandelten Tiere zeigten, dass hier der Nox4-Knockout nahezu komplett war (Abbildung 28 B).

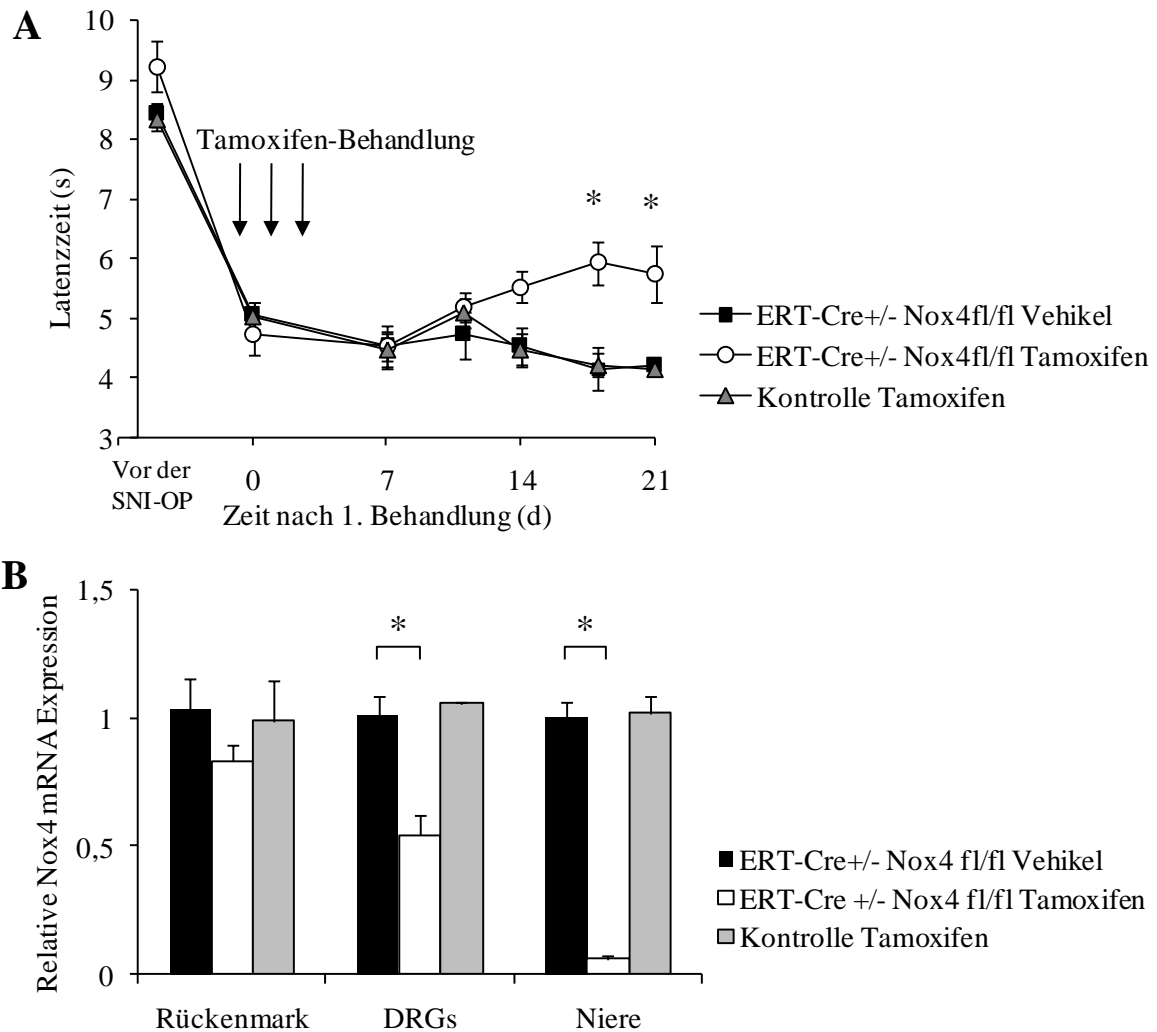


Abbildung 28. SNI-induzierte mechanische Allodynie nach induzierbarem Knockout von Nox4. A. Zeitverlauf der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach mechanischer Stimulation in Tamoxifen-induzierbaren ERT2-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäusen, deren unbehandelten Wurfgeschwistern und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren (ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}). Tamoxifen (1 mg/Tag) wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen ab Tag zehn nach der SNI-Operation verabreicht (durch die Pfeile angezeigt); n = 8-10. B. Nox4-mRNA-Expression im Rückenmark, Spinalganglien und Nieren am Versuchsende (21 Tage nach der ersten Tamoxifen-Behandlung). Die Quantifizierung der Nox4-mRNA Level erfolgte mittels Real-time quantitativer RT-PCR. Eine signifikante Reduktion der Nox4-mRNA-Expression in nozizeptiven Geweben wurde in den Spinalganglien und der Niere detektiert; p < 0,05.

Diese Daten zeigen, dass Nox4 bei der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielen könnte, da durch die späte Ausschaltung von Nox4 während der SNI-induzierten Neuropathie das Schmerzverhalten reduziert wurde. Da nur eine signifikante Reduktion der Nox4-mRNA-Expression im peripheren Gewebe und in den Spinalganglien detektiert wurde, lässt dies vermuten, dass Tamoxifen nicht gut die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Tamoxifen konnte dennoch die mechanische Allodynie in ERT-Cre^{+/-}Nox4^{fl/fl}-Mäusen reduzieren. Somit könnten insbesondere periphere Mechanismen für das reduzierte nozizeptive Verhalten verantwortlich sein.

3.1.7 Effekte von Fulvene-5 auf die SNI-induzierte mechanische Allodynie

Im Jahre 2009 wurde die Substanz Fulvene-5 beschrieben, die eine inhibitorische Wirkung auf Nox4 haben soll. Sie wurde im Zusammenhang mit der Hemmung des Wachstums von Hämangiomen beschrieben, das wiederum abhängig von Nox4 zu sein scheint (Bhandarkar u. a., 2009). Um den Effekt dieser Substanz bei neuropathischen Schmerzen zu untersuchen, wurde das SNI-Modell verwendet. Wildtypische C57Bl/6 Tiere wurden operiert und 14 Tage nach der Operation verschiedenen Konzentrationen von Fulvene-5 intrathekal (i.t.) injiziert (siehe 2.1.6). Es zeigte sich, dass Fulvene-5 dosisabhängig das neuropathische Schmerzverhalten reduzieren kann. Dies war signifikant für zwei, vier und sechs Stunden nach der Injektion der hohen Dosis (0,2 mg) Fulvene-5 (Abbildung 29 A). Um einen negativen Effekt von Fulvene-5 auf die motorische Koordination auszuschließen, wurde diese in nicht operierten Tieren getestet. Es konnte keine Beeinträchtigung der motorischen Koordination nach i.t. Injektion der hohen Dosis Fulvene-5 beobachtet werden. Der Median der Latenzzeiten bis zum Fallen von der sich rotierenden Stange lag sowohl vor als auch nach der Behandlung mit Fulvene-5 bei 120 s. Diese Daten deuten darauf hin, dass Fulvene-5 neuropathische Schmerzen reduzieren kann, ohne die motorische Koordination der Tiere zu beeinträchtigen.

Zur Überprüfung der Spezifität von Fulvene-5 wurde das Schmerzverhalten von Nox4^{-/-}-Mäusen in dem SNI-Modell nach i.t. Behandlung mit Fulvene-5 untersucht. Es stellte sich heraus, dass das neuropathische Schmerzverhalten auch in Nox4^{-/-}-Mäusen durch Fulvene-5 weiter reduziert werden kann (Abbildung 29 B). Dies zeigt, dass Fulvene-5 zwar das Schmerzverhalten der Tiere in neuropathischen Modellen hemmen kann, jedoch die Wirkung dieser Substanz offenbar nicht bzw. nicht vollständig durch eine Inhibierung von Nox4 zustande kommt.

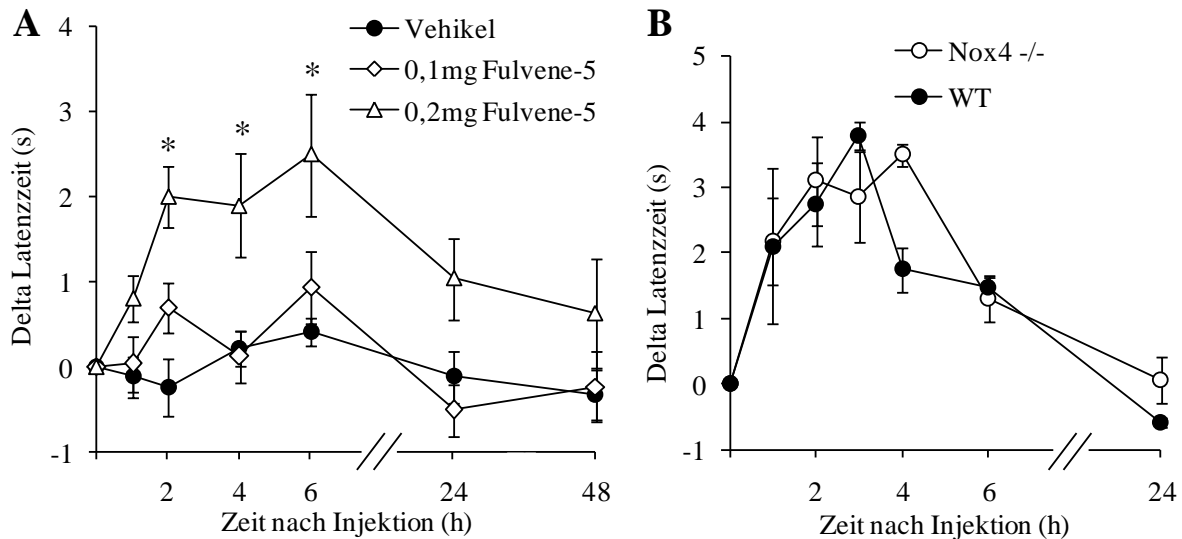


Abbildung 29. SNI-induzierte mechanische Allodynie nach Behandlung mit Fulvene-5. A. Zeitverlauf der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote nach mechanischer Stimulation in C57Bl/6-Mäusen, die mit Fulvene-5 oder Vehikel behandelt wurden. Eine signifikante Reduktion der mechanischen Allodynie wurde nach i.t. Injektion von 0,2 mg Fulvene-5 beobachtet; $n = 6-8$; $p < 0,05$; mittlerer Absolut-Wert zum Startzeitpunkt: 4,4 s. B. Zeitverlauf der mechanischen Allodynie in Nox4^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern nach Behandlung mit 0,2 mg Fulvene-5. Die Behandlung reduzierte die mechanische Allodynie in beiden Gruppen gleichermaßen; $n = 3$. Mittlerer Absolut-Werte zum Startzeitpunkt: 5,0 s. Für die Auswertung wurden die Latenzzeiten zum Startzeitpunkt des Versuchs auf „0“ gesetzt und die weiteren Messwerte auf diesen Punkt bezogen (Delta-Latenzzeit). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM der Delta-Latenzzeiten dargestellt.

3.1.8 Spinale Mikroglia-Reaktion nach peripherer Nervenschädigung

Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der Mikroglia in Rückenmark nach peripherer Nervenverletzung eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielt (Moss u. a., 2007). Nox2^{-/-}-Mäuse zeigen, wie auch die Nox4^{-/-}-Tiere, ein reduziertes neuropathisches Schmerzverhalten (Kim u. a., 2010a). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Aktivierung der Mikroglia in Nox2^{-/-}-Mäusen reduziert ist (Kim u. a., 2010a). Ob dies auch für die Nox4^{-/-}-Mäuse zutrifft, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung mit dem Mikroglia-Marker Iba1 untersucht. Es konnte keine Reduktion in der Anzahl der Iba1-positiven Zellen sieben, zehn und 14 Tage nach der SNI-Operation im Rückenmark der Nox4^{-/-}-Mäuse beobachtet werden (Abbildung 30). Die Anzahl Iba1-positiver Zellen war zu allen untersuchten Zeitpunkten bei Nox4^{-/-}-Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren ähnlich. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass Nox4, im Gegensatz zu Nox2, vermutlich keine Rolle bei der Aktivierung der Mikroglia im Rückenmark spielt.

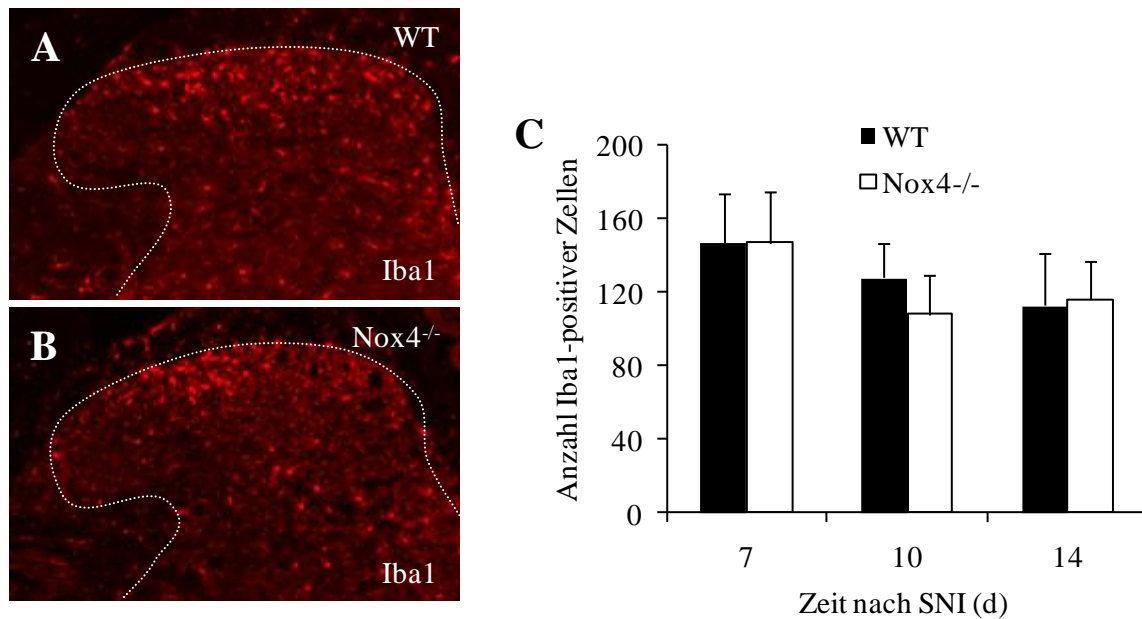


Abbildung 30. Untersuchungen der Mikroglia-Reaktion im Rückenmark. A und B. Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den Mikroglia-Marker Iba1 in Wildtyp- (A) und Nox4^{-/-}-Mäusen (B) 14 Tage nach der SNI-Operation. Die Grenzen der grauen Substanz sind als gestrichelte Linien dargestellt. C. Quantifizierung Iba1-positiver Zellen sieben, zehn und 14 Tage nach der SNI-Operation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; d = Tage.

3.1.9 Genexpressionsprofile von Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach SNI

Um Mechanismen zu identifizieren, die das reduzierte neuropathische Schmerzverhalten der Nox4^{-/-}-Mäusen erklären könnten, wurden Veränderungen der relativen mRNA-Expression des lumbalen Rückenmarks von Nox4^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern sieben Tage nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung untersucht. Hierzu wurde eine Illumina Mouse Sentrix-6 BeadChip Array basierte Gesamt-Genom-Analyse mit über 46.000 Genen durchgeführt. Die Durchführung und primäre Auswertung des Microarrays wurde durch das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) vorgenommen. Gene wurden als reguliert angesehen, wenn sie einen p-Wert kleiner 0,05 und Änderung der Expressionsstärke $> 1,4$ bzw. $< 0,6$ zeigten. Mit diesen Kriterien konnten 109 Gene identifiziert werden, die in Nox4^{-/-}- und/oder Wildtyp-Mäusen nach peripherer Nervenverletzung reguliert waren. Von den 109 regulierten Genen waren 35 Gene sowohl im Wildtyp als auch im Knockout hochreguliert. Ein Gen (*Myosin light polypeptide, Myl1*) zeigte eine Herabregulation im Wildtyp, war jedoch im Nox4-Knockout induziert. Des Weiteren waren 47 Gene nur in Wildtyp-Mäusen und 26 Gene spezifisch in Nox4^{-/-}-Mäusen verändert (Abbildung 31).

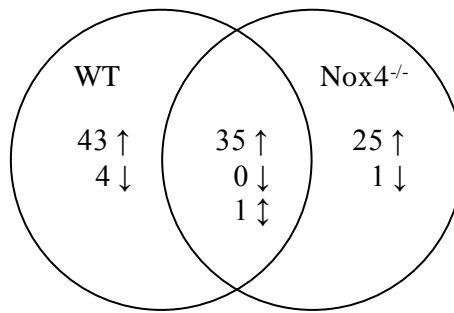


Abbildung 31. Übersicht der Microarray-Analyse. Nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung waren 109 Gene in beiden Genotypen reguliert. Von den 109 regulierten Genen wurden 36 in beiden Gruppen reguliert, während 47 eine spezifische Regulation in Wildtyp zeigten und 26 nur in Nox4^{-/-}-Mäusen verändert waren.

Die Gene, die nach den oben genannten Definitionen eine Regulation zeigten, wurden weiter mit der ‚Ingenuity Pathway Analysis Software‘ (Ingenuity Systems) untersucht. Die fünf Kategorien der physiologischen System-Funktionen, die verändert waren, sind in Tabelle 1 aufgeführt. In Wildtyp-Mäusen war die Funktion ‚Nervous System Development and Function‘ die am signifikantesten veränderte Gruppe. Interessanterweise wurde diese Kategorie in den Nox4^{-/-}-Mäusen nicht unter den fünf stärksten veränderten Gruppen aufgelistet.

Ausgehend hiervon wurden die am häufigsten regulierten Gene der Kategorie ‚Nervous System Development and Function‘ weiter untersucht. Es zeigte sich, dass sehr viele Gene dieser Kategorie, die im Wildtyp eine signifikante Induktion zeigten, in Verbindung mit Myelinisierungsprozessen stehen (Tabelle 2). Hierzu gehören ‚Early growth response 2‘ (*Egr2* auch bekannt als *Krox20*), ‚Myelin protein zero‘ (*MPZ* bzw. *P0*), ‚Nerve growth factor receptor‘ (*NGFR*) und ‚Peripheral myelin protein 22‘ (*Pmp22*). Diese Gene wurden bei Nox4^{-/-}-Mäusen nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung nicht reguliert (Tabelle 3). Von den 109 regulierten Genen konnten noch weitere identifiziert werden, die eine Rolle bei Myelinisierungsprozessen spielen, aber nicht durch die ‚Ingenuity Pathway Analysis Software‘ entsprechend zugeordnet wurden. Hierzu gehören ‚Desert hedgehog‘ (*Dhh*) (Sharghi-Namini u. a., 2006), ‚Periaxin‘ (*Prx*) (Marchesi u. a., 2010) und ‚Peripheral myelin protein 2‘ (*Pmp2*) (Majava u. a., 2010). Auch diese Gene zeigten nur in wildtypischen Tieren eine signifikante Hochregulation, nicht aber in den Nox4^{-/-}-Mäusen (Tabelle 3).

Tabelle 1. Top-5 Kategorien der physiologischen Funktionen regulierter Gene nach der Ingenuity Pathway Analyse

	<u>p-Werte</u>	<u>Gene</u>
<u>Regulierte Kategorien in WT-Mäusen</u>		
Nervous System Development and Function	$5,07 \times 10^{-6} - 8,00 \times 10^{-3}$	19
Hematological System Development and Function	$6,13 \times 10^{-6} - 8,00 \times 10^{-3}$	22
Tissue Morphology	$6,13 \times 10^{-6} - 7,71 \times 10^{-3}$	18
Immune Cell Trafficking	$1,40 \times 10^{-5} - 8,00 \times 10^{-3}$	13
Tissue Development	$5,09 \times 10^{-5} - 8,00 \times 10^{-3}$	18
<u>Regulierte Kategorien in Nox4^{-/-}-Mäusen</u>		
Hematological System Development and Function	$2,23 \times 10^{-6} - 1,22 \times 10^{-2}$	18
Immune Cell Trafficking	$2,23 \times 10^{-6} - 1,22 \times 10^{-2}$	12
Tissue Development	$3,13 \times 10^{-5} - 1,22 \times 10^{-2}$	17
Hematopoiesis	$8,12 \times 10^{-5} - 8,12 \times 10^{-3}$	6
Cardiovascular System Development and Function	$9,74 \times 10^{-5} - 1,22 \times 10^{-2}$	6

Tabelle 2. Top-5 veränderte Funktionen der Kategorie ‘Nervous System Development and Function’ in Wildtyp-Mäusen

<u>Funktionen</u>	<u>P value</u>	<u>Gene</u>
Myelination of neurons	$5,07 \times 10^{-06}$	EGR2*, NGFR*, PMP22*
Myelination of cells	$9,05 \times 10^{-05}$	EGR2*, MPZ*, NGFR*, PMP22*
Neurological process of neurons	$1,84 \times 10^{-04}$	CCL13*, EGR2*, GAL, MPZ*, NGFR*, NPY, PMP22*, XDH*
Neurological process of nerves	$2,08 \times 10^{-04}$	EGR2*, MPZ*, NGFR*
Synaptic transmission of neurons	$2,71 \times 10^{-04}$	CCL13*, GAL, MPZ*, NPY, PMP22*, XDH*

* nur im Wildtyp reguliert

Tabelle 3. Induktion Myelin-assoziiierter Gene im WT

<u>Gen Symbol</u>	<u>Relative Veränderung in WT</u>	<u>Relative Veränderung in Nox4^{-/-}</u>
Mpz*	1,5300	0,9803
Dhh	1,4482	1,1475
Ngfr*	1,4454	1,2767
Pmp22*	1,4451	1,1188
Pmp2	1,4321	0,9390
Prx	1,4180	1,0019
Egr2*	1,4019	1,0223

*Gene, die durch die Ingenuity Pathway Analyse Myelinisierungsprozessen zugeordnet wurden.

Um die Wildtyp-spezifische Regulation der Myelin-assoziierten Gene zu überprüfen, wurde eine Real-time quantitative RT-PCR mit *Mpz*-, *Pmp22*-, *Prx*- und *Egr2*-spezifischen Taqman-Assays durchgeführt. Auch hier konnte eine signifikante Induktion der Expression der untersuchten Gene im wildtypischen Lumbalmark sieben Tage nach der SNI-Operation beobachtet werden, jedoch nicht bei *Nox4*^{-/-}-Mäusen (Abbildung 32). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass myelinisierungs-abhängige Prozesse, die durch periphere Nervenverletzung induziert werden, in den beiden Genotypen unterschiedlich reguliert werden.

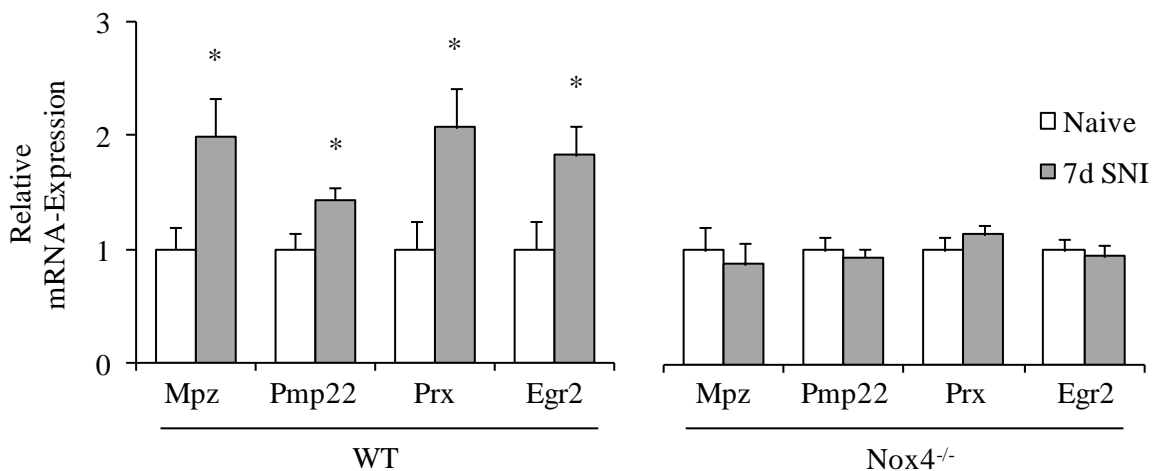


Abbildung 32. Relative mRNA-Expression Myelin-assoziiierter Gene nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung. Die Gene *Mpz*, *Pmp22*, *Prx* und *Egr2* zeigen eine signifikante Induktion sieben Tage nach der SNI-Operation im Wildtyp, nicht aber in *Nox4*^{-/-}-Mäusen; $p < 0,05$; WT = Wildtyp.

3.1.10 Myelinisierungs-Zustand peripherer Nerven nach Schädigung

Verletzungen des peripheren Nervensystems führen zu vielseitigen peripheren und zentralen Veränderungen. Es kommt unter anderem zu Änderungen der Erregbarkeit der primär afferenten Fasern, funktionellen Verschiebungen der A β -Fasern, die fortan auch das Gefühl „Schmerz“ signalisieren, zum Abbau verletzter primär afferenter Fasern, zu einer Reduktion inhibitorischer Signalwege und zu ektoptischer Aktivierung von Nozizeptoren. Des Weiteren können auch strukturelle Veränderungen beobachtet werden. Hierzu gehört beispielsweise der Abbau von Myelin-Resten, die Induktion des axonalen Wachstums, synaptische Remodulierung und anschließende Remyelinisierung (Stoll und Müller, 1999; Costigan u. a., 2009).

Um zu überprüfen, ob die Degeneration der peripheren Nerven proximal der Nervenverletzung in *Nox4*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen verändert ist, wurde der Myelinisierungs-Zustand beschädigten peripheren Nervengewebes in *Nox4*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen untersucht. Hierzu wurde der proximale Teil des *N. ischiadicus* 14 Tage nach SNI-

induzierter Verletzung immunhistochemisch sowie proteinanalytisch untersucht. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Neurofilament 200 (NF200) und gegen einen Marker für Schwann-Zellen (S100) bzw. einen Marker für ein Myelin-Protein (MPZ) zeigten, dass 14 Tage nach der SNI-Operation die Intensität der Schwann-Zell- bzw. Myelin-Färbung in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Nox4^{-/-}-Mäusen deutlich abgeschwächt ist, während die Intensität der Färbung für das Neurofilament gleich blieb (Abbildung 33).

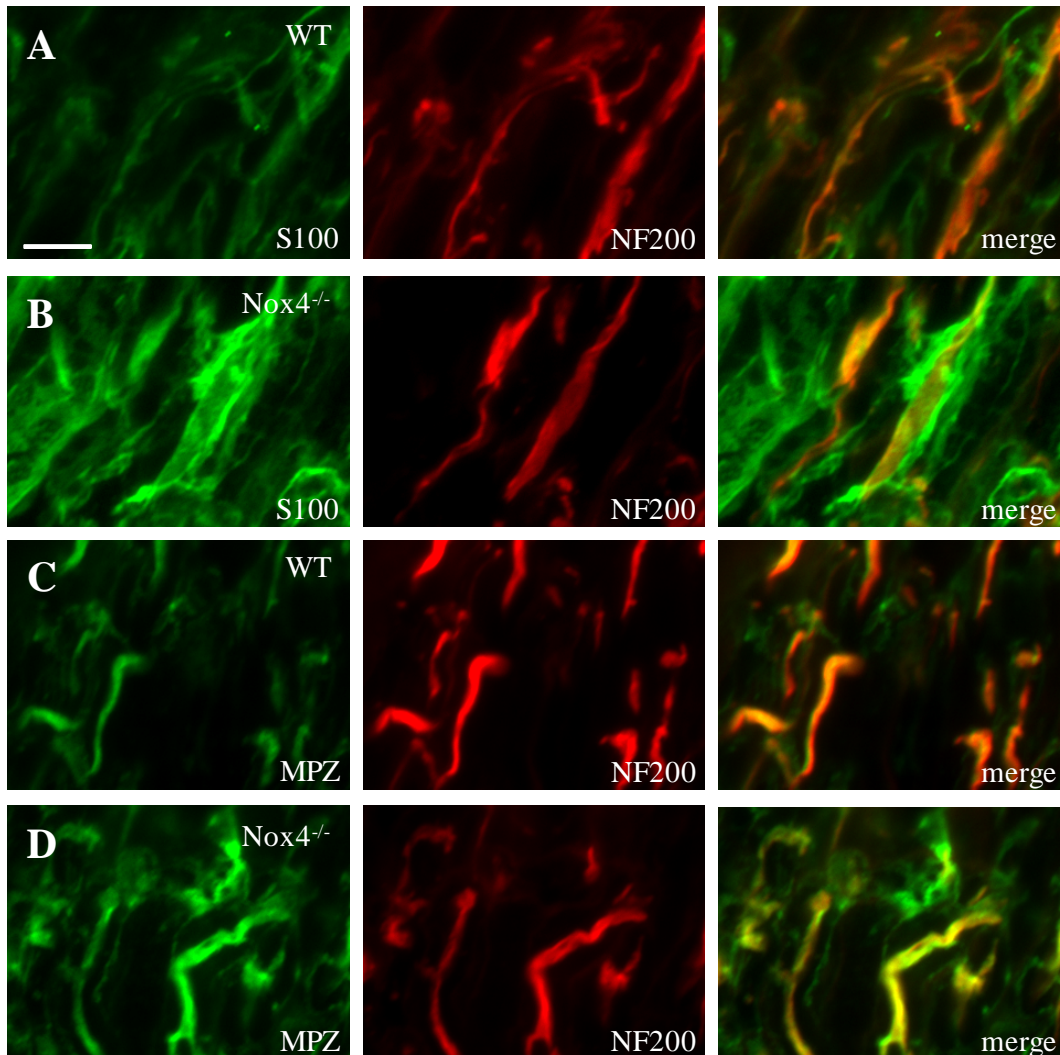


Abbildung 33. Immunhistochemische Färbung des *N. ischiadicus* 14 Tage nach der SNI-Operation in Nox4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. A und B. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen den Schwann-Zell Marker S100 und einen Antikörper gegen das Neurofilament 200 (NF200). C und D. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen das Myelin Protein Zero (MPZ) und den Axon-Marker NF200; merge = Überlagerung der Bilder; Maßstab 10 µm.

Diese Beobachtung konnte weiter mittels Immunblot-Analyse bestätigt werden. 14 Tage nach der peripheren Nervenverletzung wurde im proximalen Teil *N. ischiadicus* die Expressionsstärke des Myelin-Bestandteils Myelin Protein Zero (MPZ) und Peripheral Myelin Protein 22 (Pmp22) analysiert. Es wurde jeweils die operierte ipsilaterale Seite sowie die

nicht operierte kontralaterale Seite untersucht. Es zeigte sich, dass in wildtypischen Tieren die Expressionsstärke sowohl von MPZ als auch von Pmp22 in der ipsilateralen Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite signifikant reduziert war (Abbildung 34). Bei *Nox4*^{-/-}-Mäusen hingegen war keine reduzierte MPZ- oder Pmp22-Expression infolge der peripheren Nervenverletzung zu beobachten.

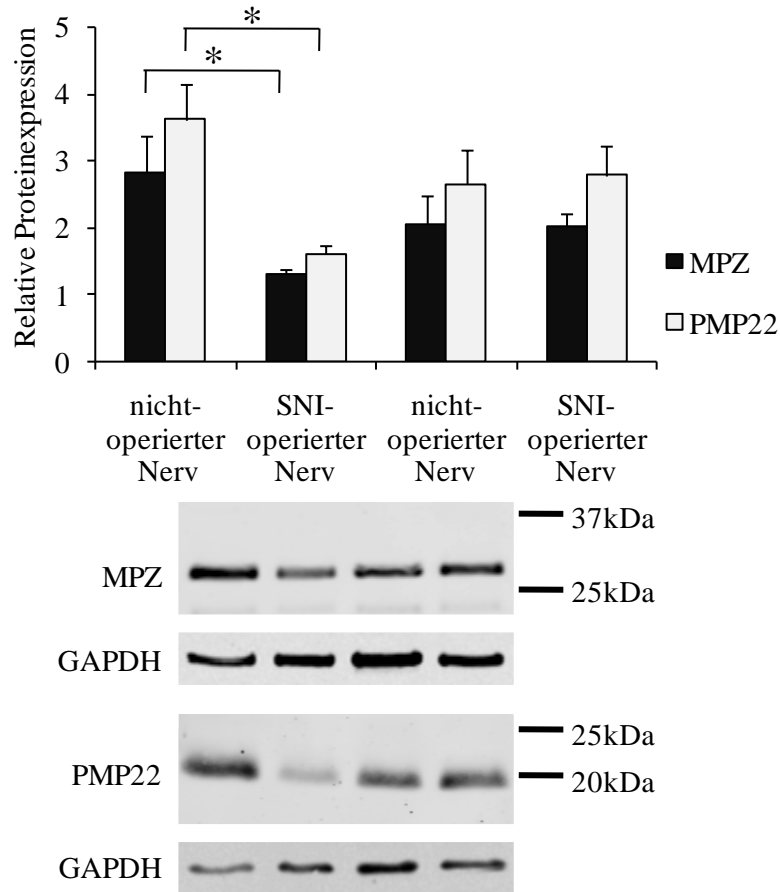


Abbildung 34. Western Blot Analyse der Proteinexpression von MPZ und Pmp22 im *N. ischiadicus* 14 Tage nach der SNI-Operation. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Proteinexpression \pm SEM sowie repräsentative Ausschnitte der Western Blot Banden von MPZ, Pmp22 und GAPDH, welches als Ladungskontrolle verwendet wurde; contra = kontralaterale, nicht operierte Seite; ipsi = ipsilaterale, operierte Seite; n = 3-4; p < 0,05.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Nox4 an der Degradation der Myelinbestandteile in peripheren Nerven nach Verletzung beteiligt ist. Dies könnte zu der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen beitragen und das reduzierte Schmerzverhalten der *Nox4*^{-/-}-Mäuse nach peripherer Nervenverletzung erklären.

3.2 Charakterisierung der Expression und Funktion von Sestrin 2 im nozizeptiven System

Neben dem ROS-generierenden System Nox4 wurde auch die Rolle von Sestrin 2 im schmerzleitenden System untersucht. Sestrine sind essentiell an der Reaktivierung von Peroxiredoxinen beteiligt. Sie tragen somit indirekt zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies in Geweben bei.

3.2.1 Expression von Sestrin 2 im nozizeptiven System

Um zu untersuchen, ob Sestrin 2 (Sesn2) auch eine Rolle bei der Schmerzverarbeitung haben könnte, wurde zunächst die Sesn2-mRNA in den Spinalganglien, im Rückenmark und im Gehirn von naiven C57Bl/6-Mäusen mittels Real-time quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Sesn2-mRNA in allen drei untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte. Die relative Expressionsstärke in den Spinalganglien war hier geringer als im Rückenmark und im Gehirn (Abbildung 35).

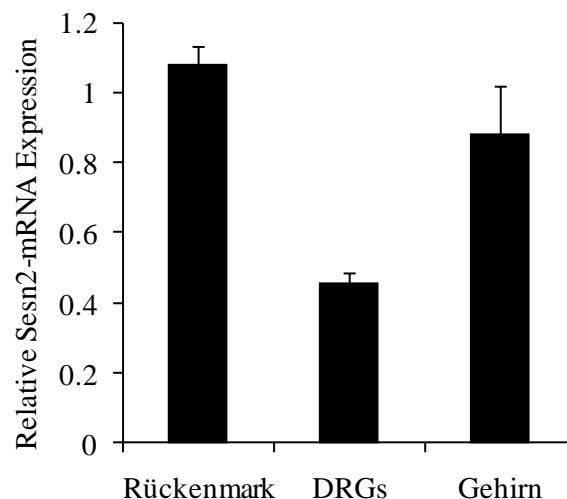


Abbildung 35. Expression von Sesn2 im nozizeptiven System. Relative mRNA-Expression von Sesn2 im Rückenmark, DRGs und Gehirn von naiven Mäusen; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 4 (Rückenmark), 6 (DRGs) bzw. 2 (Gehirn).

Auch die Untersuchung der Sesn2-Expression auf Proteinebene zeigte, dass Sesn2 im Rückenmark, in Spinalganglien und auch im *N. ischiadicus* exprimiert ist (Abbildung 36). Der für die Western-Blots verwendete Antikörper zeigt mehrere Banden, unter denen die Sesn2-spezifische Bande durch Sesn2^{-/-}-Kontrollen verifiziert werden konnte. Die Sesn2-Expressionsstärke wurde mittels Immunoblot analysiert und Rückenmark, Spinalganglien und periphere Nerven wurden miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass Sesn2 im Rückenmark, in den Spinalganglien und im Nerv auf Proteinebene etwa gleich stark exprimiert ist.

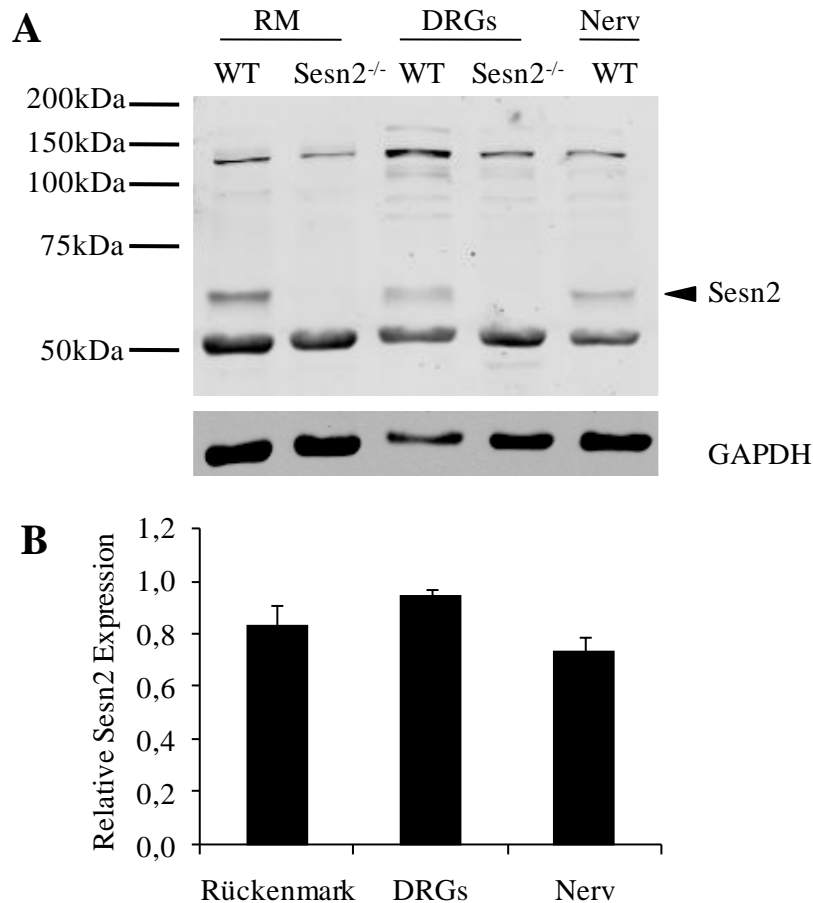


Abbildung 36. Expression des Sesn2-Proteins (54 kDa) im RM, Spinalganglien und Nerv mit Sesn2^{-/-}-Kontrolle. Dargestellt ist ein Sesn2-Western Blot mit der GAPDH Ladungskontrolle (A) sowie die quantitative Auswertung der relativen Sesn2-Proteinexpression (B); n = 3.

Da der Antikörper jedoch mehrere Banden detektiert, scheint er nicht für immunhistochemische Färbungen geeignet zu sein. Dementsprechend konnte in Immunfluoreszenzfärbungen mit diesem Antikörper kein Unterschied zwischen Sesn2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen detektiert werden.

3.2.2 Expression von Sestrin 2 nach nozizeptiver Stimulation

Die relative mRNA-Expression von Sesn2 wurde auch nach peripherer Stimulation charakterisiert. Zum einen wurde die Änderung der Sesn2-mRNA-Expressionsstärke in Spinalganglien und im Rückenmark bei Zymosan-induzierten Entzündungsschmerzen charakterisiert. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von Sesn2 im Rückenmark durch die Injektion von Zymosan A nicht beeinflusst wurde, während in Spinalganglien die Sesn2-mRNA leicht aber signifikant herab reguliert war (Abbildung 37).

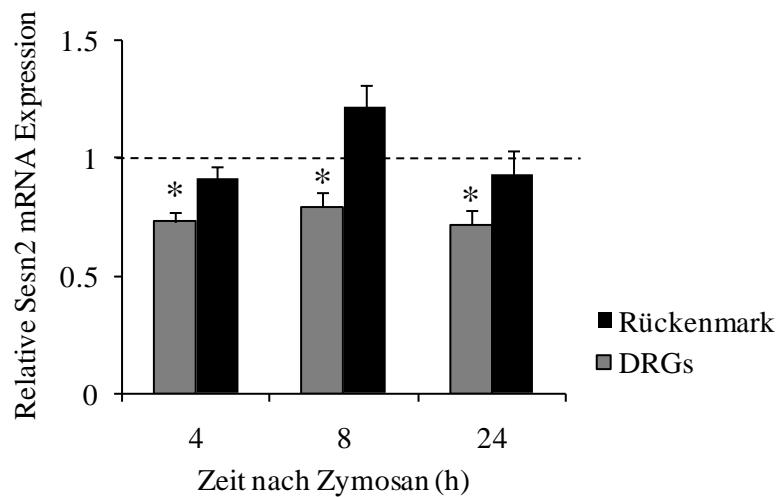


Abbildung 37. Relative Sesn2-mRNA-Expression im Rückenmark und DRGs nach Induktion einer Pfoten-Entzündung mit Zymosan. Eine Zymosan A-Lösung (20 µl, 10 mg/ml) wurde in eine Hinterpfote injiziert und die Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Als Bezug diente die relative mRNA-Expression von unstimuliertem Gewebe, die auf eins gesetzt wurde (gestrichelte Linie); n = 4-6; p < 0,05.

Zum anderen wurde die Änderung der Sesn2-mRNA-Expression bei neuropathischen Schmerzen untersucht. Hierzu wurde das SNI-Modell verwendet. Im Rückenmark war die relative Stärke der mRNA-Expression von Sesn2 am Tag drei, sieben und 14 nach der SNI-Operation unverändert, während in den Spinalganglien zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Operation ein signifikanter Anstieg der Sesn2-mRNA detektiert wurde (Abbildung 38). Diese Daten zeigen, dass insbesondere in Spinalganglien lokalisiertes Sesn2 eine Rolle bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale spielen könnte.

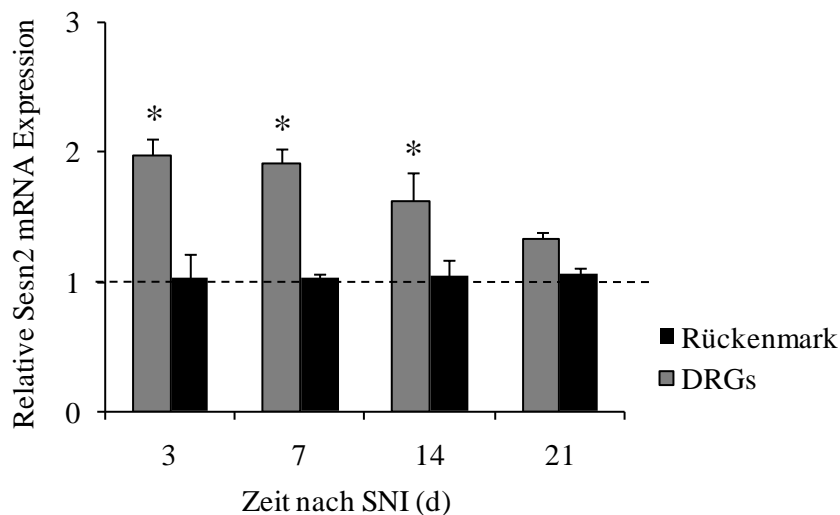


Abbildung 38. Relative mRNA-Expression von Sesn2 im Rückenmark und in Spinalganglien nach peripherer Nervenverletzung. Die gewählten Zeitpunkte waren drei, sieben, 14 und 21 Tage nach der SNI-Operation. Die relative mRNA-Expression wurde auf die relative Sesn2-Expression von unstimuliertem Gewebe bezogen, das als Referenz diente und auf „1“ gesetzt wurde (gestrichelte Linie); n = 4; p < 0,05.

Darüber hinaus wurde die *Sesn2*-Expression nach peripherer Nervenverletzung im Rückenmark, in Spinalganglien und in peripheren Nerven auf Proteinebene untersucht (Abbildung 39). Hierbei zeigte sich, dass im Rückenmark keine Änderung der *Sesn2*-Expression nach der SNI-Operation zu beobachten war. Auch in den Spinalganglien zeigte sich keine Änderung der relativen *Sesn2*-Expression sieben, 14 und 21 Tage nach der Nervenschädigung. Im proximalen Teil des *N. ischiadicus* hingegen konnte eine Hochregulation der *Sesn2*-Expression nach der SNI-Operation beobachtet werden, die auch nach sieben, 14 und 21 Tagen signifikant war. Diese Daten deuten darauf hin, dass nach Verletzung des *N. ischiadicus* die *Sesn2*-mRNA-Expression in den Spinalganglien induziert und das Protein dann in die primär afferenten Fasern der Nozizeptoren transportiert wird.

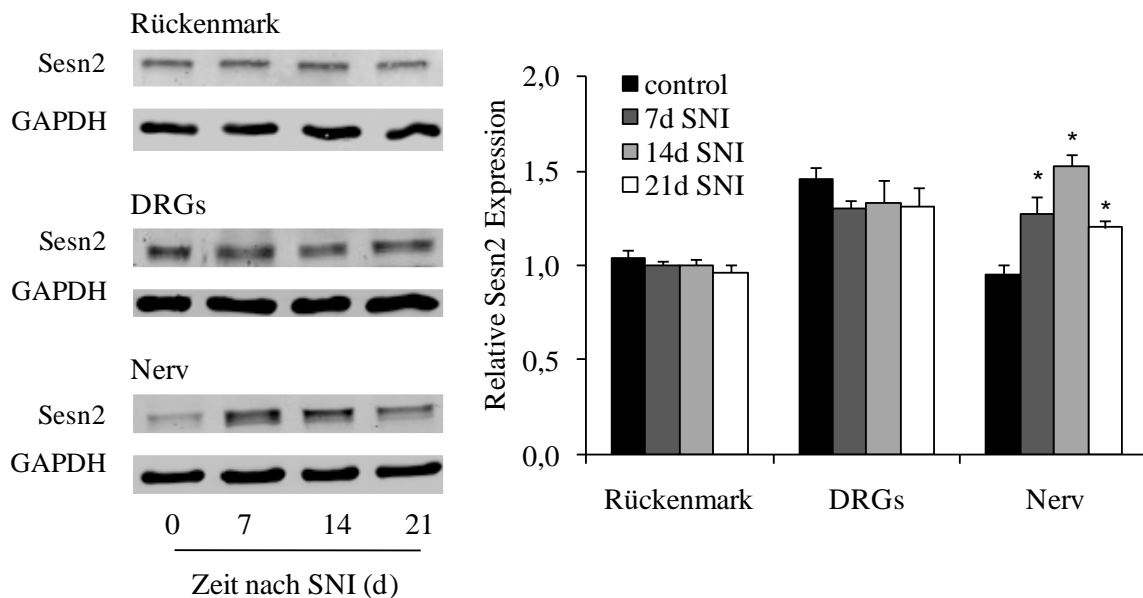


Abbildung 39. Western Blot Analyse der *Sesn2*-Expression im Rückenmark, in den Spinalganglien und im *N. ischiadicus*, sieben 14 und 21 Tage nach SNI-Operation. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen *Sesn2*-Expression \pm SEM sowie repräsentative Ausschnitte der Western Blot Banden von *Sesn2* und GAPDH, welches als Ladungskontrolle verwendet wurde; d = Tage; n = 3-5 (Rückenmark und Spinalganglien) bzw. 4-9 (Nerv).

3.2.3 Basale Charakteristika von *Sesn2*^{-/-}-Mäusen

3.2.3.1 Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien

Morphologische Untersuchungen des Rückenmarks von *Sesn2*^{-/-}-Mäusen zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern (Abbildung 40 A bis D). Auch die Verteilung der verschiedenen DRG-Neuronen-Populationen war zwischen den beiden Genotypen vergleichbar. Das Verhältnis der Substanz P (SubP), Isolectin B4 (IB4) und Neurofilament 200 (NF200) positiven DRG-Neurone war in *Sesn2*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen ähnlich (Abbildung 40 E).

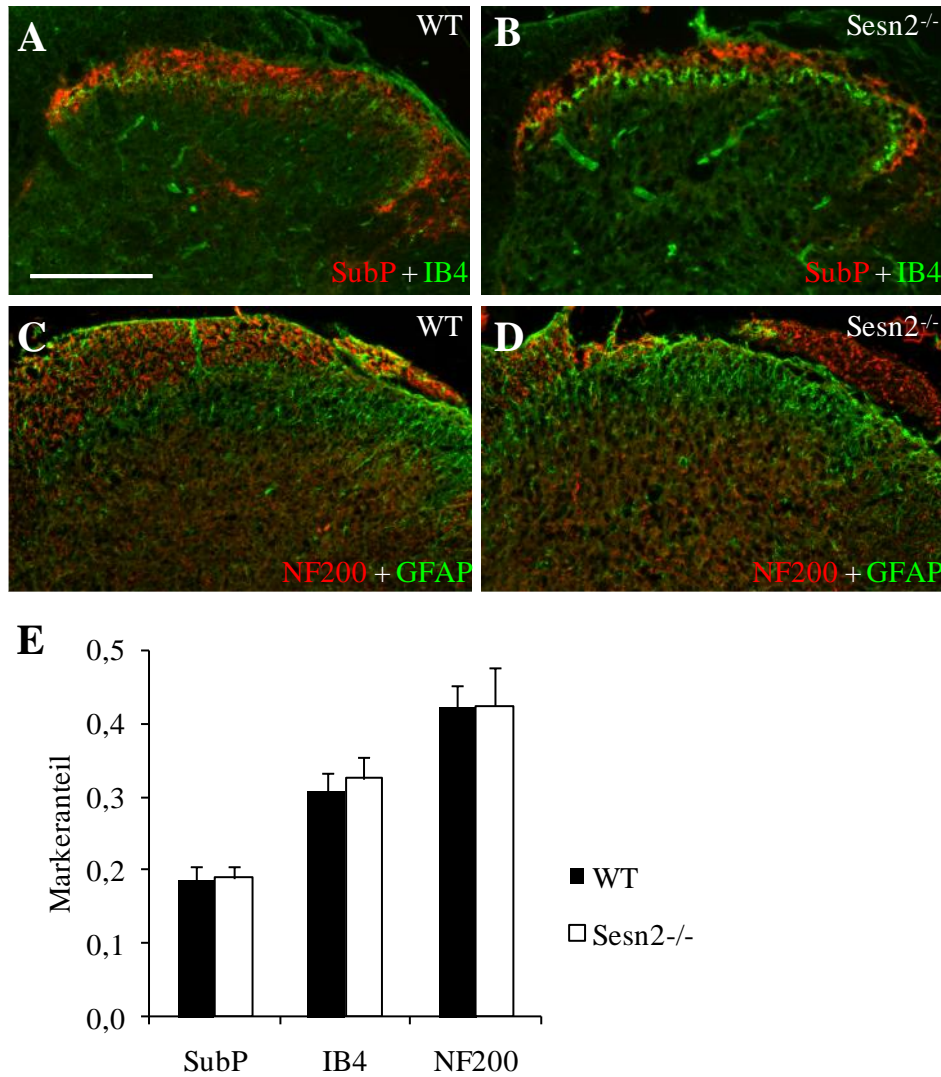


Abbildung 40. Charakterisierung der Morphologie des Rückenmarks und der DRG-Neuronen-Populationen in Sesn2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. A bis D. Immunfluoreszenzfärbung des Rückenmarks mit den Markern Substanz P (SubP), Isolectin B4 (IB4), Neurofilament 200 (NF200) und ‚Glial fibrillary acidic protein‘ (GFAP); Maßstab: 200 µm. E. Quantifizierung der IB4-, SubP- und NF200-positiven DRG-Neuronen-Populationen in Sesn2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen.

3.2.3.2 Untersuchungen der motorischen Koordination

Auch in der Sesn2^{-/-}-Linie wurde der Rota-Rod-Test durchgeführt, um die motorische Koordination zu überprüfen. Es konnte keine Beeinträchtigung der motorischen Koordinationsfähigkeit der Sesn2^{-/-}-Mäuse festgestellt werden ($p = 0,491$; Abbildung 41).

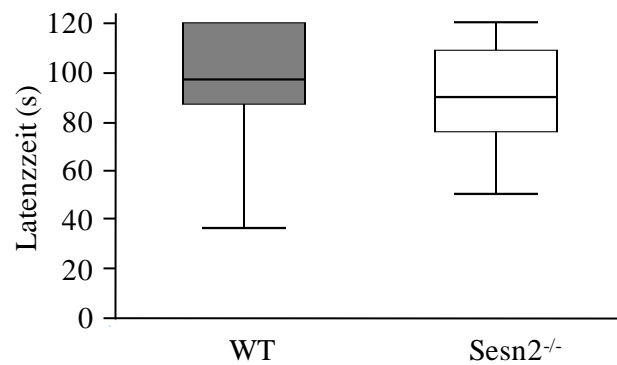


Abbildung 41. Rota-Rod-Test bei *Sesn2*^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist jeweils der Median der Latenzzeiten mit Interquartilsabstand. Der Cutoff lag bei 120 s; n = 10-13.

3.2.4 Nozizeptives Verhalten von *Sesn2*^{-/-}-Mäusen

3.2.4.1 Nozizeptives Verhalten in Modellen für akute Schmerzen

Zur Untersuchung des akuten nozizeptiven Verhaltens wurden verschiedene Modelle für akute thermische Nozizeption sowie ein Modell für akute mechanische Nozizeption verwendet. In dem Hot-Plate-Test (Abbildung 42 A) wurde die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Reaktion gemessen, während in dem Cold-Plate-Test (Abbildung 42 B) die Anzahl der Reaktionen bestimmt wurde, die das Tier auf einer 0 °C kalten Platte innerhalb von fünf Minuten zeigte. Des Weiteren wurde der Dynamic-Plantar-Test (Abbildung 42 C) als Modell für akute Schmerzen nach mechanischer Reizung verwendet und hier ebenfalls die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote ermittelt.

Es konnte weder in den Tests für akute thermische Schmerzen noch in dem Test für akute mechanische Schmerzen ein Unterschied in dem Verhalten der *Sesn2*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern beobachtet werden. Somit scheint *Sesn2* nicht an der Verarbeitung von Schmerzen nach akuter thermischer oder mechanischer Stimulation beteiligt zu sein.

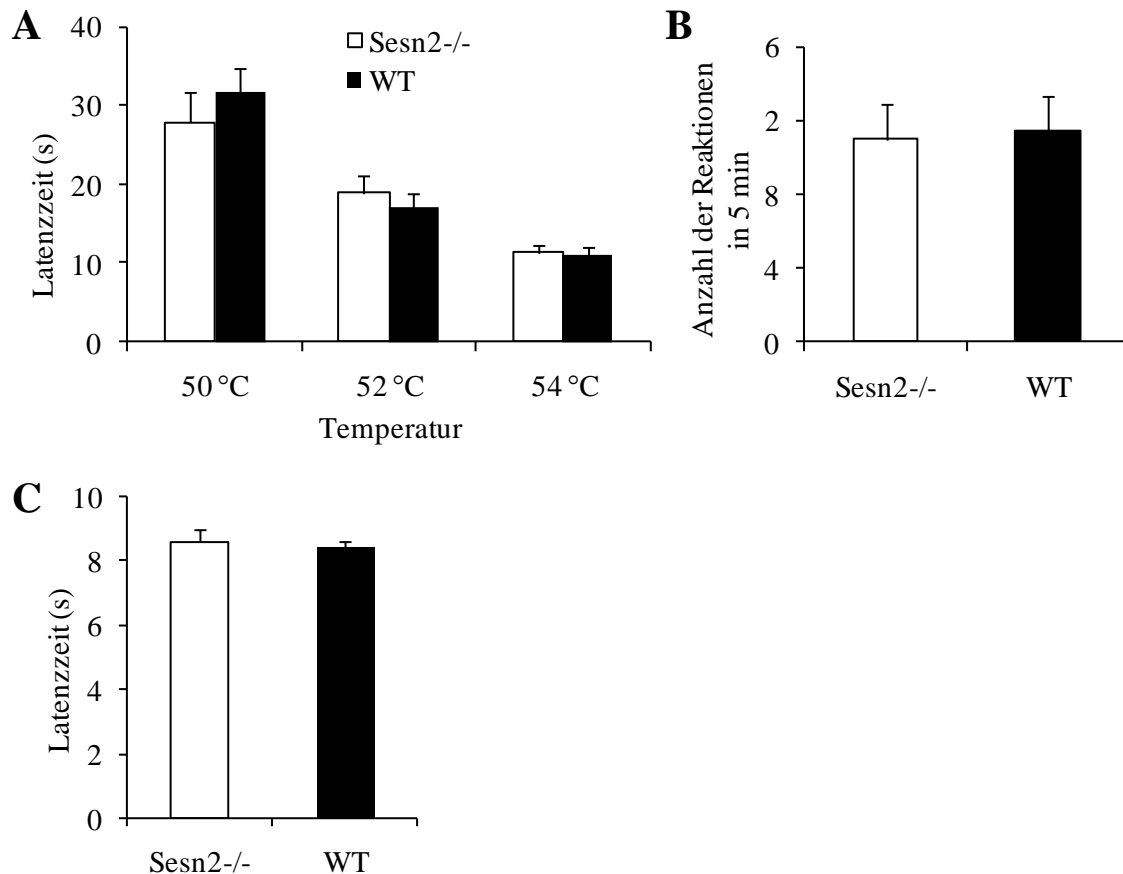


Abbildung 42. Nozizeptives Verhalten von Sesn2^{-/-}-Mäusen. A. Hot-Plate-Test zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption. n = 13-14. B. Cold-Plate-Test (0 °C) zur Untersuchung akuter thermischer Nozizeption; n = 9-10. C. Dynamic Plantar Test zur Untersuchung des nozizeptiven Verhaltens nach mechanischer Stimulation; n = 7-9.

3.2.4.2 Formalin-Test

Um zu untersuchen, ob Sestrin 2 bei der Verarbeitung nozizeptiver inflammatorischer Reize eine Rolle spielt, wurde der Formalin-Test durchgeführt. In diesem Test wird, wie im Kapitel 2.1.4.3 beschrieben, eine 5 %ige Formalin-Lösung in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert, die zu einer zwei-phasischen Leckreaktion des Tieres führt. Diese erste Phase war bei den Sesn2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nicht verändert. In der zweiten Phase hingegen zeigten die Sesn2^{-/-}-Mäuse ein deutlich verstärktes Leckverhalten (Abbildung 43 A und B). Dies deutet darauf hin, dass Sesn2 bei den Sensibilisierungsvorgängen im Rückenmark nach Formalin-Injektion eine Rolle spielen könnte.

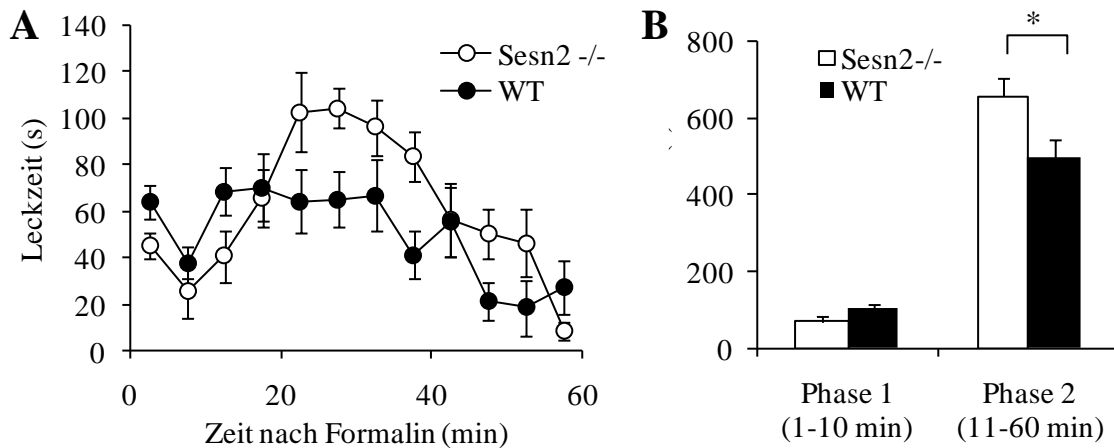


Abbildung 43. Formalin-Test mit Sesn2^{-/-}-Mäusen. A. Zeitverlauf nach Injektion einer 5 %igen-Formalin-Lösung in eine Hinterpfote. B. Darstellung der einzelnen Phasen des Formalin-Tests. Die Leckzeit war in der zweiten Phase des Formalin-Tests bei den Sesn2^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. n = 10-11; p < 0,05.

3.2.4.3 Mechanischen Hyperalgesie nach Zymosan-Injektion

Um die Rolle von Sesn2 in inflammatorischen Schmerzen weiter zu charakterisieren, wurde das Verhalten der Sesn2^{-/-}-Mäuse in dem Modell der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie untersucht. Nach Injektion einer Zymosan A-Lösung in die Plantarseite einer Hinterpfote wurde die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach mechanischer Stimulation im Zeitverlauf bestimmt. Mäuse beider Genotypen entwickelten nach Zymosan-Injektion eine mechanische Hyperalgesie, die gleichermaßen ausgeprägt war (Abbildung 44). Es konnte kein statistischer Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet werden.

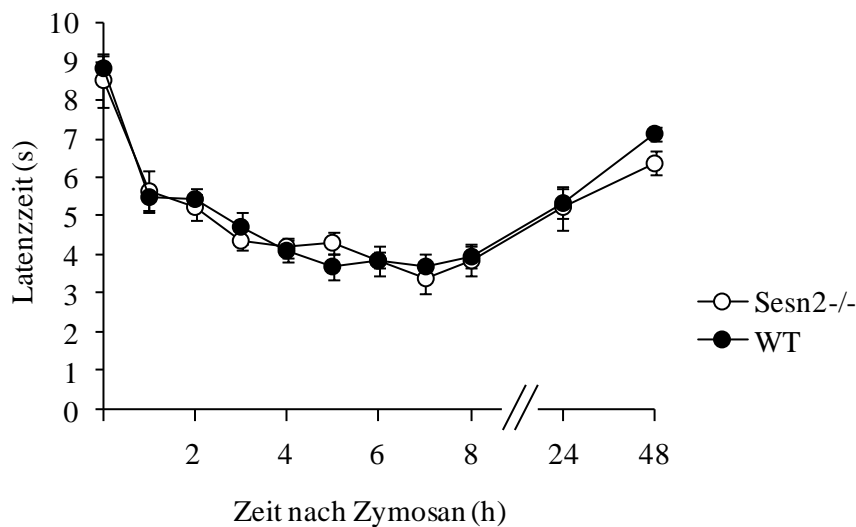


Abbildung 44. Mechanische Hyperalgesie von Sesn2^{-/-}-Mäusen nach Injektion von Zymosan A (5 mg/ml) in eine Hinterpfote. Zeitverlauf der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach mechanischer Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; n = 7-8.

3.2.4.4 Mechanische Allodynie im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen

Die Rolle von *Sesn2* wurde neben den Modellen für mechanische Hyperalgesie auch in einem neuropathischen Schmerzmodell untersucht. Hierzu wurde das SNI-Modell verwendet, bei dem, wie bereits oben beschrieben, zwei Äste des *N. ischiadicus* durchtrennt werden. Es entwickelte sich bei beiden Genotypen eine mechanische Allodynie, die sich jedoch in den *Sesn2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern nach 14 Tagen weiter verstärkte. Diese erhöhte mechanische Allodynie hielt für die Dauer des Versuchs an und war ab Tag 17 nach der Operation bis zum Versuchsende (Tag 42) signifikant (Abbildung 45). Dies deutet darauf hin, dass *Sesn2* an der Verarbeitung nozizeptiver Signale nach peripherer Nervenverletzung beteiligt ist.

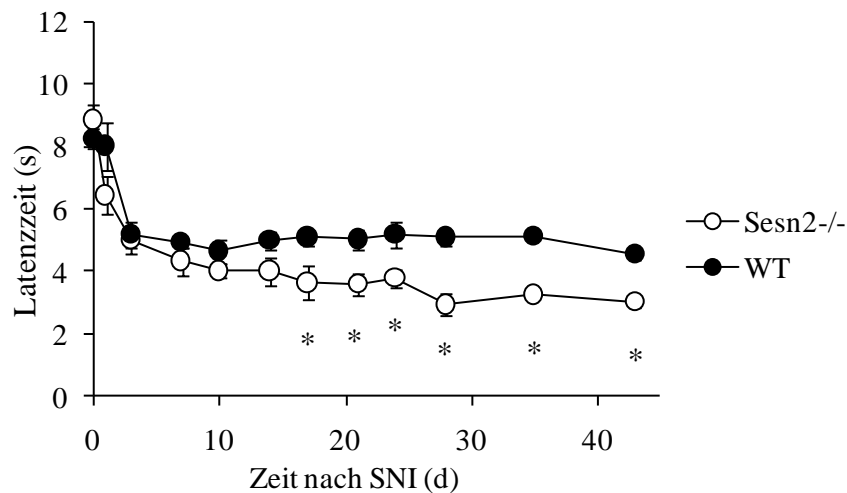


Abbildung 45. Mechanische Allodynie in *Sesn2*^{-/-}-Mäusen im SNI-Modell. Zeitverlauf der Latenzzeiten nach mechanischer Pfoten-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 6-8; p < 0,05.

3.2.5 Messung reaktiver Sauerstoffspezies nach peripherer Nervenverletzung

Um zu untersuchen, ob die verstärkte mechanische Allodynie der *Sesn2*^{-/-}-Mäuse im SNI-Modell auf eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies zurückzuführen ist, wurde H₂O₂ im Gewebe von *Sesn2*^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern 14 Tage nach der SNI-Operation mittels des Amplex-Red Assays bestimmt. Die Messung basiert auf der H₂O₂ abhängigen, Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysierten Oxidation von dem nicht fluoreszierenden Amplex-Red in das fluoreszierende Resorufin. Für die Messungen wurden das lumbale Rückenmark, die lumbalen ipsilateralen Spinalganglien (L4 und L5) und der ipsilaterale *N. ischiadicus* verwendet. Es zeigte sich, dass in den *Sesn2*^{-/-}-Mäusen eine höhere Absorption von Resorufin in den lumbalen DRGs sowie im Nerv detektiert werden konnte,

während das Emissionsverhältnis im Rückenmark im Vergleich zu Wildtypen konstant war (Abbildung 46). Da in den DRGs und im Nerv auch generell höhere Emissionswerte detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass hier H_2O_2 verstärkt an der Signalübertragung beteiligt sein könnte.

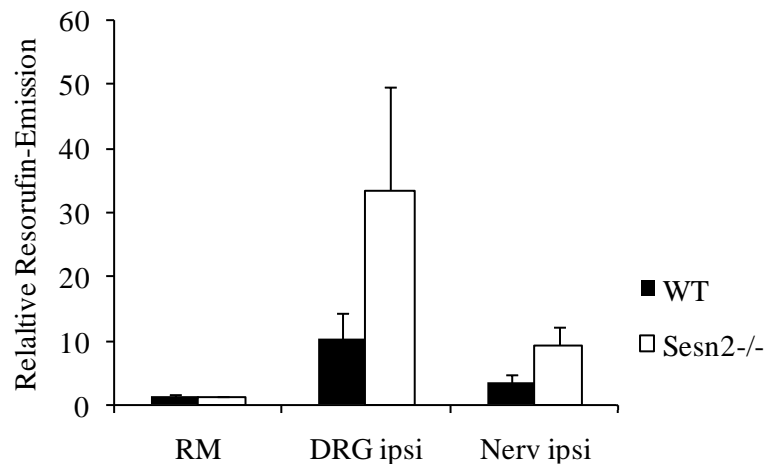


Abbildung 46. Amplex-Red-Messung im Gewebe von Sesn2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. Es wurde das Rückenmark (RM), ipsilaterale Spinalganglien (DRGs) und der ipsilaterale proximale Teil des *N. ischiadicus* 14 Tage nach der SNI-Operation verwendet. Der Nachweis von H_2O_2 erfolgte indirekt durch Messung der Emissionswerte von Resorufin, das H_2O_2 -abhängig aus Amplex-Red gebildet wird. Die Emissions-Werte wurden auf die Proteinkonzentration bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM; n = 6-7; ipsi = ipsilaterale operierte Seite; WT = Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Sesn2 zur Reduktion nozizeptiver Signale in einigen Schmerzmodellen beiträgt. Der Sesn2-vermittelte Effekt könnte auf der Reduktion von Peroxiden im nozizeptiven System beruhen.

4 DISKUSSION

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid oder Wasserstoff-Peroxid sind reaktive chemische Zwischenprodukte, die bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser entstehen (Paravicini und Touyz, 2008). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können sie Schädigungen an Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden bewirken, besonders wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen. Oxidativer Stress im zentralen Nervensystem kann demnach zur Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder amyotropher Lateralsklerose beitragen (Wang u. a., 2010). Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies, wenn sie in physiologischen Konzentrationen vorliegen, als funktionelle Messenger-Moleküle agieren und zu einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Funktionen beitragen (Winterbourn und Hampton, 2008). Darüber hinaus wurde den ROS auch eine Rolle in Schmerzsignalwegen zugesprochen (Little u. a., 2010; Salvemini u. a., 2011). In verschiedenen Tiermodellen für inflammatorische sowie neuropathische Schmerzen konnte das Schmerzverhalten durch die Gabe von Antioxidantien wie 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy (TEMPO), Phenyl-*N-tert*-butyl-nitron (PBN), 5,5-Dimethyl-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) oder N-Acetyl-Cystein (NAC) reduziert werden (Muscoli u. a., 2003; Kim u. a., 2004; Wang u. a., 2004; Hacimuftuoglu u. a., 2006; Khattab, 2006; Kim u. a., 2006; Lee u. a., 2007; Schwartz u. a., 2008; Mao u. a., 2009; Tanabe u. a., 2009). Jedoch wird hieraus weder ersichtlich, welche ROS-generierenden Systeme noch welche Art reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind, da es sich bei den verwendeten Antioxidantien um nicht-selektive Substanzen handelt, die zum Abbau verschiedener reaktiver Sauerstoff- und Nitrogenspezies beitragen (Little u. a., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des ROS-produzierenden Enzyms NADPH Oxidase 4 (Nox4) bei der Verarbeitung akuter, inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen untersucht. Nox4, das überwiegend in kleinen, nicht-peptidergen DRG Neuronen exprimiert wird, scheint an der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen beteiligt zu sein, während die Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen offenbar Nox4-unabhängig verläuft. Mäuse, bei denen das *Nox4*-Gen ausgeschaltet ist (*Nox4*^{-/-}), zeigen ein reduziertes Schmerzverhalten in verschiedenen Modellen für neuropathische Schmerzen. Da in *Nox4*^{-/-}-Mäusen die Degradation bestimmter Myelinproteine nach peripherer Nervenverletzung weniger stark ausgeprägt ist als in wildtypischen Tieren, ist davon auszugehen, dass Nox4 Einfluss auf De- bzw. Remyelinisierungsprozesse nimmt und somit dass Schmerzverhalten in Neuropathie-Modellen beeinflusst.

Neben Nox4 wurde auch die Rolle von Sestrin 2 (Sesn2) als ein Vertreter der ROS-abbauenden Enzyme bei nozizeptiven Signalwegen untersucht. In dem SNI-Modell für neuropathische Schmerzen konnte eine starke Induktion der Sesn2-mRNA in Spinalganglien beobachtet werden. Interessanterweise zeigen auch Sesn2^{-/-}-Mäuse einen Phänotyp in einem Neuropathie-Modell: das nozizeptive Verhalten war hier verstärkt. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass reaktive Sauerstoffspezies eine essentielle Rolle bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale spielen und dass sowohl Nox4 als auch Sesn2 eine wichtige Funktion in den dabei beteiligten Signalkaskaden inne haben.

4.1 Nox4 bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale

Reaktive Sauerstoffspezies können durch viele verschiedene Quellen entstehen, wie durch NADPH Oxidasen, die mitochondriale Elektronentransportkette, Xanthin-Oxidasen, Cyclooxygenasen, Lipooxygenasen oder nicht-gekoppelte NO-Synthasen. In dieser Arbeit wurde die Rolle der ROS-generierenden Enzymfamilie der NADPH Oxidasen bei der Verarbeitung verschiedener Schmerzarten genauer charakterisiert. Nox-Enzyme unterscheiden sich von den meisten anderen ROS-Quellen, da bei ihnen die ROS-Produktion die primäre Funktion darstellt und ROS nicht als Nebenprodukt der physiologischen Reaktionen entstehen (Sorce und Krause, 2009). Die mRNA-Expression der Nox-Isoformen Nox2 und Nox4 sowie die der Untereinheit p22^{phox} konnten sowohl im Rückenmark als auch in den Spinalganglien mittels Real-time quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden, während Nox1 und Nox3 in diesen Geweben nicht verlässlich detektiert wurden. Da Nox2 bereits mit der nozizeptiven Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht wurde (Kim u. a., 2010a) und p22^{phox} eine essentielle Untereinheit für viele Nox-Isoformen darstellt, wurde der Fokus in dieser Arbeit auf Nox4 gelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass Nox4 vorwiegend in kleinen nicht-peptidergen und zu einem geringeren Anteil auch in großen myelinisierten DRG-Neuronen exprimiert wird. Des Weiteren kann Nox4 auch in der Lamina II des Rückenmarks detektiert werden, in welche die kleinen nicht-peptidergen DRG-Neurone terminieren. Somit scheint Nox4 sowohl in den Zellkörpern als auch in den zentralen Endigungen kleiner nicht-peptiderger primär afferenter Neurone vorhanden zu sein, während es in großen myelinisierten DRG-Neuronen nur im Zellkörper nachgewiesen werden kann. Mäuse, bei denen das *Nox4*-Gen ausgeschaltet ist, zeigen weder Defekte in der motorischen Koordination, noch ein verändertes Verhalten bei Tests für akute Schmerzen. Ferner konnte weder eine Änderung der Zusammensetzung der

verschiedenen Nozizeptoren-Populationen noch morphologische Unterschiede des Rückenmarks beobachtet werden. Wie oben beschrieben wird die Nox4-mRNA in einem Modell für Entzündungsschmerzen im Rückenmark hochreguliert, nicht aber in einem Neuropathie-Modell. Überraschenderweise zeigten Nox4^{-/-}-Mäuse jedoch keinen Phänotyp in verschiedenen inflammatorischen Schmerzmodellen. Demnach scheint die beobachtete Regulation der Nox4-mRNA-Expression nicht im direkten Zusammenhang mit der Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen zu stehen. Nox4 wurde mit vielen verschiedenen Funktionen, wie Differenzierungsprozessen oder der Zellmigration, in Zusammenhang gebracht (Lassègue und Griendling, 2010; Montezano u. a., 2011). Daher ist es durchaus denkbar, dass Nox4 bei inflammatorischen Schmerzmodellen eine Rolle einnimmt, die nicht direkt an die nozizeptive Transduktion gekoppelt ist.

Interessanterweise zeigen Nox4^{-/-}-Mäuse jedoch ein reduziertes Schmerzverhalten in verschiedenen Neuropathie-Modellen für neuropathische Schmerzen, was darauf schließen lässt, dass Nox4 bei der Schmerzverarbeitung nach peripherer Nervenverletzung eine essentielle Rolle einnimmt. Ferner konnte gezeigt werden, dass es in Wildtyp-Mäusen zu einer Fehlregulation von Genen und Proteinen kommt, die bei Myelinisierungsprozessen eine Rolle spielen. Sieben Tage nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung kommt es zu einer Hochregulation Myelin-spezifischer Gene im Rückenmark wildtypischer Tiere, nicht aber in Nox4^{-/-}-Mäusen. Darüber hinaus wurde eine Degeneration der Myelin-Proteine MPZ und PMP22 im geschädigten Nervengewebe 14 Tage nach der SNI-Operation im Wildtyp beobachtet, während die MPZ- und PMP22 Level in Nox4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum unverletzten Nerv nahezu konstant blieben. Die wahrscheinliche Ursache für die beschriebenen Veränderungen stellt einen Abbau von Myelin-Proteinen nach Nervenverletzung dar, der durch eine erhöhte Transkription kompensiert wird. Dieser Mechanismus findet offenbar in Wildtyp- nicht aber in Nox4^{-/-}-Mäusen statt. Somit stellt sich die Frage, wie Nox4 bei in diesen Modellen induziert wird und welche Mediatoren als potentielle Nox4-Targets bei der neuropathischen Signalkaskade beeinflusst werden.

Für die enzymatische Aktivität des Nox4-Enzyms scheinen bekannte zytoplasmatische Untereinheiten (p47^{phox}, NOXO1, p67^{phox}, oder NOXA1), die essentiell für die Funktion der meisten Nox-Isoformen sind, nicht von Bedeutung zu sein. Wird Nox4 in verschiedenen Zelllinien exprimiert, wird seine Aktivität weder durch NADPH Oxidase-Aktivatoren wie Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA) oder Calcium, noch durch Koexpression der bisher beschriebenen regulatorischen Nox-Untereinheiten beeinflusst, jedoch ist sie abhängig von

der membranständigen Untereinheit p22^{phox}. Inwiefern Rac an der Regulation der Nox4-Aktivität beteiligt ist, ist bis heute nicht vollständig geklärt (Bedard und Krause, 2007; Sorce und Krause, 2009; Montezano u. a., 2011). Es wurde daher angenommen, dass Nox4 als konstitutiv aktives Protein zu betrachten ist, dessen Aktivität auf der Regulation seiner Expression beruht (Kawahara u. a., 2005; Martyn u. a., 2006; Serrander u. a., 2007; Bedard und Krause, 2007). Somit stellt sich die Frage, in welcher Weise Nox4 spezifisch bei neuropathischen Schmerzen aktiviert wird.

Im Gegensatz zu Nox4 wird die Aktivität der Nox-Isoformen Nox1 und Nox2 durch posttranskriptionelle Modifikationen der regulatorischen Untereinheiten streng kontrolliert und reguliert (Bedard und Krause, 2007). Die Aktivität des Nox4-Enzyms hingegen scheint in vielen Geweben von seinem Expressionslevel abhängig zu sein. Eine Induktion der Nox4-mRNA-Expression wurde in glatten Muskelzellen beispielsweise nach Stress des endoplasmatischen Retikulums, Scherspannung, nach Verletzung der Arteria carotis, Hypoxie und Ischämie, sowie nach Stimulation mit TGF- β 1 oder TNF α beobachtet (Bedard und Krause, 2007). Im Herzen wird die Expression von Nox4 mit steigenden Stressbedingungen erhöht (Zhang u. a., 2010). Ferner wurde im Gehirn gezeigt, dass bei einem ischämischen Schlaganfall die kortikale Expression von Nox4 induziert wird und damit eine Quelle des dort entstehenden oxidativen Stresses darstellt, der zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke und neuronaler Apoptose führt (Vallet u. a., 2005; Kleinschnitz u. a., 2010). In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Induktion der Nox4-mRNA-Expression nach peripherer Nervenverletzung beobachtet werden, so dass die transkriptionsabhängige Aktivierung des Nox4-Proteins hier sehr unwahrscheinlich scheint. Interessanterweise wurde in einigen Studien jedoch eine Regulation der Nox4-Aktivität beobachtet, die nicht über transkriptionelle oder translationelle Induktion erfolgt. In Fettzellen wurde beispielsweise eine Nox4-abhängige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies fünf Minuten nach Insulin-Stimulation beobachtet (Mahadev u. a., 2004), und auch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert Nox4 durch die TLR4-Rezeptor Signalkaskade innerhalb von 30 Minuten (Park u. a., 2004). Diese Mechanismen sind zu schnell, um durch eine Erhöhung der Nox4-Proteinexpression erklärt zu werden. Interessanterweise scheint TLR4 auch in nozizeptiven Signalkaskaden eine Rolle zu spielen, da die spezifische Hemmung des Rezeptors, Punktmutationen des TLR4-kodierenden Gens, sowie der TLR4-Knockout mechanische Allodynie und thermische Hyperalgesie reduzieren (Tanga u. a., 2005; Bettoni u. a., 2008; Little u. a., 2010). Demnach könnte im nozizeptiven System die Nox4-Aktivierung von der TLR4-Induktion abhängig sein.

In neueren Studien wurden zwei potentielle, bisher unbekannte Nox4-Regulatoren beschrieben. Lyle u. a. (2009) konnten mittels eines Yeast Two-Hybrid Screens einen neuen p22^{phox}-Bindepartner Poldip2 (Polymerase (DNA-directed) delta-interacting Protein 2) vorstellen, der mit p22^{phox}, Nox1 und Nox4 kolokalisiert. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass Poldip2 die enzymatische Aktivität von Nox4 in vaskulären glatten Muskelzellen um das Dreifache erhöhen kann. In einer anderen Studie von Diaz u. a. (2009) wurde gezeigt, dass in Melanomzellen die Nox4-p22^{phox}-vermittelte ROS-Produktion von Tks5 (Tyrosin Kinase Substrat mit fünf Src Homologen Domänen) abhängig ist. Ein weiterer Aspekt, der bezüglich der Aktivierung von Nox4 in Betracht gezogen werden muss, ist das Vorhandensein von NADPH für eine ausreichende enzymatische Nox-Aktivität. Interessanterweise wurde berichtet, dass Granulozyten, die eine Störung in der NADPH-Produktion aufweisen, Defizite in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zeigen (Tsai u. a., 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in Herzen diabetischer Ratten die Aktivität der Glukose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PD) und der NADPH Oxidase erhöht sind und eine gesteigerte ROS-Produktion durch die Hemmung der G6PD unterdrückt werden kann (Serpillon u. a., 2009). Es ist daher denkbar, dass lokale Änderungen der NADPH-Konzentrationen innerhalb der Zelle Einfluss auf die Aktivität von Nox-Enzymen nehmen und bei deren Regulation eine Rolle spielen könnten.

Durch welche Mechanismen die Nox4-Aktivität bei neuropathischen Schmerzen induziert wird, konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht geklärt werden. Da jedoch keine Regulation von Nox4 auf mRNA-Ebene zu beobachten war, muss es sich hier um eine direkte Aktivierung des Enzyms handeln. Die Expression der jüngst entdeckten Nox4-Aktivatoren Poldip2 (Lyle u. a., 2009) und Tks5 (Diaz u. a., 2009) wurde bisher noch nicht im Nervensystem beschrieben. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sie möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung von Nox4 spielen oder andere, bisher unbekannte Mechanismen hier beteiligt sind.

Eine direkte Bestimmung der Nox4-Aktivität ist nur durch die Messung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die H₂O₂-Konzentration mittels des Amplex Red Assays in dem schmerzrelevanten Gewebe der Nox4^{-/-}-Mäuse nicht verlässlich bestimmt werden. Neben den globalen Nox4^{-/-}-Mäusen wurden auch Mäuse untersucht, bei dem der Nox4-Knockout durch Tamoxifen induziert wurde. Da die Nox4-mRNA Expression hier aber nur in den Spinalganglien signifikant reduziert war und dennoch ein reduziertes Schmerzverhalten in dem SNI-Modell für neuropathische Schmerzen beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass das in den DRG-

Neuronen lokalisierte Nox4 hauptsächlich an der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen beteiligt ist. Daher können nur die L4- und L5 Spinalganglien zur Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration nach SNI-induzierter Nervenverletzung verwendet werden. Dies stellt einen limitierenden Faktor der verlässlichen H_2O_2 -Detektion dar, da nur geringe Mengen an Gewebe vorhanden sind und die Detektion in diesem Gewebe nahe der Detektionsgrenze liegt. Da die ROS-Produktion jedoch die einzige Funktion des Nox4-Enzyms zu sein scheint und bei den $\text{Nox4}^{-/-}$ -Mäusen H_2O_2 -Expression in anderen Geweben reduziert sind (Zhang 2010), ist davon auszugehen, dass auch im Nox4-exprimierenden nozizeptiven Gewebe die H_2O_2 -Expression verringert sind.

Nox4 weist besondere Charakteristika unter den Nox-Isoformen auf. Zum einen wird Wasserstoff-Peroxid primär als Nox4-Produkt detektiert und nicht, wie bei den meisten anderen Nox-Isoformen, Superoxid (Martyn u. a., 2006; Serrander u. a., 2007; Takac u. a., 2011). Verantwortlich hierfür könnte der sogenannte extrazytosolische E-Loop sein, der zwischen den Transmembrandomänen V und VI lokalisiert ist. Dieser trägt einen stark konservierten Histidin-Rest, der als Protonendonator fungieren und somit die spontane Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 beschleunigen könnte. Interessanterweise ist der konservierte Histidin-Rest spezifisch für Nox4 und weder in der Nox1- noch in der Nox2-Isoform zu finden (Takac u. a., 2011). Wie eingangs erläutert weisen H_2O_2 und O_2^- unterschiedliche Eigenschaften auf. Aufgrund der schnellen Dismutation zu H_2O_2 ist O_2^- relativ instabil. Ferner kann O_2^- im Gegensatz zu H_2O_2 keine biologischen Membranen passieren. Wasserstoff-Peroxid weist, im Vergleich zu O_2^- , eine längere Lebensdauer auf (Thannickal und Fanburg, 2000; Paravicini und Touyz, 2008). Neben der freien Diffusion von H_2O_2 innerhalb der Zelle und über biologische Membranen scheinen auch Aquaporin-Kanäle an der aktiven Aufnahme von H_2O_2 in die Zelle beteiligt zu sein (Miller u. a., 2010). Wasserstoff-Peroxid kann verschiedene Signalwege aktivieren und damit als sekundärer ‚Messenger‘ fungieren (Winterbourn und Hampton, 2008; Forman u. a., 2010). Studien an Zellkultursystemen konnten des Weiteren belegen, dass das H_2O_2 -Signal innerhalb der Zelle lokal begrenzt ist und keine Diffusion beobachtet werden konnte. Ursache hierfür könnte der schnelle enzymatische Abbau durch antioxidative Systeme innerhalb der Zelle sein (Mishina u. a., 2011). Durch die lokale Eingrenzung des ROS-Signals ist eine spezifische Signaltransduktion auf bestimmte Targetmoleküle denkbar und die Rolle von H_2O_2 als sekundäres Botenmolekül plausibel.

Es stellt sich die Frage, wie genau Nox4-generiertes H_2O_2 pronozizeptive Effekte bei neuropathischen Schmerzen vermitteln könnte. Ein generell sehr gut verstandener

Mechanismus, über den reaktive Sauerstoffspezies spezifisch in Signalkaskaden eingreifen, ist die Oxidation redox-sensitiver Cystein-Reste in Proteinen. Bei lokal niedrigen pH-Werten liegt der Cystein-Rest als Thiol-Anion vor und kann leicht durch H_2O_2 zur Sulfensäure oder anderen Derivaten oxidiert werden (Forman u. a., 2010). So können Nox-Enzyme beispielsweise die Aktivität von Phosphatasen, Kinasen oder Ionenkanälen steuern und zur Signaltransduktion in den Zellen beitragen. Prinzipiell können so zahlreiche Proteine und Kanäle durch NADPH Oxidasen aktiviert werden, entscheidend sind immer die spezifische Lokalisation der ROS-erzeugenden Enzyme und deren Target-Proteine (Chen u. a., 2009). Die Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) durch ROS ist, wie bereits eingangs beschrieben, relativ gut verstanden. Sie tragen einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum, der, wenn er oxidiert wird, zur Inhibierung des Proteins führt. Bereits frühe Studien in Phagozyten zeigten, dass hier die durch Nox2 entstandenen ROS beteiligt sein könnten (Zor u. a., 1993). In Adipozyten konnte eine Nox4-vermittelte Inaktivierung der PTP1B nachgewiesen werden, die wiederum zur Verstärkung der Insulin-Rezeptor Signaltransduktion führt (Mahadev u. a., 2004). Darüber hinaus führt die Nox4-vermittelte Inaktivierung der LMW-PTP und die damit einhergehenden verlängerten Phosphorylierung von JAK2 zu einer verstärkten Wachstumsantwort (Lee u. a., 2007; Brown und Griendling, 2009). Auch die Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen kann durch ROS verändert werden. Jedoch ist unklar, ob dies immer ein direkter ROS-vermittelter Effekt oder vielmehr ein indirekter Effekt durch die Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen ist. Sie tragen ein konserviertes C-terminales Motiv, an dem die Oxidierung von Cystein-Resten durch ROS wahrscheinlich scheint (Chen u. a., 2009). Tatsächlich konnte in Mesangiumzellen gezeigt werden, dass die Angiotensin II induzierte Nox4-Expression zur oxidations-vermittelten Aktivierung von der Protein-Tyrosin-Kinase Src führt (Block u. a., 2008). Ein weiteres potentiell Target-Protein ist das SNARE Protein SNAP25, das eine Rolle als präsynaptischer ROS-Sensor einnimmt und somit möglicherweise die ROS-abhängige Hemmung der Transmitterausschüttung vermittelt (Giniatullin u. a., 2006). Darüber hinaus scheint, wie bereits oben erläutert, auch der NMDA-Rezeptor durch das Redox-Potential moduliert zu werden. Reduktion oder Oxidation spezifischer Cystein-Reste verändern die Konformation der Kanalpore, was in einem erhöhten Calciumstrom oder dessen Blockade führt (Lipton u. a., 2002; Sorce und Krause, 2009). Zusätzlich können auch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 oder p53 redox-reguliert werden (Giles, 2009) und stellen somit potentielle Targets der Nox4-vermittelten Schmerzübertragung dar.

Neben den direkten Nox4-Targets wurde auch die Aktivierung vieler weiterer Proteine beschrieben, bei denen noch nicht ganz verstanden ist, ob es sich um eine direkte oder indirekte Aktivierung durch ROS handelt. Die Rolle von Nox4 in Signaltransduktionsprozessen ist nur unvollständig geklärt und scheint teilweise kontrovers. So wurde eine Nox4-Aktivierung beispielsweise sowohl mit Zellwachstum, Zelltod als auch Differenzierungsprozessen in Verbindung gebracht (Brown und Griendling, 2009; Katsuyama, 2010). In vaskulären glatten Muskelzellen scheint die IGF-I-induzierte Migration beispielsweise abhängig von der Nox4-vermittelten Aktivierung der Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) zu sein (Meng u. a., 2008; Brown und Griendling, 2009). Interessanterweise wurde gezeigt, dass MMPs bedeutend für die Induktion und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen sind (Ji u. a., 2009b). Es gibt ferner Hinweise für die Nox-vermittelte Aktivierung der MAP Kinasen wie p38, aber auch der Ras/ERK Signalweg, sowie JNK und Akt Tyrosin Kinasen scheinen durch Nox4 aktiviert zu werden (Bedard und Krause, 2007; Lassègue und Griendling, 2010; Son u. a., 2011). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass MAP Kinasen auch eine wichtige Rolle in der Transduktion nozizeptiver Signale einnehmen. So konnte beispielsweise eine erhöhte Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAP Kinasen p38, ERK1/2 und JNK in verschiedenen Schmerzmodellen demonstriert werden (Ji u. a., 2009a). Welche Targetmoleküle also direkt von den Nox4-generierten reaktiven Sauerstoffspezies induziert werden, bleibt weiterhin unklar. Es scheint aber durchaus denkbar, dass Nox4 in verschiedene Signalkaskaden eingreift und so zur Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale beiträgt.

Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass Gliazellen einen essentiellen Anteil bei der Entstehung und Verarbeitung der Allodynie in verschiedenen Neuropathie-Modellen haben. Bereits Anfang der 1990er wurde eine verstärkte Astroglia-Aktivierung im Rückenmark neuropathischer Ratten beobachtet, die in weiteren Neuropathie-Modellen bestätigt werden konnte (Garrison u. a., 1991; Gosselin u. a., 2010). Auch die Aktivierung von Mikroglia im Rückenmark kann nach verschiedenen Schmerzmodellen beobachtet werden. Sie ist jedoch meist der Astroglia-Aktivierung vorgeschaltet und dauert oft nur wenige Tage an (Gosselin u. a., 2010). Direkte Hinweise auf die Bedeutung von Mikroglia kommen von Studien, in denen die Aktivierung der Mikroglia inhibiert wurde, was zur einer Hemmung des neuropathischen Schmerzenverhaltens führt, bzw. durch die Beobachtung, dass die Injektion aktivierter Mikroglia thermisches und mechanisches Schmerzverhalten hervorruft (Gosselin u. a., 2010). In einer Studie zum Schmerzverhalten an Nox2^{-/-}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei diesen die Aktivierung spinaler Mikroglia gehemmt war, was

mit einem reduzierten neuropathischen Schmerzverhalten einherging (Kim u. a., 2010a). Da auch Nox4 neuropathisches Schmerzverhalten beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Mikroglia-Aktivierung in Nox4^{-/-}-Mäusen nach peripherer Nervenverletzung untersucht. In diesen Tieren konnte jedoch eine deutliche Aktivierung spinaler Mikroglia beobachtet werden, die im Vergleich zu wildtypischen Tieren auch nicht abgeschwächt war. Hieraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung spinaler Mikroglia in der Nox4-vermittelten Transduktion neuropathischer Schmerzsignale, im Gegensatz zu Nox2, keine Rolle spielt.

Interessanterweise konnte, wie oben beschrieben, in Wildtyp-Mäusen eine verstärkte Degeneration peripherer Myelinbestandteile 14 Tage nach der SNI-Operation im *N. ischiadicus* beobachtet werden, die in den Nox4^{-/-}-Mäusen weniger stark ausgeprägt war. Dies deutet darauf hin, dass Nox4 entweder Degenerationsprozesse peripherer Myelinbestandteile induziert oder aber die Regeneration peripherer Myelinbestandteile inhibiert. Myelinisierung ist ein fundamentaler biologischer Prozess, bei dem eine segmentierte Ummantelung um große Axone gebildet wird, die als Schutz der Neurone dient und durch die Isolierfunktion eine schnelle saltatorische Weiterleitung ermöglicht. Änderungen in der Myelinisierung oder die Zerstörung der Myelinschicht wurden mit einer Reihe neurologischer Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, in Zusammenhang gebracht (Wang u. a., 2010). Darüber hinaus scheinen Demyelinisierungen mit neuropathischen Schmerzenverhalten assoziiert zu sein (Campana, 2007; Thacker u. a., 2007) und Mutationen in Genen die für Myelin-spezifische Proteine wie MPZ oder PMP22 kodieren führen zu Neuropathien wie dem Morbus Charcot-Marie-Tooth (Keller und Chance, 1999). Wie genau Nox4, das in DRG Neuronen exprimiert wird, Einfluss auf die Myelinisierungsprozesse nimmt, ist jedoch noch unklar. Interessanterweise wurden ROS auch mit demyelinisierenden Erkrankungen in Verbindung gebracht. Reaktive Sauerstoffspezies, die durch Nox2 in Mikroglia produziert werden, werden beispielsweise auch für die Phagozytose von Myelin benötigt, da die Hemmung des Enzyms durch verschiedene Nox-Inhibitoren mit einer reduzierten Myelin-Phagozytose einhergeht (van der Goes u. a., 1998). Darüber hinaus führen reaktive Sauerstoffspezies zur Hemmung der Genexpression Myelin-spezifischer Gene in primären Oligodendrozyten und die Expression antioxidativer Enzyme wird in diesem Krankheitsbild hochreguliert, vermutlich durch die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nrf2 (van Horssen u. a., 2010, 2011). Auch eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an dem NGF-Signalweg wird diskutiert. So scheinen reaktive Sauerstoffspezies beispielsweise eine Rolle bei neuronalem Wachstum und Differenzierung einzunehmen (Suzukawa u. a., 2000; Sorce und Krause, 2009). Auf der anderen Seite scheint Nox4 auch an neuronalen

Zelltod und Apoptose nach ischämischem Schlaganfall beteiligt zu sein, da in $Nox4^{-/-}$ -Mäusen in diesem Modell die Anzahl apoptotischer Zellen reduziert ist und es nicht zu einer Störung der Blut-Hirn Schranke kommt (Kleinschnitz u. a., 2010).

Im Gegensatz zum ZNS, wo Oligodendrozyten die myelinisierende Funktion einnehmen, wird die Myelinschicht peripherer Axone durch Schwann-Zellen gebildet. Auch für Schwann-Zellen, die im direkten Kontakt zu sensorischen Neuronen stehen, konnte eine Beteiligung bei der neuropathischen Schmerzverarbeitung demonstriert werden (Campana, 2007; Thacker u. a., 2007). Nach Verletzung des peripheren Nervengewebes werden Schwann-Zellen aktiviert und ihre myelinisierenden Eigenschaften verändert, was zur veränderten Leitfähigkeiten nozizeptiver Neurone führen kann (Devor, 2006; Gosselin u. a., 2010). Eine Myelin-Degeneration von A β -Fasern führt zur Anfälligkeit der axonalen Plasmamembran gegenüber nozizeptiven Stimuli und damit zu einer ektopischen Depolarisation und Allodynie (Kobayashi u. a., 2008). Folglich führen eine experimentelle Demyelinisierung von peripheren oder zentralen Neuronen (Wallace u. a., 2003; Inoue u. a., 2004; Moalem-Taylor u. a., 2007; Olechowski u. a., 2009; Ahn u. a., 2009), eine aberante Myelinisierung und Myelin-Verlust (Gillespie u. a., 2000) und Störungen des ErbB-Rezeptor Signalwegs (Chen u. a., 2006) in Schwann-Zellen zu neuropathischem Schmerzverhalten. Dass Demyelinisierung Neuropathien verursacht, wird auch durch viele demyelinisierende Krankheitsbilder, wie dem Guillain-Barre Syndrom, der Charcot Marie-Tooth Typ I Erkrankung und Multiple Sklerose reflektiert (Ueda, 2008).

Ein wichtiger Faktor, der Neuron-Schwann-Zell Signale vermittelt und somit ein essentieller Regulator der Glia-Differenzierung und Myelinisierung ist, ist Neuregulin 1 Typ III (NGR1) (Michailov u. a., 2004; Taveggia u. a., 2005). NGR1 aktiviert die Membran-assoziierte Tyrosinkinase ErbB in Schwann-Zellen und induziert so spezifisch Transkriptionsfaktoren wie Oct-6 oder Krox-20 und damit die Expression von Myelin-spezifischen Proteinen (Taveggia u. a., 2005; Quintes u. a., 2010). Bereits kurz nach Schädigung peripherer Nerven kommt es zu einer schnellen Aktivierung der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase und damit zu einer einsetzenden Demyelinisierung, die durch Unterbrechung des Signalwegs abgeschwächt werden kann (Guertin u. a., 2005; Scholz und Woolf, 2007). Erst im späteren Verlauf nach der ErbB-Aktivierung ist diese mit der Schwann-Zell-Proliferation und Remyelinisierung gekoppelt (Carroll u. a., 1997; Scholz und Woolf, 2007). Im Rückenmark konnte die NGR1-Expression direkt mit der Aktivierung des ErbB2-Rezeptors in Mikroglia und anschließender Mikrogliose bei neuropathischen Schmerzverhalten in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus führte die Inhibierung dieses Signalwegs zu einer reduzierten mechanischen

Hypersensitivität im SNL-Modell für neuropathische Schmerzen (Calvo u. a., 2010). Des Weiteren führen Störungen des ErbB2-Signalwegs in Schwann-Zellen zu Änderungen der sensorischen Eigenschaften und damit zu chronischen Schmerzen (Campana, 2007). Obwohl Neuregulin 1 Typ III viele Cystein-reiche Domänen aufweist (Buonanno und Fischbach, 2001) konnte eine Regulation dieses Proteins durch reaktive Sauerstoffspezies bis heute noch nicht demonstriert werden. Vielmehr scheint der NGR1-vermittelte Signalweg die ROS-Produktion zu induzieren und so eine neuronale Differenzierung zu regulieren (Goldsmith u. a., 2001), so dass es eher unwahrscheinlich scheint, dass Nox4 über den NGR1-ErbB-Signalweg Myelinisierungsprozesse beeinflusst.

Nach peripherer Nervenverletzung kommt es zur Anreicherung residierender und zirkulierender Makrophagen und damit zur Phagozytose axonaler Trümmer und Myelinbestandteile. Sie schütten unter anderem Matrix Metalloproteinasen aus, die zur Schädigung der Blut-Nerv-Schranke führen. Die aktivierten Makrophagen tragen zum Abbau degenerierender Axone und Myelintrümmer nach peripherer Nervenverletzung bei und helfen so bei der Reorganisation verbleibender Schwann-Zellen und dem Auswachsen der verletzten Axone (Scholz und Woolf, 2007). Interessanterweise konnte durch eine Abschwächung der Makrophagen-Rekrutierung eine reduzierte Hyperalgesie in einem Modell für neuropathische Schmerzen sowie eine reduzierte wallerianische Degeneration beobachtet werden (Thacker u. a., 2007). Somit scheint die Makrophagen-Aktivierung auch zu neuropathischen Schmerzen beizutragen. In einem *in vitro* Modell zum Abbau von Myelin konnte eine ROS-abhängige Myelin-Phagozytose demonstriert werden, welche durch Behandlung mit einem nicht-spezifischen Nox-Inhibitor reduziert wurde. Interessanterweise konnte die Myelin-Phagozytose durch Applikation von Katalase und Mannitol, die H_2O_2 bzw. OH^- abbauen, gehemmt werden, nicht aber durch Behandlung mit der Superoxid-Dismutase, die für den Abbau von O_2^- zuständig ist (van der Goes u. a., 1998). Da Wasserstoff-Peroxid das primäre Effektormolekül der Nox4-vermittelten Signaltransduktion darstellt, könnte der hier beobachtete Effekt auf einer Beteiligung von Nox4 beruhen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Makrophagen-Aktivierung bei der Nox4-vermittelten Degeneration peripherer Myelinproteine eine Rolle spielt.

Wie bereits oben erwähnt, kommt es nach Verletzung peripherer Nerven zur Ausschüttung von Proteasen und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) aus Schwann-Zellen, Makrophagen, DRG-Neuronen und Satelliten-Zellen (Ji u. a., 2009b; Gosselin u. a., 2010). Sie wurden im Gehirn-Parenchym mit einem Myelin-Verlust und axonaler Verletzung in Verbindung gebracht und haben eine schädliche Wirkung bei neuralen Schädigungen des zentralen

Nervensystems wie Multiple Sklerose, Verletzungen des Rückenmarks und Schlaganfall (Yong, 2005). Die Freisetzung von Proteasen führt zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, wodurch zirkulierende Immunzellen ins Nervengewebe eindringen und nozizeptionsvermittelte Aktionen ausüben (Gosselin u. a., 2010). Matrix Metalloproteinasen sind Endopeptidasen, die eine wichtige Rolle bei Inflammationsprozessen spielen, da sie zur Abspaltung extrazellulärer Matrixproteine, Chemokine und Cytokine beitragen (Ji u. a., 2009b). Generell werden sie als inaktive Pro-Enzyme ausgeschüttet und anschließend durch proteolytische Spaltung oder Oxidation des Cystein-Rests im aktiven Zentrum aktiviert (Dev u. a., 2010). Sowohl MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 als auch MMP12 wurden mit neuropathischen Schmerzen in Zusammenhang gebracht: Während MMP9 beispielsweise bei der Induktion neuropathischer Schmerzen beteiligt zu sein scheint, spielt MMP2 erst in der späten Phase eine Rolle (Kawasaki u. a., 2008; Ji u. a., 2009b; Dev u. a., 2010). Nach einer Crush-Verletzung des *N. ischiadicus* kommt es zu einer schnellen Hochregulation und Aktivierung von MMP9, die mit Demyelinisierungsprozessen des peripheren Nervs einhergeht. Ferner kann durch selektive Gen-Deletion von MMP9 sowie durch Applikation eines MMP-Inhibitors das neuropathische Schmerzverhalten und die Degradation des Myelin-Basic-Proteins (MBP) reduziert werden (Chattopadhyay u. a., 2007; Kobayashi u. a., 2008). Interessanterweise können MMPs sowohl auf Transkriptions- sowie auf Post-Transkriptionsebene von reaktiven Sauerstoffspezies aktiviert werden (Siwik und Colucci, 2004) und stellen somit auch ein potentielles Target der Nox4-produzierten ROS dar. Darüber hinaus wurden die ROS-generierenden NADPH-Oxidase mit der Induktion von Matrix Metalloproteinasen in Verbindung gebracht. In Raw-Makrophagen scheint Nox2 unter anderem die Expression von MMP9 zu induzieren und damit Zellmigration zu ermöglichen (Kim u. a., 2010b). Es ist daher denkbar, dass Nox4 eine Rolle bei der Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen spielt und so die Degeneration peripherer Myelinproteine beeinflusst (Abbildung 47).

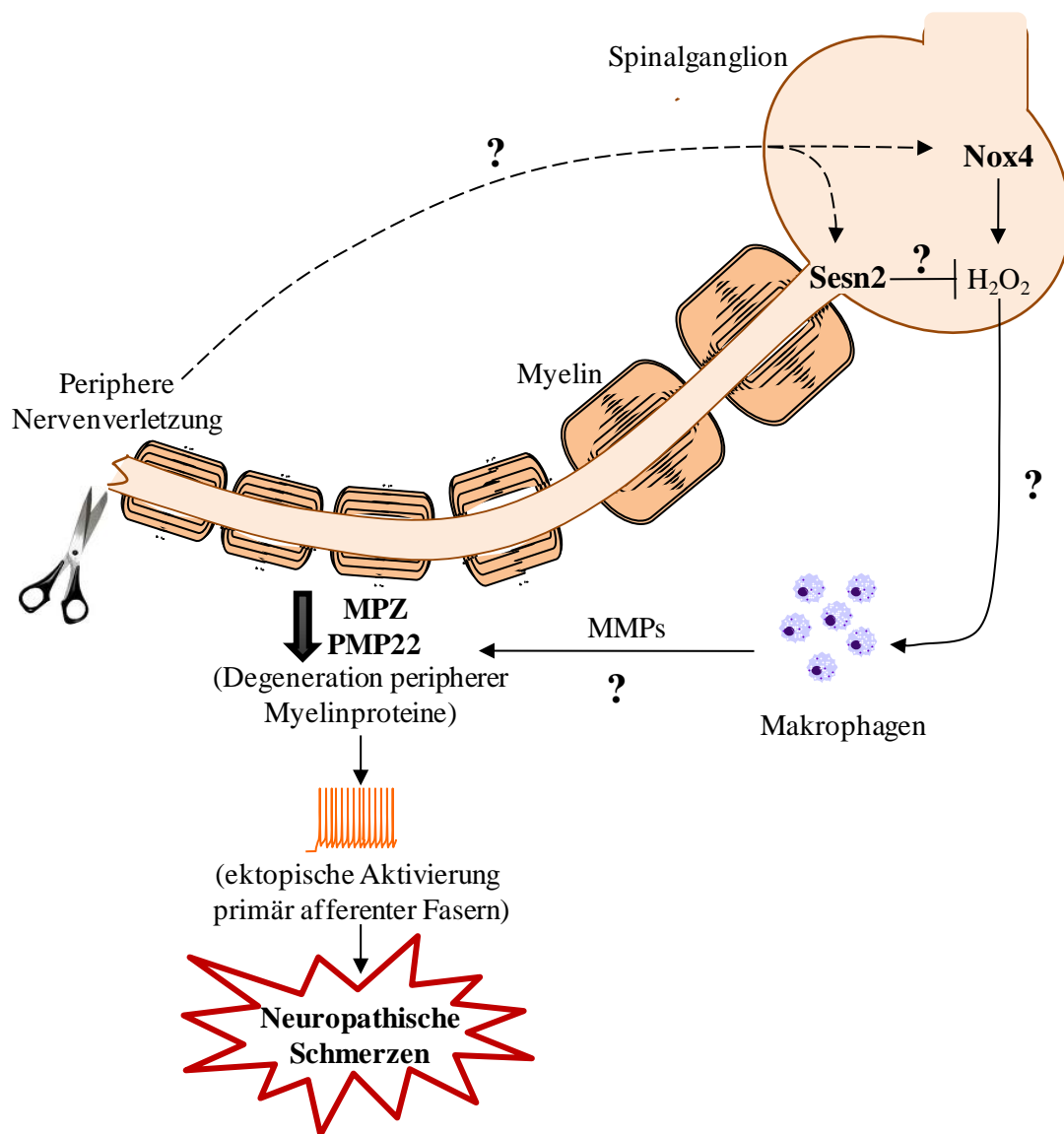


Abbildung 47. Hypothetische Darstellung der Nox4- und Sesn2-abhängigen Verarbeitung neuropathischer Schmerzen. Nach Verletzung des peripheren Nervengewebes kommt es zur Aktivierung von Nox4 und damit zur Produktion von H₂O₂. Dieses könnte möglicherweise zur Aktivierung von Makrophagen beitragen, die dann zur Degeneration peripherer Myelinproteine beitragen. Der Abbau von Myelinproteinen führt zur ektopischen Aktivierung primär afferenter Fasern und induziert so neuropathische Schmerzen. Darüber hinaus wird Sesn2, das Peroxide abbaut, hochreguliert und steuert daher der Nox4-abhängigen Signalkaskade gegen.

4.2 Weitere ROS-generierende Systeme in nozizeptiven Signalwegen

Neben der NADPH Oxidase 4 scheinen auch die Nox-Isoformen Nox1 und Nox2 bei nozizeptiven Signalkaskaden involviert zu sein (Ibi u. a., 2008; Kim u. a., 2010a). Die mRNA-Expression der Nox-Isoformen Nox1, Nox2 und Nox4 wurde bereits 2008 in einer Studie von Ibi u. a. in Spinalganglien und in Pfortengewebe beschrieben. Ferner wurde beobachtet, dass Nox1^{-/-}-Mäuse ein reduziertes nozizeptives Verhalten in dem Formalin-Test

(Phase 2), in dem Essigsäure-induzierten ‚Writhing-Test‘ für viszerale Schmerzen und dem Carrageenan-Modell für inflammatorische Schmerzen zeigen. Akutes nozizeptives Verhalten war bei diesen Tieren hingegen unverändert (Ibi u. a., 2008). Ein Mechanismus der Nox1-beteiligten Schmerzweiterleitung liegt möglicherweise in der Nox1-abhängigen Translokation der PKC ϵ und damit der verstärkten Aktivierung von TRPV1-Kanälen. Da Nox1-mRNA jedoch sowohl im Rückenmark, in den DRGs als auch in der Pfote nachgewiesen werden konnte, bleibt weiterhin unklar, ob die hier beobachteten Effekte auf Veränderungen im peripheren oder zentralen Nervensystem zurückzuführen sind (Sorce und Krause, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der Nox1-mRNA weder in den Spinalganglien noch im Rückenmark verlässlich nachgewiesen werden. Ursachen hierfür liegen möglicherweise in den verschiedenen Mauslinien oder aber auch in den verwendeten Primern bzw. Taqman-Assays für die Real-time quantitative RT-PCR, die sich in ihrer Effizienz unterscheiden können. Nox1 wurde daher in den Expressionsanalysen für inflammatorische und neuropathische Schmerzmodelle in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es bleibt somit offen, ob die Expression der Nox1-mRNA in Modellen für inflammatorische Schmerzen reguliert wird und eine erhöhte Nox1-Produktion mit einer gesteigerten ROS-Formation und Aktivierung von TRPV1 einhergeht.

Wie oben erwähnt, scheint Nox2 im Gegensatz zu Nox1 bei der nozizeptiven Verarbeitung neuropathischer Signale eine Rolle zu spielen. In dem SNT-Modell für neuropathische Schmerzen konnte eine Hochregulation der Nox2-mRNA im Rückenmark bereits kurz nach der Nervenverletzung detektiert werden. Ferner wurde gezeigt, dass das Nox2-Protein in Mikrogliazellen des Rückenmarks exprimiert ist. Nox2^{-/-}-Mäuse zeigten in dem SNT-Modell eine abgeschwächte mechanische Allodynie sowie eine verringerte thermische Hyperalgesie (Kim u. a., 2010a). Des Weiteren waren Marker wie CD11b und Iba1, die charakteristisch für aktivierte Mikroglia sind, in Nox2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Tieren nach peripherer Nervenverletzung nur sehr schwach reguliert. Darüber hinaus konnte eine verringerte Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine im Rückenmark von Nox2^{-/-}-Mäusen beobachtet werden (Kim u. a., 2010a). Während die Studie von Kim u. a. (2010a) überwiegend auf das Rückenmark als Ort der Nox2-vermittelten Schmerzweiterleitung fokussiert war, konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine Hochregulation der Nox2-mRNA in den Spinalganglien nach peripherer Nervenverletzung beobachtet werden. Im Gegensatz zum Rückenmark, in welchem die beschriebene kurzweilige Hochregulation der Nox2-mRNA bestätigt werden konnte, ist die verstärkte periphere Expression von Nox2 in Spinalganglien auch noch 21 Tage nach der SNI-Operation

signifikant (Abbildung 17). Es ist daher durchaus denkbar, dass auch periphere Mechanismen in der Nox2-vermittelten Sensibilisierung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielen könnten. Wie oben beschrieben, wird Nox2 im Rückenmark in Mikroglia exprimiert (Kim u. a. 2010a). Im Gegensatz hierzu konnte Nox4 in primär afferenten Neuronen detektiert werden, nicht aber in Gliazellen des Rückenmarks. Somit scheinen die verschiedenen Nox-Isoformen im nozizeptiven System verschiedene Expressionsmuster aufzuweisen und an verschiedenen Stellen der Schmerzverarbeitung ihre spezifische Rolle einzunehmen (Abbildung 48).

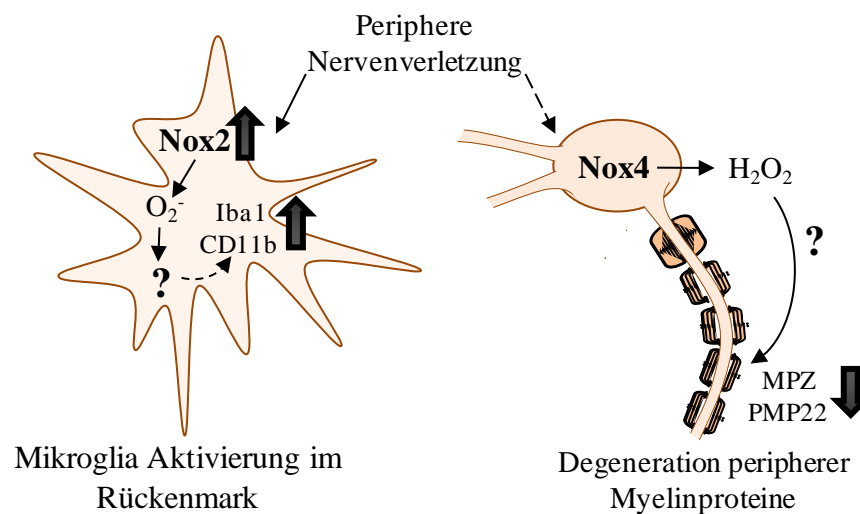


Abbildung 48. Hypothetische Darstellung der Bedeutung der verschiedenen Nox-Isoformen bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale nach peripherer Nervenverletzung. Während Nox2 in den Mikroglia des Rückenmarks hochreguliert wird und deren Aktivierung steuert, wird Nox4 in den Neuronen der Spinalganglien aktiviert und ist an der Degeneration peripherer Myelinproteine beteiligt. Nox2 und Nox4 beeinflussen demnach die Schmerzverarbeitung über unterschiedliche Mechanismen.

Neben den Befunden für die NADPH Oxidasen gibt es auch Hinweise, die auf eine mitochondriale Beteiligung bei der ROS-vermittelten Schmerzweiterleitung deuten (Kim u. a., 2008; Schwartz u. a., 2009). Durch die Hemmung des Komplex I oder Komplex III der mitochondrialen Atmungskette können Elektronen diese nicht mehr vollständig durchlaufen und werden frühzeitig auf molekularen Sauerstoff übertragen, der zu Superoxid reduziert wird. Es kommt somit zur Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies. In nozizeptiven Studien im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die intrathekale Injektion von Inhibitoren des mitochondrialen Komplex I und III eine mechanische Hyperalgesie induziert, die wiederum durch systemische Applikation von PBN oder TEMPOL reduziert werden kann (Kim u. a., 2008). Des Weiteren wurde mit Hilfe eines Farbstoffs, der spezifisch mit mitochondrialem Superoxid reagiert (MitoSox Red), eine durch Pfotenstimulation mit Capsaicin induzierte Superoxid-Produktion in Rückenmarks-Neuronen nachgewiesen (Schwartz u. a., 2008). Die

Bedeutung der Familie der NADPH Oxidassen und anderer ROS-produzierender Systeme im nozizeptiven System scheint daher vielseitig zu sein. Ferner scheint es plausibel, dass reaktive Sauerstoffspezies der verschiedenen ROS-Quellen auch an unterschiedlichen Punkten der nozizeptiven Signalkaskaden eingreifen.

Wie reaktive Sauerstoffspezies im Detail die Schmerzweiterleitung beeinflussen, ist noch weitestgehend ungeklärt, jedoch deuten erste Studien auf vielseitige Wirkmechanismen hin. Elektrophysiologische Messungen von „Wide Dynamic Range“ (WDR) Neuronen im Rückenmark haben gezeigt, dass diese nach intradermaler Capsaicin-Injektion, einem Modell für akute Entzündungsschmerzen, verstärkt aktiviert werden, was durch systemische Applikation der Antioxidantien TEMPOL oder PBN wieder reduziert werden kann (Lee u. a., 2007). Ferner wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors, die mit der Capsaicin-induzierten Hyperalgesie einhergeht und ein Indikator für die Schmerzsensibilisierung ist, durch systemische Applikation von PBN reduziert werden kann. Gleichzeitig kann eine mechanische Hyperalgesie durch Gabe von PBN reduziert werden (Gao u. a., 2007). Ob es sich hierbei um eine direkte Aktivierung von Proteinkinasen durch reaktive Sauerstoffspezies handelt, die wiederum zur Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors beitragen, oder eine ROS-vermittelte Hemmung von Phosphatase vorliegt, bleibt jedoch weiterhin unklar.

Ergänzend zu der Studie von Gao u.a. (2007) wurde in elektrophysiologischen Studien an Rückenmarksschnitten gezeigt, dass exzitatorische postsynaptische Potentiale, hervorgerufen durch Stimulation dorsaler Fasern, durch Antioxidantien inhibiert sowie durch Applikation des ROS-Donors *Tert*-butyl Hydroperoxid (t-BOOH) induziert werden können. Demnach können reaktive Sauerstoffspezies zur Langzeitpotenzierung (LTP) im Rückenmark beitragen (Lee u. a., 2010). Während die Induktion der Hoch-Frequenz-Stimulation-induzierten LTP sowohl durch PBN und den NMDA-Rezeptor Antagonist d-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D -AP5) inhibiert werden kann, zeigt nur PBN in der Hemmung der Aufrechterhaltung der LTP eine Wirkung. Hieraus lässt sich folgern, dass reaktive Sauerstoffspezies in diesem Signalweg der NMDA-Rezeptor-Aktivierung nachgeschaltet sind und bei der Aufrechterhaltung der LTP in der zentralen Sensibilisierung eine Rolle spielen (Lee u. a., 2010). Es scheint aber auch möglich, dass NMDA-Rezeptoren direkt durch reaktive Sauerstoffspezies moduliert werden können und damit zu Sensibilisierungsprozessen bei Schmerzen beitragen. Die Reduktion oder Oxidation bestimmter Cystein-Reste an NMDA-Rezeptor-Untereinheiten führt zu Konformationsänderungen und damit zu einem erleichterten

Ca²⁺ Einstrom bzw. einer Blockade des Kanals und damit zur Änderungen seiner Leitfähigkeit (Lipton u. a., 2002; Sorce und Krause, 2009).

Generell könnten reaktive Sauerstoffspezies auch Einfluss auf den Glutamat-Haushalt haben. Liegt Glutamat extrazellulär in zu hohen Konzentrationen vor (> 1 µM) wirkt es toxisch und führt zum Zelltod. Die Wiederaufnahme extrazellulären Glutamats erfolgt durch die Natrium-abhängigen Glutamat-Transporter, die in Neuronen und Astrozyten exprimiert werden. Hohe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies könnten zur Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen und damit zur Inaktivierung der Glutamat-Transporter führen und damit die Glutamat-abhängige Signaltransduktion verstärken (Trotti u. a., 1998; Maher und Schubert, 2000).

Auch in Bezug auf neuropathische Schmerzen wurden neurale Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies genauer untersucht. ‚Whole cell voltage clamp‘ Aufnahmen von *Substantia gelatinosa* (SG) Neuronen des Dorsalhorns des Rückenmarks haben gezeigt, dass nach Perfusion mit dem ROS-Donor t-BOOH die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale reduziert werden, während die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale unverändert bleiben. In dem SNL-Modell für neuropathische Schmerzen sind ebenfalls die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale der SG-Neurone reduziert. Dieser Effekt konnte in beiden Fällen durch Applikation von PBN gehemmt werden (Yowtak u. a., 2011), was darauf hindeutet, dass ROS über die Hemmung von inhibitorischen Signalwegen neuropathische Schmerzen modulieren könnten. Ferner wurde gezeigt, dass t-BOOH spezifisch die Frequenz von GABA_A Rezeptor-vermittelten inhibitorischen Signaltransduktion hemmt, während es keinen Einfluss auf den Glycin-Rezeptor vermittelten Signalweg nimmt (Yowtak u. a., 2011). Diese Studien legen nahe, dass eine Verabreichung von Antioxidantien antinozizeptive Effekte in verschiedenen Schmerzmodellen ausüben kann.

4.3 Sestrin 2 und andere antioxidative Systeme bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale

Auch antioxidative Systeme scheinen eine Rolle in der Verarbeitung von Schmerzsignalen einzunehmen. Möglicherweise werden reaktive Sauerstoffspezies im nozizeptiven System durch Peroxiredoxine abgebaut. Peroxiredoxine wurden mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und dem Down-Syndrom in Verbindung gebracht, wo sie spezifisch hoch- bzw. runter reguliert werden (Bell und Hardingham, 2011). Die Expression und Funktion von Peroxiredoxinen im zentralen und

peripheren Nervensystem ist nur ansatzweise untersucht. Im Vorderhirn der Maus werden beispielsweise Prdx II, IV und V neuronal exprimiert, während Prdx VI in Astrozyten und Prdx I in Mikroglia zu finden sind. Darüber hinaus wird Prdx I auch im Nervensystem der Ratte überwiegend in Gliazellen wie Oligodendrozyten bzw. Schwann-Zellen exprimiert (Mizusawa u. a., 2000). Die Expression von Prdx V konnte im *N. suralis* und in den Axon-umgebenden Schwann-Zellen humaner Proben nachgewiesen werden (Lu u. a., 2006) und Prdx I und Prdx VI scheinen in primären DRG-Kulturen axonal transkribiert zu werden (Willis u. a., 2005), was auf eine Expression von Peroxiredoxinen im nozizeptiven System hinweist. Wie eingangs beschrieben können Peroxiredoxine bei sehr großem oxidativen Stress überoxidiert und damit inaktiviert werden. Die Reaktivierung basiert auf der ATP-abhängigen Reduktion durch Sulfiredoxine oder Sestrine. Somit sind Sestrine indirekt am Abbau von Peroxiden beteiligt (Jönsson und Lowther, 2007). Zur Überoxidation von Peroxiredoxinen kommt es auch im zentralen Nervensystem. In einem Schlaganfallsmodell in der Maus konnte beispielsweise die Inaktivierung von Prdx III beobachtet werden (Bell und Hardingham, 2011). Die Funktion der Peroxiredoxin-reaktivierenden Sestrinen im zentralen oder peripheren Nervensystem ist jedoch nur wenig untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von Sestrin 2 (*Sesn2*) an der Verarbeitung von neuropathischen Schmerzsignalen demonstriert. *Sesn2*-mRNA wird spezifisch in dem SNI-Modell für neuropathischen Schmerz in den Spinalganglien hochreguliert, zeigt jedoch keine Regulation im Rückenmark. Auf Proteinebene kann die Hochregulation von *Sesn2* im Nerv nach SNI-induzierter peripherer Nervenverletzung beobachtet werden, während die *Sesn2*-Expression in den Spinalganglien in etwa gleich bleibt. Dies deutet darauf hin, dass das in den Spinalganglien produzierte *Sesn2* infolge der Nervenverletzung in die axonalen Fortsätze transportiert wird. *Sesn2*^{-/-}-Mäuse weisen keine Beeinträchtigung der motorischen Koordination auf. Darüber hinaus zeigen sie auch keine morphologischen Veränderungen des Rückenmarks oder eine veränderte Zusammensetzung der DRG-Neuronen-Populationen. Ihr Schmerzverhalten war im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen und in der Phase 2 des Formalin-Tests verstärkt, während im Modell der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie ihr Schmerzphänotyp ähnlich dem der wildtypischen Wurfgeschwister war. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Sestrin 2 eine protektive Funktion in der neuropathischen Schmerzweiterleitung einnimmt. Der Formalin-Test und die Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie werden beide als Modelle zur Untersuchung des inflammatorischen Schmerzverhaltens herangezogen. Es ist aber zu beachten, dass hier verschiedene nozizeptive Signalkaskaden angeschaltet werden.

Durch die Injektion einer Formalin-Lösung kommt es zur Aktivierung von TRPA1-Kanälen (Macpherson u. a., 2007; McNamara u. a., 2007), jedoch werden durch hohe Formalin-Konzentrationen, wie sie bei den *Sesn2*^{-/-}-Mäusen eingesetzt wurden, auch andere Nozizeptoren aktiviert (Shields u. a., 2010). Darüber hinaus kann der Formalin-Test, sofern hohe Formalin-Konzentrationen eingesetzt werden, auch neuropathische Komponenten enthalten. Der ‚activating transcription factor 3‘ (ATF3), der als ein Marker für Verletzung neuralen Gewebes verwendet wird, wird nach Injektion von hohen Formalin-Konzentrationen (2-5 %) in sensorischen Neuronen hochreguliert, während dieser Effekt bei niedrigen Formalin-Konzentrationen (0,5 %) nicht zu beobachten ist (Bráz und Basbaum, 2010). Im Gegensatz zum Formalin-Test wird das Modell der Zymosan-induzierten Hyperalgesie als reines inflammatorisches Modell angesehen (Meller und Gebhart, 1997). Zwar konnte eine signifikante Herabregulation der *Sesn2*-mRNA in den Spinalganglien nach Zymosan-Injektion in eine Hinterpfote beobachtet werden, jedoch war die Regulation nur sehr schwach ausgeprägt. Da die Tiere keinen Phänotyp in dem Zymosan-Modell für inflammatorische Schmerzen zeigten, scheint die hier beobachtete schwache Regulation der *Sesn2*-mRNA nicht im direkten Zusammenhang mit der Verarbeitung inflammatorischer Schmerzsignale zu stehen.

Die Aktivierung von *Sesn2* auf Transkriptionsebene ist sehr wahrscheinlich. Generell wurden *Sestrin* als p53-regulierte Gene beschrieben, deren Expression durch DNA-Schädigung oder oxidativen Stress induziert wird (Szabó u. a. 2009). Interessanterweise konnte in einer Studie an kortikalen Neuronenkulturen eine NMDA-Rezeptor-aktivitätsabhängige Hochregulation von *Sestrin 2* beobachtet werden (Papadia u. a., 2008), die wahrscheinlich durch eine gesteigerte Histon-Acetylierung des *Sesn2*-Promotors erklärbar ist (Soriano u. a., 2009). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte die Induktion von *Sesn2* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene beobachtet werden, was für die transkriptionelle Regulation der *Sesn2*-Aktivität spricht. Da nur eine Regulation der *Sesn2*-mRNA in den Spinalganglien bzw. des *Sesn2*-Proteins im Nerv, nicht aber im Rückenmark, detektiert wurde, könnten auch hier primär periphere Mechanismen eine Rolle spielen. Interessanterweise konnte in den *Sesn2*^{-/-}-Mäusen auch eine tendenziell stärkere Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in den Spinalganglien und im *N. ischiadicus* 14 Tage nach peripherer Nervenverletzung beobachtet werden, was wiederum auf einen peripheren Mechanismus hindeutet. Unklar bleibt jedoch, welche Peroxiredoxin-Proteine potentielle *Sesn2*-Target-Moleküle darstellen könnten, da zur Expression von Peroxiredoxinen im peripheren Nervensystem, wie oben beschrieben, nur wenig bekannt ist.

Obwohl Sestrin 2 primär mit der Regeneration überoxidiertes Peroxiredoxine in Zusammenhang gebracht wurde (Budanov u. a., 2002, 2004), scheint Sesn2 auch eine Redox-unabhängige Funktion auszuüben. Interessanterweise konnte die Prdx-reaktivierende Funktion von Sesn2 nicht von allen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Woo u. a., 2009). Eine redox-unabhängige Rolle von Sesn2 könnte in der Regulation des ‚mammalian target of rapamycin complex 1‘ (mTORC1) liegen. Zusammen mit Sesn1 kann es die Aktivierung von Inhibitoren des mTORC1-Signalweges induzieren und somit zur Hemmung des mTORC1-Komplexes beitragen (Budanov und Karin, 2008; Hay, 2008). Da aber, wie oben beschrieben, eine verstärkte Akkumulation des H₂O₂-abhängigen Resorufin-Signals in den Spinalganglien und im *N. ischiadicus* in Sesn2^{-/-}-Mäusen gemessen wurde, spricht dies eher für eine redox-abhängige Rolle von Sesn2 bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale.

Neben dem Peroxiredoxin/Sestrin-System könnten auch andere ROS-abbauende Systeme bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale beteiligt sein. Einige Untersuchungen lassen vermuten, dass unter anderem die Superoxid-Dismutase (SOD) eine wichtige Rolle bei der nozizeptiven Transduktion spielt. Zum einen scheint in dem SNT-Modell für neuropathische Schmerzen die SOD-Aktivität im Rückenmark sieben Tage nach dem Eingriff reduziert zu sein, während die Aktivität der Katalase sowohl in der Sham-operierten Kontrollgruppe als auch in der SNT-Gruppe reduziert war (Guedes u. a., 2006). Darüber hinaus wird im Carrageenan-Modell für inflammatorische Schmerzen die mitochondriale SOD nitriert und damit deaktiviert, was wiederum durch den Einsatz von SOD-Mimetika wie M40403 inhibiert werden konnte (Wang u. a., 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Capsaicin-Modell für inflammatorische Schmerzen gemacht, bei dem es ebenfalls zu einer Nitrierung und damit zu einer Inaktivierung von SOD2 kommt (Schwartz u. a., 2009). Demzufolge könnte eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies zur Hemmung von Superoxid-Dismutasen führen, damit den Abbau von Superoxid inhibieren und Superoxid-induzierte Signalwege verstärken. Ergänzend hierzu konnte in einer Studie mit transgenen Ratten, die eine mutierte Form der Superoxid-Dismutase 1 (hSOD1^{G93A}) tragen, gezeigt werden, dass diese Tiere in dem ‚partial sciatic nerve ligation‘ (PSNL)-Modell für neuropathische Schmerzen eine verstärkte thermische Hypersensitivität aufweisen, während die mechanische Hypersensitivität nicht signifikant verstärkt war (Berger u. a., 2011). Ob jedoch andere SOD-Isoformen Einfluss auf die mechanische Hypersensitivität nehmen, kann nicht ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint es möglich, dass auch die verschiedenen SOD-Enzyme bei unterschiedlichen Schmerzmodellen ihre spezifische Funktion einnehmen.

4.4 Reaktive Sauerstoffspezies als potentielle Targets zur Therapie neuropathischer Schmerzen

Im Gegensatz zu inflammatorischen Schmerzen, die meist durch nicht-steroidale Antiphlogistika therapiert werden können, erweist sich die Behandlung neuropathischer Schmerzen als schwierig. Es kommen unter anderem bestimmte Antidepressiva, einige wenige Antiepileptika oder Opioide zum Einsatz, jedoch ist die Therapie oft mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden (Dev u. a., 2010; Gao und Ji, 2010). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch Applikation von PBN, Vitamin E oder einer Kombination aus Vitamin C und E analgetische Effekte auch in neuropathischen Schmerzmodellen erzielt werden können (Kim u. a., 2004, 2006; Mao u. a., 2009; Lu u. a., 2011). Daher könnte die Verabreichung von ROS-Scavengern ein neuer Ansatz für die Entwicklung neuer Analgetika zur Behandlung von Neuropathien sein.

Da *Sesn2*^{-/-}-Mäuse, wie oben beschrieben, ein verstärktes Schmerzverhalten in der Phase 2 des Formalin-Tests sowie in dem SNI-Modell für neuropathische Schmerzen zeigten, scheinen antioxidative Systeme bei der Pathogenese von Schmerzen besonders wichtig zu sein. Kommt es zum Verlust ROS-abbauender Systeme, resultiert dies in einer verstärkten nozizeptiven Antwort. Dies und die Beobachtung, dass die Applikation von Antioxidantien neuropathisches Schmerzverhalten lindern kann, suggerieren, dass die gezielte Aktivierung ROS-abbauender Systeme möglicherweise als Therapieansatz zur Behandlung neuropathischer Schmerzen geeignet wäre. Da reaktiven Sauerstoffspezies jedoch eine besondere Bedeutung als Signalmoleküle zugesprochen werden kann, wäre eine lokale schmerzspezifische Wirksamkeit dieser Aktivatoren wünschenswert, um mögliche unerwünschte Nebeneffekte, beispielsweise im kardiovaskulären System, zu minimieren.

Zusätzlich zu Studien an *Nox4*^{-/-}-Mäusen wurde das neuropathische Schmerzverhalten auch in Mäusen untersucht, bei denen das *Nox4*-Gen ‚gefloxed‘ und durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen ausgeschaltet wird. Der *Nox4*-Knockdown wurde zu einem Zeitpunkt eingeleitet, zu dem das neuropathische Schmerzverhalten voll ausgeprägt war. Er resultierte in einer Reduktion mechanischer Hypersensitivität zwei Wochen nach der ersten Tamoxifen-Behandlung. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass sich der Knockdown von *Nox4* oder eine spezifische *Nox4*-Hemmung positiv auf den ‚neuropathischen Schmerz‘ auswirken könnten.

In diesem Versuch wurde eine sehr niedrige Tamoxifen-Dosis gewählt (1 mg/Tag i.p. für drei Tage), um mögliche unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen, die eventuell die Analyse des nozizeptiven Verhaltens beeinträchtigen könnten. Untersuchungen der *Nox4*-

mRNA-Expression nach Versuchsende zeigte in den Spinalganglien eine signifikante Reduktion der Nox4-mRNA-Expression auf etwa 50 %. Im Rückenmark konnte lediglich eine Reduktion der Nox4-Expression auf ca. 80 % erreicht werden, im peripheren Gewebe hingegen wurde eine fast vollständige Reduktion der Nox4-Expression durch die Tamoxifen-Behandlung erzielt. Dies bestätigt frühere Befunde, in welchen berichtet wurde, dass Tamoxifen und sein Metabolit 4-Hydroxytamoxifen, der die Cre-abhängige Rekombination induziert, nicht leicht die Blut-Hirnschranke passieren und daher nur eine limitierte Rekombination im Rückenmark vorliegt (Feil u. a., 2009). Da das neuropathische Schmerzverhalten in den induzierbaren Nox4^{-/-}-Mäusen dennoch verändert ist, kann gefolgert werden, dass das in den DRG-Neuronen exprimierte Nox4 hauptsächlich zur Pathogenese neuropathischer Schmerzen beiträgt. Der Nox4-Knockdown scheint sich bei bereits existierenden neuropathischen Schmerzen dennoch positiv auf das Schmerzverhalten in Mäusen auszuwirken. Somit stellt sich die Frage, ob sich auch eine Hemmung von Nox4 bei humanen Patienten mit neuropathischen Schmerzen positiv auf das Schmerzempfinden auswirken könnte. Da die physiologische Bedeutung von Nox4 jedoch nur ansatzweise verstanden ist und beispielsweise auch zum Teil widersprüchliche Erkenntnisse zu der Rolle von Nox4 bei Herzinsuffizienz veröffentlicht wurden (Kuroda u. a., 2010; Zhang u. a., 2010; Brandes u. a., 2011), sind mögliche unerwünschte Nebenwirkungen einer Nox4-spezifischen Hemmung schwer abschätzbar. Als Therapie-Möglichkeit könnte auch eine duale Nox2/Nox4-Hemmung denkbar sein, da sowohl Nox2 als auch Nox4 mit mechanischer Allodynie in neuropathischen Schmerzmodellen in Verbindung gebracht werden kann, aber keine vollständige Reduktion des Schmerzverhaltens bei den Nox2- oder Nox4-Knockouts beobachtet werden konnte (Kim u. a., 2010a).

Generell erweist sich die spezifische Inhibition der verschiedenen Nox-Isoformen als schwierig. Es sind verschiedene Substanzen mit Nox-inhibitorischen Eigenschaften bekannt, die jedoch keine hohe Spezifität aufweisen (Jaquet u. a., 2009; Sorce und Krause, 2009). Erste Studien, in denen die Eigenschaften der NADPH Oxidasen untersucht wurden, machten Gebrauch von Flavoprotein-Inhibitoren und Analoga, wie Diphenyleneiodonium (DPI), Quinacrine und 5-Deaza-FAD, Häm-Liganden, wie Bipyridyl und Benylimidazole, oder NADPH Analoga wie ADP oder Cibacron Blue. Viele der verwendeten Nox-Inhibitoren hemmen aber auch andere ROS-generierende Enzyme, blockieren Signalkaskaden, die den NADPH Oxidasen vor- bzw. nachgeschaltet sind, oder wirken als Antioxidantien. Des Weiteren sind auch Substanzen beschrieben, die die Konzentration des Elektronendonors NADPH herabsetzen oder die Expression ROS-abbauender Enzyme induzieren (Jaquet u. a.,

2009). Da die Bestimmung der Aktivität von Nox-Enzymen meist über die Messung des Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies geht, ist eine Aussage über die Spezifität der einzelnen Substanzen sorgfältig zu überprüfen. Ein oft verwendeter Nox-Inhibitor ist Diphenyleiodonium (DPI), welches ein Elektron von FAD abfängt, ein Radikal bildet, anschließend eine kovalente Bindung mit dem FAD eingeht und so die Nox-Aktivität schnell und irreversibel blockiert. Da DPI jedoch auch mit einer Vielzahl anderer Proteine reagiert, irreversible Bindungen eingeht, eine geringe Löslichkeit zeigt und eine hohe substanzspezifische Toxizität aufweist ($LD_{50} < 10$ mg/kg in Nagetieren), eignet es sich weniger als Kandidat für zukünftige Therapieformen (Jaquet u. a., 2009; Borbély u. a., 2010). Apocynin ist ein weiterer oft verwendeter Nox-Inhibitor, der jedoch, wenn er in hohen Konzentrationen (> 100 mM) eingesetzt wird, als unspezifischer ROS-Scavenger wirkt. Im Tiermodell zeigt Apocynin auch schon bei sehr geringen Dosen (2,5–5 mg/kg) eine Wirkung, was gegen einen ROS-abfangenden und für einen inhibitorischen Effekt spricht (Sorice und Krause, 2009). Vermutlich inhibiert Apocynin die Interaktion von $p47^{phox}$ mit der katalytischen Untereinheit und wäre demnach nur spezifisch für Nox-Isoformen, die abhängig von ihren zytosolischen Untereinheiten sind, nicht jedoch für Nox4, Nox5 oder DUOX1/2 (Jaquet u. a., 2009).

Verschiedene Pharmaunternehmen beschäftigen sich gegenwärtig mit der Entwicklung Nox-spezifischer Inhibitoren. GenKyoTex hat beispielsweise die Substanz GKT137831 entwickelt, die spezifisch Nox1 und Nox4 zu hemmen scheint, jedoch wenig Einfluss auf die Nox2-Aktivität nimmt (Laleu u. a., 2010) und gegenwärtig in der klinischen Phase I zur Behandlung idiopathischer Lungenfibrose getestet wird (<http://www.genkyotex.com/>). VAS2870 ist ein weiterer Nox-Inhibitor der Firma Vasopharm, dem bisher eine inhibierende Wirkung auf die Isoformen Nox1, Nox2 und Nox4 zugesprochen werden konnte (Kleinschnitz u. a., 2010; Wind u. a., 2010). Da jedoch in beiden Fällen mehr als eine Nox-Isoform gehemmt wird und verschiedene Nox-Isoformen vermutlich in andere Bereiche der nozizeptiven Transmission eingreifen, eignen sich diese Substanzen nicht, um den Effekt einer spezifischen Nox4-Inhibierung im Bezug auf neuropathische Schmerzen zu untersuchen.

Fulvene-5 wurde an der Emory Universität in Georgia, USA, entwickelt und als Substanz publiziert, die in endothelialen Tumoren Nox4 und damit das Tumorwachstum inhibiert (Bhandarkar u. a., 2009). Um die Wirkung dieser Substanz in neuropathischen Schmerzen zu untersuchen, wurde Wildtyp-Mäusen 14 Tage nach der SNI-Operation verschiedene Dosen von Fulvene-5 intrathekal appliziert und das neuropathische Schmerzverhalten untersucht. In der Tat konnte eine dosisabhängige Reduktion des neuropathischen Schmerzverhaltens an den

Tieren beobachtet werden, ohne einen Einfluss auf die motorische Koordination zu nehmen. Um den Effekt von Fulvene-5 zu verifizieren wurde der Effekt dieser Substanz auch in Nox4^{-/-}-Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch, dass auch in diesen Tieren neuropathisches Schmerzverhalten weiter reduziert werden konnte, was darauf hin deutet, dass Fulvene-5 sich zwar positiv in der Therapie neuropathischer Schmerzen auswirken könnte, jedoch offenbar ein Nox4-unabhängiger Wirkmechanismus vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Beteiligung des ROS-generierenden Systems Nox4 sowie des Peroxid-abbauenden-Systems Sestrin 2 an der Schmerzsensibilisierung bei neuropathischen Schmerzen demonstriert werden. Während eine Nox4-Aktivierung bei neuropathischen Schmerzen pronozizeptive Effekte zeigt, scheint eine Sesn2-Aktivierung antinozizeptiv zu wirken. Eine selektive Hemmung von Nox4 bzw. die spezifische Aktivierung von Sesn2 könnte daher ein neues Wirkprinzip zur Behandlung neuropathischer Schmerzen darstellen. Somit könnte die Entwicklung selektiver Nox4-Inhibitoren oder Sesn2-Aktivatoren eine neue Option für die Therapie von neuropathischen Schmerzen bedeuten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei Entzündung oder Verletzung peripherer Gewebe und Nerven kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im schmerzleitenden System. Welche ROS-generierenden Systeme hierbei beteiligt sind, ist jedoch nur ansatzweise verstanden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ROS-produzierende NADPH Oxidase 4 (Nox4) einen wichtigen ROS-Generator im nozizeptiven System darstellt. Nox4 wird in unmyelinisierten nicht-peptidergen sowie in myelinisierten primär afferenten Neuronen exprimiert. In Modellen für akute und inflammatorische Schmerzen zeigten Nox4^{-/-}-Mäuse ein ähnliches Verhalten wie ihre wildtypischen Wurfgeschwister, jedoch war ihr Schmerzverhalten in Modellen für neuropathische Schmerzen reduziert. Eine Microarray-Analyse des lumbalen Rückenmarks nach peripherer Nervenverletzung zeigte eine Hochregulation der Expression Myelin-spezifischer Gene in Wildtyp-, nicht aber in Nox4^{-/-}-Mäusen. Darüber hinaus wurden in Wildtyp-Mäusen Myelin-spezifische Proteine im *N. ischiadicus* nach peripherer Nervenverletzung herab reguliert, während in Nox4^{-/-}-Mäusen keine Regulation dieser Proteine beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nox4 eine essentielle Rolle bei Myelinisierungsprozessen spielt und so die Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale beeinflusst.

Neben dem ROS-produzierenden System Nox4 wurde auch die Rolle des Peroxid-abbauenden Proteins Sestrin 2 (Sesn2) im nozizeptiven System untersucht. Nach peripherer Nervenverletzung wurde Sesn2-mRNA in den Spinalganglien und Sesn2-Protein im peripheren Nerv hochreguliert. Sesn2^{-/-}-Mäuse zeigten ein normales Verhalten in Modellen für akute und inflammatorische Schmerzen. Ihr Schmerzverhalten war jedoch im Formalin-Test und nach peripherer Nervenverletzung verstärkt.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl Nox4 als auch Sesn2 bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzsignale wichtige Funktionen einnehmen. Während Nox4 pronozizeptiv wirkt, weist Sesn2 antinozizeptive Effekte auf. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies scheint daher ein wichtiger endogener Faktor der Sensibilisierung im Rahmen von neuropathischen Schmerzen zu sein.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ad	Auf
AF488	Alexa Fluor 488
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	„antioxidant response element“
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCI	„Chronic constriction injury“
cDNA	komplementäre DNA
CFA	Complete Freund´s Adjuvants
CGD	chronische granulomatöse Erkrankung
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	„calcitonin gene-related peptide“
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlendioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
Cre	„cyclization recombination“
CREB	„cAMP response element-binding protein“
C _T	„Cycle Threshold“
CX3CR1	„CX3C chemokine receptor 1“
Cy3	Cyanin 3

d	Tag
D-AP5	,d-2-amino-5-phosphonopentanoic acid‘
Dhh	,desert hedgehog‘
DIG	Digoxigenin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMPO	5,5-Dimethyl-pyrroline- <i>N</i> -Oxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DPI	Diphenyleneiodonium
DRGs	,dorsal root ganglia‘ (Spinalganglien)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Egr2	,early growth response 2‘
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	,extracellular signal-regulated‘ Kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanzenergietransfer
fwd	forward
g	Gramm
G6PD	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GABA	γ -Aminobuttersäure
GADD	Growth Arrest and DNA Damage
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GlyR α 3	α 3-Untereinheit des Glycinrezeptors
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Disulfid-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde
H ⁺	Proton, Wasserstoffatom

H ₂ O	<i>Aqua purificata</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
HCl	Salzsäure
HCN	‘hyperpolarization-activated cyclic nucleotid gated’
HNPP	2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide Phosphat
HO•	Hydroxyl-Radikal
HOCl	Hypochlorsäure
HRP	‘horseradish peroxidase’ (Meerrettich-Peroxidase)
i.t.	intrathekal
IASP	International Association for the Study of Pain
IB4	Isolectin B4
Iba1	‘ionized calcium-binding adaptor molecule 1’
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IκB	Inhibitor of κB
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
K ⁺	Kaliumion
kb	Kilobase
KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ -Ko-Transporter
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch Domain Protein 1
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L4	Lumbalsegement 4
LB	‘lysogeny broth’
LiCl	Lithiumchlorid
loxP	‘locus of crossing over of bacteriophage P1’
LPS	Lipopolysaccharid
LTP	Langzeit-Potenzierung
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase

mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MGB	„Minor groove binder“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGlu-Rezeptor	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2
MPZ	„Myelin Protein Zero“
mRNA	messenger RNA
mTORC1	„mammalian target of rapamycin“
n	Anzahl
n.d.	nicht detektiert
Na ⁺	Natriumion
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogencarbonat
NAC	N-Acetyl-Cystein
NaCl	physiologische Kochsalzlösung (0,9%)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDS	Normal donkey serum
NeuN	Neuronal Nuclei
NF200	Neurofilament 200
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher-Farbstoff
NF-κB	„Nuclear factor κB“
NGF	„nerve growth factor“
NGS	Normal goat serum (Ziegenserum)
NK-1	Neurokinin-1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH Oxidase

NOXA1	Nox Activator 1
NOXO1	Nox Organizer 1
Nrf2	NF-E2-related Faktor 2
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika (non steroidal anti inflammatory drug)
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Radikal
ONNO ⁻	Peroxyinitrit
PBN	Phenyl- <i>N-tert</i> -butyl-nitron
PBS	„Phosphat buffered saline“ (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
pH	Potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Protein Kinase A/ cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G/ cGMP-abhängige Proteinkinase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
Pmp22	„Peripheral Myelin Protein 22“
Poldip2	„Polymerase (DNA-directed) delta-interacting Protein 2“
Prdx	Peroxiredoxin
Prx	Periaxin
PSNL	„partial sciatic nerve ligation“
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
PTTG	„pituitary tumor transforming gene“
R	Rezeptor
R	Referenzgen
rev	reverse
RM	Rückenmark
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RO [•]	Alkoxy-Radikal
ROO [•]	Peroxy-Radikal

ROS	‚reactive oxygen species‘ (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	‚round per minute‘ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
SEM	‚standard error of the mean‘ (Standardfehler des Mittelwerts)
Sesn	Sestrin
SG	<i>Substantia gelatinosa</i>
SNAP25	SNARE Protein 25
SNI	Spared nerve injury
SNL	Spinal nerve ligation
SNT	spinal nerve transection
SOD	Superoxid-Dismutase
SPSS	‚Statistical Product and Service Solution‘
Srx	Sulfiredoxin
SSC	‚Saline sodium citrate‘ (Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer)
SubP	Substanz P
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
t-BOOH	<i>tert</i> -buty-Hydroperoxid
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy
TGF- β	‚Transforming growth factor β ‘
Tks5	Tyrosin Kinase Substrat mit fünf Src Homologen Domänen
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TR	Thioredoxin-Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkB Rezeptor	Tyrosinkinase B-Rezeptor
tRNA	transfer-RNA
TRP-Kanal	‚Transient Receptor Potential‘-Kanal

Trx	Thioredoxin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V	Volt
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
VGS-Kanal	„Voltage-gated Sodium“-Kanal
VSMC	vaskulären glatten Muskelzellen
WDR	„wide-dynamic-range“
WT	Wildtyp
Z	Zielgen
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
° C	Grad Celsius
µm	Mikrometer

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., und Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324-329.
- Ahn, D. K., Lee, S. Y., Han, S. R., Ju, J. S., Yang, G. Y., Lee, M. K., Youn, D. H., und Bae, Y. C. (2009). Intratrigeminal ganglionic injection of LPA causes neuropathic pain-like behavior and demyelination in rats. *Pain* 146, 114-120.
- Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H. H. W., Busse, R., und Brandes, R. P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem* 279, 45935-45941.
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.-L., Frapart, Y.-M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noël-Hudson, M.-S., Francon, J., u. a. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J. Biol. Chem* 280, 30046-30054.
- Apel, K., und Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.
- Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., und Krause, K. H. (2000). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287, 138-142.
- Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedűs, B., Demaurex, N., und Krause, K. H. (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem* 276, 37594-37601.
- Bánfi, B., Clark, R. A., Steger, K., und Krause, K.-H. (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem* 278, 3510-3513.
- Bánfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., und Krause, K.-H. (2004a). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem* 279, 46065-46072.
- Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G. Z., Krause, K.-H., und Cox, J. A. (2004b). Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem* 279, 18583-18591.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., und Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
- Bautista, D. M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., und Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.
- Bedard, K., und Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev* 87, 245-313.
- Bell, K. F. S., und Hardingham, G. E. (2011). CNS peroxiredoxins and their regulation in health and disease. *Antioxid. Redox Signal* 14, 1467-1477.
- Bennett, G. J., und Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.

- Berendes, H., Bridges, R. A., und Good, R. A. (1957). A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med* 40, 309-312.
- Berger, J. V., Deumens, R., Goursaud, S., Schäfer, S., Lavand'homme, P., Joosten, E. A., und Hermans, E. (2011). Enhanced neuroinflammation and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats expressing mutated superoxide dismutase 1. *J Neuroinflammation* 8, 33.
- Bettoni, I., Comelli, F., Rossini, C., Granucci, F., Giagnoni, G., Peri, F., und Costa, B. (2008). Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia* 56, 1312-1319.
- Bhandarkar, S. S., Jaconi, M., Fried, L. E., Bonner, M. Y., Lefkove, B., Govindarajan, B., Perry, B. N., Parhar, R., Mackelfresh, J., Sohn, A., u. a. (2009). Fulvene-5 potently inhibits NADPH oxidase 4 and blocks the growth of endothelial tumors in mice. *J. Clin. Invest* 119, 2359-2365.
- Biteau, B., Labarre, J., und Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.
- Block, K., Eid, A., Griendling, K. K., Lee, D.-Y., Wittrant, Y., und Gorin, Y. (2008). Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J. Biol. Chem* 283, 24061-24076.
- Borbély, G., Szabadkai, I., Horváth, Z., Markó, P., Varga, Z., Breza, N., Baska, F., Vántus, T., Huszár, M., Geiszt, M., u. a. (2010). Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4. *J. Med. Chem* 53, 6758-6762.
- 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, 248-254.
- Brandes, R. P., Takac, I., und Schröder, K. (2011). No superoxide--no stress?: nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 31, 1255-1257.
- Bráz, J. M., und Basbaum, A. I. (2010). Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain* 150, 290-301.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., und Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.
- Brennan, J. P., Wait, R., Begum, S., Bell, J. R., Dunn, M. J., und Eaton, P. (2004). Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J. Biol. Chem* 279, 41352-41360.
- Brennan, J. P., Bardswell, S. C., Burgoyne, J. R., Fuller, W., Schröder, E., Wait, R., Begum, S., Kentish, J. C., und Eaton, P. (2006). Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J. Biol. Chem* 281, 21827-21836.
- Brown, D. I., und Griendling, K. K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med* 47, 1239-1253.
- Budanov, A. V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., u. a. (2002). Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. *Oncogene* 21, 6017-6031.

- Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., und Chumakov, P. M. (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596-600.
- Budanov, A. V., und Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451-460.
- Buonanno, A., und Fischbach, G. D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol* 11, 287-296.
- Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schröder, E., Browning, D. D., und Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation. *Science* 317, 1393-1397.
- Calvo, M., Zhu, N., Tsantoulas, C., Ma, Z., Grist, J., Loeb, J. A., und Bennett, D. L. H. (2010). Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury. *J. Neurosci* 30, 5437-5450.
- Campana, W. M. (2007). Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav. Immun* 21, 522-527.
- Carroll, S. L., Miller, M. L., Frohnert, P. W., Kim, S. S., und Corbett, J. A. (1997). Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J. Neurosci* 17, 1642-1659.
- Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., und Rhee, S. G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract* 45, 101-112.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., und Rhee, S. G. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 7017-7021.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Choi, S. Y., Yu, S., Kang, S. W., und Rhee, S. G. (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem* 277, 25370-25376.
- Chang, T.-S., Cho, C.-S., Park, S., Yu, S., Kang, S. W., und Rhee, S. G. (2004a). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J. Biol. Chem* 279, 41975-41984.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., und Rhee, S. G. (2004b). Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J. Biol. Chem* 279, 50994-51001.
- Chattopadhyay, S., Myers, R. R., Janes, J., und Shubayev, V. (2007). Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav. Immun* 21, 561-568.
- Chen, K., Craige, S. E., und Keaney, J. F. (2009). Downstream targets and intracellular compartmentalization in Nox signaling. *Antioxid. Redox Signal* 11, 2467-2480.
- Chen, S., Velardez, M. O., Warot, X., Yu, Z.-X., Miller, S. J., Cros, D., und Corfas, G. (2006). Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J. Neurosci* 26, 3079-3086.

- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269, 131-140.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-534, 536-537.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., 3rd, Charrier, V., and Parsonage, D. (1999). Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* 38, 15407-15416.
- Coderre, T. J., Vaccarino, A. L., and Melzack, R. (1990). Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535, 155-158.
- Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci* 32, 1-32.
- D'Mello, R., and Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101, 8-16.
- Decosterd, I., and Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E., and Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem* 275, 23227-23233.
- De Deken, X., Wang, D., Dumont, J. E., and Miot, F. (2002). Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp. Cell Res* 273, 187-196.
- Dev, R., Srivastava, P. K., Iyer, J. P., Dastidar, S. G., and Ray, A. (2010). Therapeutic potential of matrix metalloprotease inhibitors in neuropathic pain. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 455-468.
- Devor, M. (2006). Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7, S3-S12.
- Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., and Courtneidge, S. A. (2009). Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal* 2, ra53.
- Diebold, B. A., and Bokoch, G. M. (2001). Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol* 2, 211-215.
- Dikalov, S., Griendling, K. K., and Harrison, D. G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717-727.
- Dubuisson, D., and Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M. S., Dème, D., and Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J. Biol. Chem* 274, 37265-37269.
- Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., Zettel, M., and Coleman, P. (1992). Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 3010-3014.

- Eddy, N. B., und Leimbach, D. (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 107, 385-393.
- Essler, S., Dehne, N., und Brüne, B. (2009). Role of sestrin2 in peroxide signaling in macrophages. *FEBS Lett* 583, 3531-3535.
- Fairbanks, C. A. (2003). Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv. Drug Deliv. Rev* 55, 1007-1041.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., und Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 10887-10890.
- Feil, S., Valtcheva, N., und Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol* 530, 343-363.
- Ferreira, J., Campos, M. M., Pesquero, J. B., Araújo, R. C., Bader, M., und Calixto, J. B. (2001). Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41, 1006-1012.
- Findlay, V. J., Townsend, D. M., Morris, T. E., Fraser, J. P., He, L., und Tew, K. D. (2006). A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res* 66, 6800-6806.
- Forman, H. J., Maiorino, M., und Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835-842.
- Gao, X., Kim, H. K., Chung, J. M., und Chung, K. (2007). Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131, 262-271.
- Gao, Y.-J., und Ji, R.-R. (2010). Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol. Ther* 126, 56-68.
- Garrison, C. J., Dougherty, P. M., Kajander, K. C., und Carlton, S. M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565, 1-7.
- Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., und Krause, K.-H. (2006). Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* 580, 497-504.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., und Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 8010-8014.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., und Leto, T. L. (2003). Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem* 278, 20006-20012.
- Giguère, P., Turcotte, M.-E., Hamelin, E., Parent, A., Brisson, J., Laroche, G., Labrecque, P., Dupuis, G., und Parent, J.-L. (2007). Peroxiredoxin-4 interacts with and regulates the thromboxane A(2) receptor. *FEBS Lett* 581, 3863-3868.
- Giles G. I. (2009). Redox-Controlled Transcription Factors and Gene Expression. Textbook Redox Regulation in Biology and Medicine (WILEY-VCH Verlag gmbH & Co. KGaA)
- Gillespie, C. S., Sherman, D. L., Fleetwood-Walker, S. M., Cottrell, D. F., Tait, S., Garry, E. M., Wallace, V. C., Ure, J., Griffiths, I. R., Smith, A., u. a. (2000). Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26, 523-531.

- Giniatullin, A. R., Darios, F., Shakirzyanova, A., Davletov, B., und Giniatullin, R. (2006). SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J. Neurochem* 98, 1789-1797.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valecx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., und Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.
- Gloire, G., und Piette, J. (2009). Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox Signal* 11, 2209-2222.
- van der Goes, A., Brouwer, J., Hoekstra, K., Roos, D., van den Berg, T. K., und Dijkstra, C. D. (1998). Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J. Neuroimmunol* 92, 67-75.
- Goldsmid, Y., Erlich, S., und Pinkas-Kramarski, R. (2001). Neuregulin induces sustained reactive oxygen species generation to mediate neuronal differentiation. *Cell. Mol. Neurobiol* 21, 753-769.
- Gosselin, R.-D., Suter, M. R., Ji, R.-R., und Decosterd, I. (2010). Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 16, 519-531.
- Grasberger, H., und Refetoff, S. (2006). Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem* 281, 18269-18272.
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., und Rittinger, K. (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113, 343-355.
- Guedes, R. P., Bosco, L. D., Teixeira, C. M., Araújo, A. S. R., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Ribeiro, M. F. M., und Partata, W. A. (2006). Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem. Res* 31, 603-609.
- Guertin, A. D., Zhang, D. P., Mak, K. S., Alberta, J. A., und Kim, H. A. (2005). Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J. Neurosci* 25, 3478-3487.
- Guzik, T. J., Chen, W., Gongora, M. C., Guzik, B., Lob, H. E., Mangalat, D., Hoch, N., Dikalov, S., Rudzinski, P., Kapelak, B., u. a. (2008). Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol* 52, 1803-1809.
- Hacimuftuoglu, A., Handy, C. R., Goettl, V. M., Lin, C. G., Dane, S., und Stephens, R. L. (2006). Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav. Brain Res* 173, 211-216.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* 59, 1609-1623.
- Hamann, M., Zhang, T., Hendrich, S., und Thomas, J. A. (2002). Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Meth. Enzymol* 348, 146-156.
- Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A., und Lambeth, J. D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J. Biol. Chem* 273, 16663-16668.

- Haridas, V., Ni, J., Meager, A., Su, J., Yu, G. L., Zhai, Y., Kyaw, H., Akama, K. T., Hu, J., Van Eldik, L. J., u. a. (1998). TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase. *J. Immunol* *161*, 1-6.
- Hay, N. (2008). p53 strikes mTORC1 by employing sestrins. *Cell Metab* *8*, 184-185.
- den Hertog J. (2009). Protein Tyrosin Phosphatases as Mediators of Redox Signaling. *Textbook Redox Regulation in Biology and Medicine* (WILEY-VCH Verlag gmbH & Co. KGaA)
- van Horssen, J., Drexhage, J. A. R., Flor, T., Gerritsen, W., van der Valk, P., und de Vries, H. E. (2010). Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free Radic. Biol. Med* *49*, 1283-1289.
- van Horssen, J., Witte, M. E., Schreibelt, G., und de Vries, H. E. (2011). Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 141-150.
- Hunskaar, S., Fasmer, O. B., und Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods* *14*, 69-76.
- Hurd T. R. und Murphy M. P. (2009). *Biological Systems Relevant for Redox Signaling and Control. Textbook Redox Regulation in Biology and Medicine* (WILEY-VCH Verlag gmbH & Co. KGaA).
- Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., u. a. (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J. Neurosci* *28*, 9486-9494.
- Inoue, M., Rashid, M. H., Fujita, R., Contos, J. J. A., Chun, J., und Ueda, H. (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat. Med* *10*, 712-718.
- Jaquet, V., Scapozza, L., Clark, R. A., Krause, K.-H., und Lambeth, J. D. (2009). Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid. Redox Signal* *11*, 2535-2552.
- Ji, R.-R., Gereau, R. W., Malcangio, M., und Strichartz, G. R. (2009a). MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* *60*, 135-148.
- Ji, R.-R., Xu, Z.-Z., Wang, X., und Lo, E. H. (2009b). Matrix metalloprotease regulation of neuropathic pain. *Trends Pharmacol. Sci* *30*, 336-340.
- Jönsson, T. J., und Lowther, W. T. (2007). The peroxiredoxin repair proteins. *Subcell. Biochem* *44*, 115-141.
- Julius, D., und Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* *413*, 203-210.
- Katsuyama, M. (2010). NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J. Pharmacol. Sci* *114*, 134-146.
- Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., und Lambeth, J. D. (2005). Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J. Biol. Chem* *280*, 31859-31869.
- Kawahara, T., Quinn, M. T., und Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol. Biol* *7*, 109.

- Kawasaki, Y., Xu, Z.-Z., Wang, X., Park, J. Y., Zhuang, Z.-Y., Tan, P.-H., Gao, Y.-J., Roy, K., Corfas, G., Lo, E. H., u. a. (2008). Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat. Med* *14*, 331-336.
- Keeble, J. E., Bodkin, J. V., Liang, L., Wodarski, R., Davies, M., Fernandes, E. S., Coelho, C. de F., Russell, F., Graepel, R., Muscara, M. N., u. a. (2009). Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain* *141*, 135-142.
- Keller, M. P., und Chance, P. F. (1999). Inherited peripheral neuropathy. *Semin Neurol* *19*, 353-362.
- Khattab, M. M. (2006). TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur. J. Pharmacol* *548*, 167-173.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H., und Fukumoto, M. (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* *254*, 237-243.
- Kim, D., You, B., Jo, E.-K., Han, S.-K., Simon, M. I., und Lee, S. J. (2010a). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *107*, 14851-14856.
- Kim, H. K., Park, S. K., Zhou, J.-L., Taglialatela, G., Chung, K., Coggeshall, R. E., und Chung, J. M. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* *111*, 116-124.
- Kim, H. K., Kim, J. H., Gao, X., Zhou, J.-L., Lee, I., Chung, K., und Chung, J. M. (2006). Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* *122*, 53-62.
- Kim, H. Y., Chung, J. M., und Chung, K. (2008). Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci. Lett* *447*, 87-91.
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., und Stadtman, E. R. (1988). The isolation and purification of a specific „protector“ protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem* *263*, 4704-4711.
- Kim, S.-Y., Lee, J.-G., Cho, W.-S., Cho, K.-H., Sakong, J., Kim, J.-R., Chin, B.-R., und Baek, S.-H. (2010b). Role of NADPH oxidase-2 in lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase expression and cell migration. *Immunol. Cell Biol* *88*, 197-204.
- Kim, T. S., Sundaresh, C. S., Feinstein, S. I., Dodia, C., Skach, W. R., Jain, M. K., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Nomura, N., u. a. (1997). Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca²⁺-independent phospholipase A₂ and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem* *272*, 2542-2550.
- Kiss, P. J., Knisz, J., Zhang, Y., Baltrusaitis, J., Sigmund, C. D., Thalmann, R., Smith, R. J. H., Verpy, E., und Bánfi, B. (2006). Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr. Biol* *16*, 208-213.
- Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M. E., Jones, E., Mittal, M., Barit, D., Schwarz, T., Geis, C., Kraft, P., u. a. (2010). Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* *8*.

- Knoops, B., Goemaere, J., Van der Eecken, V., und Declercq, J.-P. (2010). Peroxiredoxin 5: Structure, mechanism and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid. Redox Signal.*
- Kobayashi, H., Chattopadhyay, S., Kato, K., Dolkas, J., Kikuchi, S.-I., Myers, R. R., und Shubayev, V. I. (2008). MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol. Cell. Neurosci* 39, 619-627.
- Kopnin, P. B., Agapova, L. S., Kopnin, B. P., und Chumakov, P. M. (2007). Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability. *Cancer Res* 67, 4671-4678.
- Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M. D., und Sadoshima, J. (2010). NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 15565-15570.
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D.-S., Woolf, C. J., und Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277-289.
- Laleu, B., Gaggini, F., Orchard, M., Fioraso-Cartier, L., Cagnon, L., Houngninou-Molango, S., Gradia, A., Duboux, G., Merlot, C., Heitz, F., u. a. (2010). First in class, potent, and orally bioavailable NADPH oxidase isoform 4 (Nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Med. Chem* 53, 7715-7730.
- Lassègue, B., und Griendling, K. K. (2010). NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 30, 653-661.
- Latremoliere, A., und Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10, 895-926.
- Lee, I., Kim, H. K., Kim, J. H., Chung, K., und Chung, J. M. (2007). The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133, 9-17.
- Lee, K. Y., Chung, K., und Chung, J. M. (2010). Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J. Neurophysiol* 103, 382-391.
- Lindia, J. A., McGowan, E., Jochnowitz, N., und Abbadie, C. (2005). Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain* 6, 434-438.
- Lipton, S. A., Choi, Y.-B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A., und Bankston, L. A. (2002). Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* 25, 474-480.
- Little, J. W., Doyle, T., und Salvemini, D. (2010). Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552384>
- Lu, J. L., Vallat, J.-M., Pollard, J. D., Knoops, B., und Ouvreier, R. (2006). Expression of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 in the human peripheral nervous system. *J. Peripher. Nerv. Syst* 11, 318-324.

- Lu R., Kallenborn-Gerhardt W., Geisslinger G., Schmidtko A (2011). Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS ONE (in press)*.
- Lyle, A. N., Deshpande, N. N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassègue, B., und Griending, K. K. (2009). Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res* 105, 249-259.
- Macpherson, L. J., Xiao, B., Kwan, K. Y., Petrus, M. J., Dubin, A. E., Hwang, S., Cravatt, B., Corey, D. P., und Patapoutian, A. (2007). An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci* 27, 11412-11415.
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J. M., Arnold, R. S., Cheng, G., Lambeth, J. D., und Goldstein, B. J. (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biol* 24, 1844-1854.
- Maher, P., und Schubert, D. (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci* 57, 1287-1305.
- Majava, V., Polverini, E., Mazzini, A., Nanekar, R., Knoll, W., Peters, J., Natali, F., Baumgärtel, P., Kursula, I., und Kursula, P. (2010). Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2. *PLoS ONE* 5, e10300.
- Mao, Y.-F., Yan, N., Xu, H., Sun, J.-H., Xiong, Y.-C., und Deng, X.-M. (2009). Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. *Brain Res* 1248, 68-75.
- Marchesi, C., Milani, M., Morbin, M., Cesani, M., Lauria, G., Scaioli, V., Piccolo, G., Fabrizi, G. M., Cavallaro, T., Taroni, F., u. a. (2010). Four novel cases of periaxin-related neuropathy and review of the literature. *Neurology* 75, 1830-1838.
- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., und Knaus, U. G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal* 18, 69-82.
- Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., Yamanishi, K., Miyazaki, M., Matsubara, H., u. a. (2005). Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112, 2677-2685.
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., u. a. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 13525-13530.
- Meller, S. T., und Gebhart, G. F. (1997). Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain* 1, 43-52.
- Meng, D., Lv, D.-D., und Fang, J. (2008). Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res* 80, 299-308.
- Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H., und Nave, K.-A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304, 700-703.

- Miller, E. W., Dickinson, B. C., und Chang, C. J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *107*, 15681-15686.
- Milligan, E. D., Zapata, V., Chacur, M., Schoeniger, D., Biedenkapp, J., O'Connor, K. A., Verge, G. M., Chapman, G., Green, P., Foster, A. C., u. a. (2004). Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur. J. Neurosci* *20*, 2294-2302.
- Mishina, N. M., Tyurin-Kuzmin, P. A., Markvicheva, K. N., Vorotnikov, A. V., Tkachuk, V. A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., und Belousov, V. V. (2011). Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid. Redox Signal* *14*, 1-7.
- Mizusawa, H., Ishii, T., und Bannai, S. (2000). Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neurosci. Lett* *283*, 57-60.
- Moalem-Taylor, G., Allbutt, H. N., Iordanova, M. D., und Tracey, D. J. (2007). Pain hypersensitivity in rats with experimental autoimmune neuritis, an animal model of human inflammatory demyelinating neuropathy. *Brain Behav. Immun* *21*, 699-710.
- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., u. a. (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* *80*, 67-82.
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., und Netto, L. E. S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 4886-4891.
- Montezano, A. C., Burger, D., Ceravolo, G. S., Yusuf, H., Montero, M., und Touyz, R. M. (2011). Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin. Sci* *120*, 131-141.
- Morand, S., Ueyama, T., Tsujibe, S., Saito, N., Korzeniowska, A., und Leto, T. L. (2009). Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB J* *23*, 1205-1218.
- Moss, A., Beggs, S., Vega-Avelaira, D., Costigan, M., Hathway, G. J., Salter, M. W., und Fitzgerald, M. (2007). Spinal microglia and neuropathic pain in young rats. *Pain* *128*, 215-224.
- Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Zweier, J. L., Thiemermann, C., Wang, Z.-Q., und Salvemini, D. (2003). On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br. J. Pharmacol* *140*, 445-460.
- Nisimoto, Y., Jackson, H. M., Ogawa, H., Kawahara, T., und Lambeth, J. D. (2010). Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry* *49*, 2433-2442.
- O'Connor, J. C., Wallace, D. M., O'Brien, C. J., und Cotter, T. G. (2008). A novel antioxidant function for the tumor-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* *49*, 4237-4244.
- Olechowski, C. J., Truong, J. J., und Kerr, B. J. (2009). Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* *141*, 156-164.

- Paffenholz, R., Bergstrom, R. A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., u. a. (2004). Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18, 486-491.
- Papadia, S., Soriano, F. X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovská, V., u. a. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci* 11, 476-487.
- Paravicini, T. M., und Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2, S170-180.
- Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., und Bae, Y. S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol* 173, 3589-3593.
- Pemberton, H. N., Franklyn, J. A., Boelaert, K., Chan, S. Y., Kim, D. S., Kim, C., Cheng, S. Y., Kilby, M. D., und McCabe, C. J. (2007). Separase, securin and Rad21 in neural cell growth. *J. Cell. Physiol* 213, 45-53.
- Quintes, S., Goebbels, S., Saher, G., Schwab, M. H., und Nave, K.-A. (2010). Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. *J. Peripher. Nerv. Syst* 15, 10-16.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., und Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52, 35-41.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., und Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med* 38, 1543-1552.
- Rhee, S. G., Jeong, W., Chang, T.-S., und Woo, H. A. (2007). Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int. Suppl*, S3-8.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., und Orkin, S. H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322, 32-38.
- Salvemini, D., Little, J. W., Doyle, T., und Neumann, W. L. (2011). Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277369>
- Sandri, G., Panfili, E., und Ernster, L. (1990). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 300-305.
- Schäppi, M. G., Jaquet, V., Belli, D. C., und Krause, K.-H. (2008). Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol* 30, 255-271.
- Schmidtko, A., Tegeder, I., und Geisslinger, G. (2009). No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci* 32, 339-346.

- Schnell, S. A., Staines, W. A., und Wessendorf, M. W. (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem* 47, 719-730.
- Scholz, J., und Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat. Neurosci* 5 *Suppl*, 1062-1067.
- Scholz, J., und Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci* 10, 1361-1368.
- Schwartz, E. S., Lee, I., Chung, K., und Chung, J. M. (2008). Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138, 514-524.
- Schwartz, E. S., Kim, H. Y., Wang, J., Lee, I., Klann, E., Chung, J. M., und Chung, K. (2009). Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. *J. Neurosci* 29, 159-168.
- Segal, A. W., Jones, O. T., Webster, D., und Allison, A. C. (1978). Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 2, 446-449.
- Segal, A. W., und Jones, O. T. (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276, 515-517.
- Serpillon, S., Floyd, B. C., Gupte, R. S., George, S., Kozicky, M., Neito, V., Recchia, F., Stanley, W., Wolin, M. S., und Gupte, S. A. (2009). Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 297, H153-162.
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Fórró, L., Schlegel, W., und Krause, K.-H. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J* 406, 105-114.
- Sharghi-Namini, S., Turmaine, M., Meier, C., Sahni, V., Umehara, F., Jessen, K. R., und Mirsky, R. (2006). The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J. Neurosci* 26, 6364-6376.
- Shields, S. D., Cavanaugh, D. J., Lee, H., Anderson, D. J., und Basbaum, A. I. (2010). Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 151, 422-429.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., und Sumimoto, H. (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem* 276, 1417-1423.
- Siwik, D. A., und Colucci, W. S. (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 9, 43-51.
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D. G., und Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* 2011, 792639.
- Sorce, S., und Krause, K.-H. (2009). NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid. Redox Signal* 11, 2481-2504.

- Soriano, F. X., Papadia, S., Bell, K. F. S., und Hardingham, G. E. (2009). Role of histone acetylation in the activity-dependent regulation of sulfiredoxin and sestrin 2. *Epigenetics* 4, 152-158.
- Stoll, G., und Müller, H. W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., und Lambeth, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401, 79-82.
- Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., und Kamata, T. (2000). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem* 275, 13175-13178.
- Szabó K. E., Line K., Eggeleton P., Littlechild J. A. und Winyard P.G.(2009). Structure and Function of the Human Peroxiredoxin-Based Antioxidant System: the Interplay between Peroxiredoxins, Thioredoxins, Thioredoxin Reductases, Sulfiredoxins and Sestrins. *Textbook Redox Regulation in Biology and Medicine (WILEY-VCH Verlag gmbH & Co. KGaA)*.
- Takac, I., Schroder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J. D., Shah, A. M., Morel, F., und Brandes, R. P. (2011). The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem*.
- Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., und Mori, Y. (2008). Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* 2, 287-298.
- Tanabe, M., Nagatani, Y., Saitoh, K., Takasu, K., und Ono, H. (2009). Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* 56, 702-708.
- Tanga, F. Y., Nutile-McMenemy, N., und DeLeo, J. A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 5856-5861.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R. M., Loeb, J. A., Shrager, P., u. a. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47, 681-694.
- Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., und Segal, A. W. (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327, 720-721.
- Thacker, M. A., Clark, A. K., Marchand, F., und McMahon, S. B. (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth. Analg* 105, 838-847.
- Thannickal, V. J., und Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 279, L1005-1028.
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., und Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.
- Trotti, D., Danbolt, N. C., und Volterra, A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci* 19, 328-334.

- Tsai, K. J., Hung, I. J., Chow, C. K., Stern, A., Chao, S. S., und Chiu, D. T. (1998). Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS Lett* 436, 411-414.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., und Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.
- Ueda, H. (2008). Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain* 4, 11.
- Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., und Sumimoto, H. (2005). The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J. Biol. Chem* 280, 23328-23339.
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J.-P., und Szanto, I. (2005). Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 132, 233-238.
- Velasco-Miguel, S., Buckbinder, L., Jean, P., Gelbert, L., Talbott, R., Laidlaw, J., Seizinger, B., und Kley, N. (1999). PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene* 18, 127-137.
- Verge, G. M., Milligan, E. D., Maier, S. F., Watkins, L. R., Naeve, G. S., und Foster, A. C. (2004). Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur. J. Neurosci* 20, 1150-1160.
- Wallace, V. C. J., Cottrell, D. F., Brophy, P. J., und Fleetwood-Walker, S. M. (2003). Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids. *J. Neurosci* 23, 3221-3233.
- Wang, X., Michaelis, M. L., und Michaelis, E. K. (2010). Functional genomics of brain aging and Alzheimer's disease: focus on selective neuronal vulnerability. *Curr. Genomics* 11, 618-633.
- Wang, Z.-Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C., Mollace, V., Ndengele, M., Ischiropoulos, H., u. a. (2004). A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 309, 869-878.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., und Maier, S. F. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24, 450-455.
- Willis, D., Li, K. W., Zheng, J.-Q., Chang, J. H., Smit, A., Kelly, T., Merianda, T. T., Sylvester, J., van Minnen, J., und Twiss, J. L. (2005). Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J. Neurosci* 25, 778-791.
- Wind, S., Beuerlein, K., Armitage, M. E., Taye, A., Kumar, A. H. S., Janowitz, D., Neff, C., Shah, A. M., Winger, K., und Schmidt, H. H. H. W. (2010). Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* 56, 490-497.
- Winterbourn, C. C., und Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med* 45, 549-561.

- Woo, H. A., Bae, S. H., Park, S., und Rhee, S. G. (2009). Sestrin 2 is not a reductase for cysteine sulfinic acid of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal* *11*, 739-745.
- Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., und Rhee, S. G. (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem* *280*, 3125-3128.
- Woolf, C. J., und Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *96*, 7723-7730.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med* *140*, 441-451.
- Woolf, C. J., und Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* *55*, 353-364.
- Yamamoto, S., Takahashi, N., und Mori, Y. (2010). Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol* *103*, 18-27.
- Yong, V. W. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci* *6*, 931-944.
- Yowtak, J., Lee, K. Y., Kim, H. Y., Wang, J., Kim, H. K., Chung, K., und Chung, J. M. (2011). Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* *152*, 844-852.
- Zeilhofer, H. U. (2005). The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2027-2035.
- Zhang, M., Brewer, A. C., Schröder, K., Santos, C. X. C., Grieve, D. J., Wang, M., Anilkumar, N., Yu, B., Dong, X., Walker, S. J., u. a. (2010). NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *107*, 18121-18126.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., und Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* *253*, 162-168.
- Zigelboim, I., Goodfellow, P. J., Schmidt, A. P., Walls, K. C., Mallon, M. A., Mutch, D. G., Yan, P. S., Huang, T. H.-M., und Powell, M. A. (2007). Differential methylation hybridization array of endometrial cancers reveals two novel cancer-specific methylation markers. *Clin. Cancer Res* *13*, 2882-2889.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J.-ichi, Nau, C., Wood, J. N., und Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* *447*, 855-858.
- Zor, U., Ferber, E., Gergely, P., Szücs, K., Dombrádi, V., und Goldman, R. (1993). Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation: potentiation by vanadate. *Biochem. J* *295 (Pt 3)*, 879-888.

8 ANHANG

8.1 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger für die Bereitstellung dieser Arbeit, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Institut und seine Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Stark bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ein Besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Dr. Achim Schmidtke für die hervorragende Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für den hilfreichen Austausch und Diskussion neuer Ideen sowie die produktive Kritik meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken, insbesondere der „AG Schmidtke“. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, eure Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Mann Sascha. Danke für deinen stetigen Rückhalt, deine Geduld und deine liebevolle Unterstützung. Auch bei meinen Eltern, Geschwistern und meiner Schwiegerfamilie möchte ich mich für die großartige Unterstützung bedanken. Vielen Dank für die zahlreichen und schnellen Korrekturen.

8.2 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Katrin Schröder, Domenico Del Turco, Ruirui Lu, Katharina Kynast, Judith Kosowski, Ellen Niederberger, Ajay M. Shah, Ralf P. Brandes, Gerd Geisslinger, Achim Schmidtko. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury (*submitted*).

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Thorsten Bangsow, Juliana Heidler, Harald von Melchner, Gerd Geisslinger, Achim Schmidtko. Sestrin 2 attenuates injury-induced neuropathic pain by a ROS-dependent mechanism (*in preparation*).

Ruirui Lu, Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Gerd Geisslinger, Achim Schmidtko. Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS ONE* (*in press*).

Wiebke Kallenborn-Gerhardt^{*}, Ruirui Lu^{*}, Jana Lorenz, Wei Gao, Jessica Weiland, Domenico Del Turco, Thomas Deller, Bodo Laube, Heinrich Betz, Gerd Geisslinger, Achim Schmidtko (2011). Prolonged zymosan-induced inflammatory pain hypersensitivity in mice lacking glycine receptor alpha2. (* contributed equally) Behav Brain Res. 2012 Jan 1;226(1):106-11. Epub 2011 Sep 8.

Sandra Heine, Stylianos Michalakis, Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Hee-Young Lim, Jessica Weiland, Domenico Del Turco, Thomas Deller, Irmgard Tegeder, Martin Biel, Gerd Geisslinger, and Achim Schmidtko (2011). CNGA3: a target of spinal nitric oxide/cGMP signaling and modulator of inflammatory pain hypersensitivity. J Neurosci. 2011 Aug 3;31(31):11184-92.

Wiebke Kallenborn-Gerhardt und Achim Schmidtko (2011). A novel signaling pathway that modulates inflammatory pain. J Neurosci. 2011 Jan 19;31(3):798-800.

Tagungsbeiträge

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Judith Schreiber, Katrin Schröder, Ralf P Brandes, Gerd Geisslinger and Achim Schmidtko. The role of NADPH Oxidase 4 derived reactive oxygen species in pain signaling. Poster Präsentation. 1st conference on Structural Plasticity and Reorganization in Chronic Pain. Heidelberg. 19. – 20.09.2011.

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Judith Schreiber, Katrin Schröder, Ralf P Brandes, Gerd Geisslinger and Achim Schmidtko. The role of NADPH Oxidase 4 derived reactive oxygen species in pain signaling. Poster Präsentation. 77. Jahrestagung der DGPT. Frankfurt am Main. 30.03. – 01.04.2011

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Judith Schreiber, Katrin Schröder, Ralf P Brandes, Gerd Geisslinger and Achim Schmidtko. Limited Role of Reactive Oxygen Species Derived from NOX4 in Inflammatory Pain. Poster Präsentation. 13th World Congress on Pain. Montreal, Kanada. 29.08. - 02.09.2011.

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Ruirui Lu, Judith Schreiber, Katrin Schröder, Ralf P Brandes, Gerd Geisslinger and Achim Schmidtko. Behavioral characterization of Nox4-deficient mice suggests a limited role of Nox4 in inflammatory pain. Poster Präsentation. Neuroscience 2009. Chicago, Kanada. 17. -21.10.2009.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Kallenborn-Gerhardt, Wiebke

geb. Kallenborn

Gartenfeldweg 25, 65510 Hünstetten

geboren am 31. Mai 1983, in Wiesbaden

Hochschulausbildung

- seit Juni 2008 Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie (*pharmazentrum frankfurt/ZAFES*) der Goethe Universität Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger und PD Dr. Dr. Achim Schmidtke
- 2007 15. Januar 2007 bis 13. April 2007 Praktikum bei Sanofi-Aventis in Frankfurt Höchst
- 2004 16. August 2004 bis 15. Oktober 2004 Praktikum bei der Firma Bayer Crop Science in Frankfurt Höchst
- 2003 bis 2008 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz; Abschluss Diplom-Biologin; Gesamturteil: sehr gut

Schulbildung

- 2003 Abiturprüfung (Gesamtnote 1,6)
- 2000 – 2003 Pestalozzischule Idstein (gymnasiale Oberstufe)
- 1999 – 2000 Teilnahme am IST Highschool Programm in den USA
- 1993 – 1999 IGS Wallrabenstein
- 1989 – 1993 Grundschule Wallrabenstein