

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Pharmakologie
Institut für Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger

**Untersuchungen zur Rolle der
TANK-Binding Kinase (TBK) 1
bei entzündlichen Schmerzreaktionen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen
Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Heike Isabell Stephan
Diplom-Biologin
aus Geislingen an der Steige

Frankfurt am Main, 2014

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. Ellen Niederberger
Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Brüne
Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2015

*Für meine Familie,
ganz besonders meinen kleinen Bruder*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	12
1.1 Nozizeption	12
1.2 Schmerzarten	15
1.3 Der Transkriptionsfaktor NF-κB	20
1.3.1 Struktur von NF- κ B	20
1.3.2 Die NF- κ B Signalwege	22
1.3.3 Der klassische NF- κ B Signalweg	23
1.3.4 Der alternative NF- κ B Signalweg	23
1.4 TANK-Binding Kinase 1	26
1.4.1 Die IKK ϵ /TBK1-Bindungspartner	26
1.5 Interferon (IFN)-Signalweg	28
1.6 Potenzielle TBK1-Zielproteine	29
1.7 IKKϵ und Schmerz	30
1.8 Therapeutischer Ansatz	32
1.9 Ziel der Arbeit	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Chemikalien und Substanzen	37
2.1.2 Geräte und Materialien	40
2.1.3 Kits	41
2.1.4 Antikörper	42
2.1.4.1 Western-Blot	42
2.1.4.2 Immunhistochemie	43
2.1.5 Primer	44
2.1.5.1 TaqMan [®] Gene Expression Assays	44
2.2 Zellkultur	45
2.2.1 Kultivierung der Zellen	45
2.2.2 Passagieren von Zellen	46
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von RAW 264.7-Zellen	47
2.2.4 Stimulation von Zellen	47
2.3 Tierexperimentelle Methoden	48
2.3.1 Versuchstiere	48

2.3.2	Untersuchungen zur TBK1-Expression	48
2.3.3	Nozizeptive Tiermodelle	49
2.3.3.1	Dynamic-Plantar-Test	49
2.3.3.2	Formalin Test	50
2.3.4	Gewebeentnahme	50
2.3.4.1	Für Expressionsanalysen	50
2.3.4.2	Für Gefrierschnitte	51
2.3.5	Herstellung von Gefrierschnitten	51
2.4	Molekularbiologische Methoden	52
2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.4.2	RNA-Isolierung	52
2.4.2.1	RNA-Isolierung aus murinem DRG-und Rückenmarks-Gewebe	52
2.4.2.2	Reverse Transkription	53
2.4.2.3	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	54
2.4.3	RT ² Profiler™ PCR Array	56
2.4.3.1	RT ² First Strand Kit	57
2.4.3.2	RT ² qPCR Master Mix	58
2.4.4	Genotypisierung	59
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	60
2.5	Proteinbiochemische Methoden	61
2.5.1	Proteinextraktion	61
2.5.1.1	Proteinextraktion aus murinem Gewebe	61
2.5.1.2	Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen	62
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	62
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
2.5.4	Western-Blot	64
2.5.5	Antikörper-Inkubation	65
2.5.6	Immunhistochemie	66
2.6	Statistik	67
2.6.1	Western-Blots	67
2.6.2	Verhaltenstest	67
3.	Ergebnisse	68
3.1	Expression von TBK1 in verschiedenen murinen Geweben	68
3.1.1	Expression von TBK1 in verschiedenen Zelltypen im Rückenmark und den Hinterwurzelganglien der Maus	68
3.1.2	Effekte einer TBK1-Inhibition in Astrozyten	72
3.2	Regulation von TBK1 im Rückenmark nach entzündlich-nozizeptiver Stimulation	75

3.2.1	Formalin-induzierte Nozizeption	75
3.2.2	mRNA-Expression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin	77
3.2.3	Proteinexpression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin	78
3.2.4	Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion in Knockout-Tieren	79
3.2.5	mRNA-Expression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Zymosan	81
3.2.6	Proteinexpression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Zymosan	82
3.3	Einfluss von TBK1 auf die Regulation NF-κB-abhängiger Gene nach nozizeptiver Stimulation	83
3.3.1	Regulation NF- κ B-abhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin	83
3.3.2	Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion und Behandlung mit Celecoxib in Knockout-Tieren	86
3.4	Genregulation nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin und Zymosan	90
3.4.1	Übersicht der Regulation TBK1-abhängiger Gene nach Formalininjektion	90
3.4.2	Überprüfung der Regulationen der entzündungsrelevanten Gene des Array's mittels quantitativer Realtime RT-PCR	91
3.4.3	Regulation TBK1-abhängiger Gene auf Proteinebene	93
3.4.4	Genregulation nach Behandlung mit Zymosan und Celecoxib in Knockout-Tieren	95
3.4.5	Regulation NF- κ B-unabhängiger Gene nach Formalininjektion	98
3.5	Untersuchung der TBK1-abhängigen Signalübertragung in der Zellkultur	101
3.5.1	RAW 264.7 Maus-Makrophagen behandelt mit LPS und BX-795	102
4.	Diskussion	110
4.1	Lokalisation und Regulation von TBK1 im zentralen Nervensystem	112
4.2	Nozizeptives Verhalten in Knockout-Mäusen und Regulation von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation	113
4.3	Nozizeptives Verhalten nach Behandlung mit Zymosan und Celecoxib in Knockout- Mäusen	116
4.4	Regulation NF-κB-abhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin in Knockout Mäusen	119
4.5	Regulation NF-κB-unabhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin in Knockout Mäusen	121

4.6	Pharmakologische Ansätze zur TBK1-Hemmung	123
5.	Zusammenfassung	126
6.	Literaturverzeichnis	131
7.	Abbildungsverzeichnis	157
8.	Anhang	164
8.1	mRNA-Array	164
8.2	Danksagung	166
8.3	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	167
8.4	Schriftliche Erklärung	168

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ad	auf
AF	Alexa Fluor
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BAFF	<i>B-cell-activating-factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>copy DNA</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
C _T	Zyklus-Schwellenwert (<i>Cycle threshold</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosid Triphosphat
DRG	Hinterwurzelganglien (<i>Dorsal Root Ganglia</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
Fw	<i>Forward</i>
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
griech.	griechisch
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

HCl	Salzsäure
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>
IB4	Isolektin B4
IFN	Interferon
IKK	<i>Inhibitor of κB Kinase</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF	Interferon-regulierenden Faktor
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
l	Liter
L4-L6	Lumbalmarksegmente 4-6
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leuzin-Zipper
M	Molar
mg	Miligramm (10^{-3} g)
min	Minute
ml	Mililiter (10^{-3} l)
mM	Milimolar (10^{-3} M)
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mV	Millivolt
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)
NaCl	Natriumchlorid
NBD	NEMO-bindende Domäne
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF	Neurofilament

NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
RHD	Rel-Homologie Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Rv	<i>Reverse</i>
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK	<i>TANK binding kinase</i>
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF α	Tumornekrosisfaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WDR	<i>wide-dynamic-range</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

Die Wahrnehmung von Schmerzen ermöglicht es dem Organismus, auf noxische Reize zu reagieren. Der akute nozizeptive Schmerz hat somit eine natürliche Warnfunktion. Bei länger anhaltenden bzw. chronischen Schmerzen oder Nervenschädigungen kann es jedoch zu pathophysiologischen Veränderungen im Nervensystem kommen, die zur Verselbständigung des Schmerzes führen können. Unter diesen Umständen gilt der Schmerz nicht mehr als Warnsignal, sondern als eigenes Krankheitsbild (MUTSCHLER ET AL. 2008). Die „International Association for the Study of Pain (IASP)“ definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Da bisher verfügbare Arzneimittel chronische Schmerzen in vielen Fällen nicht ausreichend reduzieren können und teilweise zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, ist es unverzichtbar, an der Entwicklung neuer und noch spezifischer wirkenden Analgetika festzuhalten. Um Pharmaka zu entwickeln, die gezielt in den Mechanismus der Schmerzverarbeitung eingreifen können, ist es notwendig, diesen auf molekularer Ebene zu kennen und zu verstehen.

1.1

Nozizeption

Ein Reiz, wie beispielsweise ein Stich in die Hand, aktiviert Nozizeptoren, welche einen Impuls über die periphere Nervenbahn an das Rückenmark weiterleiten. Hier wird er noch nicht als Schmerz erkannt, kann jedoch einen Reflex (Zurückziehen der Hand) auslösen. Der Reiz wird elektrisch über die Dendriten der Nervenfasern im Rückenmark verteilt, wobei verstärkende und hemmende Signale aufeinander treffen. An der Synapse bewirkt der Impuls die Freisetzung chemischer Botenstoffe, die sekundäre Neurone aktivieren und so die Weiterleitung des elektrischen Impulses bis zum Gehirn induzieren. Der

Impuls wird vom Rückenmark über das Koordinationszentrum im Hirnstamm zum Thalamus (Zwischenhirn) und von dort an den Cortex (Großhirnrinde) geleitet. Erst an dieser Stelle wird der Schmerz als solcher bewusst wahrgenommen. Im Limbischen System wird der Schmerz emotional bewertet. Durch die Erfahrung wird ein Stich auch sofort als ein solcher empfunden (Abbildung 1).

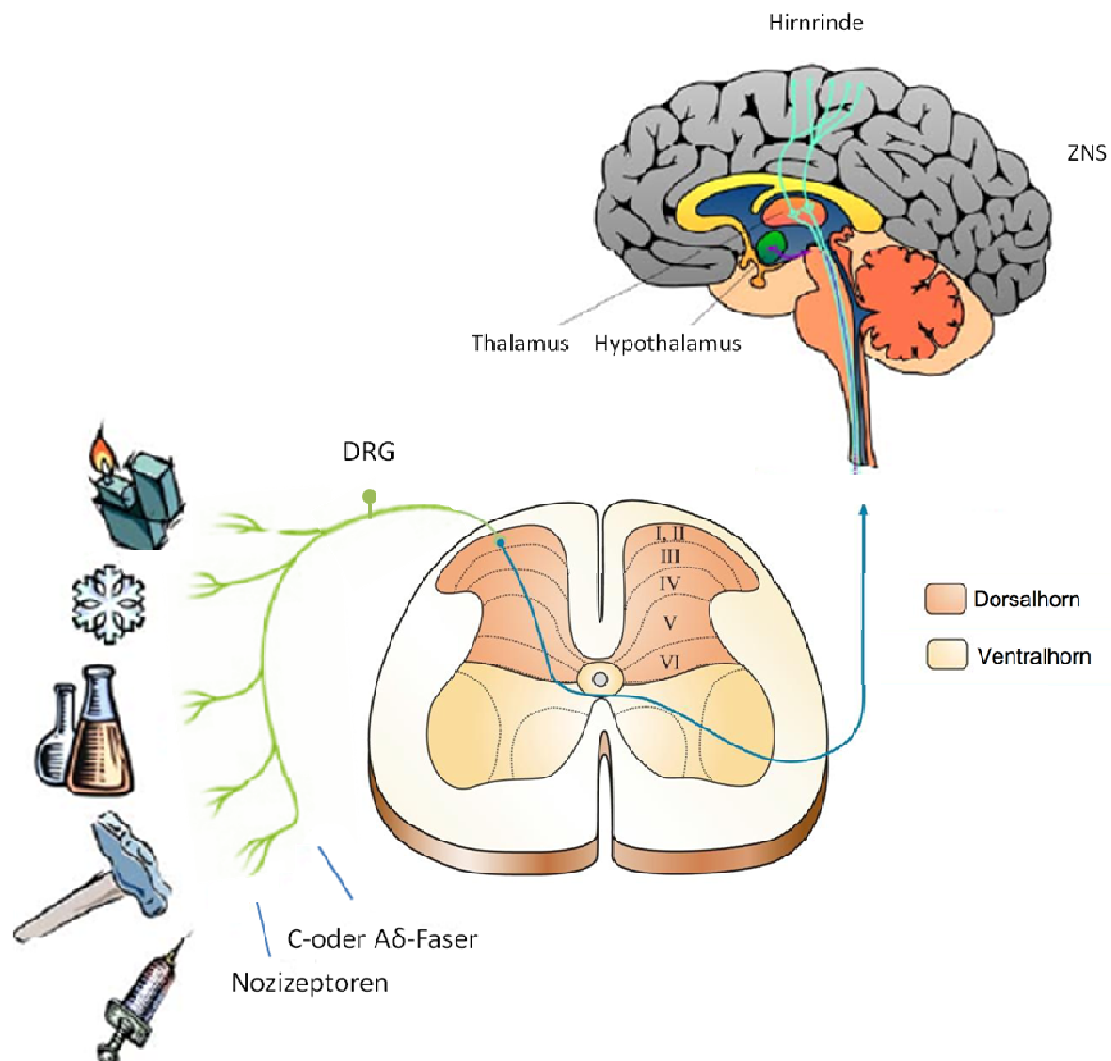


Abbildung 1:

Die nozizeptive Übertragung. Die Nozizeptoren werden über unterschiedliche Schmerzreize aktiviert. Laminae I–VI sind mit römischen Ziffern beschriftet. Die Abbildung ist modifiziert nach Schmidt 2006 & Schmidtko et al. 2009.

Schmerz ist das Ergebnis verschiedener Aktivitäten neuronaler Strukturen unseres Gehirns. Hierbei ist das räumliche und zeitliche Zusammenspiel von

verschiedenen Hirnarealen von Bedeutung. Nozizeption bezeichnet die Aufnahme noxischer Reize, sowie deren Weiterleitung und Verarbeitung im peripheren und zentralen Nervensystem (MESSLINGER, 2002). Primäre afferente Nervenzellen, sogenannte Nozizeptoren, sind meistens polymodal, das heißt sie können durch mechanische, thermische und chemische Reize aktiviert werden. An diesen Nozizeptoren findet die Umsetzung der Reizenergie in Aktionspotentiale statt. Die Aktionspotentiale werden über myelinisierte A δ -Fasern bzw. unmyelinisierte C-Fasern und die Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia (DRGs)) zum Dorsalhorn der grauen Substanz des Rückenmarks weitergeleitet, wo die synaptische Umschaltung auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) erfolgt. Das Dorsalhorn umfasst sechs Schichten, die Laminae I-VI, wobei die A δ - und C-Fasern überwiegend in den Schichten I, II und V enden. Bei der synaptischen Erregung von nozizeptiven Rückenmarksneuronen sind Substanz P und Glutamat die wichtigsten Neurotransmitter. Die Schichten II und III werden zusammen als Substantia gelatinosa bezeichnet. Hier erstrecken sich die Ausläufer von Dendriten der großen Neuronen aus Schicht V und gehen synaptische Kontakte mit afferenten Fasern ein. Diese Neuronen sind meist multimodal, das bedeutet, dass sie auf nicht-noxische, wie auch auf noxische Reize reagieren. Man nennt sie daher „Wide Dynamic Range“ (WDR)-Neurone. Im Hinterhorn des Rückenmarks sind die Neuronen mit einer Vielzahl erregender und hemmender Interneurone verschaltet, welche über prä- und postsynaptische Verbindungen die Erregungsschwelle der aufsteigenden Neuronen kontrollieren. Die Axone der nozizeptiven Nervenfasern kreuzen auf die kontralaterale Seite des Rückenmarks und leiten die Informationen aufwärts in der Vorderseitenstrangbahn zum Hirnstamm und zum Thalamus und von dort aus in kortikale, somatosensorische Gebiete. Die komplexen Verarbeitungsprozesse, welche schließlich zur bewussten Schmerzwahrnehmung führen, finden im primären und sekundären somatosensorischen Kortex des Großhirns statt. Darüber hinaus ist das limbische System für die Empfindung der affektiven Komponente des Schmerzes verantwortlich. Zusätzlich zu diesem aufsteigenden nozizeptiven verfügt der Körper über ein deszendierendes System, welches der körpereigenen Schmerzunterdrückung dient. Es wird reguliert über die Ausscheidung der Neurotransmitter Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin,

welche eine wichtige Rolle bei der Schmerzunterdrückung in Stresssituationen spielen (MESSLINGER 2002; SCHMIDTKO ET AL., 2009).

1.2

Schmerzarten

Die Schmerzeinteilung erfolgt nach dem Entstehungsort und der Dauer des Ereignisses (Abbildung 2). Der akute physiologische Nozizeptorschmerz ermöglicht es dem Organismus, schnell und adäquat auf potenziell schädliche Reize zu reagieren. Er erfüllt somit eine nützliche Warn- und Schutzfunktion. Ausgelöst wird diese Schmerzreaktion durch gewebeschädigende Reize auf normales Gewebe und klingt daher bei Entfernung des Reizes schnell wieder ab (z.B. bei der Berührung einer heißen Herdplatte). Klinische Bedeutsamkeit haben vor allem der pathophysiologische Nozizeptorschmerz und der neuropathische Schmerz. Bei dem pathophysiologischen Nozizeptorschmerz handelt es sich um einen Schmerz, der durch Gewebeschädigungen oder Entzündungen hervorgerufen wird. Man unterscheidet den Ruheschmerz, die Hyperalgesie und die Allodynie. Hyperalgesie bezeichnet eine verstärkte Schmerzempfindung auf einen noxischen Reiz und die Allodynie einen Schmerz, der bereits durch Reize ausgelöst wird, die normalerweise nicht schmerzhaft sind. Ein Beispiel dafür ist das Berühren der Haut bei Sonnenbrand. Der neuropathische Schmerz ist ein chronischer Schmerzzustand, der durch Verletzung oder Schädigung der peripheren Nervenzellen und/oder des zentralen Nervensystems (ZNS) entsteht. Er führt zu einer gestörten Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie, Allodynie) und teilweise zu Spontanschmerzen durch spontane Entladungen in den Nervenzellen (WOOLF, 2004; PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN, THIEME VERLAG, 2005; MUTSCHLER ET AL., 2008).

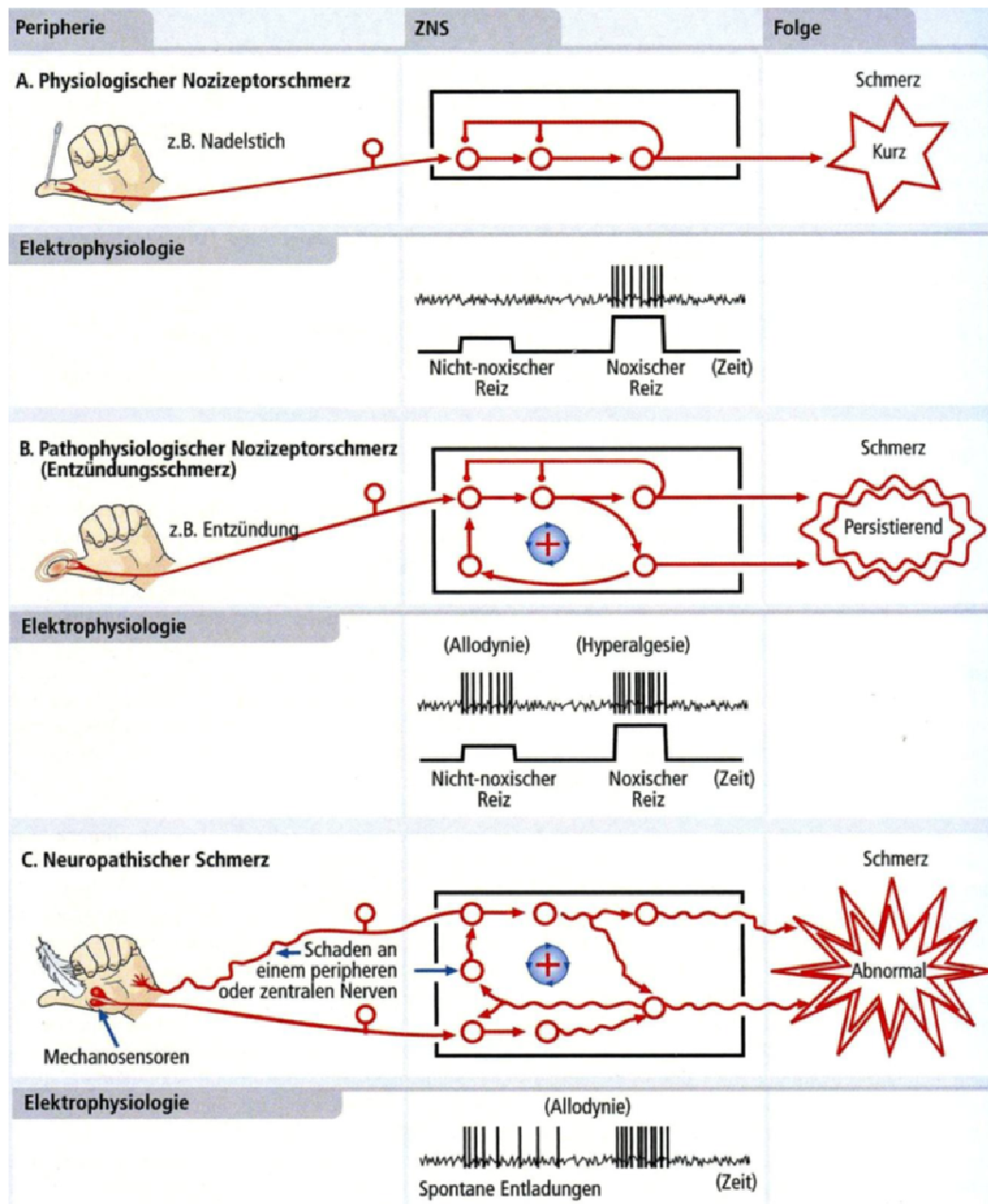


Abbildung 2:

Schmerztypen nach ihrer Ätiologie und Pathogenese (nach CERVERO ET AL. und SCHABILE ET AL.). A. Physiologischer Nozizeptorschmerz. Aktionspotentiale treten erst nach einem noxischen Reiz auf. B. Pathophysiologischer Nozizeptorschmerz. Bereits nicht-noxische Reize lösen Aktionspotentiale aus (Allodynie), noxische Reize führen zu einem Anstieg der Aktionspotentiale (Hyperalgesie). C. Neuropathischer Schmerz. Spontane Entladungen nach Nervenläsion. (MUTSCHLER, ARZNEIMITTELWIRKUNGEN, 9. AUFLAGE, 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vor allem der pathophysiologische Nozizeptorschmerz untersucht. Nach einer Gewebeschädigung durch chemische (z.B. Säure) oder physikalische (Hitze, Kälte) Reizung werden verschiedene Entzündungsmediatoren ausgeschüttet. Durch die Ausschüttung

der Mediatoren, wie z.B. Bradykinin, Histamin, Serotonin, Substanz P, Prostaglandin oder auch Zytokine, kommen die typischen Symptome einer Entzündung, wie Rötung (Rubor), Wärme (Calor), Schwellung (Tumor) und Schmerz (Dolor) zustande (SCHAIBLE ET AL. 2002). Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren führt zu einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers an der Infektionsstelle, der lokale Blutfluss wird verstärkt und die Fließgeschwindigkeit des Blutes wird gleichzeitig verringert (Hitze und Rötung). Des Weiteren entsteht eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand, so dass aus dem Blut Flüssigkeit und Proteine austreten und sich lokal im Gewebe anreichern (Schwellung). Die Ausschüttung verschiedener Entzündungsmediatoren führt unter anderem durch die Aktivierung der „stillen“ Nozizeptoren auch zu einer Sensibilisierung der nozizeptiven Primärafferenzen (Schmerz). Dabei werden die Nozizeptoren entweder direkt aktiviert (z.B. Bradykinin) oder für andere Stimuli sensibilisiert, indem diese die Aktivierungsschwelle der Nozizeptoren herabsetzen (z.B. Prostaglandine). Man unterscheidet einerseits die periphere Sensibilisierung, die auf Veränderungen der Transduktion in den Primärafferenzen zurückzuführen ist und andererseits die zentrale Sensibilisierung, bei der Veränderungen der spinalen Reizverarbeitung vorliegen. Beide Formen sind maßgeblich für die Dauer und die Intensität von klinischem Schmerz verantwortlich (WOOLF 1991, 1994; SCHAIBLE UND RICHTER 2004; MUTSCHLER ET AL. 2008). Bei der peripheren Sensibilisierung antworten u.a. benachbarte Nozizeptoren auf mechanische Reize, auf die sie normalerweise nicht reagieren würden. Als Folge der Gewebeschädigung erfolgt die Synthese von Gewebshormonen, wie Prostaglandinen und Leukotrienen, aus Arachidonsäure mittels Cyclooxygenasen bzw. 5-Lipoxygenasen, wodurch die Reizschwelle der Nozizeptoren im Bereich der Läsion herabgesetzt wird (WOOLF, 2004).

Bei der zentralen Sensibilisierung treten im Bereich des Rückenmarks strukturelle Veränderungen auf. Diese ereignen sich vor allem im Dorsalhorn, wo die synaptische Übertragung von peripheren Schmerzimpulsen auf zentrale Neuronen stattfindet (BASBAUM ET AL., 2009). Ursache hierfür ist vermutlich die verstärkte Expression und die anhaltende Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren, die zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom führen (LATREMOLIERE UND WOOLF, 2009; SCHOLZ UND WOOLF, 2002). Neben Glutamat werden weitere

Neurotransmitter bzw. Neuropeptide wie Substanz P oder CGRP (calcitonin gene-related peptide) vermehrt ausgeschüttet, die an spezifische Rezeptoren binden und die Erregbarkeit der Neuronen steigern, indem sie die Erregungsschwelle herabsetzen (WOOLF, 2011; SCHAIBLE UND RICHTER, 2004; IKEDA ET AL., 2003; SCHOLZ UND WOOLF, 2002; WOOLF UND MAX, 2001; YAKSH ET AL., 1999; CODERRE UND MELZACK, 1992). Durch die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration werden zahlreiche Signalübertragungsprozesse aktiviert, was Änderungen in der Expression verschiedener Gene zur Folge haben kann (YAKSH ET AL., 1999). Proteinkinase A und C spielen dabei eine wesentliche Rolle. Sie phosphorylieren bestimmte Zielmoleküle, was auf direktem und indirektem Weg zu einer gesteigerten Transkription von Genen wie z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2) oder induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) resultiert. Durch eine periphere Entzündung kommt es zu einer Hochregulation der COX-2 im Rückenmark, was zu einer verstärkten Synthese von proinflammatorischem Prostaglandin E2 (PGE2) führt (BEICHE ET AL., 1998; BABA ET AL., 2001). Als Folge der Induktion von iNOS im Rückenmark wird vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) produziert (GUHRING ET AL. 2000; TAO ET AL. 2003; BIAN ET AL. 2006). PGE2 und NO sind Mediatoren, die eine wichtige Rolle bei Sensibilisierungsprozessen während entzündlicher Schmerzen im Dorsalhorn des Rückenmarks spielen (SCHMIDTKO ET AL., 2009).

Für die Behandlung von entzündlichen Schmerzen werden häufig NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) eingesetzt, deren Hauptwirkmechanismus auf der Inhibition der Prostaglandinbiosynthese basiert. Diese erfolgt über die Hemmung von Cyclooxygenasen, die Arachidonsäure in Prostaglandine umwandeln. Prostaglandine erhöhen im traumatisierten Gewebe die Empfindlichkeit von Nozizeptoren auf andere Stimuli, indem sie normalerweise nicht erregbare polymodale Rezeptoren in einen Zustand leichter Erregbarkeit überführen. Dieses Phänomen wird als sekundäre Hyperalgesie bezeichnet und stellt ein charakteristisches Merkmal von entzündetem Gewebe dar (WOOLF, 1983; YAKSH ET AL. ,1999; SCHAIBLE AND RICHTER 2004; LATREMOLIERE UND WOOLF 2009). Darüber hinaus kommt es nach einer peripheren Gewebeschädigung nicht nur im betroffenen Gewebe, sondern auch im Rückenmark zur Bildung von Prostaglandinen, die die Übertragung schmerzrelevanter Informationen vom geschädigten Gewebe zum Großhirn

modulieren. Durch die reduzierte Bildung von Prostaglandinen werden die mit diesen Entzündungsmediatoren im Zusammenhang stehenden typischen Entzündungssymptome abgeschwächt (VANE UND BOTTING, 1996; BALLOU ET AL., 2000). Die therapeutisch erwünschte Hemmung der Prostaglandinproduktion im erkrankten Zielgewebe führt in anderen Organsystemen, die auf das Vorhandensein bestimmter Prostaglandinkonzentrationen angewiesen sind, zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Insbesondere betroffen davon sind der Magen-Darm-Trakt, die Nieren, die Lungen und die Blutplättchen.

In zahlreichen Studien wurde eine Korrelation zwischen schmerzhaften Reizen und einem Anstieg der Expression des c-Fos-Proteins in den zugehörigen Teilen des Rückenmarks nachgewiesen. Zellulärer Stress oder die Stimulierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg durch Bindung des Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) an seinen Rezeptor aktivieren die de-novo-Expression von „immediate early genes“, zu deren Hauptvertretern unter anderem c-Fos gehört (HUNT ET AL., 1987; KARIN ET AL. 1997; WAGNER, 2010; TU ET AL., 2013). Der MAPK-Signalweg ist ein sehr komplexer Signalweg, über den verschiedene Kaskaden Signale von der Zelloberfläche bis in den Zellkern weitergeben. Die funktionelle Bedeutung der MAPK liegt hauptsächlich in der Regulation von Zytokinen, aber auch bei der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung ist sie beteiligt. Darüber hinaus wirkt sie über Phosphorylierung auf zytosolische Enzymaktivitäten und Transkriptionsfaktoren ein (XIAO ET AL., 2002). Die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos kann im Rückenmark in recht kurzer Zeit (1-2 h) durch Phosphorylierung durch die MAPK hochreguliert werden (KARIN ET AL., 1997). Dabei unterscheidet man zwischen dem Ort der c-Fos-Produktion, der von der Dauer der Reizeinwirkung abhängig ist (akuter oder chronischer Stimulus) und der Höhe der c-Fos-Produktion, die von der Reizintensität gesteuert wird (HUNT ET AL., 1987; PRESLEY ET AL., 1990; MA UND WOOLF, 1996). Je schädigender und je schmerzhafter ein peripherer Reiz ist, desto mehr c-Fos-Protein wird gebildet, d.h. die Menge an c-Fos-Protein im Hinterhorn des Rückenmarkes steigt mit der Intensität des einwirkenden thermischen, mechanischen oder chemischen Stimulus an (MESSERSMITH ET AL., 1998). Die c-Fos-Expression wird daher als wichtiger Marker für nozizeptive Sensibilisierungsmechanismen im Rückenmark angesehen.

1.3

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) wurde 1986 von Sen und Baltimore entdeckt und kommt in praktisch allen Zelltypen und Geweben vor. Die Bezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass NF- κ B zuerst als ein Protein beschrieben wurde, welches im Nukleus reifer B-Lymphozyten vorkommt und die Transkription des Gens für die κ -Kette der Immunglobuline aktiviert (SEN UND BALTIMORE 1986). 1988 wurde NF- κ B aus B-Zellen gereinigt und durch in-vitro-Transkriptionsassays analysiert (KAWAKAMI ET AL., 1988). Anknüpfende Studien enthüllten ein komplexes Bild der funktionalen Bedeutung dieses Faktors, die weit über die Regulation der Transkription in B-Zellen hinausreicht. Über die Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA ist eine Beeinflussung der Transkription NF- κ B-abhängiger Gene möglich. NF- κ B spielt eine sehr wichtige Rolle im Immunsystem und der Entwicklung der lymphatischen Organe (GHOSH ET AL., 1998; LI UND VERMA 2002; BONIZZI UND KARIN 2004), bei der Apoptose und bei akuten und chronischen Entzündungen und der damit verbundenen Schmerzentstehung und -weiterleitung (LI UND VERMA 2002; GOSH UND HAYDEN 2008). Außerdem wird NF- κ B mit zahlreichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Durch Fehlregulationen können beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder Krebs entstehen (KARIN, 2009).

1.3.1 Struktur von NF- κ B

NF- κ B ist ein Sammelbegriff für dimere Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren (Rel-Homologie-Domäne (RHD)) ist (Abbildung 3). Sie ist notwendig für DNA-Bindung, Dimerisierung und nukleäre Translokation. Die RHD enthält eine C-terminale „nuclear localization sequence“ (NLS), die die Translokation von NF- κ B in den Nukleus ermöglicht. Die Rel-Proteine enthalten

neben der Rel-Homologie-Domäne noch mindestens eine Transaktivierungsdomäne (TAD), welche für die Transkription bestimmter Zielgene notwendig ist (GOSH ET AL., 1998; KARIN ET AL., 2004; LEUNG ET AL., 2004). Säugetiere exprimieren fünf Proteine der NF- κ B/Rel-Familie (NF- κ B1, NF- κ B2, c-Rel, Rel-A, Rel-B), wobei NF- κ B1, NF- κ B2 und Rel-A nach ihrem Molekulargewicht in der Literatur oft auch als p50, p52 und p65 bezeichnet werden. p50 und p52 entstehen erst nach proteolytischer Spaltung ihrer Vorläuferproteine p105 und p100 (BRIVANLOU, A. ET AL., 2002; GOSH ET AL., 1998; GHOSH UND KARIN 2002). Jeweils zwei dieser Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise zahlreiche Homo- bzw. Heterodimere bilden.

Die am häufigsten beobachteten Dimere sind eine Kombination aus einem Nicht-Rel-Protein (NF- κ B1 oder NF- κ B2) und einem Rel-Protein. Solche Heterodimere (häufigste Variante p50/RelA) besitzen aufgrund der Transaktivierungsdomäne der Rel-Proteine eine aktivierende Wirkung, wohingegen Dimere ohne Beteiligung von Rel-Proteinen (v. a. p50/p50) eine hemmende Wirkung haben (SACCANI ET AL., 2003; HAYDEN UND GHOSH, 2004).

NF- κ B/Rel Familie

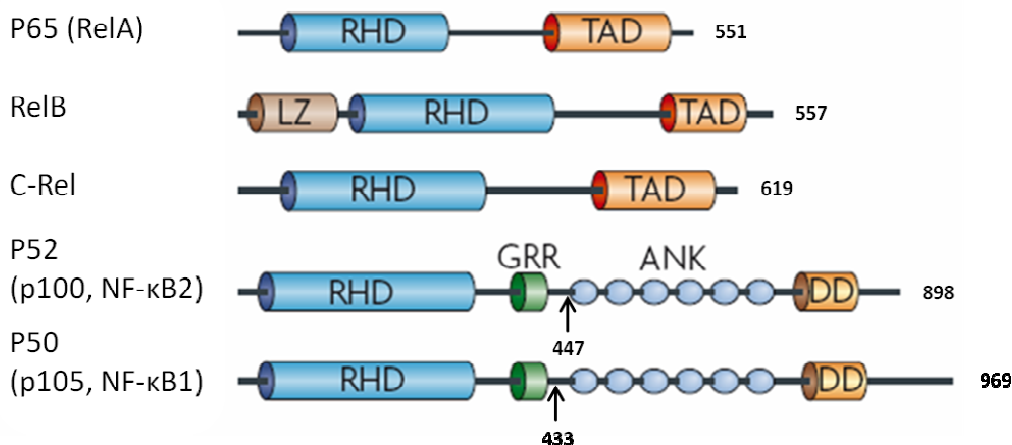


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der NF- κ B-Proteinfamilie. Die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine ist rechts angegeben. Die entsprechenden Prozessierungsstellen für p100 (Aminosäure 447) und p105 (Aminosäure 433) sind mit Pfeilen markiert. Die Rel-Homologie-Domäne (RHD) ist für die DNA-Bindung und die Dimerisierung der Rel-Faktoren verantwortlich. (TAD) Transaktivierungsdomäne, (LZ) Leuzin Zipper, (GRR) Glycin-reiche Region, (ANK) Ankyrin-Sequenz, (DD) Todesdomäne (verändert nach Hayden und Ghosh, 2008).

1.3.2 Die NF- κ B Signalwege

In den meisten Zelltypen liegt NF- κ B inaktiv im Zytoplasma vor und hat keinen Zugang zu der im Zellkern befindlichen DNA. Verantwortlich für diese Blockade sind inhibitorische κ B-Proteine (I κ B), die an NF- κ B binden und es so deaktivieren (BALDWIN, 1996; GOSH ET AL., 1998). Die „Ankyrin Repeat“-Domäne ist das gemeinsame Merkmal der I κ B-Proteine. Diese besteht aus fünf bis sieben Wiederholungen einer Ankyrin-Sequenz am C-terminalen Ende, die an die RHD binden und durch Maskierung der „nuclear localization sequence“ (NLS) der NF- κ B-Dimere den Kernimport der Rel-Faktoren verhindern (SIEBENLIST ET AL., 1994; HAYDEN UND GHOSH, 2008). Durch bestimmte Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, bakterielle und virale Antigene (z.B. Lipopolysaccharide, doppelsträngige RNA) und chemisch-physikalische Noxen kann eine Aktivierung des NF- κ B-p50/p65-Dimers (p50/RelA) ausgelöst werden. Charakteristisch für NF- κ B ist seine schnelle Aktivierung, die schon wenige Minuten nach der Stimulation einsetzt. Dabei werden zunächst I κ B-Kinasen (IKKs) aktiviert, was zu einer Phosphorylierung der I κ B-Proteine führt. I κ B wird daraufhin polyubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert. Dadurch wird die NLS von NF- κ B freigesetzt, was in den Zellkern translozieren und die Transkription verschiedener Zielgene induzieren kann. Dazu gehören Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL)-1, IL-6, proinflammatorische Enzyme (z.B. COX-2, iNOS), Proteasen (z.B. Matrixmetalloproteasen (MMPs)), Chemokine (z.B. Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted (RANTES)) und anti-apoptotische Proteine (KARIN UND BEN-NERIAH, 2000; HAYDEN UND GHOSH, 2004; KARIN ET AL., 2004). Nachgewiesen ist dieser Vorgang u.a. in Entzündungszellen (NIEDERBERGER ET AL., 2006; YOO ET AL., 2002) sowie in Neuronen und Astrozyten im ZNS (KIM ET AL., 2005; WENG ET AL., 2004).

Wie bereits erwähnt können zahlreiche inflammatorische, bakterielle und virale Signale die Aktivierung von NF- κ B induzieren, was jedoch nicht immer über die gleiche Signalkette erfolgt (HAYDEN UND GHOSH, 2004; NIEDERBERGER UND GEISSLINGER, 2008).

1.3.3 Der klassische NF- κ B Signalweg

Der klassische, kanonische NF- κ B-Signalweg wird unter anderem durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine (z.B. TNF α , IL-1 β) und auch LPS aktiviert (HAYDEN UND GHOSH, 2004). Dabei wird die Phosphorylierung von I κ B α durch den IKK α / β / γ -Komplex vermittelt (siehe Abbildung 4). Dieser besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) (*NF- κ B essential modulator*). Die β -Untereinheit des aktiven Komplexes bewirkt die Phosphorylierung von I κ B α an den beiden Serinresten 32 und 36. Dies führt zur Polyubiquitinierung und dem sofortigen proteolytischen Abbau von I κ B α durch das 26S-Proteasom. Mit dem Abbau von I κ B α kommt es gleichzeitig zur Demaskierung der NLS des NF- κ B-Dimers (KARIN UND BEN-NERIAH, 2000; GHOSH UND HAYDEN, 2008; HAYDEN UND GHOSH, 2008). Die darauf folgende Translokation des Dimers p50/p65 in den Zellkern und Bindung an entsprechende Promotorsequenzen auf der DNA aktiviert die Transkription von Genen, die für die Aktivierung der angeborenen Immunität, Entzündung und Inhibition der Apoptose verantwortlich sind (HAYDEN UND GHOSH, 2004; NIEDERBERGER UND GEISSLINGER 2008).

1.3.4 Der alternative NF- κ B Signalweg

Eine IKK-verwandte Kinase namens IKK ϵ wurde 1999 von Shimada et al. identifiziert. Es wurde vermutet, dass IKK ϵ gemeinsam mit TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) einen Komplex bildet, der bei der Phosphorylierung von I κ B α eine Rolle spielt. Da IKK ϵ vorzugsweise an Serinrest 36 phosphoryliert, mehrere Versuche jedoch eine zusätzliche Phosphorylierung am Serinrest 32 zeigten, deutete dies auf eine weitere Kinase hin und verstärkte somit die Vermutung, dass IKK ϵ und TBK1 einen Komplex bilden (SHIMADA ET AL., 1999; POMERANTZ UND BALTIMORE 1999; BONNARD ET AL. 2000; PETERS ET AL. 2000; PETERS UND MANIATIS 2001; HARRIS ET AL. 2006). Als Folge der

Phosphorylierungen kommt es zur Freisetzung des p50/p65-Heterodimers, welches in den Nukleus transloziert und die Transkription bestimmter Zielgene aktiviert (SHIMADA ET AL., 1999; SENFTLEBEN ET AL., 2001; BONIZZI UND KARIN, 2004; HARRIS ET AL., 2006). Dieser alternative NF- κ B Signalweg wird, ähnlich wie der klassische Signalweg, durch LPS, Phorbol ester (PMA) und Zytokine, wie TNF α , IL-1 β und IL-6, aktiviert (SHIMADA ET AL., 1999; PETERS ET AL., 2000). Versuche haben außerdem gezeigt, dass der IKK ϵ /TBK1-Komplex den IKK α / β / γ -Komplex direkt an der β -Untereinheit phosphorylieren und somit aktivieren kann. Dies führt ebenfalls zu einer Freisetzung von NF- κ B-p50/p65 (TOJIMA ET AL., 2000; HUYNH ET AL., 2002). Ferner wurde eine direkte Phosphorylierung von p65 des NF- κ B-p50/p65-Dimers an den Serinresten 536 und 468 durch TBK1 und IKK ϵ nachgewiesen (BUSS ET AL., 2004; ADLI UND BALDWIN, 2006; MATTIOLI ET AL., 2006; FITZGERALD ET AL., 2003). Eine weitere wichtige Funktion des IKK ϵ /TBK1-Komplexes ist die Beteiligung an der Aktivierung des Interferon-Signalwegs. Nachdem IKK ϵ /TBK1 aktiviert wurden, führt dies zur Phosphorylierung der Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) -3 und 7. Zudem ist er bedeutend für die angeborene Immunantwort auf Virusinfektionen (FITZGERALD ET AL., 2003; CIVAS ET AL., 2006) (siehe Abbildung 4).

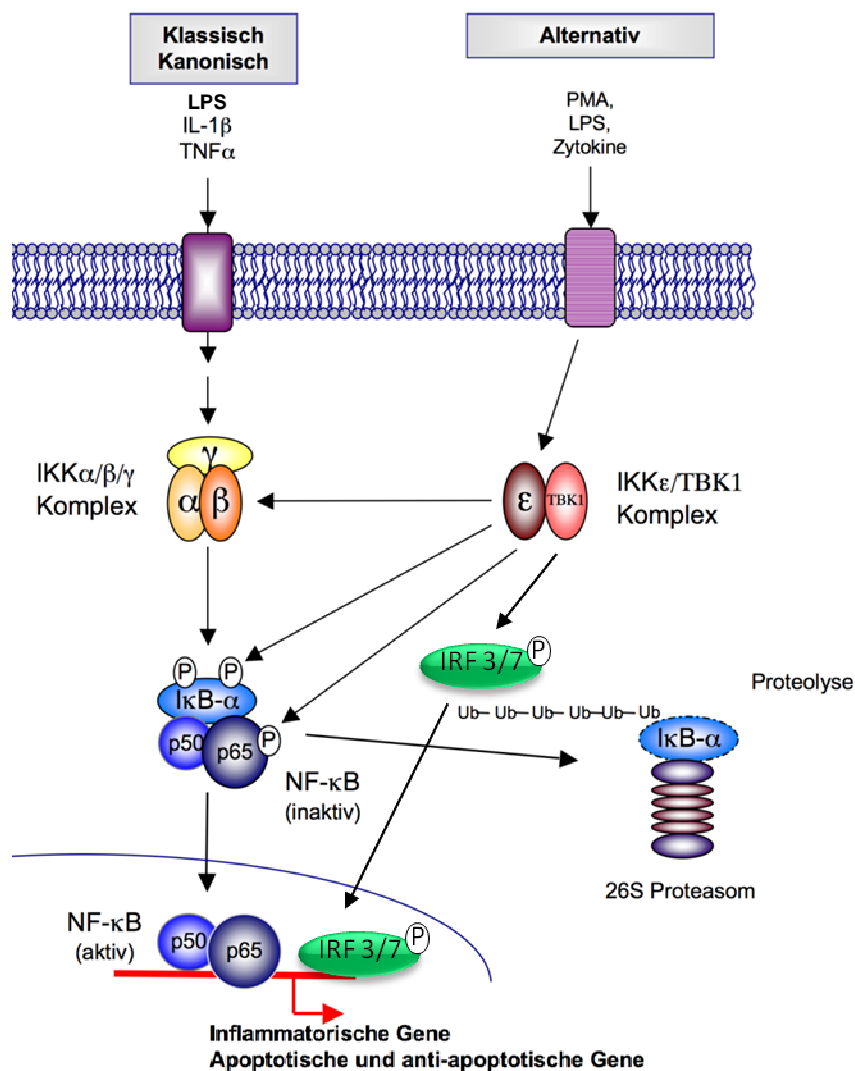


Abbildung 4:

Schematischer Überblick über die verschiedenen NF-κB-Aktivierungswege. Der Kanonische Signalweg wird durch inflammatorische Stimuli wie Zytokine (z.B. TNFα, IL-1β) oder Chemokine aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung des klassischen IKKα/β/γ-Komplexes, welcher den NF-κB-Inhibitor IκBα phosphoryliert. Es folgt eine sofortige Ubiquitinierung von IκBα mit anschließendem Abbau im 26S-Proteasom. Auf diese Weise wird das p50/p65-Heterodimer freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription einer Reihe von NF-κB-abhängigen Zielgenen (z.B. COX-2, iNOS, MMP-9, TNFα) aktivieren. Ein neuer, alternativer Signalweg wird durch Lipopolysaccharid (LPS), Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) oder Zytokine induziert. Dies führt zu Aktivierung des IKKε/TBK1-Komplexes. Durch Phosphorylierung von IκBα oder IKKβ des klassischen Signalwegs kommt es zur Freisetzung des p50/p65-Heterodimers, dessen Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung einer Reihe von NF-κB-abhängigen Zielgenen (nach Niederberger und Geisslinger, 2008).

1.4

TANK-Binding Kinase 1

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) und deren Rolle bei entzündlichen Schmerzreaktionen. TBK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der angeborenen Immunantwort spielt, v.a. bei viralen Infektionen und anderen Pathogen-assoziierten Entzündungen. TBK1 ist Bestandteil der IKK-Familie, welche die Expression von Typ I-Interferone induziert und den NF- κ B Signalweg beeinflusst (POMERANTZ UND BALTIMORE, 1999; BONNARD ET AL., 2000; PETERS ET AL., 2000; PICHLMAIR ET AL., 2007; GUO UND CHENG, 2007; CHAU ET AL., 2008; GONCALVES ET AL., 2011). Da TBK1 Knockout-Mäuse embryonal aufgrund weit ausgeprägter hepatischer Apoptose sterben, wie auch p65-, IKK β und NEMO-defiziente Mäuse, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass TBK1, wie auch die kanonischen IKKs, eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt (LI ET AL., 1999; BONNARD ET AL., 2000; CHAU ET AL., 2008).

1.4.1 Die IKK ϵ /TBK1-Bindungspartner

TBK1 besteht aus 729 Aminosäuren, welche sich in einer N-terminalen Kinase Domäne (KD), einer Ubiquitin-artigen Domäne (ULD), der gerüstgebenden Dimerisierungs Domäne (SDD) und zwei C-terminalen coiled-coil Domänen (CTD) aufteilen (MA ET AL., 2012; TU ET AL., 2013; LARABI ET AL., 2013). Obwohl die Schlüsselreize zur TBK1 Regulation und Substraterkennung weiterhin unbekannt sind, zeigen strukturelle Untersuchungen, dass möglicherweise die Ubiquitin-artige Domäne die Substratspezifität steuert und als gerüstgebende Einheit die Assoziation von TBK1 als Teil eines Protein-Proteinkomplexes unterstützt (IKEDA ET AL., 2007; GONCALVES ET AL., 2011; MA ET AL., 2012; LARABI ET AL., 2013; TU ET AL., 2013). TBK1 kann verschiedene Wechselbeziehungen eingehen. Es wird angenommen, dass TBK1, je nach gebundenem Interaktionspartner, in verschiedenen Signalwegen

unterschiedliche Aufgaben einnehmen kann, wobei die spezifischen Funktionen durch die Art des Bindungspartners vermittelt werden (GONCALVES ET AL., 2011; LARABI ET AL., 2013). Des Weiteren sind bislang einige wenige Grundgerüste zur Inhibition von TBK1 bekannt, welche reversible Bindungsmodi aufweisen. Das Pyrimidin BX-795 stellt beispielsweise einen hochaffinen Liganden dar und wurde bereits als Grundlage für Optimierungen potentieller TBK-Inhibitoren verwendet (CLARK ET AL., 2009; MCIVER ET AL., 2012).

TBK1 und IKK ϵ werden als Antwort auf virale bzw. bakterielle Infektionen, wie auch durch verschiedene Zytokine stimuliert. TBK1 und IKK ϵ stimmen zu 64% in ihrer Sequenz überein und teilen sich einige Bindungspartner, wie z.B. TANK (*TRAF family associated NF- κ B activator*), was eine Verbindung zu den kanonischen IKKs ermöglicht (GONCALVES ET AL., 2011; CLARK ET AL., 2011B). TBK1 und IKK ϵ spielen durch die Induktion von Typ I-Interferonen und anderen Zytokinen eine ausschlaggebende Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Obwohl beide Kinasen die gleichen Signalwege vermitteln, gibt es einige Unterschiede in den jeweiligen Signaltransduktionen (IKEDA ET AL., 2007; MIYAHIRA ET AL., 2009). Beispielsweise nimmt die IRF3 Aktivierung nach einer poly(I:C) Stimulierung in TBK1-defizienten Makrophagen ab, wohingegen die IRF3 Aktivierung in IKK ϵ -defizienten Makrophagen normal erfolgt (HEMMI ET AL., 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die IRF3 Aktivierung überwiegend durch TBK1 reguliert wird.

Neben ihrer Funktion im angeborenen Immunsystem wurde TBK1 und IKK ϵ eine weitere Rolle in der Zellproliferation und in der Tumorentwicklung zugeschrieben (CLEMENT ET AL., 2008; SHEN UND HAHN, 2011; XIE ET AL., 2011; SHEN ET AL., 2012). IKK ϵ kann zur Transformation menschlicher Zellen beitragen. Es wurde gezeigt, dass IKK ϵ unter hypoxischen Bedingungen induziert und in vielen Tumoren, wie z.B. in Brustkrebs-Zelllinien, in signifikanter Höhe exprimiert wird (OU ET AL., 2011). Das Protoonkogen KRAS führt zur Aktivierung von TBK1 und NF- κ B, was die Auslösung eines Tumors, wie bei Brustkrebs, Lungenkrebs oder einem Bauchspeicheldrüsenkarzinom, zur Folge haben kann (SEGUIN ET AL., 2014). Studien haben herausgefunden, dass das gleichzeitige Anvisieren beider Kinasen, TBK1 und IKK ϵ , eine effiziente Art ist, die Tumorzellproliferation zu unterdrücken (LI ET AL., 2013).

1.5

Interferon (IFN)-Signalweg

Der IRF3- bzw. IRF7-Signalweg wird vor allem durch TBK1 und IKK ϵ reguliert. In zytosolischen wie TLR-abhängigen Signalwegen erfolgt die Aktivierung von IRF3 primär über die TBK1 (MCWHIRTER ET AL., 2004). Bei zytosolischer und TLR3-TRIF vermittelter Viruserkennung ist an der IRF3-Aktivierung neben TBK1 auch IKK ϵ beteiligt (SHARMA ET AL., 2003, FITZGERALD ET AL., 2003, HEMMI ET AL., 2004). IRFs sind essentiell für die Induktion von Typ I-IFN und IFN-abhängigen Genen (HACKER ET AL., 2006; OGANESYAN ET AL., 2006). Interferone (IFN) sind sezernierte Glykoproteine von vor allem Leukozyten und Fibroblasten und gehören zu der Gruppe der Zytokine. IRF3 wird ubiquitär exprimiert und liegt in unstimulierten Zellen als Monomer überwiegend im Zytoplasma vor (AU ET AL., 1995). Stimulierungen durch virale Infektionen führen zur Aktivierung von IKK ϵ /TBK1 und folglich zur C-terminalen Phosphorylierung von IRF3, welches daraufhin Homodimere oder Heterodimere mit IRF7 bildet. Diese Dimere interagieren nach Translokation in den Nukleus mit den transkriptionellen Coaktivatoren CREP-bindendes Protein (CBP) und p300, über die sie an die DNA binden und die Expression von Typ I-IFN induzieren (HEMMI ET AL., 2004; SASAI ET AL., 2005; HACKER ET AL., 2006; OGANESYAN ET AL., 2006). Die Ubiquitinartige Domäne (ULD) der TBK1 ist für die Kinase-Aktivität und die IRF3 Phosphorylierung erforderlich, da die Bindung von TBK1 auf der IRF-Assoziationsdomäne (IAD) davon abhängig ist. Die IAD befindet sich am C-Terminus und vermittelt die Homo- bzw. Heterodimerisierung wie auch regulatorische Funktionen (EROSHKIN ET AL., 1999; PANNE ET AL., 2007). Damit es zur Phosphorylierung der C-terminalen Serinreste von IRF3 und IRF7 durch die Kinasen TBK1 und IKK ϵ kommt, erfolgt hier zunächst die Signalweiterleitung von MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*). MAVS assoziiert dabei direkt mit IKK ϵ , während die Interaktion mit TBK1 über das Protein TRAF3 geschieht (KAWAI ET AL., 2005; MEYLAN ET AL., 2005). TRAF3 wiederum interagiert direkt mit MAVS und es erfolgt die Weiterleitung des Signals an IKK ϵ /TBK1, die dadurch die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 einleiten (OGANESYAN ET AL., 2006; SAHA ET AL., 2006). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass IKK ϵ -defiziente

Mäuse keine Beeinträchtigung bei der Aktivierung von IRF3 haben und TBK1-defiziente Mäuse einen nur teilweisen reduzierten Effekt aufwiesen. Jedoch zeigten Mäuse, die in beiden Kinasen defizient sind, eine fast vollständige Aufhebung der IRF3-Aktivierung (YAMAMOTO ET AL., 2003; RYZHAKOV UND RANDOW, 2007).

IRF3 und IRF7 besitzen eine Transaktivierungsdomäne, die im unstimulierten Zustand durch intramolekulare autoinhibitorische Strukturen geblockt ist (LIN ET AL., 2000, AU ET AL., 2001, BARNES ET AL., 2002). Im Gegensatz zu IRF3 muss IRF7 in den meisten Zellen erst durch Typ I-IFN induziert werden (KERKMANN ET AL., 2003). Die Regulierung der IRF7-Expression erfolgt auf zwei Ebenen. Auf Transkriptionsebene wird IRF7 durch Typ I-IFN oder LPS induziert. Die Regulierung der Transaktivierungsfunktion erfolgt im Rahmen der virusinduzierten Aktivierung von IRF7. Diese besteht in einer Phosphorylierung spezifischer C-terminaler Serinreste, was zur Hemmung der autoinhibitorischen Domäne und stabilen Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit IRF3 führt. Phosphoryliertes IRF7 akkumuliert daraufhin im Zellkern und aktiviert die Transkription von IFN α und IFN β (MARIE ET AL., 2000; CAILLAUD ET AL., 2005).

1.6

Potenzielle TBK1-Zielproteine

Im Verlauf der Arbeit wurde zur Detektion von neuen TBK1-Zielproteinen ein micro-Array durchgeführt (siehe 3.4.1). Die Ergebnisse des Arrays deuteten darauf hin, dass der Adenosin A_{2A}-Rezeptor (Adora_{2A}) und der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) durch TBK1 reguliert werden könnten.

1.6.1 Adora_{2A}

Das Nukleosid Adenosin ist im Körper weit verbreitet und spielt im Immunsystem eine wichtige modulatorische Rolle. Unter anderem entfaltet es

seine Effekte als physiologischer Agonist an membranständigen Rezeptorproteinen, den Adenosin-Rezeptoren (FREDHOLM ET AL., 2001). A_{2A}-Rezeptoren bewirken über die Stimulation der Adenylatcyclase einen Anstieg des cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Spiegels (RALEVIC UND BURNSTOCK, 1998), welcher die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IFN γ oder IL-1 β inhibiert.

1.6.2 MIF

MIF ist ein proinflammatorisches Cytokin, das z.B. die Induktion von TNF α herbeiführen kann (LEECH, 1998; MIKULOWSKA, 1997; MORAND ET AL., 2002). Durch seine konstitutive Expression unterscheidet es sich von einigen anderen proinflammatorischen Zytokinen, die auf einen Reiz hin erst synthetisiert werden müssen (BAUGH UND BUCALA, 2002). MIF wird nach Stimulierung z.B. durch LPS oder auch durch Tumornekrosefaktor (TNF α) und Interferon- γ (IFN- γ) freigesetzt (CALANDRA ET AL., 1994; CALANDRA ET AL., 1998) und bewirkt die Stimulierung der Ausschüttung vieler entzündungsfördernder Faktoren, wie TNF α , IL-6 oder Stickstoffmonoxid (NO), wie ein klassisches proinflammatorisches Zytokin (BERNHAGEN ET AL., 1994; CALANDRA ET AL., 1995; MITCHELL ET AL., 1999).

1.7

IKKe und Schmerz

Seit der Entdeckung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B werden umfangreiche Forschungsarbeiten zur biologischen Funktion und zur Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung durch endogene und exogene Substanzen durchgeführt. In den 90er-Jahren gelang der Nachweis, dass Promotoren der Gene von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Chemokine oder proinflammatorische Enzyme, Bindungsstellen für NF- κ B besitzen (LEE

UND BURCKART, 1998). Es konnte auch gezeigt werden, dass Fehlregulationen von NF- κ B-Signalübertragungswegen mit pathologischen Prozessen wie chronisch-entzündlichen Erkrankungen (NIEDERBERGER ET AL., 2001; TEGEDER ET AL., 2001), entzündlichen Darmerkrankungen (ATREYA ET AL., 2008) und Krebs involviert ist (KARIN, 2006).

Des Weiteren spielt NF- κ B eine bedeutsame Rolle bei der durch akute und chronische Entzündungen hervorgerufenen Schmerzentstehung und -weiterleitung (LI UND VERMA, 2002; DE MOS ET AL., 2009). Nach nozizeptiver Stimulation konnte in Astrozyten, Mikroglia und Neuronen eine Aktivierung von NF- κ B in isolierten Zellen, wie auch im Gewebe, nachgewiesen werden (KALTSCHMIDT ET AL., 2002; LILIENBAUM UND ISRAEL, 2003; WENG ET AL., 2004; KIM ET AL., 2005), wobei das NF- κ B-Dimer p50/p65 in Neuronen sowohl im Zytoplasma als auch konstitutiv im Nukleus zu finden ist (KALTSCHMIDT ET AL., 1994). Im Nervensystem liegt NF- κ B hauptsächlich als p50/p65- und p50/p50-Dimer vor (MEFFERT ET AL. 2003; KALTSCHMIDT ET AL. 2005). Es wird vermutet, dass die p50 Untereinheit von NF- κ B bei chronischen Entzündungsschmerzen auf zentraler Ebene an einer Aktivierung proinflammatorischer Stimuli beteiligt ist. Dies konnte durch Tierversuche belegt werden, in denen nachgewiesen wurde, dass p50^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine geringere nozizeptive Antwort auf akute und inflammatorisch noxische Stimulation zeigten, was mit einer verringerten Expression von NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen Genen, wie COX-2, im Rückenmark einherging (NIEDERBERGER ET AL. 2007). Zudem führt eine Hemmung von NF- κ B im Mausmodell zu einer Verringerung der Zytokinproduktion und milderte die Krankheitssymptome (MCINTYRE ET AL. 2003; PODOLIN ET AL. 2005).

In dieser Arbeit war vor allem die Rolle von IKK ϵ als potenzieller Bindungspartner von TBK1 bei der Schmerzentstehung und -weiterleitung interessant. So konnte gezeigt werden, dass es nach einer nozizeptiven Stimulation in schmerzrelevanten Zellen im Rückenmark und in den DRGs zu einer Hochregulation von IKK ϵ auf mRNA- und Proteinebene kommt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass IKK ϵ eine Rolle bei der Schmerzverarbeitung spielt (MÖSER ET AL., 2011). In Entzündungsmodellen konnte man nach einer inflammatorischen Stimulation bei IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen ein reduziertes nozizeptives

Verhalten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren beobachten. Die $IKK\epsilon^{-/-}$ -Deletion in Mäusen führt zu einer Hemmung der durch Entzündung hervorgerufenen NF- κ B-Aktivierung und deren DNA-Bindungsaktivität und führen folglich zur Inhibierung der Expression NF- κ B-abhängiger proinflammatorischer Gene. Der antinozizeptive Effekt von $IKK\epsilon^{-/-}$ konnte pharmakologisch in C57BL/6-Mäusen durch Gabe des $IKK\epsilon$ /TBK1-Inhibitors BX-795 bestätigt werden (MÖSER ET AL., 2011).

IRF3 als wichtiges $IKK\epsilon$ -Zielprotein in viralen Infektionen wird in Wildtypen, wie auch in $IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen während einer inflammatorischen Hyperalgesie nicht aktiviert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine verringerte Hyperalgesie von Typ I-IFN Reaktionen unabhängig ist, und eher von einer gestörten NF- κ B-Bindung an die Promoter-Region bestimmter Gene abhängt (MÖSER ET AL., 2011). Die Hochregulation von NF- κ B-unabhängigen Entzündungs-assoziierten Genen wurde nicht durch die $IKK\epsilon$ -Deletion beeinflusst, was bedeutet, dass der nozizeptive Effekt von $IKK\epsilon$ über den NF- κ B-Signalweg reguliert wird (VERHELST ET AL., 2013). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass $IKK\epsilon$ als Zielprotein für entzündungshemmende Medikamente geeignet ist, da die Expression von $IKK\epsilon$ für die Regulation verschiedener proinflammatorischer Proteine notwendig ist (KRAVCHENKO ET AL., 2003). Des Weiteren wird $IKK\epsilon$ eine Beteiligung an chronischen Entzündungen zugesprochen, da $IKK\epsilon$ nachweislich in entzündetem Gelenkgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis exprimiert wird (AUPPERLE ET AL., 2001; SWEENEY ET AL., 2005). Da TBK1 der Bindungspartner von $IKK\epsilon$ ist, ist es von großem Interesse herauszufinden, inwieweit TBK1 ein geeignetes Target für pharmakologische Eingriffe ist.

1.8

Therapeutischer Ansatz

Viele Schmerz- und Entzündungsmediatoren, wie z.B. iNOS und COX-2 werden über den NF- κ B Signalweg reguliert. Zudem werden auch proinflammatorische,

schmerzrelevante Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, die als Aktivatoren der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ /Kaskade fungieren, durch $\text{NF-}\kappa\text{B}$ selbst kontrolliert, was zu einer positiven Selbstverstärkung führt (BARNES UND KARIN, 1997). Dementsprechend könnte ein Eingriff in den $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg selbst einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie von Entzündungen und Schmerzen darstellen (KARIN ET AL., 2004; NIEDERBERGER UND GEISLINGER, 2008). Die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung kann auf verschiedenen Stufen der Aktivierungskaskade inhibiert werden. So unterdrücken Glucocorticoide die Bindung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ an die DNA durch direkte Assoziation oder durch Verstärkung der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Expression. Cyclosporine und Tacrolimus verhindern die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch Inhibierung der Calcineurinwirkung der Phosphatase, die indirekt den $\text{I}\kappa\text{B}$ -Abbau induziert. Hohe Konzentrationen von Aspirin und Salicylate führen durch Induzierung der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Phosphorylierung zur Hemmung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität (PIERCE ET AL., 1996; YIN ET AL., 1998). Ebenso inhibieren Antioxidantien durch Veränderung des Redox-Zustandes der Zelle die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung (LEE UND BURCKART, 1998). Verschiedene NSAIDs, deren Hauptmechanismus auf der Inhibition von Cyclooxygenasen, die Arachidonsäure in Prostaglandine umwandeln, basiert, können ebenfalls die Aktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ hemmen. NSAIDs werden als sogenannte „*first-choice*“ Medikamente in der Behandlung von Entzündungen und Entzündungsschmerzen eingesetzt. Eine wichtige Wirkstoffklasse der NSAIDs sind Arylpropionsäuren und deren Derivate, welche seit langem als nichtsteroidale, antiinflammatorisch und analgetisch wirksame Arzneimittel eingesetzt werden. Bekannte Vertreter dieser Wirkstoffgruppe sind unter anderem Ibuprofen, Flurbiprofen oder Naproxen (NEUGEBAUER ET AL., 1995; GOODMAN UND GILMAN'S, 1996). Eine weitere wichtige Gruppe der NSAIDs sind die COX-2-Hemmer (Coxibe), dazu gehören beispielsweise Celecoxib, Etoricoxib und Lumiracoxib (GEISLINGER ET AL., 1994; NIEDERBERGER ET AL., 2001; TEGEDER ET AL., 2001; NIEDERBERGER ET AL., 2003; NIEDERBERGER ET AL., 2006). Die Anwendung der NSAIDs bei der Langzeittherapie chronischer Entzündungen ist jedoch häufig durch unerwünschte Nebenwirkungen limitiert und die erwünschten Wirkungen sind nicht immer ausreichend (GABRIEL ET AL. 1991; LANGMAN ET AL. 1994; SINGH 1998; WOLFE ET AL. 1999). Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Analgetika weiterhin notwendig. Vor allem die

Aufklärung von Mechanismen, die spezifisch für die zentrale Sensibilisierung bei chronischen Schmerzen sind, ist dabei von entscheidender Bedeutung.

Bisherige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass diese Medikamente ihre antiphlogistische und analgetische Wirkung, zumindest teilweise, über die Regulation von NF- κ B vermitteln. Als hoffnungsvolle Targets für Inhibitoren bei Entzündungen gelten I κ B-Kinasen. Diese Kinasen sind relativ spezifisch für die Aktivierung von NF- κ B. V.a. für den klassische Komplex wurde lange Zeit angenommen, dass er hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen aktiviert wird (KARIN ET AL., 2004; NIEDERBERGER UND GEISSLINGER, 2008). Da NF- κ B aber auch in der Entwicklung und für das Überleben der Zelle eine große Rolle spielt, könnte eine unspezifische bzw. komplette Inhibierung des NF- κ B-Signalweges zu beträchtlichen Nebenwirkungen führen.

Bestätigt wurde diese Vermutung anhand von Knockout-Tieren. Ein genetischer Knockout von p65, IKK α und β bei Mäusen ist letal. p65^{-/-}-Mäuse sterben während der embryonalen Phase, wie auch IKK β ^{-/-}-Mäuse (BEG ET AL., 1995; LI ET AL., 1999; TANAKA ET AL., 1999). IKK α ^{-/-}-Tiere zeigen Abnormalitäten in ihrer Entwicklung und sterben kurz nach der Geburt. TBK1^{-/-}-Mäuse sind ebenso wenig lebensfähig, da sie embryonal an massiver Leberdegeneration durch Apoptose sterben (HU ET AL., 1999; LI ET AL., 1999; BONNARD ET AL., 2000; HEMMI ET AL., 2004). Unter einem TNF α -R^{-/-}-Background sind allerdings TBK1^{-/-}-Mäuse lebensfähig. Durch das Fehlen des TNFR konnte die embryonale Sterblichkeit durch massive Leberdegeneration verhindert werden (BONNARD ET AL., 2000; YU ET AL., 2012). Einzig für IKK ϵ sind die entsprechenden Knockout-Tiere lebensfähig und fertil (HEMMI ET AL. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass IKK ϵ an der Schmerzentstehung und -verarbeitung bei Entzündungen beteiligt zu sein scheint (MÖSER ET AL., 2011). TBK1 als eventueller Bindungspartner von IKK ϵ könnte daher ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt bei der Entwicklung neuer Analgetika sein.

1.9

Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von TBK1 bei der Regulation der Schmerzentstehung und -verarbeitung bei entzündlichen Schmerzen zu untersuchen. Des Weiteren war es von Interesse, herauszufinden, inwiefern sich TBK1 als Zielmolekül für die Schmerztherapie eignet. Um dies beurteilen zu können, sollten die funktionellen Konsequenzen einer Hemmung von TBK1 in Entzündungsmodellen erforscht werden.

Die Rolle von IKK ϵ , die vermutlich einen Komplex mit TBK1 bildet, wurde bereits in verschiedenen Schmerzmodellen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäuse nach inflammatorischer Stimulation ein reduziertes nozizeptives Verhalten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren aufweisen, womit eine Beteiligung von IKK ϵ an der Schmerzverarbeitung bei Entzündungen nachgewiesen wurde. Untersuchungen im Rückenmark der Mäuse zeigten, dass diese Auswirkungen auf eine Hemmung der NF- κ B-Signalübertragungskaskade zurückzuführen sind, was eine verringerte Induktion von NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen Genen zur Folge hatte (MÖSER ET AL., 2011).

Interessant war nun die Frage, ob TBK1 als wahrscheinlicher Bindungspartner von IKK ϵ ähnliche Effekte zeigt. Zunächst sollte die Lokalisation von TBK1 im peripheren und zentralen Nervensystem charakterisiert werden. Vor allem waren dabei die an der Schmerzweiterleitung beteiligten Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia, DRGs) und das lumbale Rückenmark der Mäuse von Bedeutung. Anschließend sollte im Rückenmark die Regulation von TBK1 nach peripherer proinflammatorischer nozizeptiver Stimulation untersucht werden. Mit Hilfe von TBK1-Knockout Mäusen sollte die funktionelle Relevanz von möglichen TBK1-Regulationen in den inflammatorischen Schmerzmodellen des Formalintests und der Zymosaninduzierten Pfotenentzündung charakterisiert werden. Um Hinweise auf eine Beteiligung von TBK1 an der Aktivierung von NF- κ B zu erhalten, sollte in einer weiteren Analyse untersucht werden, ob es Veränderungen bei der Regulation von NF- κ B-abhängigen Genen bei entzündlichen Schmerzen gibt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob es zu

einer unterschiedlichen Aktivierung von NF- κ B in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren kommt. Um der Frage nachzugehen, ob außer NF- κ B noch weitere Signalwege involviert sind, sollten auch NF- κ B-unabhängige Gene wie Akt1, c-Fos und CD68 untersucht werden. Des Weiteren wurde ein micro-Array durchgeführt, um neue TBK1-Zielproteine zu detektieren und diese auf ihre Beteiligung bei entzündlichen Schmerzen zu untersuchen. Die pharmakologischen Ansätze zur spezifischen TBK1 Hemmung sollten mit dem Inhibitor BX-795 durchgeführt werden, um einerseits die molekularen Mechanismen von TBK1 in der Zellkultur näher zu beleuchten und andererseits, um eventuelle Veränderungen der Expression von TBK1 zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1

Materialien

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

1 kB Plus-DNA-Marker	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
18S PDAR	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose, SeaKem [®] LE Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Brilliant blue G250	Serva GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Celecoxib	WITEGA, Berlin
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM 11960	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DNase Stock Solution	Qiagen GmbH, Hilden
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Essigsäure 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze

FastStart SYBR Green Master (Rox)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, AL
Formalin 5%	Apotheke der Universitätsklinik, Frankfurt
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HBSS 1x	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isofluran	Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden
Isopropanol 100%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
L-Glutamin 200mM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lipopolysaccharid von E.coli	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

Natriumhydroxid-Plättchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Odyssey Blocking Puffer	Li-COR Odyssey, Bad Homburg
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Pefabloc	Qbiogene-Alexis GmbH, Grünberg
Pen Strep	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure 85%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Phosphosafe™ Extraction Reagent	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
PonceauS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	BioRad Laboratories, Kalifornien
Primersequenzen	BioSpring, Frankfurt am Main
Primersequenzen	Biomer, Ulm
RDD-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
RNAse ZAP	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti®-Safe GelStain	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RPMI 1640 + Glutamax™	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TrypLE™ Express (-Phenol Red)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

TritonX-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Trypton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Tween20	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze

2.1.2 Geräte und Materialien

ABI 7500 Fast Realtime PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Elektrophoresesystem Mini-Protean [®] 3	Bio-Rad, München
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf [®] Tube	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
HeraSafe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Kryotom CM 3050	Leica, Wetzlar
MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Microtiter [®] -Platte	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

MiniTrans-Blot [®] Blottingapparatur	Bio-Rad, München
Mixer Mill 400	Retsch [®] , Haan
NanoDrop-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Odyssey [®] Infrared Scanner	LI-COR, Lincoln, USA
QuantitiyOne [®] -Software	Bio-Rad, München
Schüttelapparat GFL-3005 [®]	GFL, Burgwedel
Schüttler Duomax [®] 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttler Titramax [®] 100	Heidolph, Schwabach
Spectrafluor Plus [®] -Instrument	Tecan, Crailsheim
Super-Frost-Plus Poly-L-Lysierte Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Thermomixer compact [®]	Eppendorf, Hamburg
UV-Meter Gel Doc [®] Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
X-Fluor [®] -Software	Tecan, Crailsheim

2.1.3 Kits

peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
RNeasy [®] Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RT ² Profiler [™] PCR Array	Qiagen GmbH, Hilden
Verso [™] cDNA Synthese Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Western-Blot

Primärantikörper

Adora _{2A}	monoclonal-mouse	Acris Antibodies GmbH, Herford
Adora _{2A}	monoclonal-mouse	Millipore GmbH, Schwalbach
β-Aktin	monoclonal-mouse	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
COX-2	polyclonal-mouse	Cayman Chemical, Michigan, USA
IκBα	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
IKKε	monoclonal-mouse	ActiveMotif, Belgien
IKKε	monoclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
IRF3	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
MIF	polyclonal-goat	Acris Antibodies GmbH, Herford
NAK/TBK1	monoclonal-rabbit	Epitomics, Burlingame, USA
NAK/TBK1	polyclonal-rabbit	QED Bioscience, San Diego, USA
TBK1/NAK	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt

Sekundärantikörper

goat anti-goat 680	Odyssey LI-COR, Lincoln, USA
goat anti-goat 800	Rockland, Gilbertsville, USA
goat anti-mouse IgG Alexa Fluor [®] 680	Molecular Probes, Oregon, USA
goat anti-mouse IRDye [™] 800 CW	Odyssey LI-COR, Lincoln, USA
goat anti-rabbit IRDye [™] 680	Odyssey LI-COR, Lincoln, USA

2.1.4.2 Immunhistochemie

Primärantikörper

CD11b	monoclonal-rat	Serotec, Düsseldorf
GFAP	monoclonal-mouse	Merck KGaA, Darmstadt
NeuN	monoclonal-mouse	Merck KGaA, Darmstadt
NF200	polyclonal-mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TBK1/NAK	polyclonal-rabbit	QED Bioscience, San Diego, USA

IB4-AF488	Glycoprotein*	Life Technologies GmbH, Darmstadt
-----------	---------------	--------------------------------------

*aus Samen der afrikanischen Schwarzbohne (*Griffonia simplicifolia*)

Sekundärantikörper

anti-goat AF488	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-mouse AF488	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-rabbit AF488	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-rat AF488	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-mouse Cy3	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
anti-rabbit Cy3	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
anti-rat Cy3	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.1.5 Primer

Primer	Sequenz	Temp [C°]
Akt1 Fw	5'-GGCTGGCTGCACAAACG-3'	60
Akt1 Rv	5'-GACTCTCGCTGATCCACATCCT-3'	
c-Fos Tq Fw	5'-ACCATGATGTTCTCGGGTTTCAA-3'	60
c-Fos Tq Rv	5'-GCTGGTGGAGATGGCTGTCAC-3'	
CD68 Fw	5'-CTTCCCACAGGCAGCACAG-3'	60
CD68 Rv	5'-AATGATGAGAGGCAGCAAGAGG-3'	
COX2 Tq Fw	5'-AGACACTCAGGTAGACATGATCTACCCT-3'	60
COX2 Tq Rv	5'-GGCACCAGACCAAAGACTTCC-3'	
Gapdh Tq Fw	5'-CAA TGT GTC CGT CGT GGA TCT-3'	58
Gapdh Tq Rv	5'-GTC CTC AGT GTA GCC CAA GAT G-3'	
iNOS Tq Fw	5'-CCAAGCCCTCACCTACTTCC-3'	60
iNOS Tq Rv	5'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'	
MMP-9 Tq Fw	5'-GAAGCCAAACCCTGTGTGTT-3'	60
MMP-9 Tq Rv	5'-AGAGTACTGCTTGCCCAGGA-3'	
TBK1 wild	5'- CTAATGGTTGTAGTCAGGGTCTCCTGC -3'	67
TBK1 extra	5'- TGC GTTCCTGTCCTGACCGTGATTGTG -3'	
TBK1 neo	5'- ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG -3'	67
TBK1 extra	5'- TGC GTTCCTGTCCTGACCGTGATTGTG -3'	
TNF α Sense1	5'- AGATGGAGAAGGGCAGTTAG -3'	58
AntiSense1	5'- ATACCAGGGTTTGAGCTCAG -3'	
AntiSense2	5'-TACTTTGTTAAGAAGGGTGAGA -3'	

2.1.5.1 TaqMan[®] Gene Expression Assays

Adora _{2A}	Mm00802075_m1
MIF	Mm01611157_gH
18S rRNA	RefSeq: X03205.1

2.2

Zellkultur

Für die *in vitro*-Untersuchungen in dieser Arbeit wurden murine Makrophagen des Typs RAW 264.7 (RALPH UND NAKOINZ, 1977) verwendet. Außerdem wurden aus embryonalem Mausgehirn Primärkulturen (Astrozyten) gewonnen, die für unterschiedliche Stimulationsversuche herangezogen wurden. Um Kontaminationen zu verhindern, wurden alle zellulären Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt und die verwendeten Materialien zuvor autoklaviert.

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung der Makrophagen wurde das Medium RPMI 1640 von Invitrogen benutzt. Dieses beinhaltet verschiedene Aminosäuren und Vitamine, sowie die nicht-essentielle Stickstoffquelle L-Glutamin. Außerdem wurde das Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und jeweils 100 U/ml Penicillin und Streptomycin versetzt.

Die Inkubation erfolgte in Zellkulturflaschen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Begasung von 5 % CO₂.

<u>Medium</u>	RPMI 1640 + Glutamax™ (Gibco®, Invitrogen)
	10 % fötales Kälberserum (FCS)
	100 U/ml Penicillin
	100 U/ml Streptomycin

Die Gewinnung der Astrozyten erfolgte aus embryonalen Mausgehirnen, welche am Entwicklungstag 15 aus dem Uterus der mit CO₂ getöteten Mutter herauspräpariert und in eiskaltem HBSS (supplementiert mit CaCl₂ und MgCl₂) aufgenommen wurden. Nach einer anschließenden Inkubation von 2 h in 10 % TrypLE™ Express in HBSS bei 37 °C, 5 % CO₂ wurde das fötale Gehirngewebe

mindestens drei Mal mit DMEM 11960, 10 % FCS, 1 % PenStrep gewaschen, um die Enzymreaktion abzustoppen und ein Homogenat zu erhalten. Dieses wurde mit 1 % L-Glutamin [200 mM] auf 25 ml Gewebekulturflaschen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) verteilt und 10-14 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die gegebenenfalls vorhandenen Mikroglia von den Astrozyten abgeschüttelt und die Astrozyten weiter in Kultur gehalten bzw. für Versuche eingesetzt.

<u>Medium</u>	DMEM 11960 (Gibco [®] , Invitrogen)
1 %	200 mM L-Glutamin
10 %	fötales Kälberserum (FCS)
100 U/ml	Penicillin
100 U/ml	Streptomycin

2.2.2 Passagieren von Zellen

Nachdem die RAW 264.7-Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80-90 % erreicht hatten, wurden sie unter der Bench mit einem sterilen Schaber vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt und bei 1.200 rpm 3 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Vollmedium resuspendiert und die Zellen je nach Bedarf in Zellkulturflaschen ausgesät. Um eine bestimmte Zellanzahl zu erhalten, wurden die Zellen zuvor mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Astrozyten wurden mit PBS gespült und mit TrypLE™ Express 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der gleichen Menge an FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die vom Flaschenboden gelösten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen runterzentrifugiert (3 min bei 1400 rpm). Das Zellpellet wurde in neuem Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilen.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von RAW 264.7-Zellen

Für die Lagerung der Zellen wurde das Zellpellet in Zelleinfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in Cryo™-Einfrierröhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis langsam abgekühlt und bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgt bei -196 °C in einem Stickstofftank.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Cryo™-Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und zur weiteren Kultivierung in Medium (RPMI 1640 + Glutamax™, 10 % FCS, 1 % PenStrep) aufgenommen.

2.2.4 Stimulation von Zellen

Um bestimmte Eigenschaften der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Stimulationsversuche durchgeführt. Dafür wurden RAW 264.7 Makrophagen in Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm, Zellkonzentration $5 \times 10^6/10$ ml) oder in 6-Loch-Platten ausgesät (Zellkonzentration $2 \times 10^5/2$ ml). Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 über Nacht wurden die Zellen mit (Lipopolysaccharid) LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert.

Versuchsabhängig wurden die Zellen zusätzlich mit dem TBK1/IKK ϵ -Inhibitor BX-795 [100 nM] 30 min vor den jeweiligen Stimulationen behandelt.

Die Astrozyten wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät (Zellkonzentration $1 \times 10^6/10$ ml) und nach vier Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 mit einem Cytokin-Mix stimuliert.

Cytokin-Mix: 5 ng/ml TNF α
 1 ng/ml IL-1 β
 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS

Der Inhibitor BX-795 [100 nM] wurde versuchsabhängig ebenfalls 30 min vor der jeweiligen Stimulation auf die Zellen aufgetragen.

2.3

Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Versuchstiere

Um die Regulation von TBK1 zu untersuchen, wurden die *in vivo*-Versuche an männlichen Wildtyp-Mäusen des Typs C57BL/6 (Harlan Winkelmann, Borcheln) durchgeführt. Des Weiteren wurden für Verhaltensexperimente und die darauf folgenden Expressionsanalysen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäuse und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäuse herangezogen, welche bei mfd Diagnostics (Wendelsheim) gezüchtet wurden (Zuchtpaar zur Verfügung gestellt von Prof. Shizuo Akira, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Japan). Für die Überprüfung des Genotyps wurden aus Schwanzbiopsien PCR-Analysen mit dem REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Tiere wurden während der ganzen Zeit unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur $22 \pm 0,5$ °C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und bekamen Trockenfutter und Wasser ad libitum. Die Tierethikkommission genehmigte alle durchgeführten Experimente.

2.3.2 Untersuchungen zur TBK1-Expression

Um die Regulation von TBK1 in *in vivo*-Modellen zu untersuchen, wurden den C57BL/6-Mäusen 20 μl einer 5 %-igen Formaldehyd-Lösung subkutan in die Dorsalseite der Hinterpfoten injiziert und damit ein Entzündungsschmerz hervorgerufen. Die Tiere wurden nach definierten Zeiten (30 min, 2 h, 8 h und 24 h) nach der Formalininjektion getötet. Anschließend wurde das Gewebe wie in 2.3.4 beschrieben entnommen.

In einem weiteren Versuch wurden 20 μl einer 10 mg/ml Zymosan/PBS-Lösung subkutan in die Plantarseite der Hinterpfoten injiziert. Die Tiere wurden 5 h,

16 h, 24 h, 48 h nach der Zymosaninjektion getötet und das Gewebe, wie unter 2.3.4 beschrieben, ebenfalls entnommen.

Das Gewebe wurde frisch für die Expressionsanalysen auf Protein- und auf mRNA-Ebene verwendet. Bei Kontrolltieren wurde zusätzlich Gewebe mit 4 %PFA durch Perfusion fixiert und für die Herstellung von Gefrierschnitten für die anschließende Immunhistochemie verwendet.

2.3.3 Nozizeptive Tiermodelle

Schmerz wird durch Erfahrungen und Lernprozesse beeinflusst. Aus diesem Grund können Schmerzen im Tiermodell nur indirekt, durch Beobachtungen von zuvor definierten Verhaltensänderungen des Versuchstieres, erfasst werden. Diese Änderungen im Verhalten geben Rückschlüsse auf die nozizeptive Antwort der einzelnen Tiere. Zu den etablierten nozizeptiven Tiermodellen zählen unter anderem der Formalintest und die mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion (Dynamic Plantar).

2.3.3.1 Dynamic-Plantar-Test

Zur Ermittlung der mechanischen Sensitivität wurde der Dynamic-Plantar-Test angewandt. Hierbei werden die Mäuse in einen Plexiglaskäfig gesetzt, unter dem sich ein grobmaschiges Gitternetz befindet. Die Messung erfolgt durch einen definierten Druck mit einem Stahlstab, der dabei mit steigendem Druck gegen die Plantarseite der Hinterpfote der Maus gedrückt wird. Gemessen wird die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote.

Um unnötigen Stress bei den Versuchstieren zu vermeiden, wurden die Mäuse zur Gewöhnung einen Tag vor dem Experiment für mindestens 1 h in den Käfig gesetzt und das Dynamic Plantar Aesthesiometer testweise eingesetzt. Am Versuchstag selbst wurden die Mäuse vor der Behandlung für 1 h an den Käfig gewöhnt und eine Basislinie erstellt. Dazu wurde die Latenzzeit des

Pfotenwegziehens aus dem Mittelwert von vier Messwerten und der Differenz zwischen der linken und der rechten Pfote berechnet.

Um das Verhalten der Mäuse nach einer nozizeptiven Entzündung zu untersuchen, wurde den Mäusen anschließend subkutan in eine Hinterpfote 20 µl Zymosan [10 mg/ml] injiziert, wodurch dort eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde. In einem weiteren Schmerzmodell wurde den Mäusen 30 min vor der Zymosaningektion der COX-2 selektive Hemmstoff Celecoxib [10 mg/kg KG] per oraler Schlundsondierung verabreicht. Anschließend wurde 60 min nach der Zymosaningektion mit dem Stahlstab des Dynamic Plantar Aesthesimeters mit steigendem Druck gegen die Plantarseiten beider Hinterpfoten gedrückt, und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote infolge der Druckausübung gemessen. Die Druckstärke wurde über 10 sec von 0-5 g gesteigert und anschließend weitere 10 sec konstant bei 5 g gehalten (cut-off Zeit waren 20 sec). Im 1-Studentakt wurde insgesamt 8 Stunden lang gemessen (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h und 8 h), zusätzlich auch nach 24 h und 48 h. Nach der letzten Messung wurden die Versuchstiere getötet und für weitere Versuche präpariert.

2.3.3.2 Formalin Test

Dem Versuchstier werden bei diesem Test 20 µl einer 5 %-igen Formaldehyd-Lösung (Formalin) subkutan in die linke Hinterpfote injiziert. Zwei Stunden nach dem Formalintest wurden die Tiere getötet und die Gewebe zur weiteren Analyse entnommen.

2.3.4 Gewebeentnahme

2.3.4.1 Für Expressionsanalysen

Vor der Gewebeentnahme wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und durch kardiale Punktion entblutet. Direkt im Anschluss wurden die Tiere entlang des Rückenmarks mit einem Skalpell aufgeschnitten und die Wirbelsäule freipräpariert. In Höhe des Zervikalmarks wurde die Wirbelsäule quer durchgeschnitten und in kaudaler Richtung die Wirbelbögen vorsichtig durchtrennt. Das nun freie Rückenmark wurde im lumbalen Bereich L4-L6 einschließlich den entsprechenden DRGs entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde es bei -80 °C gelagert.

2.3.4.2 Für Gefrierschnitte

Für die Herstellung von Kryoschnitten war es notwendig, das Gewebe zu fixieren. Dazu wurden die Versuchstiere mit Isofluran tief narkotisiert und der Blutkreislauf der Mäuse nach Punktion des linken Herzventrikels mit einer NaCl-Lösung gespült. Direkt im Anschluss wurde das Gewebe mit 4 %-iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd) fixiert. Eine schnelle Fixierung verhindert die autolytische Zerstörung von Proteinen, die in den späteren Schnittpräparaten als Antigene für spezifische Antikörper fungieren. Um die Fixierung noch zu verbessern, wurden die Tiere 1 h in Eis gekühlt. Es folgte die Gewebeentnahme des Rückenmarks (L4-L6) mit den dazugehörigen DRGs. Das entnommene Gewebe wurde in eine 6-Loch-Platte überführt und für eine weitere Stunde in 4 %-igem PFA bei 4 °C fixiert. Zur Entwässerung des Gewebes wurden die Proben für 1 h mit 10 %-iger Saccharoselösung und über Nacht mit 30 %-iger Saccharoselösung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Gewebe in Gefriermedium (Jung, Leica Microsystems, Bensheim) eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Gelagert wurden die Blöcke bei -80 °C.

2.3.5 Herstellung von Gefrierschnitten

An einem Kryotom (Leica, Wetzlar) wurden von den in Gefriermedium eingebetteten Rückenmarks- und DRG-Proben unter konstanten

Temperaturbedingungen (Objekt: -19 °C; Umgebung: -20 °C) Schnitte mit einer Dicke von 14 µm-16 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, 2 bis 3 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4

Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Es gilt:

A_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw.

A_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger RNA

Zur Messung wurde 1 µl der Nukleinsäurelösung am NanoDrop-Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) gemessen.

2.4.2 RNA-Isolierung

2.4.2.1 RNA-Isolierung aus murinem DRG-und Rückenmarks-Gewebe

Die RNA aus Rückenmarks-Proben wurde mit dem RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Proben wurden mit 200 µl QIAzol Lysis Reagent versetzt und durch Zugabe von drei sterilen Kügelchen pro Probe für 4 min bei einer Frequenz von 25 Hertz in einer Mixer Mill (Retsch®) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 800 µl QIAzol Lysis Reagent auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und

entsprechend der Herstellerangaben fortgefahren. Der optionale DNase I Verdau wurde, wie beschrieben, durchgeführt. Die RNA wurde mit 25 µl RNase-freiem H₂O (Qiagen) aus den Säulen eluiert und die Konzentration am Nano-Drop photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.2.2 Reverse Transkription

Die in der RNA-Präparation enthaltenen mRNAs wurden in komplementäre cDNA-Stränge umgeschrieben, die dann bei der Realtime PCR als Matrize dienten. Die Reverse Transkription wurde mit dem Verso™ cDNA Synthese Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben durchgeführt. 200 ng RNA wurden dabei von der DNA-Polymerase mit einem Gemisch aus Oligo-dT-Primern und sechs zufällig aneinander gereihten Random Hexamer-Nukleotiden revers transkribiert. Der RT-Enhancer sorgt dafür, dass mögliche DNA-Rückstände während der Transkription degradiert werden.

Reaktionsansatz: (20 µl) cTTP)	4 µl 2 µl	5x Synthesis-Puffer 20 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, cGTP, cTTP)
	0,7 µl 0,3 µl	Random Hexamere Oligo dT
	1 µl	Verso™ Enzymmix
	1 µl	RT Enhancer
	200 ng	RNA
	ad 20 µl	RNase-freies H ₂ O

Tabelle 2: Reaktionsprotokoll RT-PCR

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30'	42 °C
Termination	2'	95 °C
Hold	∞	4 °C

Die cDNA-Proben wurden bis zur quantitativen Analyse bei -20 °C gelagert.

2.4.2.3 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Mit der Realtime-PCR kann man die Amplifikation von DNA in einer Probe in Echtzeit messen. Das Prinzip beruht auf einer üblichen PCR-Reaktion mit einer variablen Anzahl an Zyklen. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) erfolgte mit dem ABI 7500 Fast Realtime-PCR System von Applied Biosystems®. Die Durchführung basierte auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I (Roche). Dieser sich interkalierend in die Doppelhelix einfügende Farbstoff kann mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende der Elongationsphase gemessen, wenn in jedem Zyklus die maximale amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Während der Denaturierung löst sich der SYBR Green I-Farbstoff wieder aus der doppelsträngigen DNA heraus. Die 18S-rRNA diente als Kontrolle bei der TBK1 Basalexpression nach inflammatorischer Stimulation. Deren Quantifizierung, sowie die von MIF und Adora_{2A}, erfolgte mit Hilfe von TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems®), die aus unmarkierten, Sequenz-spezifischen Primerpaaren und einer fluoreszenzmarkierten TaqMan®-Hydrolysierungssonde bestanden. Die TaqMan®-Hydrolysierungssonde trägt am 5'-Ende einen FAM™- oder VIC®-markierten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ), sowie einen „minor groove binder“ (MGB), der die Hybridisierung der TaqMan®-Sonde durch Einlagerung in die kleine Furche der DNA stabilisiert. Bei Anlagerung der intakten TaqMan®-Sonde an die DNA unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Bei der Elongation der DNA wird die TaqMan®-Sonde gespalten und der Reporter freigesetzt, dessen Emission proportional mit der amplifizierten DNA-Menge zunimmt.

Für die Auswertung musste zuerst ein Schwellenwert (Threshold) festgelegt werden, bei dem sich die DNA-Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet. Man prüft, bei welcher Zykluszahl einer DNA-Probe das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert erreicht, denn diese ist proportional zur Anzahl der DNA-Kopien zu Beginn des Experiments. Diese Zykluszahl wird als Threshold-Cycle (C_t) bezeichnet. Proben mit einer höheren DNA-Konzentration erreichen den Schwellenwert früher und benötigen daher weniger Zyklen als

solche Proben, die eine geringere DNA-Konzentration aufweisen. Somit kann von dem C_t -Wert auf die DNA-Konzentration geschlossen werden.

Nachdem die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben wurde (siehe 2.4.2.2), erfolgte die Quantifizierung der Expression von TBK1, COX-2, MMP-9, iNOS, cFos, Akt1, CD68, Adora_{2A} und MIF am ABI 7500 Fast Realtime-PCR System (Applied Biosystems®, Darmstadt) unter Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.1.5). Die Messung erfolgte in einer Triplet-Bestimmung und dem internen Standard 18S-rRNA bzw. GAPDH. Mit einem speziellen, kommerziell erhältlichen, FastStart Universal Master Mix Kit wurden die Messungen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Expressionsanalysen von TBK1, COX-2, MMP-9, iNOS, cFos, Akt1, CD68 und GAPDH diente als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der ebenfalls im Mix enthalten war (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)).

Reaktionsansatz von TBK1, COX-2, MMP-9, iNOS, cFos, Akt1, CD68 und GAPDH:
(10 µl)

5 µl	2x FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)
1 µl	10 µM Fw Primer
1 µl	10 µM Rv Primer
1 µl	cDNA
ad 10 µl	RNase-freies H ₂ O

Reaktionsansatz von 18S-rRNA, Adora_{2A} und MIF:
(10 µl)

5 µl	2x FastStart Universal Probe Master (ROX)
0,5 µl	18S PDAR
1 µl	cDNA
ad 10 µl	RNase-freies H ₂ O

Tabelle 3: Reaktionsprotokoll Quantitative Realtime RT-PCR

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	10'	95 °C	
Amplifikation und Realtime Analyse	10" 30"	95 °C 60 °C	40

Für die Auswertung wurde die cDNA-Menge der behandelten Tiere auf die cDNA-Menge unbehandelter Kontrolltiere bezogen. Bei der Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten Referenzgens (18S RNA oder GAPDH) abgeglichen, um Schwankungen in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen (ΔC_t). Aus den ΔC_t -Werten beider Gruppen wird anschließend der $\Delta\Delta C_t$ -Wert erstellt. Die C_t -Werte werden hierbei voneinander abgezogen (ΔC_t), die beiden ΔC_t -Werte der einzelnen Gruppen (Probe und Kontrolle) voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_t$ -Wert) und in die Gleichung n -fache Expression = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001).

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.4.3 RT² Profiler™ PCR Array

Mit dem Mouse Innate & Adaptive Immune Responses RT² Profiler™ PCR Array (Qiagen, Hilden) kann ein Expressionsprofil von 84 Genen erstellt werden, welche in der Immunantwort auf bakterielle Infektionen und Blutvergiftungen involviert sind. Durch eine Quantitative Realtime RT-PCR kann dann die Expression ausgesuchter Faktoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort analysiert werden (ARIKAWA ET AL., 2011). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Das Ziel war es, zu untersuchen, ob ein quantitativer Unterschied in der Expression bestimmter Gene in unterschiedlichen Knockout-Gruppen festgestellt werden konnte. Nicht die Ermittlung der exakten Kopienanzahl der mRNA in den Proben, sondern das Verhältnis der Gruppen zueinander war entscheidend. Hierfür wurden die ΔC_t -Werte erstellt. Die Expression eines Zielgens wird auf die Expression eines nicht regulierten Referenzgens („Housekeeping-Gen“) bezogen und die ΔC_t -Werte beider Gruppen gebildet. Bei einem Referenzgen wird davon ausgegangen, dass es konstitutiv im Gewebe exprimiert wird und von den Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleibt. Die C_t -Werte werden hierbei voneinander abgezogen (ΔC_t).

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

2.4.3.1 RT² First Strand Kit

Die Rückenmarksproben von jeweils vier Knockout-Tieren desselben Genotyps wurden vereinigt, um eine größere Menge an RNA zu erhalten. Den Mäusen wurden 20 μ l einer 5%igen Formalinlösung injiziert und das Gewebe nach 2 h entnommen. Eine Gruppe bestand aus TNF α ^{-/-}-Mäusen und die andere Gruppe aus TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen.

Genomic DNA Elimination-Mix:

8 μ l [\cong 1,6 μ g]	totale RNA
<u>2 μl</u>	5x gDNA Elimination Puffer
10 μ l	

Cycler Programm:

5 min bei 42 °C
1 min auf Eis

RT-Mix (2 Reaktionen):

8 µl	BC3 (5x RT Puffer 3)
2 µl	P2 (Primer and External Control Mix)
4 µl	RE3 (RT Enzym Mix 3)
ad 20 µl	RNase-freies H ₂ O

Anschließend wurden 10 µl RT-Mix und 10 µl Genomic DNA Elimination vorsichtig miteinander gemischt und die cDNA-Synthese gestartet.

cDNA-Synthese-Programm:

15 min bei 42 °C
5 min bei 95 °C

Die Proben wurden auf Eis gestellt und 91 µl RNase-freies H₂O zu jeder 20 µl cDNA-Synthese-Reaktion hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.3.2 RT² qPCR Master Mix

Die fertigen First Strand cDNA-Synthese-Proben wurden kurz abzentrifugiert (10-15 sec) und mit RT² qPCR Master Mix versetzt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt in einem 5 ml-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg) angesetzt:

Reaktionsansatz (Experimental Cocktail) für eine 96-Loch-Platte:

1350 µl	2x SABiosciences RT ² qPCR Master Mix
102 µl	Diluted First Strand cDNA Synthesis Reaktion
<u>1248 µl</u>	H ₂ O
Gesamtvolumen	2700 µl

Der Reaktionsansatz wurde einmal für die TNF α ^{-/-} und einmal für die TNF α ^{-/-} / TBK1^{-/-}-Mäuse hergestellt.

Nach dem Zusammenmischen wurden 25 µl des Experimental Cocktail in jedes Loch der Platte pipettiert und anschließend eine Quantitative Realtime RT-PCR durchgeführt.

Tabelle 4: Protokoll Quantitative Realtime RT-PCR

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	10'	95 °C	1
Amplifikation und Realtime Analyse	15" 1'	95 °C 60 °C	40

2.4.4 Genotypisierung

Zur Überprüfung des Knockouts für TNF α -R und TNF α -R/TBK1 wurden die verwendeten Versuchsmäuse genotypisiert. DNA wurde dafür aus den Schwanzbiopsien mit dem REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma) nach Herstellerangaben isoliert und anschließend mittels PCR-Analyse mit spezifischen Primern genotypisiert (siehe 2.1.5).

Reaktionsansatz für TBK1-WT:

(20 µl)	2 µl	DNA-Extrakt
	1,5 µl	Primer wild (10 µM)
	1,5 µl	Primer extra (10 µM)
	10 µl	REExtract
	5 µl	H ₂ O

Reaktionsansatz für TBK1-KO:

(20 µl)	2 µl	DNA-Extrakt
	1,5 µl	Primer neo (10 µM)
	1,5 µl	Primer extra (10 µM)
	10 µl	REExtract
	5 µl	H ₂ O

Reaktionsansatz für TNF α :

(20 μ l)	2 μ l	DNA-Extrakt
	1,5 μ l	Primer Sense (10 μ M)
	1,5 μ l	Primer AntiS1 (10 μ M)
	1,5 μ l	Primer AntiS2 (10 μ M)
	10 μ l	REDEExtract
	3,5 μ l	H ₂ O

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für TBK1:

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	3'	94 °C	1
Schmelzen	30"	94 °C	39
Primer-Anlagerung	1'	67 °C	
Polymerase-Reaktion	1'	72 °C	
Finale Extension	10'	72 °C	

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für TNF α :

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	3'	94 °C	1
Schmelzen	30"	94 °C	35
Primer-Anlagerung	1'	58 °C	
Polymerase-Reaktion	1'	72 °C	
Finale Extension	10'	72 °C	

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Fragmentlängen der extrahierten DNA-Proben und PCR-Produkte wurde mithilfe eines Agarosegels bestimmt. Dazu wurde 1 μ l des Restriktionsansatzes

mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt, über ein 1%iges Gel (w/v Agarose in 1x TBE) aufgetrennt und mit Roti[®]-Safe GelStain (Roth[®]) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Proben wurden mit 1:5 mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Um die Größe der PCR-Produkte zu ermitteln, wurde ein 1 kB DNA-Marker (Plus-DNA-Ladder, Invitrogen) als Größenstandard mitgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung bei 100 V für ca. 45 min wurde auf dem UV-Transilluminator überprüft, ob die PCR erfolgreich war und die Banden den erwarteten Genotypen entsprachen.

6x Probenpuffer:	30 %	Glycerol
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol FF in H ₂ O
10x TBE:	1 M	Tris/HCl
	1 M	Borsäure
	25 mM	EDTA pH 8,0

2.5

Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

2.5.1.1 Proteinextraktion aus murinem Gewebe

Die Proteinextraktion aus murinem Gewebe erfolgte in einem PhosphoSafe[™]-Extraktionspuffer, welcher zuvor mit 1 mM Pefabloc[®] SC als Proteinaseinhibitor supplementiert wurde. Die Rückenmarks-Proben wurden mit 200 µl PhosphoSafe[™] versetzt, drei sterile Kügelchen pro Reaktionsgefäß hinzugefügt und 4 min bei einer Frequenz von 25 Hertz homogenisiert. Nachdem die Proben 3 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, wurden sie 60 min lang bei 4 °C bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach

abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.5.2). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.5.1.2 Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen

Die Extraktion der Proteine aus eukaryontischen Zellen erfolgte in PhosphoSafe™-Extraktionspuffer, der zuvor mit 1 mM Pefabloc® SC als Proteinaseinhibitor versetzt wurde. Das Medium wurde von den 6-Loch-Platten bzw. Zellkulturschalen abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden sie anschließend in 1x PBS abgeschabt und die gewonnene Zellsuspension 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet, je nach Größe, in 50-300 µl PhosphoSafe™-Extraktionspuffer resuspendiert, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 4 °C bei 13.200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.5.2). Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Methode bestimmt (BRADFORD, 1976). Die Proteinproben wurden in dreifacher Ausführung 1:10 mit H₂O verdünnt. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde eine Standardreihe einer BSA-Lösung (PAA Laboratories) verwendet. Dafür wurden 0-7 mg/ml dieser BSA-Lösung (1 mg/mL) in doppelter Ausführung in eine 96-Well-Microtiter®-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) pipettiert und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. 200 µl Bradford-Reagenz wurden jeweils mit 10 µl der verdünnten Proteinlösung bzw. des BSA-Standards vermischt und nach kurzem Schütteln am Spectrafluor Plus®-Instrument (Tecan, Crailsheim) bei 595 nm photometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels XFluor®-Software (Tecan, Crailsheim).

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bestehend aus einem grobporigen Sammelgel (3 % Polyacrylamid, pH 6,8) und einem feinporigen Trenngel (10 % bzw. 14 % Polyacrylamid, pH 8,8). 4x Lämmli-puffer wurde 1:5 mit 2-Mercaptoethanol versetzt, 25-40 µg Protein im Verhältnis 1:4 zugeführt und 5 min bei 95 °C in einem Heizblock (Thermomixer compact[®], Eppendorf, Hamburg) denaturiert. Die Proben wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Precision Plus Protein Dual Color) aufgetragen und 10 min bei 80 V und anschließend bei einer konstanten Spannung von 120 V auf einem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean[®]3 (Bio-Rad, München) aufgetrennt.

Trenngel	10 % bzw. 14 %	Acrylamidlösung
	0,375 M	Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8)
	0,1 %	SDS (10 %)
	0,05 %	APS (10 %)
	0,05 %	TEMED
Sammelgel	3 %	Acrylamidlösung
	0,125 M	Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
	0,1 %	SDS (10 %)
	0,05 %	APS (10 %)
	0,05 %	TEMED
Laufpuffer	25 mM	Tris-Base
	0,2 M	Glycin
	0,1 %	SDS

Lämmli-puffer	0,2 M	Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
(4fach)	10 %	SDS
	40 %	Glycerol
	0,004 %	Bromphenolblau
	20 %	β -Mercaptoethanol (jeweils frisch zugeben)

2.5.4 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden direkt im Anschluss durch Elektrotransfer in einer „Wet-Blotting“ Apparatur (miniTransBlot[®], BioRad, München) auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran (Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Der Transfer erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V für 60 min. Der Proteintransfer wurde unmittelbar danach durch eine unspezifische Färbung der Proteine mit Ponceau-Lösung kontrolliert und mittels Fotokopie dokumentiert. Die Membran wurde durch Waschen in 1x PBS für 5 min entfärbt.

Transferpuffer	48 mM	Tris-Base
	39 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,0037 %	SDS
Ponceau-Lösung	3 %	Trichloressigsäure
	0,1 %	Ponceau S

2.5.5 Antikörper-Inkubation

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (Li-COR Odyssey, Bad Homburg) inkubiert. Zur Identifizierung des gesuchten Proteins folgte eine Inkubation der Membran mit einem in Antikörper-Puffer verdünnten Primärantikörper (siehe 2.1.4.1) auf einem Überkopfmischer entsprechend folgender Angaben:

Adora _{2A}	1:250	über Nacht bei 4 °C
β-Aktin	1:1200	1 h bei Raumtemperatur
COX-2	1:500	über Nacht bei 4 °C
IκBα	1:250	über Nacht bei 4 °C
IKKε	1:250	über Nacht bei 4 °C
IRF3	1:250	über Nacht bei 4 °C
MIF (Trenngel 14 %)	1:1000	1 h bei Raumtemperatur
TBK1	1:250	über Nacht bei 4 °C

Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1x PBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit einem in Antikörper-Puffer verdünnten Infrarotfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) inkubiert (siehe 2.1.4.1). Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 min in 1x PBST und einmal für 10 min in PBS gewaschen. Mithilfe eines Odyssey[®] Infrared Scanner (LI-COR, Lincoln, USA) konnte durch Scannen des Blots die entsprechende Proteinbande detektiert werden.

Blocking-Puffer:	Odyssey [®] Puffer in 1x PBS	(1:1)
Antikörper-Puffer:	Odyssey [®] Puffer in 1x PBS + Triton	(1:1)

2.5.6 Immunhistochemie

Für die immunohistochemischen Färbungen wurden die fixierten Gefrierschnitte (siehe 2.3.5) bei Raumtemperatur angetaut und die Gewebe mit einem Fettstift (Dako) umrandet. Die Schnitte wurden dann 10 min in PBSTx (1x PBS + 0,1 % Triton X 100) gewaschen, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und anschließend 1-2 h bei RT in 3 % BSA in 1x PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe 2.1.4.2), welche in 3 % BSA in 1x PBS verdünnt wurde, erfolgte wie unten angegeben:

CD11b	1:500	über Nacht bei 4 °C
GFAP	1:200	über Nacht bei 4 °C
IB4-AF448	1:50	2 h bei Raumtemperatur
NeuN	1:200	über Nacht bei 4 °C
NF200	1:500	über Nacht bei 4 °C
TBK1	1:100	über Nacht bei 4 °C

Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS für je 5 min entfernt. Die Schnitte wurden danach mit einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (siehe 2.1.4.2), der ebenfalls in 3 % BSA in 1x PBS verdünnt wurde, für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert:

anti-rabbit AF488	1:800	1 h bei Raumtemperatur
anti-mouse AF488	1:800	1 h bei Raumtemperatur
anti-rat AF488	1:800	1 h bei Raumtemperatur
anti-rabbit Cy3	1:1000	1 h bei Raumtemperatur
anti-mouse Cy3	1:1000	1 h bei Raumtemperatur
anti-rat Cy3	1:1000	1 h bei Raumtemperatur

Danach wurden die Schnitte erneut 2x 5 min mit PBSTx und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss folgte die Einbettung mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL) und die Analyse der immunohistochemischen Färbung an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) unter Verwendung der Axiovision 4.0 Software (Zeiss, Jena, Germany).

2.6

Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel[®] 2007, SPSS[®] für Windows 20.0 und GraphPad Prism[®] 5. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanzen wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels t-Test nach Student oder One-Way-ANOVA ab $p < 0,05$ festgestellt. Für multiple Vergleiche wurde der α -Fehler ($\alpha = 0,05$) über Bonferroni oder Dunnett korrigiert.

2.6.1 Western-Blots

Die densitometrische Analyse der Bandenstärken von Western-Blots erfolgte mit der Software QuantityOne[®] (Biorad, München). Die Bandenstärke des Zielproteins wurde durch die Bandenstärke der Ladekontrolle dividiert und die jeweiligen Werte auf den Wert der entsprechenden Kontrollprobe bezogen.

2.6.2 Verhaltenstest

Die Zeitverläufe der Verhaltenstests der jeweiligen Knockout- bzw. Wildtyp-Gruppe wurden mittels ANOVA for repeated measurements (rmANOVA) miteinander verglichen, wobei für die Gesamt-AUC der verschiedenen Gruppen eine One-Way-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zur Berechnung von Signifikanzen verwendet wurde.

3. Ergebnisse

3.1

Expression von TBK1 in verschiedenen murinen Geweben

3.1.1 Expression von TBK1 in verschiedenen Zelltypen im Rückenmark und den Hinterwurzelganglien der Maus

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass die TBK1 in Mäusen im Rückenmark und den Hinterwurzelganglien (DRGs) konstitutiv exprimiert wird. Regulationen in DRGs und Rückenmark spielen eine zentrale Rolle bei der Schmerzweiterleitung und -verarbeitung, weshalb in weiteren Versuchen diese Gewebe näher in den Fokus rückten.

Um zunächst zu überprüfen, in welchen Zelltypen im Rückenmark TBK1 exprimiert wird, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zellmarker zusammen mit TBK1 im Rückenmarksgewebe analysiert, um zu prüfen, ob eine Kolokalisation detektierbar ist. Abbildung 6 A zeigt eine Kolokalisation von TBK1 mit dem Marker NeuN, welcher alle Neurone im Nervensystem anfärbt. Des Weiteren wurde TBK1 in GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positiven Astrozyten nachgewiesen (Abbildung 6 B). Allerdings ist keine Kolokalisation von TBK1 mit CD11b-positiven Mikroglia zu erkennen (6 C). Die Expression von TBK1 im Dorsalhorn deutet darauf hin, dass TBK1 an der nozizeptiven Verarbeitung beteiligt sein könnte.

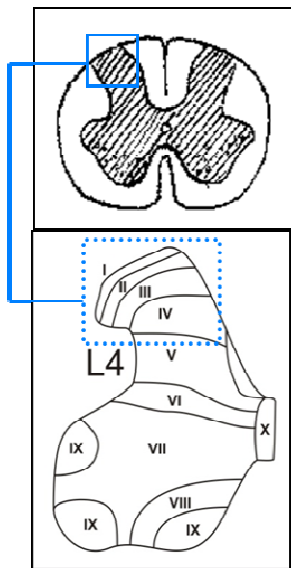


Abbildung 5: Schematische Darstellung des untersuchten Rückenmark-Areals.

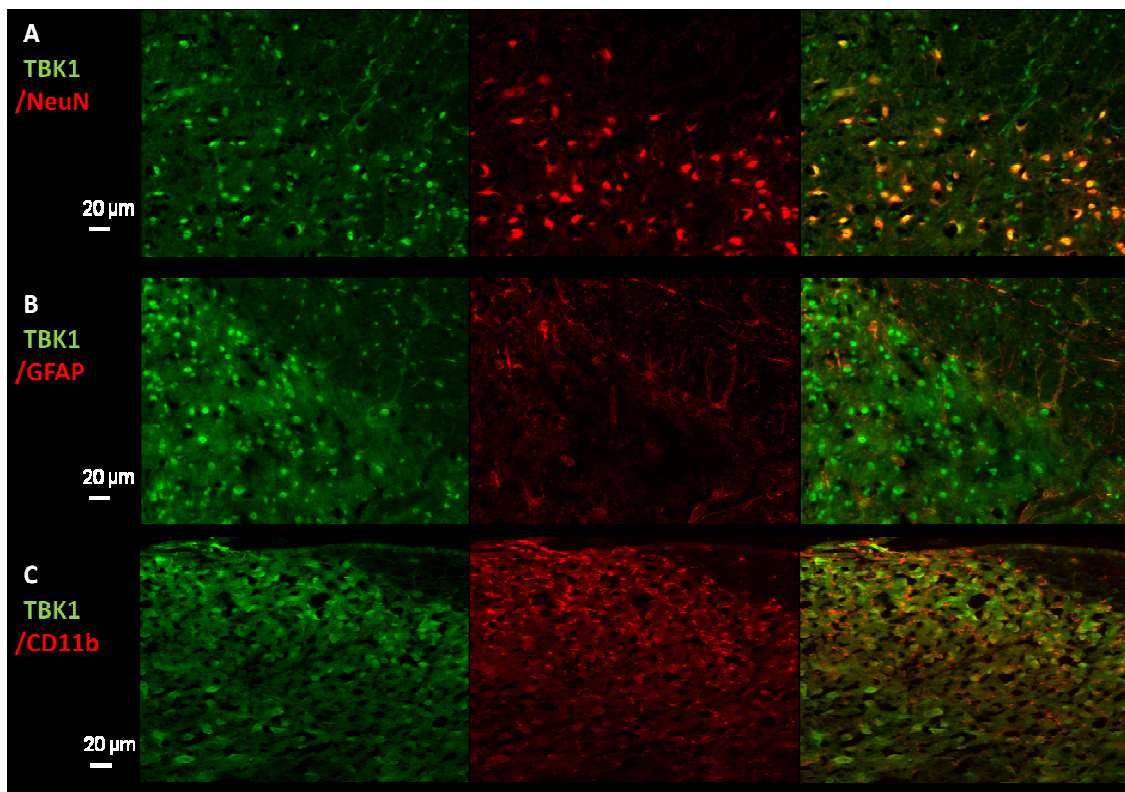


Abbildung 6:

Immunhistochemie in Schnitten des Rückenmarks von naiven C57BL/6 Mäusen. (A-C) Von links nach rechts: Immunhistochemie mit TBK1-Antikörper (grün); Immunhistochemie mit Antikörpern gegen neuronale Zellmarker (rot); Übereinanderlagerung der beiden Immunfärbungen. Kolokalisation (gelb). Scale Bar: 20 µm.

Um die Spezifität des verwendeten TBK1 Antikörpers zu überprüfen, wurden Kontrollfärbungen mit Rückenmark-Schnitten von TBK1 Knockout Mäusen durchgeführt, welche in Abbildung 7 zu sehen sind. Es wurden Mäuse mit dem Genotyp $TNF\alpha-R^{-/-}/TBK1^{+/+}$ ($TNF\alpha^{-/-}$) und $TNF\alpha-R^{-/-}/TBK1^{-/-}$ ($TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$)

verwendet. Da Mäuse mit einem TBK1-Knockout embryonal letal sind, mussten Mäuse mit einem $\text{TNF}\alpha\text{-R}^{-/-}$ -Hintergrund gezüchtet werden. Diese Doppel-Knockouts sind lebensfähig und fertil (BONNARD ET AL., 2000; PERRY ET AL., 2004 MARCHLIK, 2010). Damit die Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten, wurden $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäuse in allen folgenden Versuchen als direkte Kontrolle der $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäuse verwendet. Bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Tieren (Mitte) erkennt man eine deutliche Färbung von TBK1, wohingegen die Färbung im Rückenmark der $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Maus (rechts) vergleichbar mit der Hintergrundkontrolle war (links), was zeigt, dass der verwendete Antikörper spezifisch für TBK1 ist.

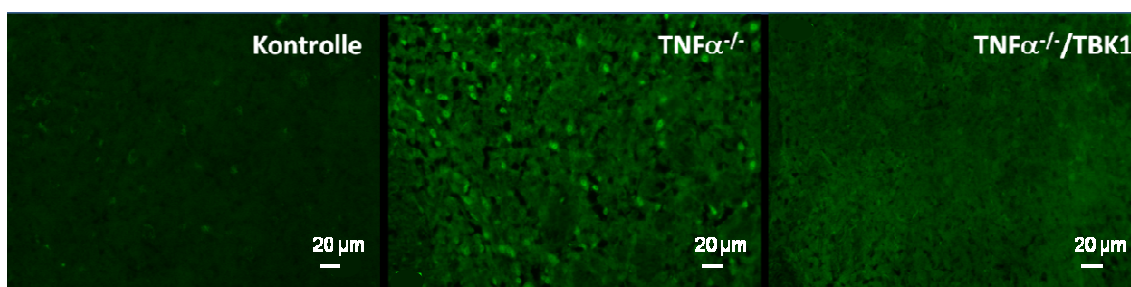


Abbildung 7:

Immunhistochemie in Rückenmark-Schnitten von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen (Mitte) und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen (rechts) mit Antikörper gegen TBK1 (QED Bioscience). Auf der linken Seite ist eine Wildtyp-Kontrollfärbung gezeigt, bei der lediglich Sekundärantikörper verwendet wurde, Scale Bar: 20 μm .

In den DRGs war, wie in Abbildung 8 zu sehen, eine Kolokalisation von TBK1 mit NF200 und IB4 detektierbar, was darauf hindeutet, dass TBK1 in großen, NF200-positiven, nicht schmerzrelevanten Neuronen (A), wie auch in kleinen, IB4-positiven, schmerzrelevanten Neuronen (B), exprimiert wird. Bei der Kofärbung von TBK1 und CD11b, einem Marker für Mikroglia, ist hingegen keine Kolokalisation zu erkennen (C).

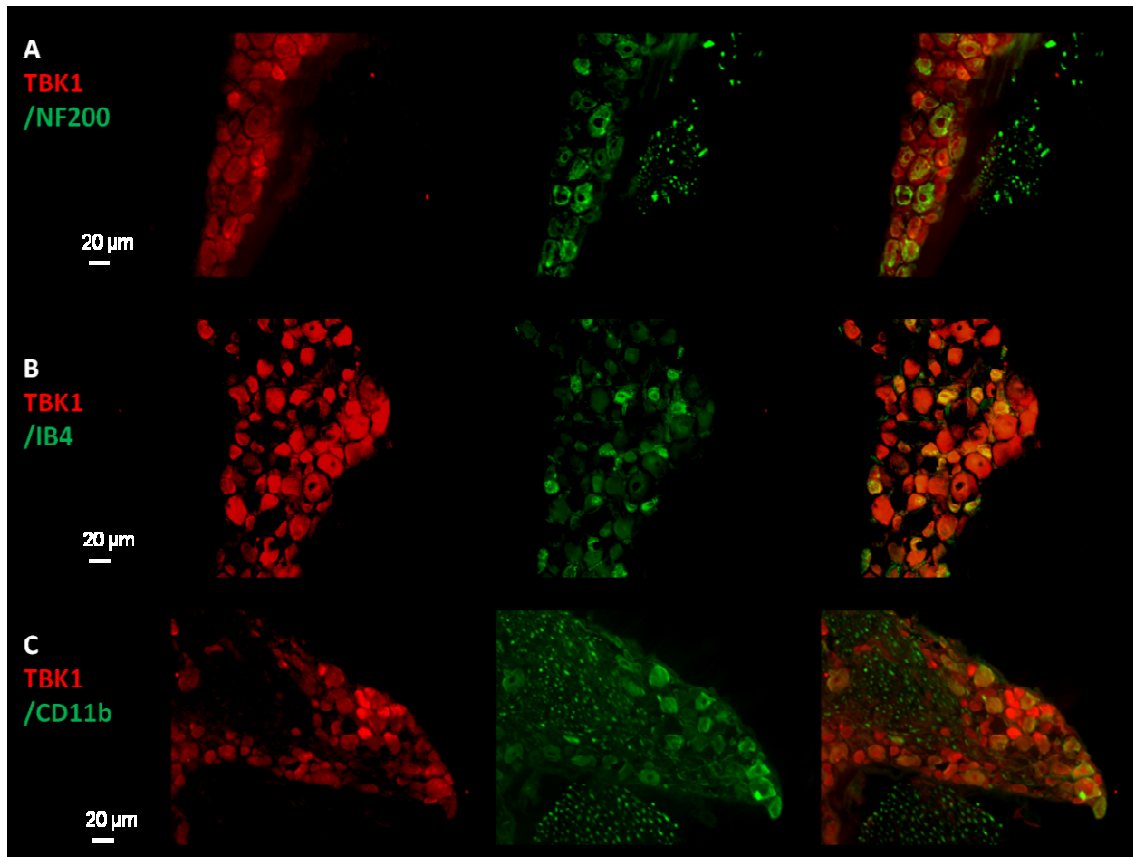


Abbildung 8:

Immunhistochemie in DRG-Schnitten von naiven C57BL/6 Mäusen. (A-C) Von links nach rechts: Immunhistochemie mit TBK1-Antikörper (rot); Immunhistochemie mit Antikörpern gegen neuronale Zellmarker (grün); Übereinanderlagerung der beiden Immunfärbungen. Scale Bar: 20 µm.

Eine Immunfärbung von TBK1 in den DRGs von $TNF\alpha^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zeigte auch in den DRGs der Doppel-Knockout Mäusen kein Signal, was erneut die Spezifität des Antikörpers bestätigt.

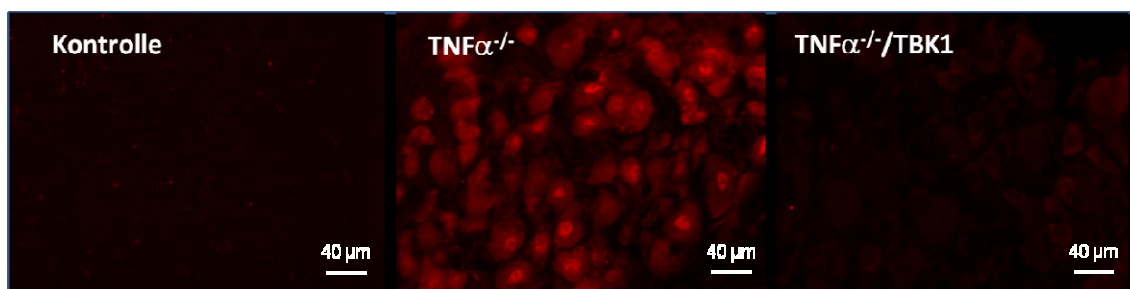


Abbildung 9:

Immunhistochemie in DRGs von $TNF\alpha^{-/-}$ (Mitte) und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen (rechts) mit TBK1-Antikörper. Scale Bar: 40 µm.

3.1.2 Effekte einer TBK1-Inhibition in Astrozyten

Vorversuche haben gezeigt, dass der IKK ϵ /TBK1-Inhibitor BX-795 im Rückenmark von C57BL/6-Mäusen die nozizeptive Reaktion der Tiere im Formalintest hemmt (MÖSER ET AL., 2011). Interessant war, inwieweit Astrozyten an der Signalübertragung beteiligt sind und ob hauptsächlich TBK1 oder IKK ϵ in den Signalweg involviert ist. Astrozyten sind Immunzellen im Nervensystem und spielen daher eine wichtige Rolle bei Entzündungen, sowie bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung (FU ET AL. 2007).

Wie die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten, wird TBK1 in Astrozyten des Rückenmarks exprimiert. Für die folgenden Versuche wurde in primären embryonalen Astrozyten eine Entzündungsreaktion durch Stimulation mit einem Cytokin-Mix simuliert. Der Cytokin-Mix enthielt die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β sowie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Die Hemmung des TBK1-Signalweges wurde durch den IKK ϵ /TBK1-Inhibitor BX-795 bewirkt.

Die Astrozyten wurden einerseits nur mit Cytokin-Mix (siehe 2.2.4) und andererseits mit Cytokin-Mix und dem IKK ϵ /TBK1-Inhibitor BX-795 [100 nM] behandelt. Der Inhibitor wurde 30 min vor der Stimulation mit Cytokin-Mix in das Zellkulturmedium gegeben und die Proteinexpression von TBK1 und IKK ϵ nach 6 h und 24 h Inkubation per Western-Blot untersucht. In Abbildung 10 ist die Regulation von TBK1 zu sehen. Feststellbar ist hieran, dass die TBK1-Expression nach 6 h und 24 h nach Stimulation mit Cytokin-Mix einen starken statistisch signifikanten Anstieg aufwies, wohingegen man nach Zugabe von Cytokin-Mix und dem Inhibitor BX-795 nach 6 h und nach 24 h eine statistisch signifikante Abnahme der TBK1-Expression beobachten konnte.

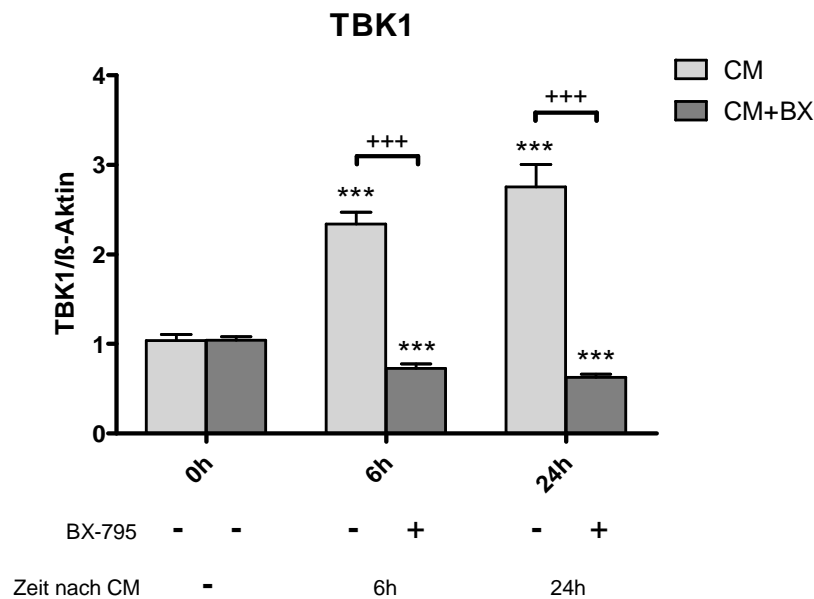


Abbildung 10:

Proteinexpression von TBK1 in Astrozyten, behandelt mit Cytokin-Mix ($\text{TNF}\alpha$ [5ng/ml], $\text{IL-1}\beta$ [1ng/ml], LPS [1 $\mu\text{g/ml}$]) und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Astrozyten wurden nach der angegebenen Zeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Um die Kompatibilität evident zu gestalten, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $***p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Additionszeichen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Cytokin-Mix und Cytokin-Mix mit Inhibitor BX-795, $+++p < 0,001$.

Da der Inhibitor BX-795 ebenfalls als $\text{IKK}\epsilon$ -Hemmer wirkt, stellte sich folglich die Frage, inwieweit die $\text{IKK}\epsilon$ -Expression beeinflusst wird. Die Untersuchung zeigte 24 h nach Zugabe des Cytokin-Mixes eine signifikante Zunahme der $\text{IKK}\epsilon$ Protein-Expression, die durch Zugabe von BX-795 unterdrückt werden konnte.

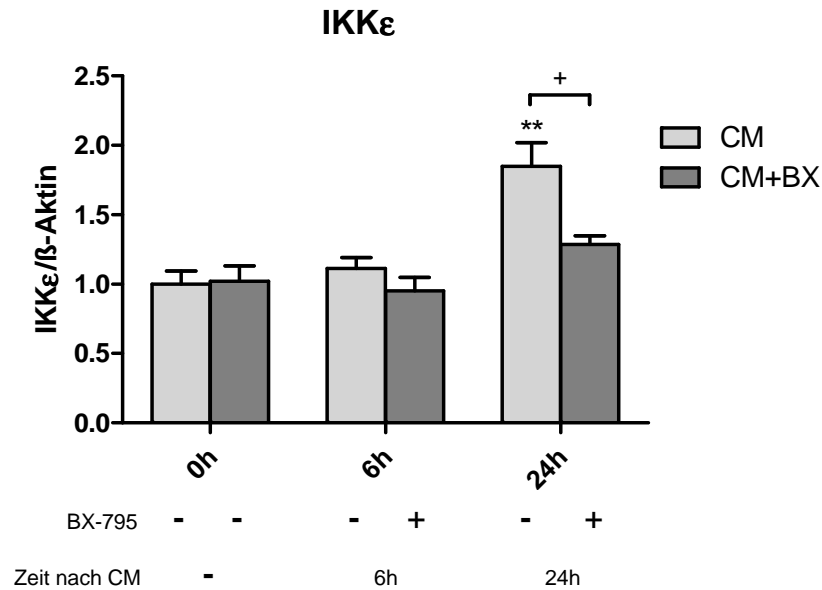


Abbildung 11:

Proteinexpression von IKK ϵ in Astrozyten, behandelt mit Cytokin-Mix (TNF α [5ng/ml], IL-1 β [1ng/ml], LPS [1 μ g/ml]) und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Astrozyten wurden nach der angegebenen Zeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Das Additionszeichen kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Cytokin-Mix und Cytokin-Mix mit Inhibitor BX-795, + $p < 0,05$.

Der signifikante Anstieg der TBK1-Expression in Astrozyten nach Behandlung mit Cytokin-Mix und die signifikant stärker gehemmte Expression von TBK1 nach Zugabe des Inhibitors BX-795 im Vergleich zu IKK ϵ deuten darauf hin, dass Astrozyten eine große Rolle bei TBK1-vermittelten Effekten im Nervensystem spielen.

3.2

Regulation von TBK1 im Rückenmark nach entzündlich-nozizeptiver Stimulation

3.2.1 Formalin-induzierte Nozizeption

In der Schmerzverarbeitung spielt das Rückenmark eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Regulationen der TBK1-Expression nach nozizeptiver Stimulation vor allem im Rückenmark fokussiert. Um die Regulation von TBK1 zu untersuchen, wurde der Formalintest angewendet, der in der Pfote eine schmerzhafte Entzündung auslöst, die auch im Rückenmark zu Veränderungen der Genexpression führt. Die dem Versuchstier in eine Pfote injizierte Formalin-Lösung verursacht eine nozizeptive Antwort, was sich in Form von Lecken oder Beißen der betroffenen Pfote zeigt (DUBUISSON UND DENNIS, 1977). Der Test besteht aus zwei Phasen. Der 1. Phase liegt eine direkte Stimulation der Nozizeptoren, insbesondere von A δ -Fasern, zugrunde. Sie beginnt unmittelbar nach Injektion und dauert ca. 10 min an. Es folgt eine etwa 5-10 minütige Ruhephase mit einer geringen Aktivität. Die 2. Phase beginnt ca. 15-20 min nach Formalininjektion und beruht auf einer C-Faser Sensibilisierung, woraus eine anhaltende Aktivierung von C-Fasern resultiert. Insbesondere die Veränderungen im Rahmen der 2. Phase machen den Formalintest zu einem Tiermodell für die Simulation anhaltender, tonischer Schmerzen.

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Niederberger zeigten bei TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen ein verringertes Leckverhalten im Vergleich mit TNF α ^{-/-}-Mäusen (Abbildung 12 A). Die statistische Auswertung des Formalintests ergab eine verringerte Gesamtleckzeit bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den TNF α ^{-/-}-Tieren (Abbildung 12 B). Bei einer Aufteilung in die zwei Phasen des Formalintests wurde deutlich, dass diese Reduktion in beiden Phasen stattfand, jedoch in der zweiten Phase deutlich größer und für TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}- gegenüber TNF α ^{-/-}-Mäusen statistisch signifikant war (**p < 0,001). In der zweiten Phase des Formalintests kam es neben der Stimulation von Nozizeptoren aufgrund der Entzündung auch zu einer Veränderung in den schmerzverarbeitenden

Neuronen des Rückenmarks (CODERRE ET AL. 1994). Die Reduktion des Leckverhaltens der $TNF\alpha^{-}/TBK1^{-}$ -Tiere deutet darauf hin, dass TBK1 eine Rolle bei der zentralen Schmerzübertragung zu spielen scheint.

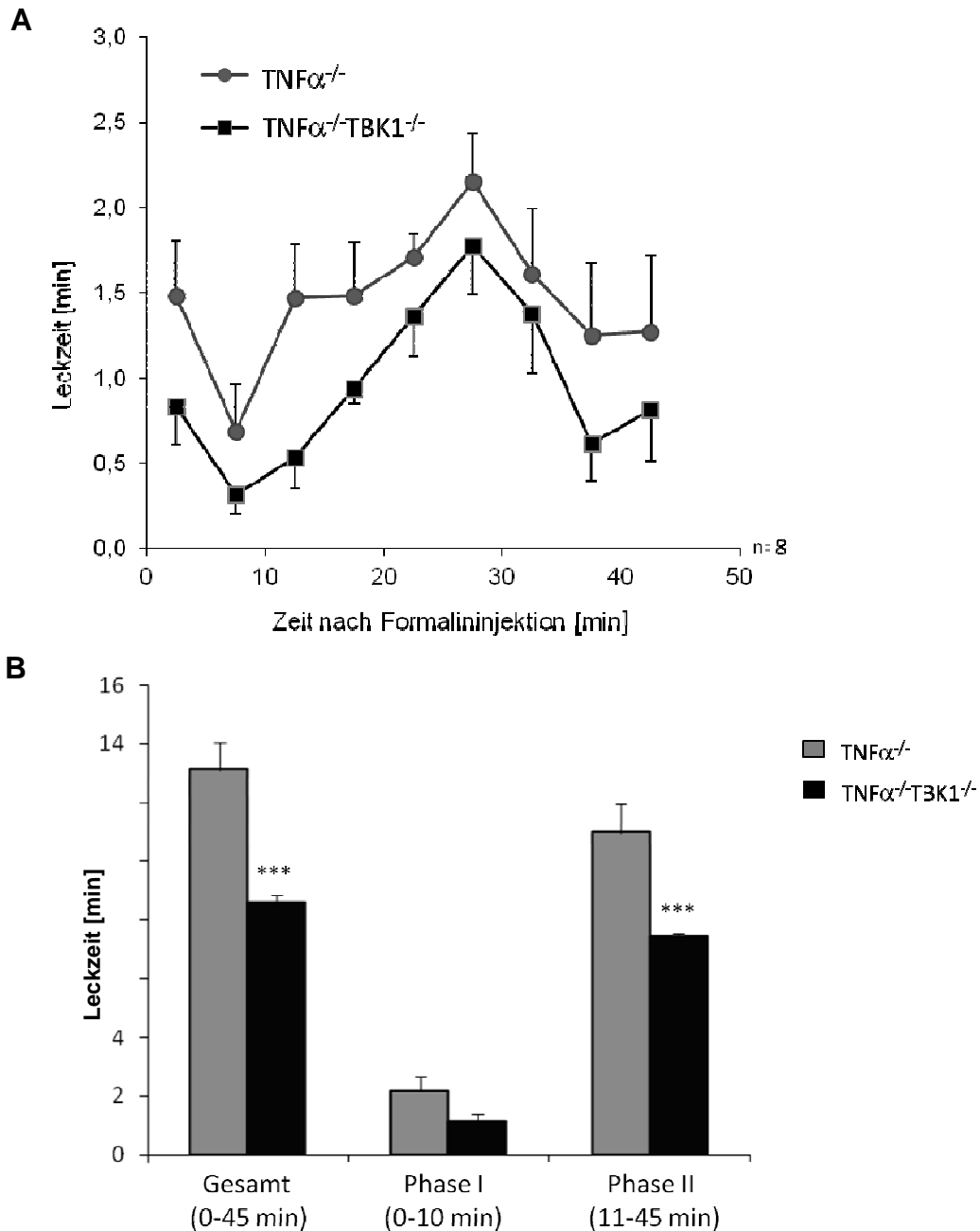


Abbildung 12:

Formalintest mit $TNF\alpha^{-}$ - und $TNF\alpha^{-}/TBK1^{-}$ -Mäusen. (A) Zeitverlauf des Leckverhaltens der $TNF\alpha^{-}$ -Mäuse im Vergleich zu den $TNF\alpha^{-}/TBK1^{-}$ -Mäusen. Nach Formalininjektion in eine Hinterpfote wurde die Leckdauer in fünfminütigen Intervallen über 45 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. (B) Statistischer Vergleich. Die Gesamtleckzeit, die Leckzeit der ersten Phase (0-10 min) und der zweiten Phase (11-45 min) wurden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. *** $p < 0,001$ kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied zwischen $TNF\alpha^{-}$ - und $TNF\alpha^{-}/TBK1^{-}$ -Mäusen (Vorarbeiten Christine Möser/Katharina Altenrath)

3.2.2 mRNA-Expression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin

Um der Frage weiter nachzugehen, inwieweit TBK1 an der Schmerzübertragung bzw. -weiterleitung beteiligt ist, sollte mit Hilfe der quantitativen Realtime RT-PCR geklärt werden, ob und wie TBK1 in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin im Rückenmark reguliert wird (Abbildung 13). Nach Formalininjektion konnte eine signifikante Zunahme von TBK1-mRNA bei den Wildtyp-Tieren beobachtet werden.

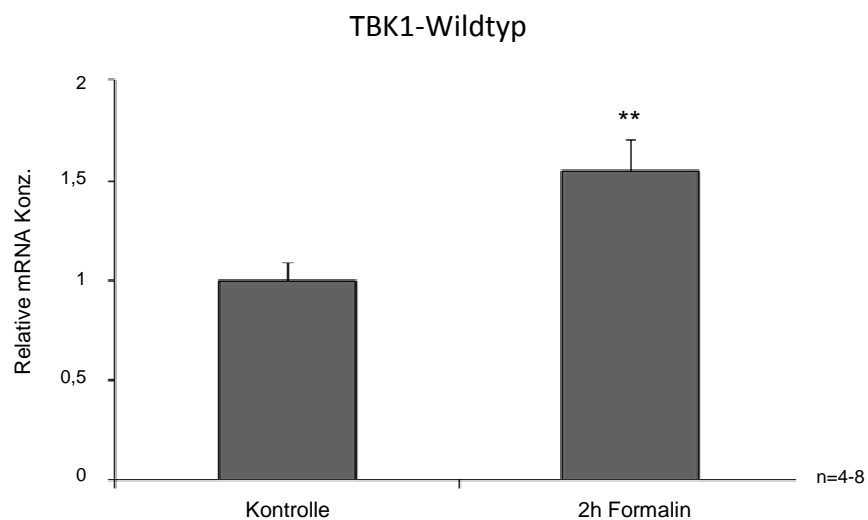


Abbildung 13:

Relative Konzentration der TBK1-mRNA in Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen nach 20 μ l Formalininjektion [5 %] in die Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Gewebe wurde nach 2 h Stimulation entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der TBK1 und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 4 unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.3 Proteinexpression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin

Um zu ermitteln, ob sich die Veränderungen der TBK1-mRNA Expression nach inflammatorischer Stimulation mit Formalin auch auf Proteinebene zeigen, wurde der Proteingehalt von TBK1 im Rückenmark unter Verwendung der Western-Blot-Methode untersucht. Auch hier konnte die Spezifität des Antikörpers (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) mit Hilfe von TBK1-Knockout-Mäusen sichergestellt werden (Abbildung 14 A). Die Formalininjektion in die Hinterpfoten von C57BL/6-Mäusen bewirkte einen raschen Anstieg (** $p < 0,01$) der TBK1-Proteinexpression nach 30 min, der nach 2 h statistisch signifikant war und über 24 h anhielt (Abbildung 14 B). Der frühe Anstieg der Proteinexpression könnte evtl. auf die TBK1-Phosphorylierung zurückgeführt werden.

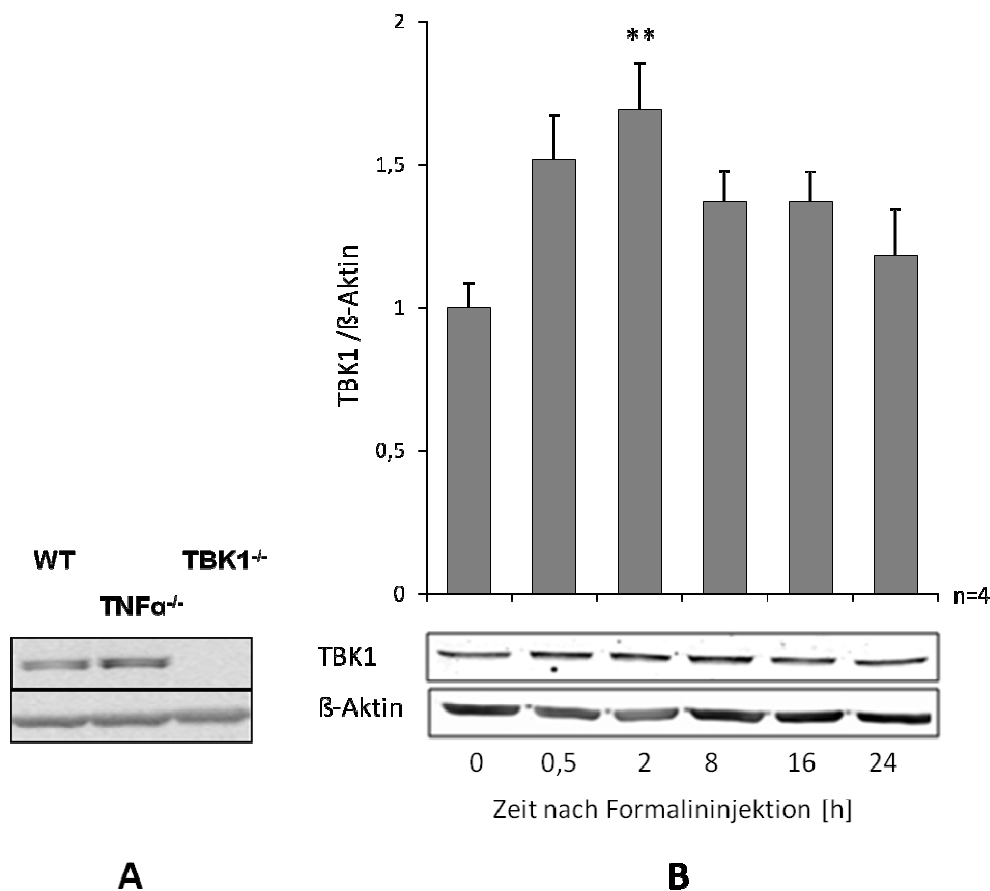


Abbildung 14:

Proteinexpression von TBK1 im Rückenmark von WT-, TNF α ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen (A) und von

C57BL/6-Mäusen nach 20 μ l Formalininjektion [5 %] in die Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren (**B**). Das Gewebe wurde zu den angegebenen Zeiten nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals, bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$, im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.4 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion in Knockout-Tieren

Aufgrund der oben gezeigten Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die Effekte spezifisch für die Formalin-induzierte Entzündung waren oder auf einem generellen Mechanismus der entzündlichen Nozizeption beruhen. Die Effekte sollten nun in einem weiteren entzündlichen Schmerzmodell, der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung, überprüft werden. Wildtyp-, $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen wurde 20 μ l einer Zymosanlösung [10 mg/ml] in eine Hinterpfote injiziert, die eine lokale Entzündung hervorrief und zu einer starken Schwellung, Rötung und Überempfindlichkeit der betroffenen Pfote führte. Die entstehende Hyperalgesie wurde durch eine mechanische Stimulation gemessen. In einem Zeitverlauf von 0-48 h nach Zymosaninjektion in die Pfote wurde die Latenzzeit des Pfotenwegziehens ('paw withdrawal latency' - PWL) mit Hilfe einer Dynamic Plantar Apparatur gemessen.

In Abbildung 15 ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Tiergruppen zu erkennen. Bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich eine viel höhere Latenzzeit im Vergleich zu den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -bzw. Wildtyp-Tieren, welche bis zum Ende der Messung nach 48 Stunden anhielt. Dieser weniger stark ausgeprägte Effekt war bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen besonders deutlich nach 24 bzw. 48 Stunden zu erkennen. Da der Knockout von $\text{TNF}\alpha$ auch eine antinozizeptive Wirkung aufweist (DENG ET AL., 2000; KHANNA ET AL., 2002), wurden Wildtyp-Tiere zum Vergleich herangezogen, bei denen die stärkste Verringerung der Latenzzeit beobachtet werden konnte, die bis zum Ende der Messung anhielt. Diese Ergebnisse deuten auf eine verminderte Hyperalgesie bei den Knockout-Tieren hin und zeigen, dass die Deletion von $\text{TNF}\alpha$ bereits,

wie erwartet, zu antihyperalgetischen Effekten führt, was durch zusätzlichen Knockout von TBK1 noch einmal verstärkt wurde.

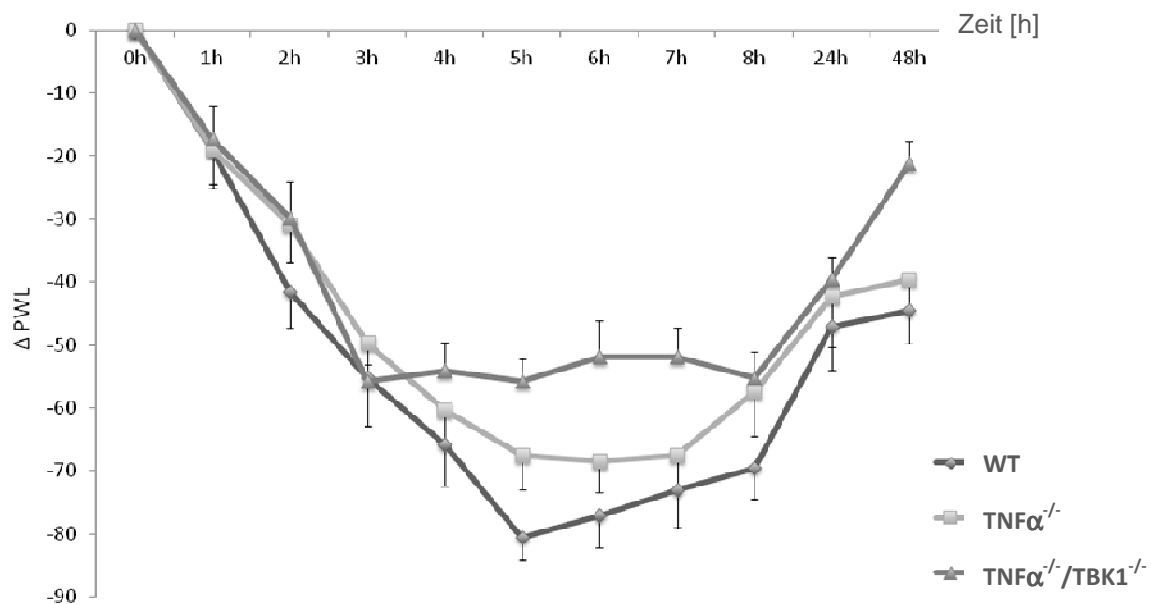


Abbildung 15:

Mechanische Hyperalgesie nach 20 μ l Zymosaninjektion [10 mg/ml] in eine Hinterpfote bei Wildtyp-, TNF α ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit des Pfotenwegziehens. Berechnet wurde die Differenz zwischen der linken und der rechten Pfote. Nach der Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote wurde stündlich bis 8 Stunden, wie auch nach 24 und 48 Stunden die mechanische Schwelle gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 Tieren.

Mit der Berechnung der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve (AUC)) in der Zeit 3 h bis 7 h nach Zymosaninjektion konnte beim gezeigten Schmerzmodell die verringerte nozizeptive Antwort sowohl bei den TNF α ^{-/-}-Mäusen als auch bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren gezeigt werden (Abbildung 16). Der Unterschied in der nozizeptiven Antwort nach Behandlung mit Zymosan war zwischen den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}- und den Wildtyp-Tieren (**p < 0,01), ebenso zwischen den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}- und den TNF α ^{-/-}-Mäusen (*p < 0,05) statistisch signifikant. Zwischen TNF α ^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

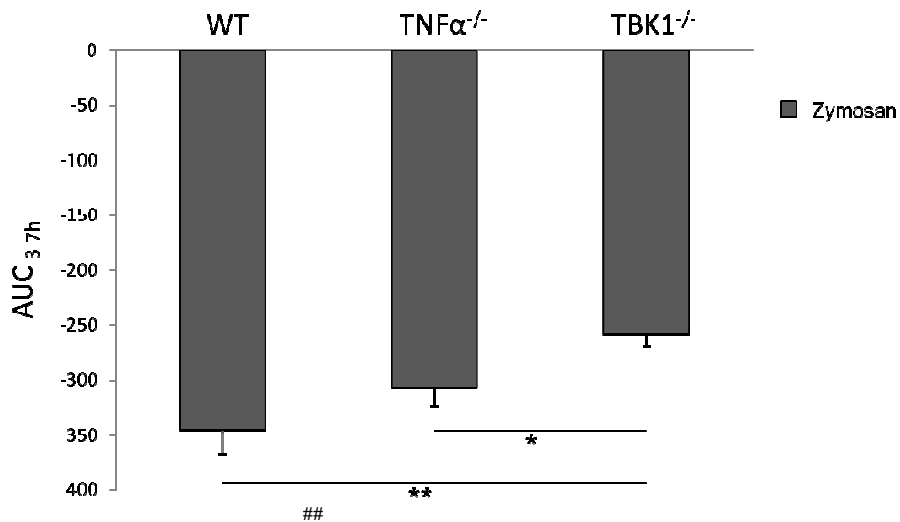


Abbildung 16:

Statistischer Vergleich nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote bei Wildtyp -, TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen durch Bestimmung der Area under the Curve (AUC). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je mindestens 7 Tieren im Zeitraum 3 h-7 h nach Zymosaninjektion. * $p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. ## $p < 0,01$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen.

3.2.5 mRNA-Expression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Zymosan

Bei der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung als weiteres entzündliches Schmerzmodell wurde wiederum die Expression von TBK1-mRNA im Lumbalmark nach Zymosaninjektion in die Hinterpfoten von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen mittels quantitativer Realtime RT-PCR untersucht. Wie man in Abbildung 17 sehen kann, war eine Zunahme der TBK1-mRNA 5 h nach der Injektion zu beobachten. Diese Zunahme war nach 16 h statistisch signifikant.

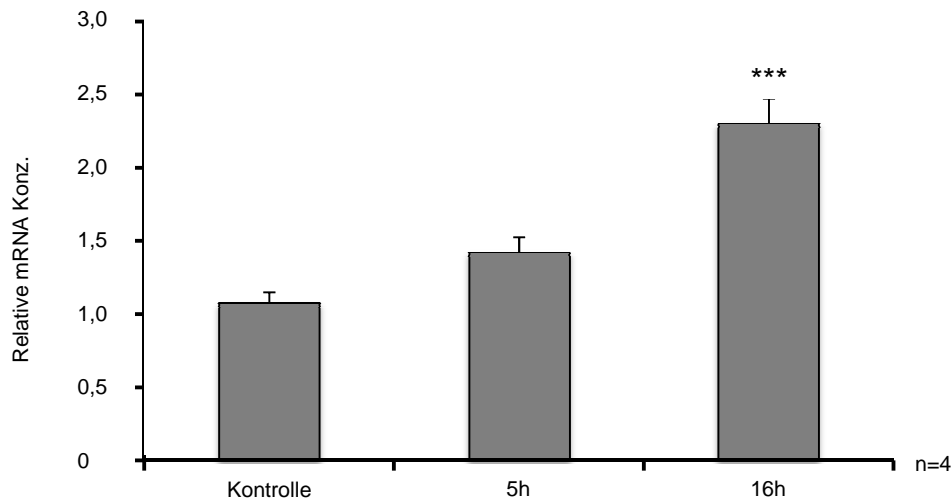


Abbildung 17:

Relative Konzentration der TBK1-mRNA in Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen nach 20 µl Zymosaninjektion [10 mg/ml] in die Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Gewebe wurde nach 5 h und nach 16 h Stimulation entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der TBK1 und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $***p < 0,001$, im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.6 Proteinexpression von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation mit Zymosan

Durch eine Untersuchung mittels Western-Blot sollte geprüft werden, ob die Veränderung in der TBK1-mRNA Expression nach Zymosaninjektion auch auf Proteinebene erfolgt. Im Ergebnis manifestiert sich eine rasche Zunahme der TBK1-Proteinexpression im Rückenmark nach Injektion mit Zymosan (Abbildung 18). Die Zunahme war nach 5 h ($**p < 0,01$), 16 h und nach 24 h statistisch signifikant ($*p < 0,05$).

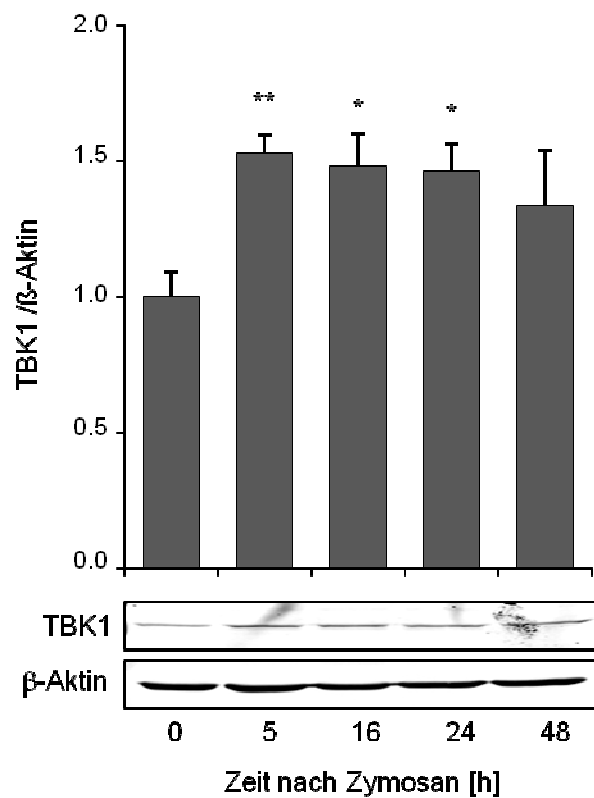


Abbildung 18:

Proteinexpression von TBK1 im Rückenmark von C57BL/6-Mäusen nach 20 μ l Zymosaninjektion [10 mg/ml] in beide Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Gewebe wurde zu den angegebenen Zeiten nach der Zymosaninjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$, im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Einfluss von TBK1 auf die Regulation NF- κ B-abhängiger Gene nach nozizeptiver Stimulation

3.3.1 Regulation NF- κ B-abhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin

Die I κ B-Kinasen TBK1 und IKK ϵ können das inhibitorische Protein I κ B α , die p65 Untereinheit von NF- κ B, sowie auch IKKs des klassischen NF- κ B

Signalwegs phosphorylieren, was in der Folge die NF- κ B Aktivierung und Transkription zahlreicher Gene begünstigt.

Die folgenden Versuche sollten Hinweise erbringen, ob TBK1 bei der Aktivierung von NF- κ B während inflammatorischer Schmerzen eine Rolle spielt, da eine Korrelation für den Bindungspartner IKK ϵ bereits gezeigt werden konnte (KRAVCHENKO ET AL., 2003; MÖSER ET AL., 2011). Die Expression verschiedener NF- κ B-abhängiger Zielgene wurde mittels quantitativer Realtime RT-PCR ermittelt. Gezeigt wird die Regulation im Rückenmark von TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Tieren und C57BL/6 Mäusen 2 h nach Formalininjektion in eine Hinterpfote im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 19).

Es wurden die NF- κ B-abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS untersucht, die bekanntlich an der Regulation von Entzündungsschmerzen beteiligt sind (GUHRING 2000, ST. PIERRE 2004). 2 h nach der Formalininjektion konnte eine signifikante Hochregulation von COX-2 in den Wildtyp-Tieren (**p < 0,001), den TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (**p < 0,001) und den -Mäusen (*p < 0,01) beobachtet werden, die jedoch bei TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt war (Abbildung 19 A). Zwischen der Wildtyp-Kontrolle und den TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Tieren wies der Unterschied eine statistische Signifikanz auf (##p < 0,01). In Abbildung 19 B ist die Expression von MMP-9 dargestellt, welche bei den Wildtyp-Kontrollen wie auch in den TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Mäusen 2 h nach der Formalininjektion eine Hochregulation zeigte (*p < 0,05). In den TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen war keine Regulation des MMP-9-Gens zu erkennen. Der Unterschied zwischen den TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen (#p < 0,05) bzw. den TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Tieren (#p < 0,05) war statistisch signifikant. Bei dem Gen iNOS (Abbildung 19 C) konnte bei der Wildtyp-Kontrolle (**p < 0,01) eine signifikante Hochregulation beobachtet werden, die bei TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Tieren nicht auftrat.

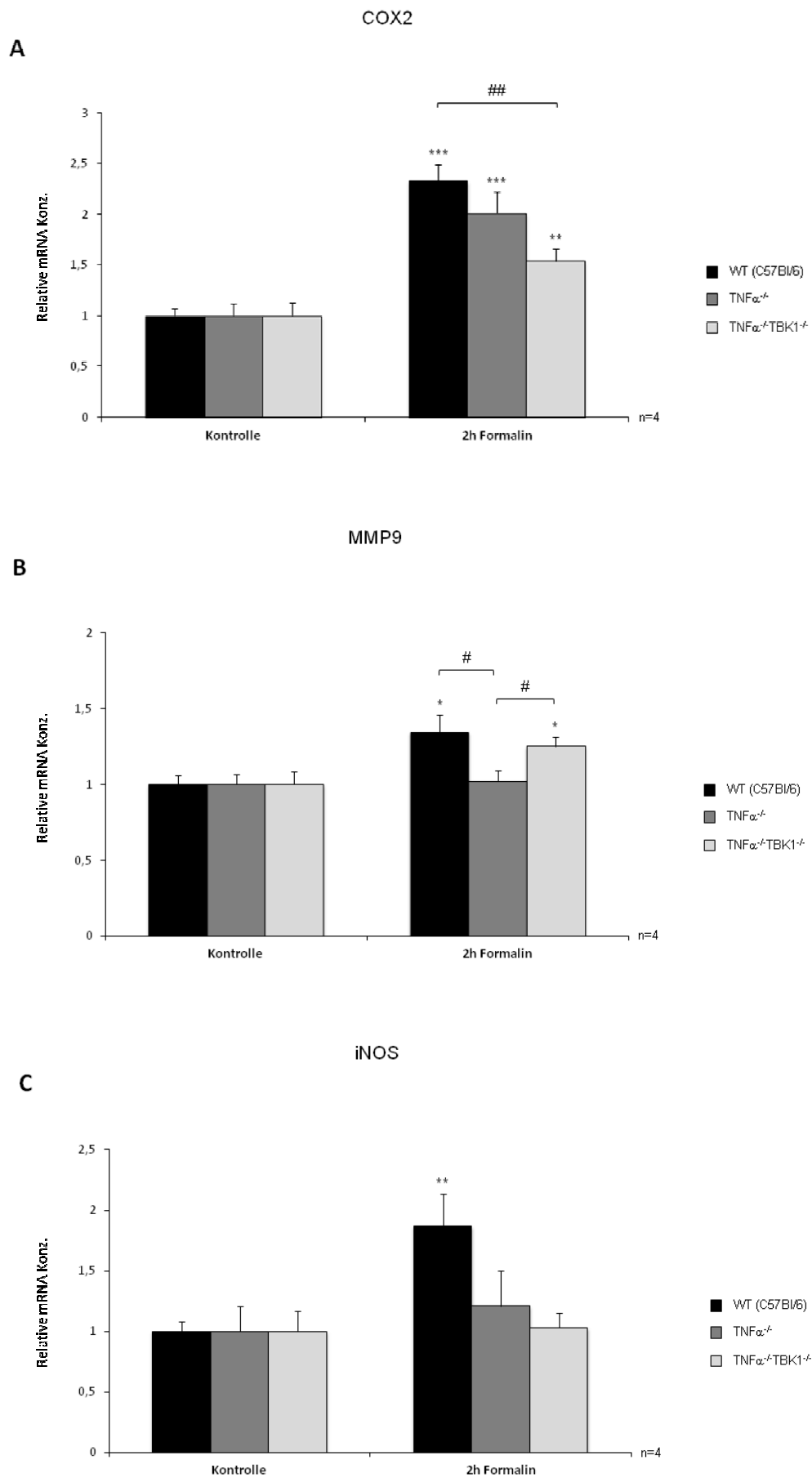


Abbildung 19:

Relative Konzentration der NF- κ B-abhängigen Gene (A) COX-2, (B) MMP-9 und (C) iNOS im Rückenmark

von Wildtyp (C57BL/6) -, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in eine Hinterpfote der Tiere. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp (C57BL/6) - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen bzw. $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäuse mit # $p < 0,05$ und ## $p < 0,01$.

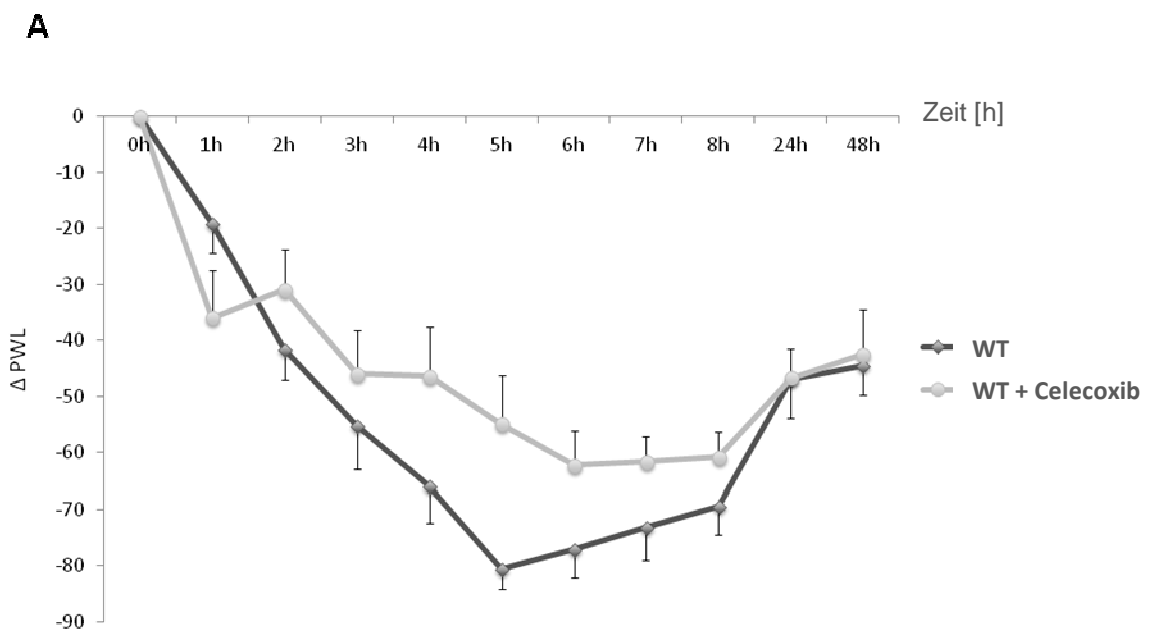
3.3.2 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion und Behandlung mit Celecoxib in Knockout-Tieren

Da die Ergebnisse der RT-PCR eine mögliche Beteiligung der COX-2 bei der TBK1-vermittelten Signalübertragung vermuten ließen, sollte dieser Zusammenhang im Zymosan-Modell für mechanische Hyperalgesie unter Behandlung mit dem COX-2 selektiven Hemmstoff Celecoxib untersucht werden. Der Zymosantest wurde wie unter 3.2.4. beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zu den Kontrolltieren wurden Mäuse verwendet, denen 30 min vor der Zymosaninjektion Celecoxib [10 mg/kg KG] oral verabreicht wurde. Da nach oraler Gabe Celecoxib relativ langsam resorbiert wird (DAVIES ET AL., 2000), wurde es 30 min vor der Zymosaninjektion appliziert.

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils einerseits die zymosaninjizierten Tiere im Vergleich zu den mit Zymosan und Celecoxib behandelten Tieren. Es sind die Latenzzeiten der Wildtyp-, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tiere als Differenz zwischen der ipsi- und contralateralen Pfote dargestellt (Δ PWL).

Wie erwartet war in Abbildung 20 A eine starke Verringerung der Latenzzeit bei den nur mit Zymosan injizierten Wildtyp-Mäusen zu beobachten, welche bis zum Ende des Versuchs nach 48 h anhielt. Die Tiere mit zusätzlicher Behandlung mit Celecoxib zeigten hingegen erwartungsgemäß eine viel höhere Latenzzeit, was auf eine verminderte Hyperalgesie hindeutet (HU ET AL., 2004; NIEDERBERGER ET AL., 2004; NIEDERBERGER ET AL., 2001).

Bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - Tieren (Abbildung 20 B) zeigten die Kurven einen ähnlichen Verlauf, wobei die Deletion von $\text{TNF}\alpha$ bereits zu einer geringen Hemmung der nozizeptiven Antwort führte (siehe Abbildung 15). Der analgetische Effekt der Celecoxib-Behandlung war in dieser Gruppe allerdings deutlich schwächer als in der Wildtyp-Gruppe. $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäuse zeigten nach Zymosaninjektion bereits ein verringertes nozizeptives Verhalten im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen (siehe Abbildung 15), was besonders zwischen 3 h und 6 h nach Zymosaninjektion auffiel (Abbildung 20 C). Nach zusätzlicher oraler Gabe von Celecoxib lies sich die nozizeptive Antwort nur minimal verringern – am deutlichsten nach 6-8 h. 24 h nach Zymosaninjektion erreichte die Latenzzeit bei beiden Gruppen annähernd das gleiche Level, was auf den Abbau von Celecoxib zurückzuführen ist.



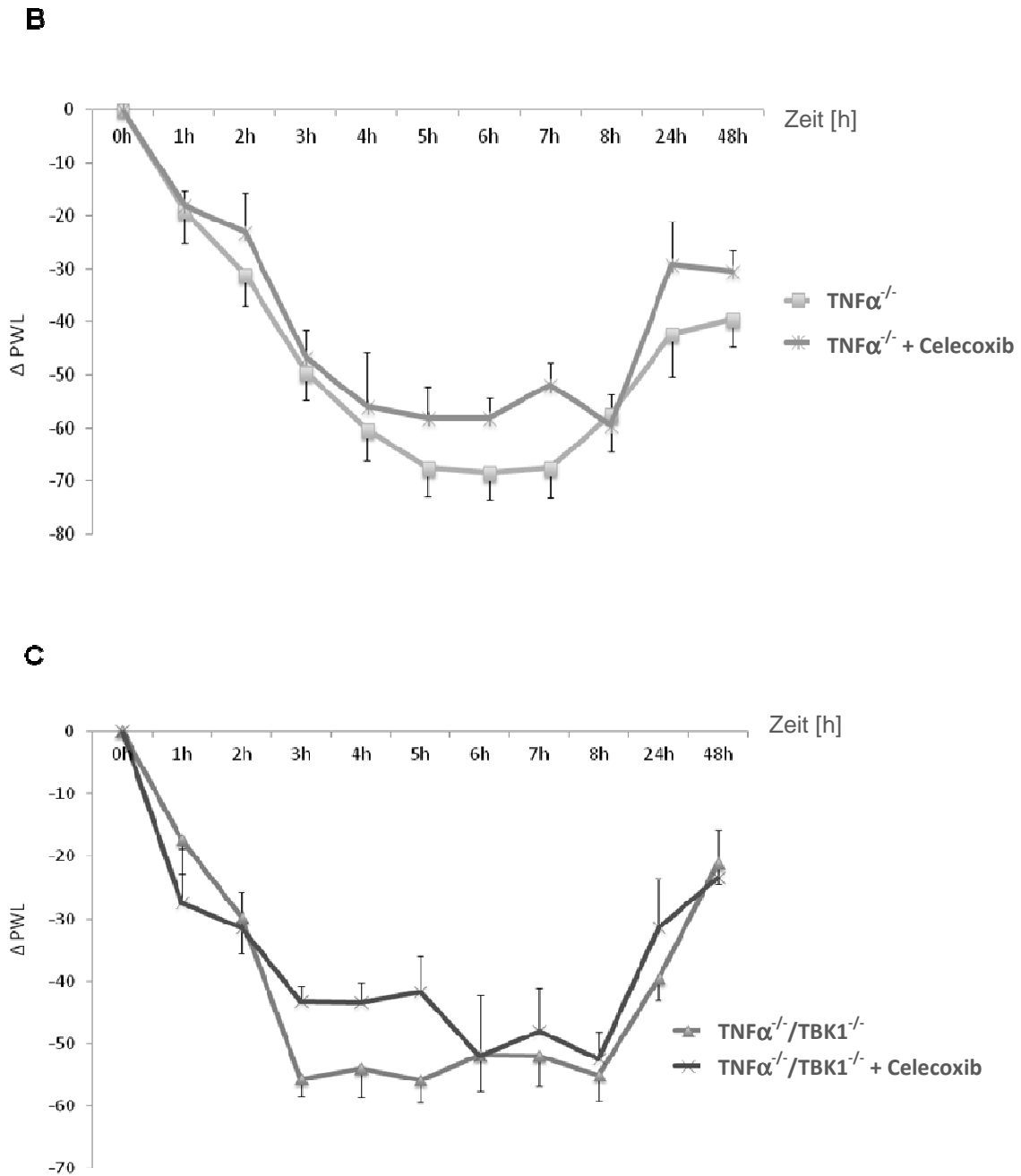


Abbildung 20:

Mechanische Hyperalgesie nach 20 μ l Zymosaninjektion [10 mg/ml] in eine Hinterpfote und nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote 30 min nach vorheriger oraler Gabe von Celecoxib [10 mg/kg KG] bei (A) Wildtyp -, (B) $TNF\alpha^{-/-}$ - und (C) $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit des Pfotenwegziehens. Berechnet wurde die Differenz zwischen der linken und der rechten Pfote. Nach der Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote wurde stündlich bis 8 Stunden, wie auch nach 24 und 48 Stunden die mechanische Schwelle gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 Tieren.

Die Berechnung der Area under the Curve (AUC) konnte beim gezeigten Schmerzmodell die verringerte nozizeptive Antwort sowohl bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen als auch bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren in der Zeit 3 h-7 h nach Zymosaninjektion zeigen (Abbildung 21). Zwischen dem Schmerzmodell mit Zymosaninjektion in Kombination mit oraler Gabe von Celecoxib (hellgraue Balken) und der alleinigen Zymosaninjektion (dunkelgraue Balken) war eine statistische Signifikanz bei den WT-Tieren ($\#p < 0,05$) zu erkennen, während Celecoxib sowohl bei $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - als auch bei $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen keine statistisch signifikante weitere Steigerung des antinozizeptiven Effekts bewirken konnte. Trotz allem ist eine verminderte nozizeptive Antwort nach Celecoxib Gabe bei beiden Knockout-Gruppen erkennbar. Es zeigte sich, dass das Schmerzverhalten bei allen drei Tiergruppen nach der Gabe von Celecoxib sehr ähnlich ist. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt der verringerten Nozizeption im Zymosan-Schmerzmodell bei den $\text{TNF}\alpha/\text{TBK1}$ Mäusen nicht nur durch die verminderte COX-2-Expression ausgelöst wird, sondern dass wahrscheinlich noch weitere Signalwege daran beteiligt sind. Um dies näher zu betrachten, sollten NF- κ B-unabhängige Targets zur Untersuchung herangezogen werden. Dafür wurde zunächst ein mRNA-Array durchgeführt, um eine bessere Vorstellung über TBK1-abhängige, schmerzrelevante Gene zu bekommen.

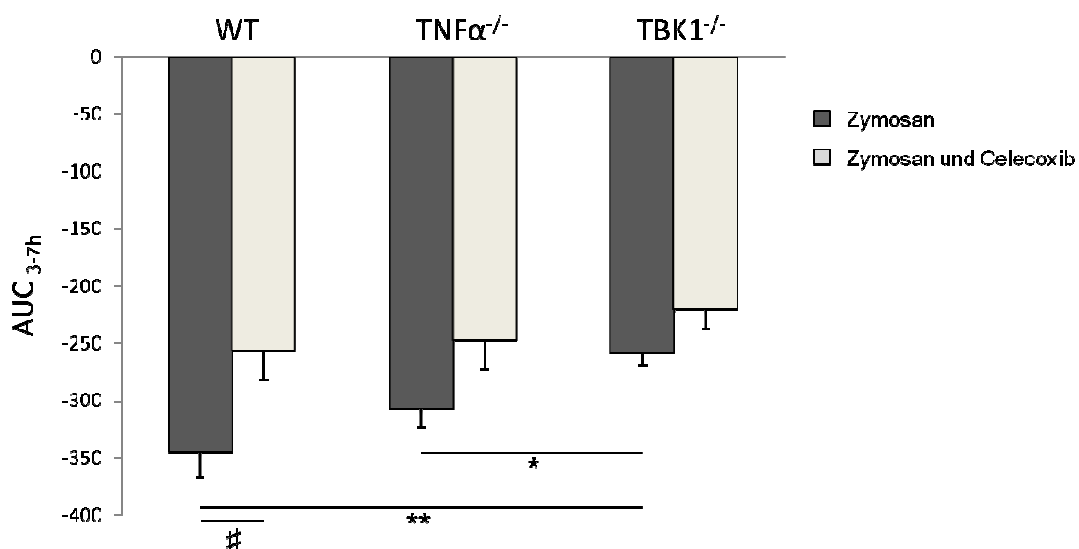


Abbildung 21:

Statistischer Vergleich nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote und nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote mit 30 min vorheriger oraler Zugabe von Celecoxib [10 mg/kg KG] bei Wildtyp -, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und

TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen durch Bestimmung der Area under the Curve (AUC) im Zeitraum von 3 h-7 h nach Zymosaninjektion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je mindestens 7 Tieren. *p < 0,05 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. **p < 0,01 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. Die Raute kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Celecoxib-Behandlung der Wildtyp - Mäuse mit #p < 0,05.

3.4

Genregulation nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin und Zymosan

Die bisherigen Ergebnisse der quantitativen Realtime RT-PCR Analysen und der Western-Blot Analysen deuten auf eine Beteiligung von TBK1 an der Übertragung inflammatorischer nozizeptiver Signale im Rückenmark hin. Um Informationen über beteiligte Signalübertragungswege zu erhalten, wurden weitere Versuche mit TNF $\alpha^{-/-}$ -, TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen (TNF α -R $^{+/+}$ /TBK1 $^{+/+}$) durchgeführt, die eine nozizeptive Stimulation durch Formalin erhalten hatten.

3.4.1 Übersicht der Regulation TBK1-abhängiger Gene nach Formalininjektion

Zur Untersuchung der TBK1-abhängigen Signalübertragung wurde ein mRNA-Array (Mouse Innate and Adaptive Immune Response PCR Array) durchgeführt, der die relative Konzentration der jeweiligen mRNA in Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Tieren ermitteln sollte. Mit Hilfe des Arrays war es möglich, viele Proben parallel zu messen und somit viele Gene gleichzeitig hinsichtlich ihrer Regulation zu analysieren. Die sich daraus ergebenden Vorteile waren der zeitliche Faktor und die bessere Vergleichbarkeit der Resultate, da alle Proben den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren. Der verwendete Array beinhaltete vor allem Gene, die eine

Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort spielen und gleichzeitig eine Schmerzrelevanz aufwiesen.

Das Rückenmarksgewebe wurde 2 h nach Stimulation mit Formalin entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der die einzelnen Gene und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Im Fokus standen vor allem entzündungsrelevante Gene, die mindestens eine 2-fache Regulation aufwiesen. In diesem Zusammenhang sind mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt worden.

Die Ergebnisse des Arrays zeigten, dass die Expression von Adenosin A_{2A} -Rezeptor ($Adora_{2A}$) im Rückenmark von $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen (C_t : $32,23 \pm 0,000446$) nach Formalinbehandlung höher war als die Expression in den $TNF\alpha^{-/-}$ -Tieren (C_t : $35 \pm 0,000103$). Bei $Adora_{2A}$ handelt es sich um einen Entzündungshemmer (STAMP ET AL., 2012). Des Weiteren war die Expression des proinflammatorischen Zytokins Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) (MIKULOWSKA, 1997; LEECH, 1998) in den $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen (C_t : $35 \pm 0,000065$) niedriger als in den $TNF\alpha^{-/-}$ -Tieren (C_t : $19,94 \pm 3,541288$).

3.4.2 Überprüfung der Regulationen der entzündungsrelevanten Gene des Array's mittels quantitativer Realtime RT-PCR

Die Genregulation von $Adora_{2A}$ und MIF in $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen mit und ohne nozizeptive Stimulation mit Formalin sollte mittels RT-PCR überprüft und bestätigt werden.

2 h nach der Formalininjektion in die Hinterpfoten von $TNF\alpha^{-/-}$ -Mäusen (* $p < 0,05$) zeigte sich für $Adora_{2A}$ eine statistisch signifikante Abnahme der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22 A), die bei $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Tieren ausblieb. Der Unterschied zwischen $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen war 2 h nach Formalininjektion statistisch signifikant (# $p < 0,05$) und

bestätigte die Daten des Arrays. Bei MIF (Abbildung 22 B) konnte man beobachten, dass 2 h nach Formalininjektion die Genexpression in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen ($***p < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls statistisch signifikant gehemmt wurde. Eine starke Hochregulation war dagegen bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen ($**p < 0,01$) zu erkennen, welche ebenfalls eine statistische Signifikanz aufwies. Zwischen den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tieren ($\#p < 0,05$) wurde ein statistisch signifikanter Unterschied offenbar, der allerdings den Ergebnissen des Arrays widersprach.

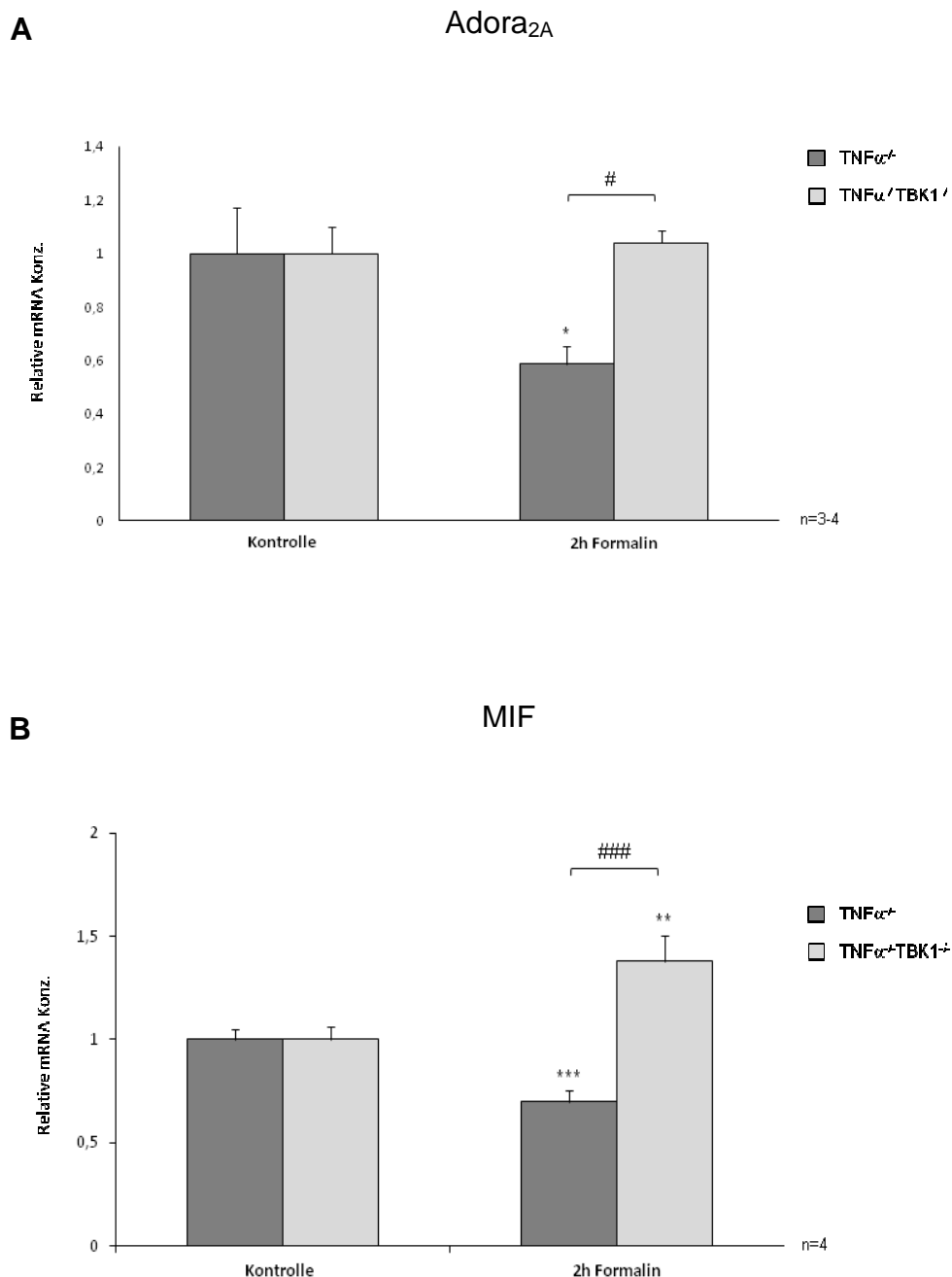


Abbildung 22:

Relative Konzentration der entzündungsrelevanten Gene Adora_{2A} (A) und MIF (B) im Rückenmark von TNF α ^{-/-} - und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in die Hinterpfoten der Tiere. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt}-Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF α - und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - Mäuse mit #p < 0,05 und ###p < 0,001.

3.4.3 Regulation TBK1-abhängiger Gene auf Proteinebene

In weiteren Experimenten sollte getestet werden, inwieweit das Gen Adora_{2A} durch nozizeptive Stimulation auf Proteinebene reguliert wird. Dazu wurden mittels Western-Blot Rückenmarkproben auf die jeweilige Genexpression in Wildtyp-, TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}- und in TNF α ^{-/-}-Tieren nach peripherer Injektion von Formalin untersucht. Als Vergleich dienten die jeweiligen unbehandelten Kontrolltiere. Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigten die Wildtyp-Tiere keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Formalin-Behandlung. Bei den TNF α ^{-/-}- und den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren war eine deutliche Abnahme der Adora_{2A}-Expression in den Rückenmarkproben der Formalin-behandelten Mäuse zu erkennen, welche bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren statistisch signifikant war (*p < 0,05). Die Ergebnisse der RT-PCR und des Arrays zeigten jedoch bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen eine stärkere Expression von Adora_{2A} nach Formalin als in TNF α - Mäusen, d.h. mRNA- und Proteinexpression scheinen für dieses Gen nicht zu korrelieren.

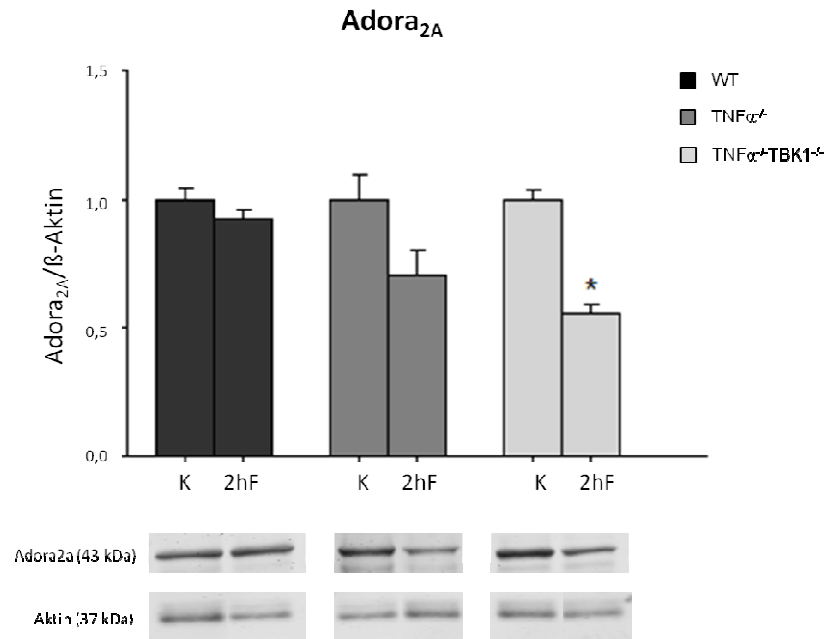


Abbildung 23:

Proteinexpression von Adora_{2A} in Rückenmarksproben von Wildtyp -, TNFα^{-/-}/TBK1^{-/-} - und TNFα^{-/-} - Mäusen nach Formalininjektion in die Hinterpfoten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Das Gewebe wurde 2 h nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Adora_{2A}-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β-Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von Adora_{2A}/β-Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Der Stern kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied mit *p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Mittels Western-Blot wurde auch die Proteinexpression von MIF im Rückenmark von Wildtyp -, TNFα^{-/-}/TBK1^{-/-} - und TNFα^{-/-} - Tieren 2 h nach Formalininjektion untersucht (Abbildung 24). Als Vergleich dienten die jeweiligen unbehandelten Kontrolltiere. Die Ergebnisse zeigten wie auch bei der RT-PCR eine Zunahme der MIF-Expression sowohl für TBK1- als auch TNFα- Mäuse, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

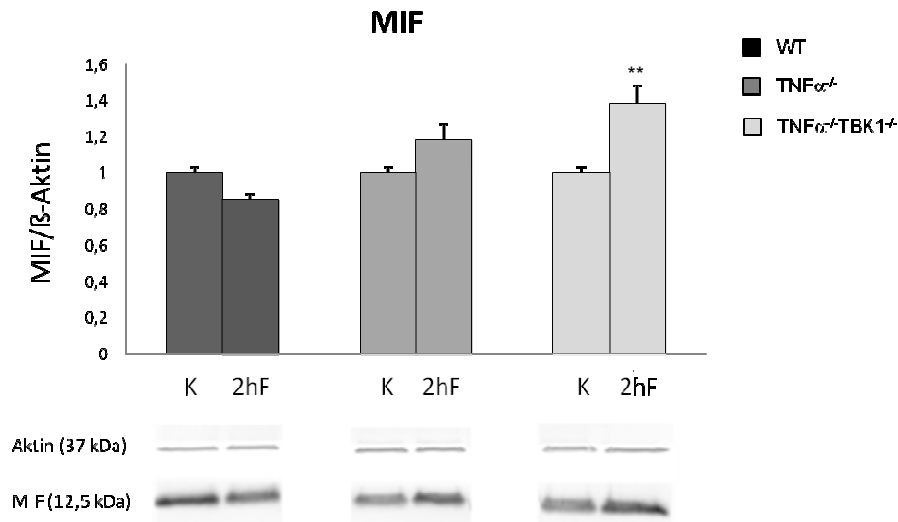


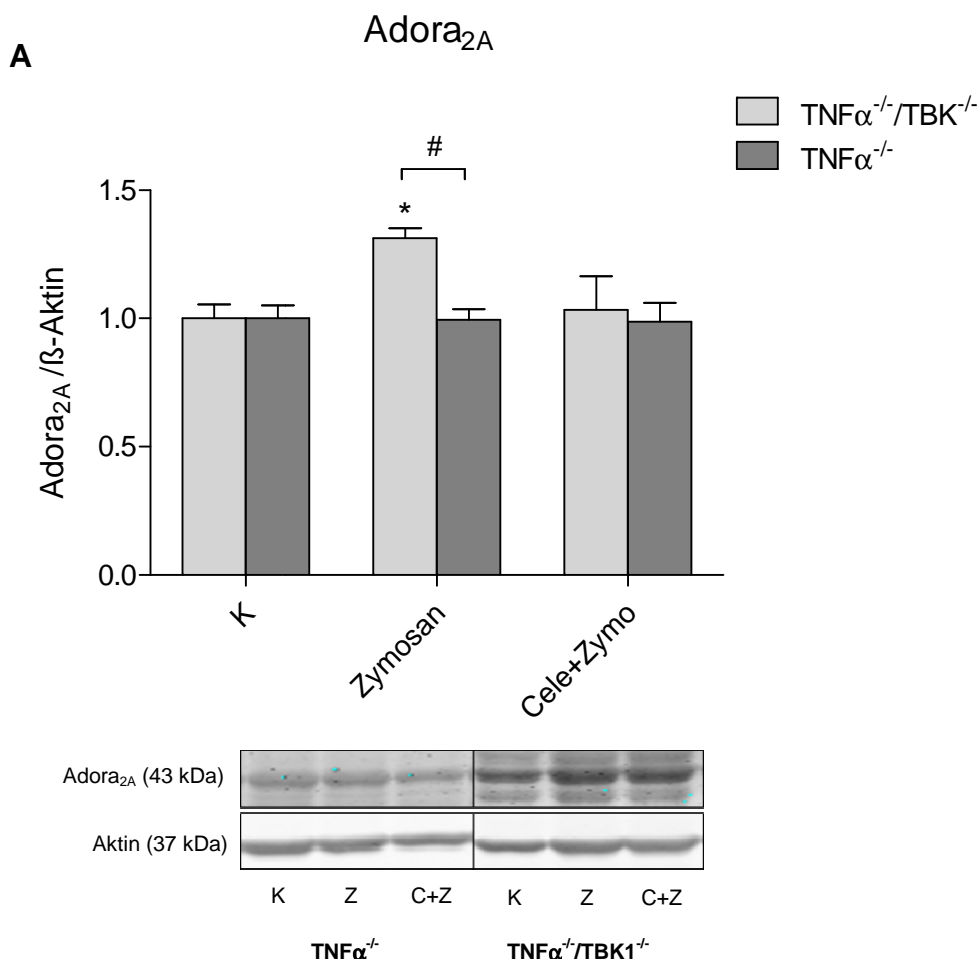
Abbildung 24:

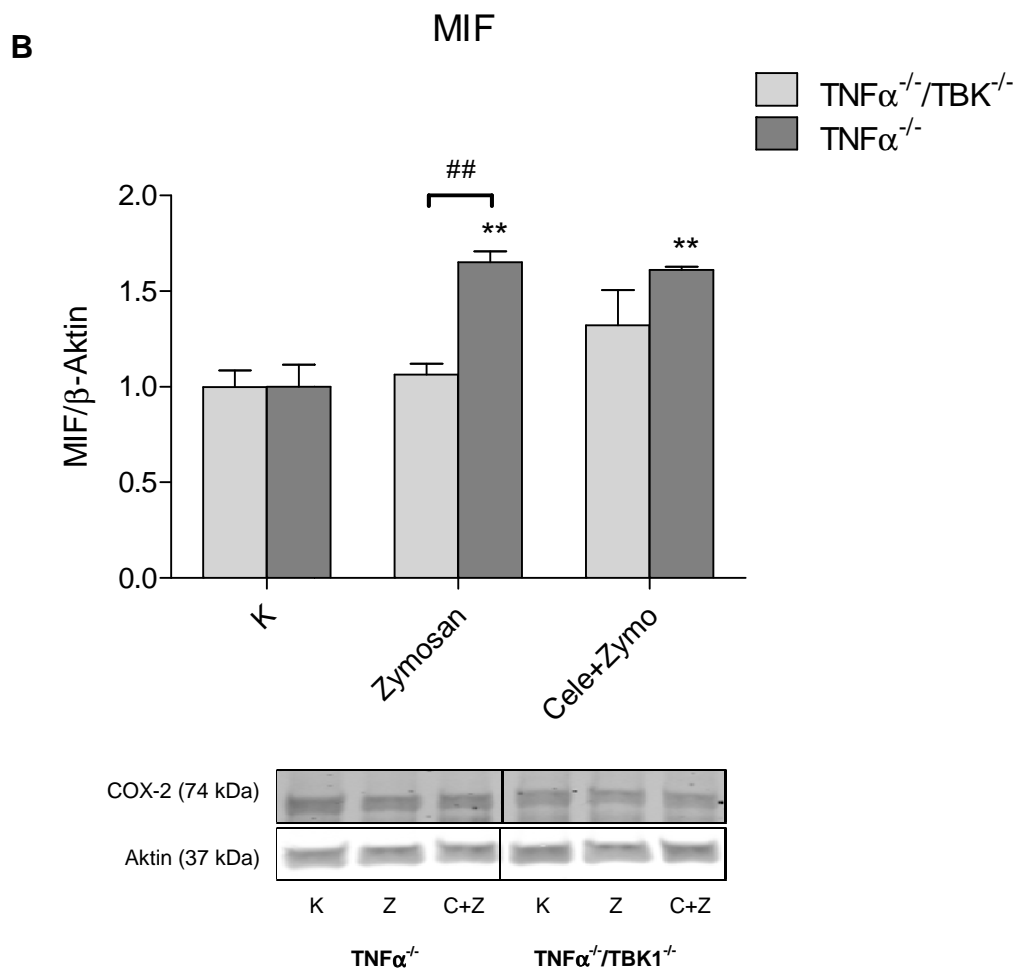
Proteinexpression von MIF in Rückenmarkproben von Wildtyp -, TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ - Mäusen nach Formalininjektion in die Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Gewebe wurde 2 h nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des MIF-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von MIF/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.4 Genregulation nach Behandlung mit Zymosan und Celecoxib in Knockout-Tieren

Im nächsten Schritt wurde getestet, welche Auswirkungen Zymosan auf die Genregulation in den verschiedenen Genotypen hat und inwiefern Celecoxib diese Regulationen beeinflussen kann. Untersucht wurden wiederum Gene, die im Array unter entzündlichen Bedingungen reguliert vorlagen, sowie NF- κ B-abhängige Entzündungsgene. Dazu wurde den Knockout-Tieren aus den Verhaltensexperimenten (TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ und TNF $\alpha^{-/-}$ - Mäusen mit Zymosan und Zymosan plus Celecoxib) nach 48 h das Rückenmarksgewebe entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Als Kontrolltiere dienten unbehandelte TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - bzw. TNF $\alpha^{-/-}$ - Mäuse.

Die folgenden Diagramme in Abbildung 25 zeigen die densitometrische Auswertung der Western-Blots der einzelnen entzündungsrelevanten Gene. Adora_{2A} (Abbildung 25 A) wurde in den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}- Tieren nach der Injektion von Zymosan in die Hinterpfoten der Mäuse signifikant hoch reguliert, was durch orale Gabe von Celecoxib annähernd auf das Ausgangslevel reduziert wurde. In den TNF α ^{-/-}- Mäusen war weder nach Zymosan, noch nach Zymosan mit Celecoxib eine Regulierung des Gens auszumachen. Bei MIF hingegen (Abbildung 25 B) lies sich ein deutlich statistisch signifikanter Anstieg bei den TNF α ^{-/-}- Mäusen nach Injektion von Zymosan (**p < 0,01) beobachten, ebenso nach vorheriger Gabe von Celecoxib (**p < 0,01). Bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren war nach Zymosan sowie Zymosan und Celecoxib keine bzw. nur eine geringe Regulation zu erkennen. Eine Zymosan-induzierte Erhöhung der COX-2-Expression (Abbildung 25 C) erfolgte weder in TNF α ^{-/-}- noch in TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren. Die Behandlung mit Celecoxib hemmte darüber hinaus die COX-2 Expression bei den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren unter den Basal-Level, was bei TNF α ^{-/-}-Tieren nicht zu beobachten war.





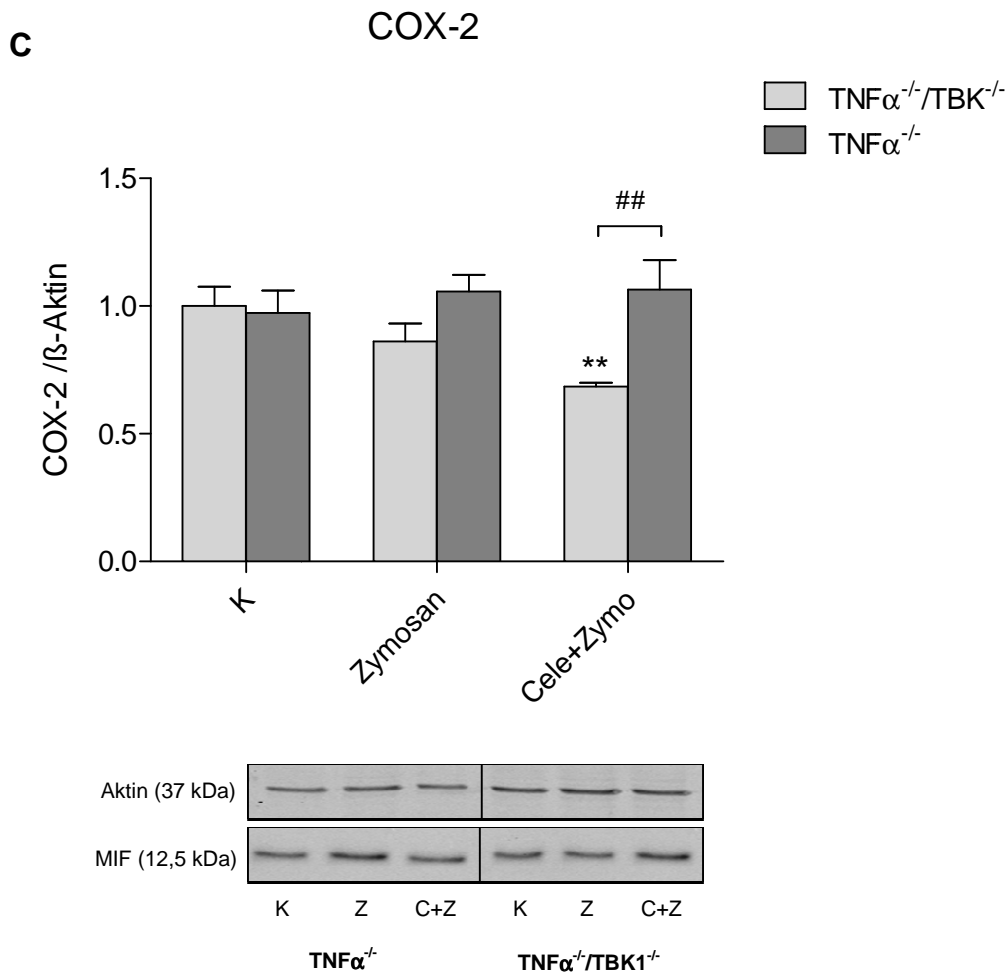


Abbildung 25:

Relativer Proteingehalt von entzündungsrelevanten Genen **A)** $Adora_{2A}$, **B)** MIF und **C)** COX-2 im Rückenmark von $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}$ - Mäusen behandelt mit Zyimosan bzw. mit Zyimosan und Celecoxib im Vergleich zu Kontrolltieren; K=Kontrolle, Z=Zyimosan, CZ=Celecoxib+Zyimosan. Das Gewebe wurde 48 h nach der Behandlung entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Die Balkendiagramme zeigen die densitometrische Auswertungen der Proteinexpression der einzelnen Gene bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Mäusen. Zwecks angemessener Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurde der Quotient von den einzelnen Genen/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäuse mit $\#p < 0,05$ und $\#\#p < 0,01$.

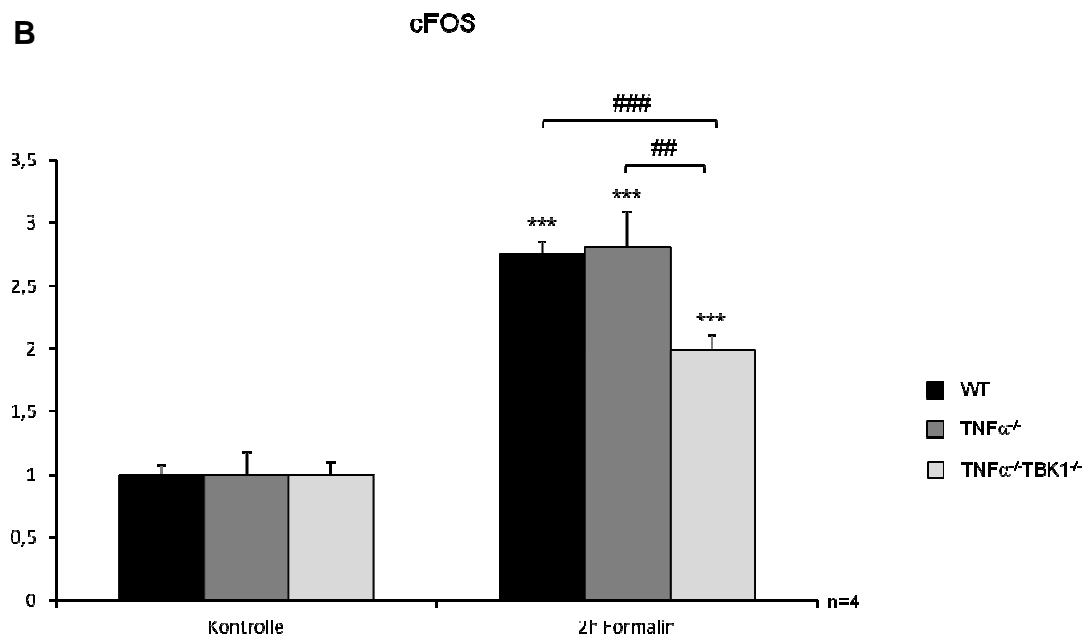
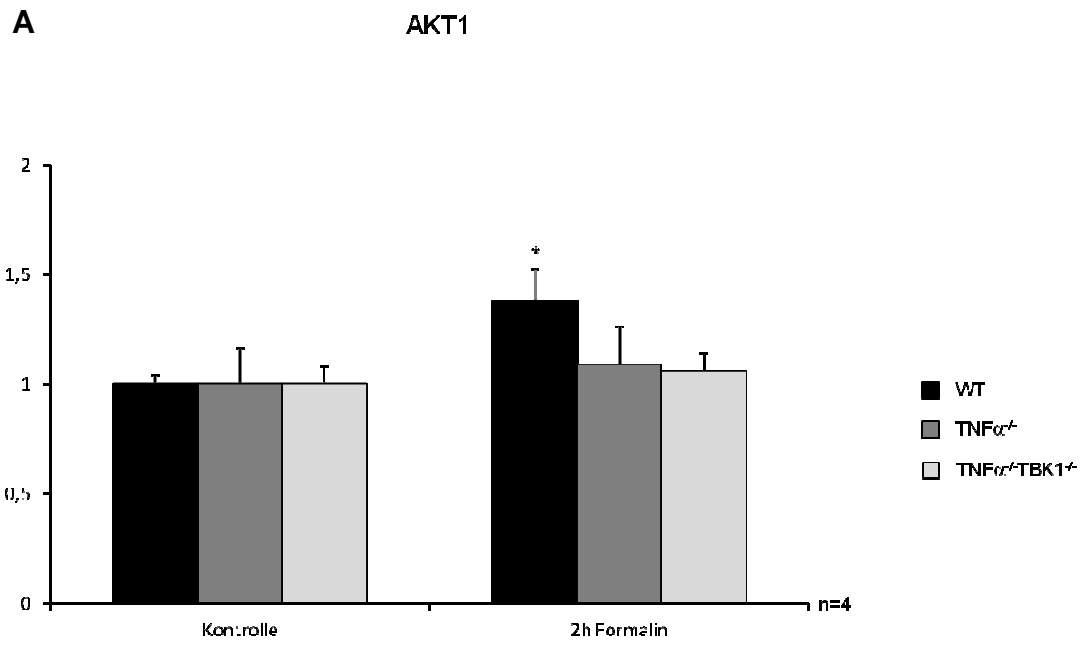
3.4.5 Regulation NF- κ B-unabhängiger Gene nach Formalininjektion

Um weitere Erkenntnisse zur TBK1-abhängigen Signalübertragung zu erhalten, wurden in einem weiteren Schritt die Regulationen der NF- κ B-unabhängigen

entzündungsrelevanten Gene Akt1, c-Fos und CD68 nach einer nozizeptiven Stimulation mit Formalin untersucht.

Die Balkendiagramme in Abbildung 26 zeigen die einzelnen Expressionen der Gene Akt1, c-Fos und CD68 2 h nach Formalininjektion in Wildtyp-, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen im Vergleich zu Mäusen ohne nozizeptive Stimulation.

2 h nach Formalininjektion konnte eine statistisch signifikante Hochregulation von Akt1 im Lumbalmark der Wildtyp-Mäuse beobachtet werden (Abbildung 26 A). In den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen blieben die Gene konstant auf dem Ausgangslevel exprimiert. Die Expression der c-Fos-mRNA (Abbildung 26 B) zeigte bei allen drei Genotypen 2 h nach nozizeptiver Stimulation eine signifikante Hochregulation, die jedoch in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen schwächer war im Vergleich zu den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - als auch Wildtyp-Tieren. Dieser Unterschied war sowohl zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen ($##p < 0,01$) als auch zwischen Wildtyp- und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Tieren ($###p < 0,001$) statistisch signifikant. Es zeigte sich nur bei den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - Mäusen eine statistisch signifikante Hemmung der CD68-Genexpression (Abbildung 26 C). In den Wildtyp- und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Tieren blieb die Expression auf dem Ausgangslevel und sowohl zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen ($\#p < 0,05$), wie auch zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen ($\#p < 0,05$) war dieser Unterschied statistisch signifikant.



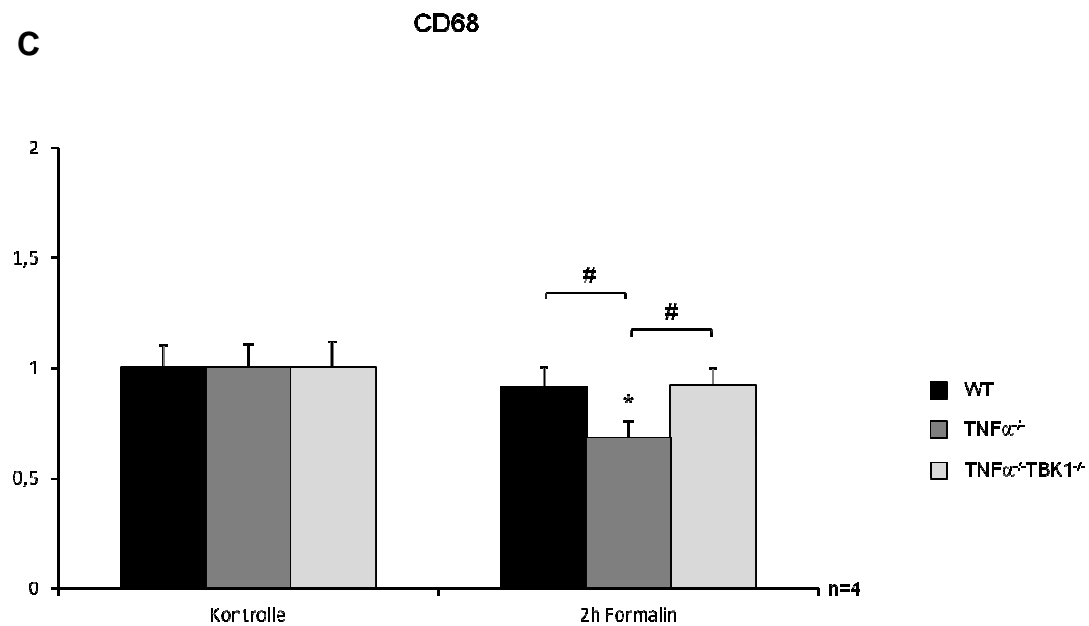


Abbildung 26:

Relative Konzentration der entzündungsrelevanten Gene Akt1 (A), c-Fos (B) und CD68 (C) im Rückenmark von TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in die Hinterpfoten der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt} -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Mäusen mit # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$.

3.5

Untersuchung der TBK1-abhängigen Signalübertragung in der Zellkultur

Wie schon in den Tierversuchen (siehe 3.3) gezeigt werden konnte, hat TBK1 Einfluss auf die entzündliche Nozizeption. Die beteiligten Signalübertragungswege sollten nun in der Zellkultur detailliert untersucht werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Rolle von TBK1 in RAW 264.7 Maus-Makrophagen untersucht.

3.5.1 RAW 264.7 Maus-Makrophagen behandelt mit LPS und BX-795

Durch eine Behandlung der Makrophagen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) kommt es zur Stimulation des Toll-like Rezeptors 4 (TLR 4), und dadurch zu einer entzündungsähnlichen Reaktion u.a. durch Aktivierung der Bindungspartner IKK ϵ /TBK1. Dieser phosphoryliert im NF- κ B-Signalweg u.a. I κ B α , was zu dessen proteolytischem Abbau, zur Einwanderung der NF- κ B-Untereinheiten p50/p65 in den Zellkern und somit letztendlich zur Transkription von Genen führt, die unter anderem für die Aktivierung von Entzündungen verantwortlich sind (NIEDERBERGER UND GEISSLINGER 2008). Darüber hinaus kann IKK ϵ /TBK1 direkt in den IRF-Signalweg einwirken und diesen aktivieren, indem er IRF3 phosphoryliert, welches daraufhin in den Nukleus transloziert, an die DNA bindet und die Expression von Typ I-IFN induziert.

Um eine Entzündungsreaktion nachzuahmen, wurden die Makrophagen mit LPS mit und ohne Vorbehandlung mit dem IKK ϵ /TBK1-Inhibitor BX-795 stimuliert. Die Stimulationszeiten betragen 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 8 h und 24 h. Nach der jeweiligen Zeit wurden die Zellen abgeerntet und die Proteinexpression verschiedener Gene in der NF- κ B Signalübertragungskaskade sowie IRF3 mittels Western-Blot analysiert. Die folgenden Balkendiagramme veranschaulichen die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Komponenten der TLR-induzierten Signalübertragungskaskade. Die Regulation von TBK1 ist in Abbildung 27 dargestellt. Bis zu 60 Minuten blieb die TBK1-Proteinexpression nach der Stimulation mit LPS weitestgehend auf Kontrollebene. Nach 8 h war eine Runterregulation erkennbar, die nach 24 h statistisch signifikant war (**p < 0,001). Nach der Zugabe von BX-795 war ebenfalls eine Hemmung der TBK1-Expression im Vergleich zur Kontrolle sichtbar, die 60 min, 8 h und 24 h nach Zugabe von LPS signifikant war, sich jedoch nicht von den LPS-behandelten Proben unterschied.

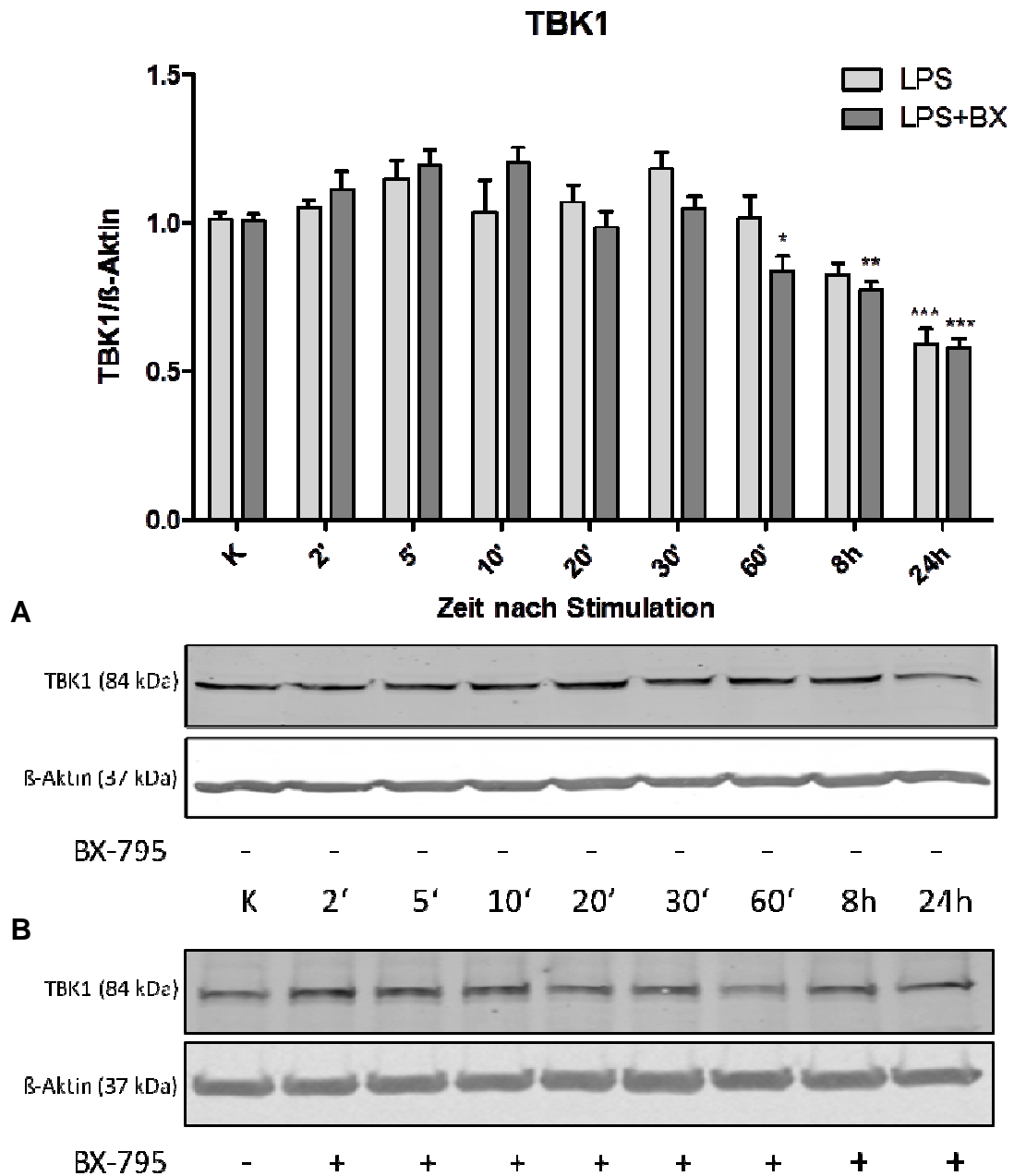


Abbildung 27:

Proteinexpression von TBK1 in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 µg/ml] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β-Aktin, wobei die Mittelwerte ± SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von TBK1/β-Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Daneben wurde auch die Regulation des TBK1-Bindungspartners IKK ϵ untersucht. Es konnte eine verringerte Expression von IKK ϵ 8 h und 24 h nach LPS-Zugabe beobachtet werden. Diese konnte durch Zugabe des Inhibitors BX-795 nach 24 h weiter unterdrückt werden (Abbildung 28).

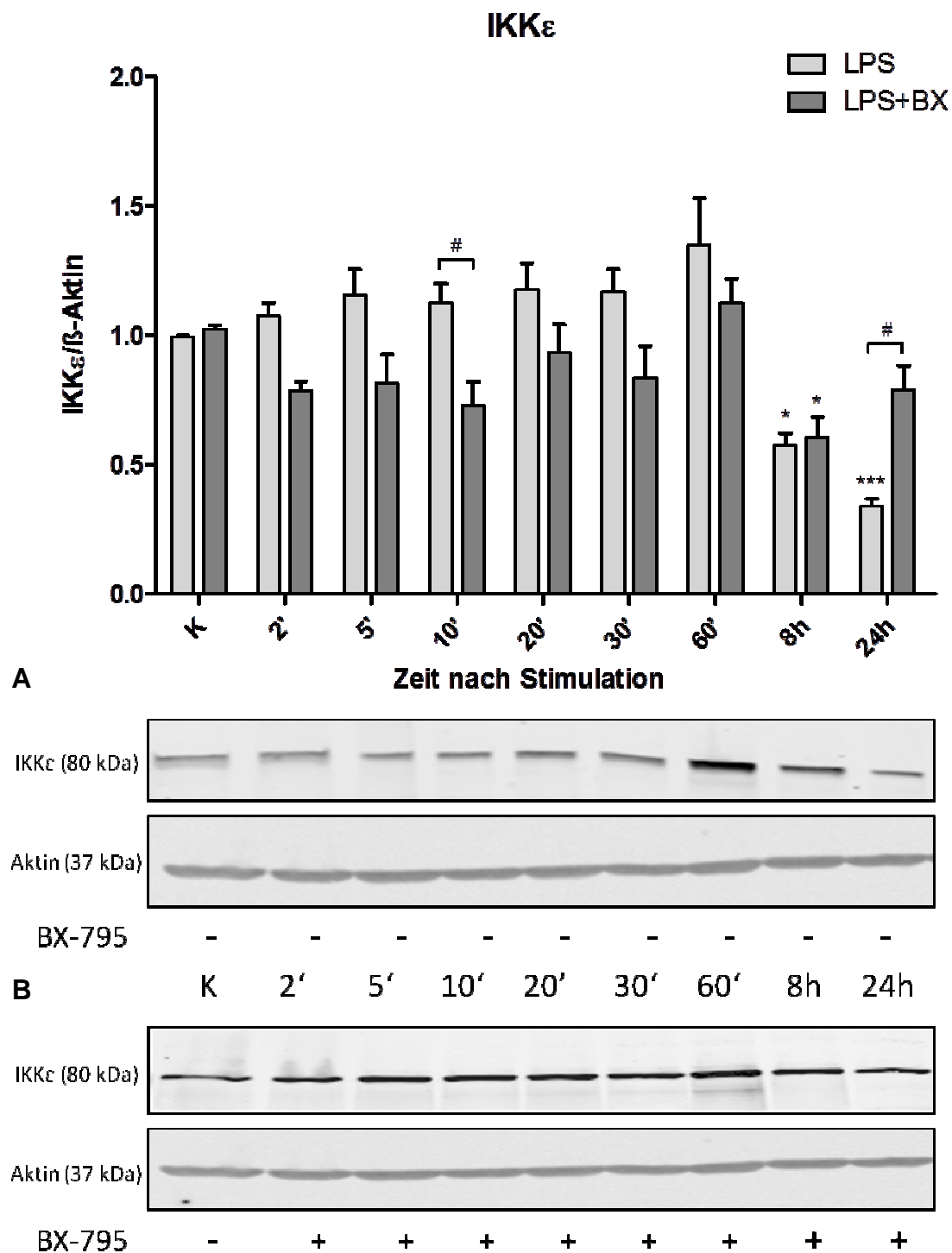


Abbildung 28:

Proteinexpression von IKK ϵ in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 μ g/ml] und dem

Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795 mit # $p < 0,05$.

Der Abbau von I κ B α ist ein wichtiger Schritt in der NF- κ B-Signalübertragungskaskade. Um zu überprüfen, ob TBK1 und IKK ϵ hier eine Rolle spielen, wurden RAW264.7 Zellen wiederum mit LPS mit und ohne BX-795 inkubiert und die Regulation von I κ B α mittels Western-Blot untersucht. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass I κ B α , wie erwartet, 2 min nach der LPS - Stimulation eine starke Abnahme zeigt, die bis zu 30 min anhielt. Im Verlauf einer Stunde nahm die Expression wieder zu, blieb allerdings unter der Kontrollebene. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wurde auch nach vorheriger Zugabe des Inhibitors beobachtet, der jedoch dazu führte, dass I κ B α bis 24 h signifikant verringert exprimiert wurde.

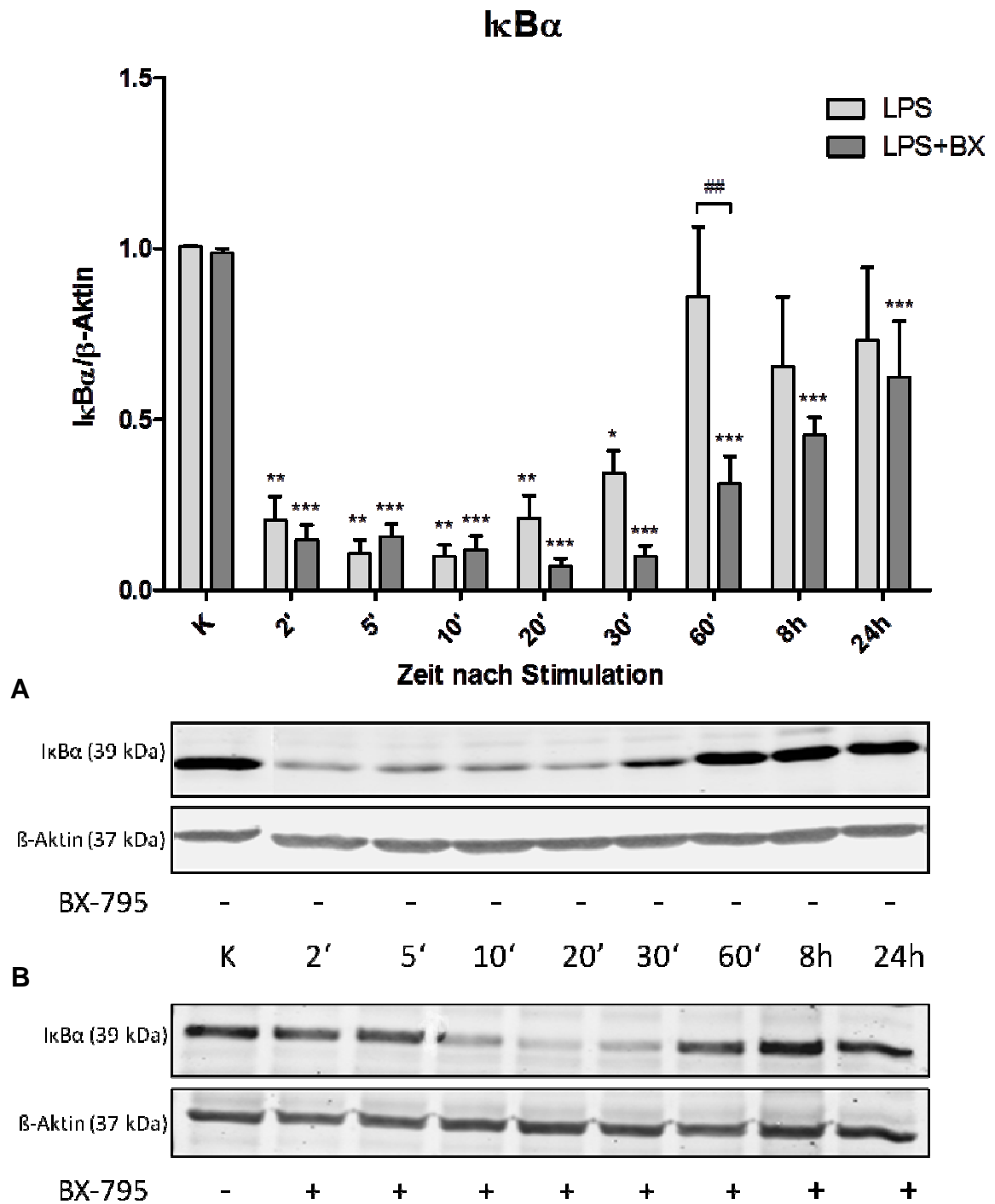


Abbildung 29:

Proteinexpression von I κ B α in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 μ g/ml] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des I κ B α -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von I κ B α / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Rauten kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795 mit $##p < 0,01$.

Als NF- κ B-unabhängiger Signalweg wurde der IRF3-Signalweg untersucht, der vor allem durch TBK1 und IKK ϵ reguliert wird. IRF3 ist essentiell für die Induktion von Typ I-IFN und IFN-abhängigen Genen. Stimulierungen durch virale Infektionen führen zur Aktivierung von TBK1/IKK ϵ und folglich zur Phosphorylierung von IRF3, was wiederum zur Translokation in den Nukleus und die Bindung an die DNA führt, um die Expression von Typ I-IFN zu induzieren.

IRF3 wurde durch LPS nicht reguliert, 8 h und 24 h nach Zugabe des Inhibitors zeigte sich jedoch ein deutlich signifikanter Anstieg der IRF3-Expression (Abbildung 30).

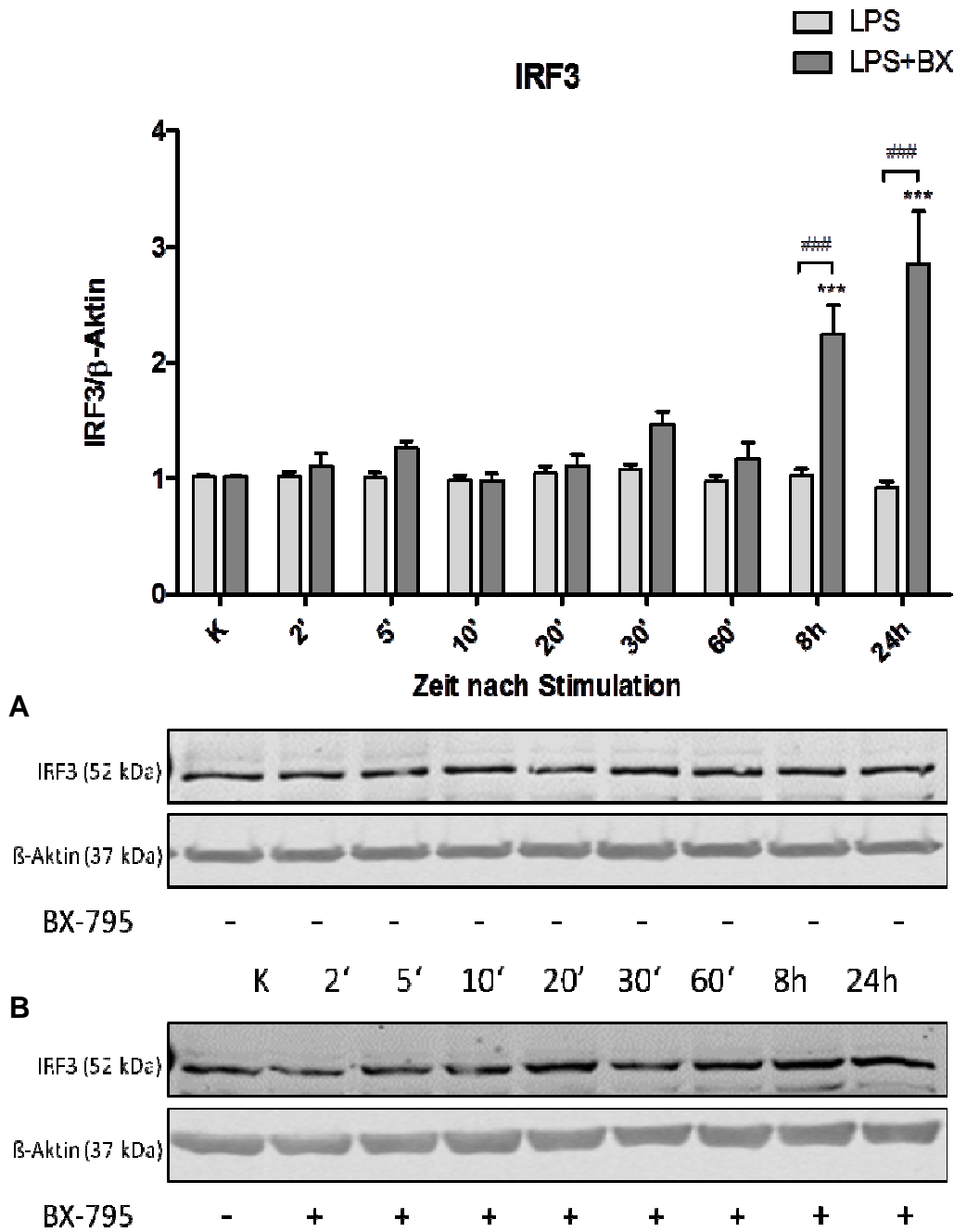


Abbildung 30:

Proteinexpression von IRF3 in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 µg/ml] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des IRF3-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β-Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IRF3/β-Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $***p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795, $###p < 0,001$.

Die Ergebnisse zeigen kaum Unterschiede in der Expression von TBK1, IKK ϵ und I κ B α nach Behandlung mit BX-795. Bei der Regulation von IRF3 kam es jedoch nach Zugabe von BX-795 zu einem signifikanten Anstieg der IRF3-Expression. Es wurde allerdings eine Hemmung der Phosphorylierung und die damit verbundene verminderte IRF3-Expression nach Zugabe des Inhibitors erwartet, da BX-795 IKK ϵ und TBK1 hemmt und somit folglich die Phosphorylierung und die Translokation von IRF3 in den Nukleus (SHIMADA ET AL., 1999; CLARK ET AL., 2009).

4. Diskussion

Die NF- κ B Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem, bei Entzündungen, der Zellproliferation und der Apoptose (KARIN, 2006; GOSH UND HAYDEN, 2008). Verschiedene Tiermodelle haben weiterhin gezeigt, dass NF- κ B neben seiner Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr, einer der wichtigsten Regulatoren der Expression proinflammatorischer Gene ist, die sowohl für entzündliche Prozesse als auch für Akute-Phase-Reaktionen relevant sind (AKIRA UND KISHIMOTO, 1997; GERONDAKIS ET AL., 1999; CHAN ET AL., 2000; BONNARD ET AL., 2000; TAK UND FIRESTEIN., 2001). So zeigten p50^{-/-}-Mäuse neben einer gestörten B-Zellproliferation ein verringertes nozizeptives Verhalten in inflammatorischen Schmerzmodellen (GRUMONT ET AL., 1998; NIEDERBERGER ET AL., 2007). Dem Schutzmechanismus, der in normalen Zellen mit einer induzierbaren, jedoch stets transienten Aktivierung von NF- κ B einhergeht, steht eine inhibierende Wirkung von NF- κ B gegenüber, die durch verschiedene molekulare Veränderungen bedingt sein kann. Eine lokale, beständig erhöhte Aktivierung von NF- κ B wurde in diversen Entzündungserkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Asthma oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen (HAN ET AL. 1998; BONETTI ET AL. 1999; MONACO ET AL. 2004). Eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung führte zu einer Verringerung der nozizeptiven Reaktion in Schmerzmodellen (TEGEDER ET AL., 2004; LEDEBOER ET AL., 2005). Untersuchungen an Knockout-Mäusen haben jedoch gezeigt, dass eine Deletion verschiedener Komponenten des NF- κ B-Signalwegs zu starken Immundefekten führen kann und in vielen Fällen letal ist wie z.B. Knockout von IKK α , - β , - γ , p65 oder TBK1 (BEG ET AL., 1995; TANAKA ET AL., 1999; HU ET AL., 1999; BONNARD ET AL., 2000; LI UND VERMA, 2002; HEMMI ET AL., 2004). Daher könnte eine komplette Hemmung der NF- κ B-Kaskade folgenschwere Nebenwirkungen mit sich bringen. Demzufolge ist es wichtig, weiterhin nach pharmakologischen Angriffspunkten in den NF- κ B-Signalwegen zu suchen, die spezifisch für die NF- κ B-Aktivierung bei pathophysiologischen Prozessen sind.

Als vielversprechenden Ansatz dafür gelten die beiden Kinasen TBK1 und IKK ϵ . Sie können durch direkte Phosphorylierung von I κ B α (PETERS ET AL. 2000), dem IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplex (TOJIMA ET AL., 2000; HUYNH ET AL., 2002) oder der direkten Phosphorylierung von NF- κ B p65 (BUSS ET AL., 2004; ADLI UND BALDWIN, 2006; MATTIOLI ET AL., 2006), den NF- κ B-Signalweg aktivieren. Eine weitere wichtige Funktion von TBK1/IKK ϵ ist die Beteiligung an der Aktivierung des Interferon-Signalwegs. Beide Bindungspartner können IRF3 und IRF7 phosphorylieren und dadurch die Aktivierung von Typ I-Interferonen hervorrufen, was bedeutend für die angeborene Immunantwort auf Virusinfektionen ist (FITZGERALD ET AL., 2003; CIVAS ET AL., 2006).

Die Rolle von IKK ϵ wurde bereits in verschiedenen Schmerzmodellen untersucht. Bei der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte mechanische Hyperalgesie bei den IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen beobachtet. Auch beim durch Formalin-Injektion hervorgerufenen Entzündungsschmerz zeigten IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse ein reduziertes nozizeptives Verhalten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (MÖSER ET AL, 2011). Beide Beobachtungen weisen darauf hin, dass IKK ϵ an der Schmerzverarbeitung bei Entzündungen beteiligt ist. Der analgetische Effekt beruht dabei nicht auf einer antiphlogistischen Wirkung der IKK ϵ -Deletion, was dadurch bestärkt wird, dass das Volumen der entzündungsbedingten Pfotenödeme bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keinen Unterschied zeigten. Molekularbiologische Untersuchungen im Rückenmark der Mäuse und der Zellkultur deuteten vielmehr darauf hin, dass die Effekte auf eine Hemmung der NF- κ B Signalübertragungskaskade, insbesondere der p65-Phosphorylierung, zurückzuführen sind. Diese bewirkt eine verringerte Induktion von NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen und pronozizeptiven Genen (MÖSER ET AL, 2011).

Interessant war nun die Frage, ob TBK1 als Bindungspartner von IKK ϵ ähnliche Effekte zeigt. Durch verschiedene Forschungsarbeiten wurde bereits analysiert, dass TBK1 eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort spielt, indem sie NF- κ B- und IRF-abhängige Gentranskriptionen induziert, welche für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen erforderlich

sind (PICHLMAIR ET AL., 2007; CLARK ET AL., 2011; GONCALVES ET AL., 2011; MCIVER ET AL., 2012). In dieser Arbeit wurde vor allem die Rolle von TBK1 bei der Entstehung und Verarbeitung entzündlicher Schmerzen untersucht.

4.1

Lokalisation und Regulation von TBK1 im zentralen Nervensystem

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TBK1-mRNA in schmerzrelevanten Geweben des zentralen und des peripheren Nervensystems konstitutiv exprimiert wird. Im Rückenmark war die Kolo-kalisation von TBK1-positiven Zellen mit neuronalen Zellmarkern vor allem im Dorsalhorn nachweisbar, wo die Umschaltung von nozizeptiven Afferenzen aus der Peripherie auf zentrale Bahnen stattfindet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TBK1 an der nozizeptiven Verarbeitung beteiligt ist. In den DRGs konnte eine Kolo-kalisation mit neuronalen Zellmarkern und TBK1 in großen, nicht schmerzrelevanten, wie auch in kleinen, schmerzrelevanten Neuronen gezeigt werden. Die Expression von TBK1 in kleinen nozizeptiv-spezifischen Neuronen liefert ebenfalls einen direkten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von TBK1 bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung im peripheren Nervensystem. Der Nachweis von TBK1 in den großen Neuronen der DRGs lässt eine neuroprotektive Rolle von TBK1 in sensorischen Neurone möglich erscheinen. TBK1 könnte unter anderem für eine adäquate Transduktion des Schmerzsignals in das zentrale Nervensystem verantwortlich sein, bei der kleine Neurone, große Neurone und Gliazellen durch ihre aufeinander abgestimmten synaptischen und metabolischen Aktivitäten zusammenarbeiten (MEFFERT ET AL. 2003; MATTSON AND MEFFERT 2006; REN AND DUBNER 2008). Die sowohl im Rückenmark als auch in den DRGs nachgewiesene konstitutive Expression von TBK1 kann gut in Einklang mit der konstitutiven Expression von NF- κ B in exzitatorischen Neuronen gebracht werden (MATTSON UND CAMANDOLA, 2001) und liefert möglicherweise einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von TBK1 an der Aktivierung von NF- κ B (BUSS ET AL., 2004; ADLI UND BALDWIN, 2006; MATTIOLI ET AL., 2006). Durch die konstitutive Expression von TBK1 könnte zum einem eine schnelle Anpassung der Neurone auf

noxische Reize gewährleistet und zum anderen die rasche Hochregulation nach peripherer nozizeptiver Stimulation begünstigt werden (WOOLF AND COSTIGAN 1999).

Eine Kolokalisation mit TBK1 konnte auch in Astrozyten nachgewiesen werden. Astrozyten sind Immunzellen im Nervensystem und spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungen, sowie bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung (BRAMBILLA ET AL., 2005; FU ET AL., 2007). Eine Expression von TBK1 in Astrozyten des Rückenmarks kann demnach auf einen Einfluss der TBK1 im Entzündungs- bzw. Schmerzprozess hindeuten.

4.2

Nozizeptives Verhalten in Knockout-Mäusen und Regulation von TBK1 nach inflammatorischer Stimulation

In der Schmerzverarbeitung spielt das Rückenmark eine wichtige Rolle, da hier die Schmerzreize aus der Peripherie auf das zentrale Nervensystem umgeschaltet werden. Im Rückenmark war die Kolokalisation von TBK1-positiven Zellen mit neuronalen Zellmarkern vor allem im Bereich der schmerzrelevanten Laminae nachweisbar. In Laminae I findet man ausschließlich nozizeptiv-spezifische Neurone, in Laminae II darüber hinaus auch Neurone, die auf nicht-noxische Reize reagieren (IADAROLA UND CAUDLE 1997; MESSLINGER 2002; SCHMIDTKO ET AL., 2009), was darauf hindeutet, dass TBK1 bei Schmerzen beteiligt sein könnte. Um die Regulation von TBK1 nach nozizeptiver Stimulation zu untersuchen, wurde der Formalintest angewendet, der in der Pfote eine schmerzhafte Entzündung auslöst, die auch im Rückenmark zu Veränderungen der Genexpression führt. Es war bereits in der Arbeitsgruppe bekannt, dass $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen ein signifikant verringertes nozizeptives Leckverhalten nach Formalininjektion aufzeigten. Dies wurde hauptsächlich in der zweiten Phase des Formalintests beobachtet, in der es neben der Stimulation von Nozizeptoren auch zu einer Sensibilisierung der schmerzverarbeitenden Neuronen des Rückenmarks kommt (CODERRE ET AL. 1994), was auf eine

Beteiligung von TBK1 an der zentralen Schmerzverarbeitung bei Entzündungen hinweist.

Eventuell entfaltet $\text{TNF}\alpha$ seine proinflammatorische und -nozizeptive Wirkung erst zu späteren Zeitpunkten und das Zeitfenster von 45 Minuten im Formalintest ist zu kurz, um Effekte des $\text{TNF}\alpha\text{R}$ -Knockouts feststellen zu können. Für diese Theorie sprechen auch frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe, wie auch weitere Ergebnisse dieser Arbeit. So konnte mittels quantitativer Realtime RT-PCR zwei Stunden nach Injektion von Formalin die erwartete verringerte Hochregulation der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS bei $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte bei der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung, welche verlässliche Informationen über länger anhaltende Schmerzen liefert, eine reduzierte mechanische Hyperalgesie der $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäuse beobachtet werden, die erst fünf Stunden nach Zymosan-Injektion einsetzte und bis zum Ende des Tests nach 48 Stunden anhielt. Eine noch größere Verringerung der mechanischen Hyperalgesie konnte bei $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen gezeigt werden, wobei der Unterschied im nozizeptiven Verhalten zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ und $\text{TNF}\alpha^{-/-}$, sowie zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen signifikant war. So konnte die Hypothese weiter untermauert werden, dass der antiinflammatorische und -nozizeptive Effekt durch die TBK1-Deletion verstärkt wird.

Interessant war es nun herauszufinden, über welchen Signalübertragungsweg die TBK1-vermittelten Effekte verlaufen und inwieweit $\text{TNF}\alpha$ als Background der $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tiere, diese beeinflusst.

$\text{TNF}\alpha$ ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, weshalb es bei einem Knockout der Rezeptoren zu antiinflammatorischen und -nozizeptiven Effekten kommt. Es wurde nachgewiesen, dass $\text{TNF}\alpha$ ein wichtiger Mediator bei der Entwicklung von rheumatoider Arthritis ist, da die Häufigkeit und die Schwere von Gelenkentzündungen in $\text{TNF}\alpha$ -Knockout Mäusen deutlich vermindert waren. Des Weiteren spielt $\text{TNF}\alpha$ bei der Entstehung und Verarbeitung entzündlicher Schmerzen, vor allem in Form der Hyperalgesie, eine entscheidende Rolle, was in verschiedenen Studien durch Ausbleiben der thermischen Hyperalgesie und einer Reduzierung der mechanischen Allodynie

in TNF α -defizienten Mäusen im Vergleich mit Wildtypen beobachtet werden konnte (WATKINS ET AL., 1995; DENG ET AL., 2000; CUNHA ET AL., 2005; VOGEL ET AL., 2006; ZHANG ET AL., 2011; SPICAROVA ET AL., 2011). Da die TBK1-Knockout-Mäuse ohne einen ausgeschalteten TNF α -R-Hintergrund embryonal letal sind, stellt sich daher die Frage, ob der Knockout von TNF α die Effekte der jeweiligen Versuche verfälschte, und somit für die reduzierte Expression verantwortlich war. Bei Untersuchungen mit IKK ϵ -Knockout-Mäusen konnte nach einer Zymosaninjektion eine verminderte Hyperalgesie bei den Knockout-Tieren im Vergleich mit Wildtyp-Tieren gezeigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die TNF α -Konzentration im Rückenmark der IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen niedriger war als in den Wildtyp-Mäusen (MÖSER ET AL., 2011). Dies lässt darauf schließen, dass TNF α an der verringerten Nozizeption der Knockout-Mäuse beteiligt ist, was sich wiederum auf die Versuche in dieser Arbeit ausgewirkt haben könnte.

Allerdings gibt es in dieser Arbeit auch Unterschiede zwischen den TNF α ^{-/-}- und den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen. MMP-9, ein NF- κ B-abhängiges Gen, wurde in den TNF α ^{-/-}-Tiere 2 h nach Formalininjektion auf mRNA-Ebene nicht exprimiert, wohingegen die TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäuse eine signifikante Hochregulation von MMP-9 im Vergleich zu den Kontroll-Tieren zeigten. Des Weiteren konnte man bei dem NF- κ B-unabhängigen Gen CD68 im Formalinversuch eine signifikante Hemmung in den TNF α ^{-/-}-Tieren beobachten, welche in den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen ausblieb. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TNF α und TBK1 zumindest teilweise über unterschiedliche Signalübertragungswege ablaufen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Effekte auf Veränderungen der TBK1-Expression und -Aktivität beruhen. Es zeigte sich, dass die Expression der TBK1-mRNA nach einer Zymosaninjektion bis zum Ende der Messung nach 16 h stetig zunahm. Ebenso konnte eine rasche Zunahme nach der Injektion mit Zymosan bei der Proteinexpression von TBK1 beobachtet werden. Die Phosphorylierung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da zu wenig Protein dafür gewonnen werden konnte, und die Spezifität des Substrats nicht bekannt war, was zu unspezifischen Bindungen und zu mangelnder Reinheit des Proteins und letztendlich zu einem falsch positiven Ergebnis führte.

Die Ergebnisse der TBK1-Expression zeigten jedoch nach peripherer Formalininjektion bei Wildtyp-Tieren im Vergleich zu nicht injizierten Kontroll-Tieren eine signifikante Zunahme von TBK1-mRNA und -Protein im Rückenmark. Da es im Formalintest zu Sensibilisierungsreaktionen im Rückenmark kommt, könnte diese Regulation ein Hinweis auf die Beteiligung von TBK1 an der zentralen Schmerzverarbeitung bei Entzündungen sein (CODERRE ET AL., 1994; NIEDERBERGER ET AL., 2003; KUNZ ET AL., 2005).

4.3

Nozizeptives Verhalten nach Behandlung mit Zymosan und Celecoxib in Knockout- Mäusen

Bisherige *in-vivo* und *in-vitro* Versuche haben gezeigt, dass TBK1 I κ B α phosphorylieren kann, was zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Des Weiteren konnte bereits mehrfach eine direkte Phosphorylierung von NF- κ Bp65 an Serinrest 536 und 468 durch TBK1 und IKK ϵ nachgewiesen (BUSS ET AL., 2004; ADLI UND BALDWIN, 2006; GATOT ET AL. 2007) und somit eine Beteiligung an der Transaktivierung von NF- κ B gezeigt werden (WIETEK ET AL. 2006; NIEDERBERGER ET AL., 2013). Daher war eine Hypothese dieser Arbeit, dass der antinozizeptive Effekt des Knockouts von TBK1 durch eine verringerte Aktivierung von NF- κ B im zentralen Nervensystem zustande kommt, was zu einer geringeren Expression NF- κ B-abhängiger Gene führen müsste.

Im zentralen Nervensystem kommt es bei entzündlichen Schmerzen zu einer durch NF- κ B-induzierten Hochregulation der Expression von COX-2, iNOS und MMP-9. COX-2 und iNOS haben eine bedeutende Aufgabe bei zentralen Sensibilisierungsprozessen und MMP-9 wird bei chronischen entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis eine wichtige Rolle zugesprochen. (FERREIRA, 1993; GUHRING ET AL., 2000; MADRIGAL ET AL., 2001; VANEGAS UND SCHAIBLE, 2001; KALTSCHMIDT ET AL., 2002; LEE ET AL., 2004; ST-PIERRE ET AL., 2004; KIM ET AL., 2005; SCHMIDTKO ET AL., 2009; BROWN UND NEHER, 2010). Die Expression der schmerzrelevanten COX-2, iNOS und MMP-9 wurden daher als

Marker für das Maß der NF- κ B-Aktivierung herangezogen. Ihre Expression wurde zwei Stunden nach Formalininjektion in die Pfote im Lumbalmark in den Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels quantitativer Realtime RT-PCR untersucht.

Bei der Untersuchung von TBK1-Zielgenen sollte zunächst analysiert werden, inwieweit TBK1 bei der Aktivierung von NF- κ B während inflammatorischer Schmerzen eine Rolle spielt. Für IKK ϵ konnte bereits gezeigt werden, dass Gene aus der NF- κ B Signalkaskade wie COX-2, iNOS und MMP-9 in Abhängigkeit von IKK ϵ reguliert werden (KRAVCHENKO ET AL., 2003; MÖSER ET AL., 2011). Daher lag es nahe, diese Targets auch im Zusammenhang mit TBK1 zu untersuchen.

Um Erkenntnisse darüber zu erhalten, ob und welche Rolle TBK1 bei der Aktivierung von NF- κ B während inflammatorischer Schmerzen spielt, wurden die NF- κ B-abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS nach einer Formalininjektion im Rückenmark von TBK1-Knockout Mäusen im Vergleich mit Kontrolltieren untersucht. Mittels quantitativer Realtime RT-PCR konnte 2 h nach Formalininjektion eine signifikante Hochregulation von COX-2 in den Wildtyp-, den TNF α ^{-/-}- und den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Mäusen beobachtet werden, die jedoch schwächer bei TNF α - und noch deutlich schwächer bei TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren ausgeprägt war. Bei MMP-9 und iNOS zeigten die Wildtyp-Mäuse wie erwartet ebenfalls eine signifikante Hochregulation, die jedoch im Vergleich zu COX-2 nicht so hoch ausfiel. Bei den TNF α ^{-/-}- und den TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-}-Tieren konnte man eine geringe Regulation von MMP-9 bzw. iNOS beobachten. Der Unterschied zwischen den TNF α - und den TBK1-Knockout Mäusen ist jedoch nur minimal.

Von besonderem Interesse ist, dass TBK1 anscheinend eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Expression von COX-2 spielt. Die Expression von COX-2 im Rückenmark wurde eindeutig mit einer Aktivierung von spinalem NF- κ B in Verbindung gebracht (LEE ET AL. 2004) und ist der Hauptverursacher für den Anstieg von PGE₂ im Rückenmark, welches für die Prozessierung von nozizeptiven Stimuli nach peripherer Entzündung verantwortlich ist (VANEGAS AND SCHAIBLE 2001).

Die deutlich verringerte COX-2-Induktion bei TBK1-Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen deutet darauf hin, dass eine Hemmung der TBK1 über die Beeinflussung der COX-2 Produktion zu antinozizeptiven Effekten führen könnte. Trotzdem ist eine signifikant erhöhte COX-2-Expression in TBK1-Knockout Mäusen nachweisbar, was sich deutlich von den Erkenntnissen bei $IKK\epsilon^{-/-}$ Tieren unterscheidet (MÖSER ET AL., 2011). Aus diesem Grund wurde die mechanische Hyperalgesie im Zymosan-Modell zusätzlich nach Behandlung mit dem selektiven COX-2-Hemmstoff Celecoxib bestimmt. Die selektive Hemmung von Celecoxib ist darauf begründet, dass diese Substanz aufgrund ihrer Struktur eine höhere Wechselwirkung mit der Bindungstasche von COX-2 aufweist als mit der von COX-1. Durch die hohe Stabilität des Inhibitor-Enzym-Komplexes kann der Inhibitor nur langsam wieder aus der Bindungstasche diffundieren (SIMMONS ET AL., 2004). Für Coxibe wie Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib und Lumiracoxib konnte u.a. eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden, die auf die COX-2 Expression Einfluss nehmen kann und zu den analgetischen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Celecoxib beiträgt (GEISLINGER ET AL., 1994; NIEDERBERGER ET AL., 2001; TEGEDER ET AL., 2001; NIEDERBERGER ET AL., 2003; NIEDERBERGER ET AL., 2006).

In Wildtyp-Tieren konnte, wie erwartet, durch Celecoxib eine deutlich analgetische Wirkung erzielt werden, was auch schon in anderen Studien gezeigt werden konnte (WINNALL ET AL., 2008; RIMON ET AL., 2010). Bei TNF α Knockout Kontrollen war dieser Effekt geringer, was damit zusammenhängen könnte, dass die TNF α -Deletion bereits per se tendenziell zu antinozizeptiven Effekte führt, die zumindest teilweise über COX-2 vermittelt werden (FUNAKOSHITAGO., 2008). TBK1-Mäuse zeigten im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle eine signifikante Reduktion der nozizeptiven Antwort, die durch Celecoxib nur geringfügig, aber doch verstärkt werden konnte, was darauf hindeutet, dass ein Teil der TBK1-vermittelten Effekte über COX-2 vermittelt wird, aber noch weitere Signalwege daran beteiligt sein müssen.

4.4

Regulation NF- κ B-abhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin in Knockout Mäusen

Die Ergebnisse der mRNA Analysen und der Verhaltenstest mit Celecoxib haben gezeigt, dass COX-2 eine Rolle in der TBK1-vermittelten Nozizeption spielt. Da jedoch COX-2 durch die Deletion von TBK1 nicht vollständig herunterreguliert wird, ist es wahrscheinlich, dass weitere, bisher nicht bekannte Gene an der TBK1-vermittelten Signalübertragung beteiligt sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden mittels mRNA-Microarray Gene gesucht, die involviert sein könnten. Darüber hinaus wurden bekannte NF- κ B-unabhängige Gene getestet, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei Entzündungen spielen. Durch den Array wurden die entzündungsrelevanten Gene Adora_{2A} und MIF ermittelt, die nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin in TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ -Mäusen unterschiedlich reguliert wurden.

Das Nukleosid Adenosin ist im Körper weit verbreitet und spielt unter Normalbedingungen, aber besonders in Stresssituationen eine wichtige modulatorische Rolle beispielsweise im zentralen Nervensystem, im Immunsystem, und generell bei der Regulierung des Zellzyklus (FREDHOLM ET AL., 2001; SCHULTE UND FREDHOLM, 2003; STAMP ET AL., 2012). Adenosin kommt im Wesentlichen in niedrigen Konzentrationen außerhalb der Zelle vor, kann aber in Folge von metabolischen Störungen dramatisch ansteigen. Unter anderem entfaltet es seine Effekte als physiologischer Agonist an membranständigen Rezeptorproteinen, den Adenosin-Rezeptoren (FREDHOLM ET AL., 2001). Bei den Adenosin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie werden anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen, die Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, unterteilt (PALMER ET AL., 1995). Alle Adenosin-Rezeptor-Subtypen können über ein G-Protein an die Adenylatcyclase als Effektorprotein gekoppelt sein, aber sie besitzen z.T. gegensätzliche Wirkungen. A_{2A}-Rezeptoren bewirken über die Stimulation der Adenylatcyclase einen Anstieg des cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Spiegels (RALEVIC UND BURNSTOCK, 1998), welcher die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α ,

IFN γ oder IL-1 β inhibiert. Der A_{2A}-Rezeptor wird auf neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten exprimiert und hat einen immunsuppressiven Effekt durch Regulation der Immunantwort auf Erreger von außen (SALMON UND CRONSTEIN, 1990; CRONSTEIN ET AL., 1995; STAMP ET AL., 2012). Die Hochregulation von Adora_{2A} bei TBK1-Knockout Mäusen auf mRNA-Ebene könnte daher zu der verringerten Nozizeption bei diesen Tieren beitragen. Diese Hypothese muss jedoch aufgrund der fehlenden Regulation auf Proteinebene mit Vorsicht betrachtet und durch weitere Schmerzmodelle in der Zukunft untermauert werden.

MIF wurde 1966 als lösliches Protein im Überstand von aktivierten Lymphozyten entdeckt, der die natürliche Bewegung von Makrophagen hemmte und deren Adhäsions- und Phagozytoseeigenschaften steigerte (DAVID, 1966; BLOOM UND BENNETT, 1966). MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das z.B. die Induktion von TNF α herbeiführen kann (LEECH, 1998; MIKULOWSKA, 1997; MORAND ET AL., 2002; JAHNS, 2010). MIF liegt gespeichert in intrazellulären Vesikeln vor und wird auf einen Stimulus wie Lipopolysaccharid (LPS) hin, ausgeschüttet. Darüber hinaus zirkuliert MIF im Blutstrom von Menschen und Nagetieren (METZ UND BUCALA, 1997). Diese beiden Merkmale unterscheiden MIF von anderen proinflammatorischen Zytokinen, die auf einen Reiz hin erst synthetisiert werden müssen und nicht konstitutiv vorliegen (BAUGH UND BUCALA, 2002). Eine der wichtigsten Quellen für MIF sind die Makrophagen. MIF wird aus ihnen nach Stimulierung durch z.B. LPS oder auch durch TNF α und IFN- γ , ausgeschüttet (CALANDRA ET AL., 1994; CALANDRA ET AL., 1998). Nach seiner Freisetzung wirkt MIF durch die Stimulierung der Ausschüttung vieler entzündungsfördernder Faktoren wie z.B. TNF α , IL-6 oder Stickoxid (NO) als klassisches proinflammatorisches Zytokin (BERNHAGEN ET AL., 1994; CALANDRA ET AL., 1995; MITCHELL ET AL., 1999). Darüber hinaus steigert MIF die Zellproliferationsrate von Lymphozyten und erhöht die Phagozytoserate von Makrophagen (NATHAN ET AL., 1971; BACHER ET AL., 1996). Außerdem wird durch MIF die Apoptose von Makrophagen und Neutrophilen gehemmt, was zusätzlich zu einer verstärkten Immunantwort beiträgt (BAUMANN ET AL., 2003; MITCHELL ET AL., 2002). In einem Arthritis-Rattenmodell konnte eine Korrelation der MIF-Konzentration in der Gelenksflüssigkeit mit dem Grad der Entzündung nachgewiesen werden. Durch spezifische Antikörper wurde MIF neutralisiert,

was zu einem signifikanten Rückgang der zellulären Entzündungsreaktion führte (LEECH ET AL., 1998). Die erhöhte MIF-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Tieren korreliert in diesem Fall also nicht mit der Hemmung des Schmerzverhaltens, so dass MIF als Regulatorprotein eher auszuschließen ist.

4.5

Regulation NF- κ B-unabhängiger Gene nach Behandlung mit Formalin in Knockout Mäusen

Weitere Erkenntnisse der TBK1-abhängigen Signalübertragung sollten die Regulationen der entzündungsrelevanten, aber NF- κ B unabhängigen Gene Akt1, c-Fos und CD68 nach einer nozizeptiven Stimulation mit Formalin in $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - bzw. $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen liefern. Alle Gene spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem, bei Entzündungen, der Zellproliferation und damit verbundene Krankheiten wie z.B. Krebs (LIN ET AL., 2005; MANNING UND CANTLEY, 2007).

Akt, auch Protein-Kinase B genannt, ist eine Serin/Threonin-Kinase und hat eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen wichtigen zellulären Vorgängen. Akt besteht aus mehreren Mitgliedern, wobei der Fokus in dieser Arbeit auf Akt1 lag. Abwandlungen der Akt1-Aktivierungen führen zu pathophysiologischen Veränderungen wie Typ-2-Diabetes oder Krebs (MANNING UND CANTLEY, 2007). Akt1 kann Signalwege der Proteinsynthese induzieren und spielt daher eine Schlüsselrolle in den zellulären Signalwegen. Mausmodelle mit einer Akt1-Deletion weisen eine Wachstumshemmung und eine gesteigerte spontane Apoptose in bestimmten Geweben, wie z.B. der Hoden oder dem Thymus, auf (CHEN ET AL., 2001). Akt1 reguliert den Zellbestand und den Zellstoffwechsel durch Bindung und Regulierung vieler nachgeschalteter Effektoren, wie z.B. NF- κ B (SONG ET AL., 2005). Durch die Regulierung von I κ B-Kinasen kann Akt1 NF- κ B aktivieren, was in der Transkription bestimmter Gene resultiert, die für das Überleben der Zelle wichtig sind

(FAISSNER ET AL., 2006). Neben anderen Kinasen kann auch TBK1 Akt1 direkt aktivieren, und somit Zellvorgänge, die Zellwachstum und -proliferation oder den Zellstoffwechsel regulieren, beeinflussen (JOUNG ET AL., 2011; OU ET AL., 2011; XIE ET AL., 2011). Nachdem TLR3 und TLR4 durch poly(I:C) und LPS stimuliert wurden, folgt die Phosphorylierung von Akt1 durch TBK1 an Ser473. Die Assoziation von TBK1 und Akt1 wurde in Makrophagen beobachtet, wobei TBK1 die Phosphorylierung von Akt1 verstärkt und ein Knockdown der TBK1-Expression die poly(I:C) und LPS induzierte Akt1-Phosphorylierung reduziert (JOUNG ET AL., 2011). Beide Kinasen, TBK1 und Akt1, wirken bei der anschließenden Induzierung der Aktivierung von IRF3 zusammen (JOUNG ET AL., 2011; MAHAJAN UND MAHAJAN, 2012).

C-Fos ist bedeutend bei zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose (DELGHANDI ET AL., 2005). Änderungen in der Regulation von c-Fos können immunologische, das Skelett betreffende oder neurologische Defekte hervorrufen oder auch bei der Tumorentwicklung mitwirken (WAGNER, 2010). Außerdem reguliert c-Fos die Freisetzung von Zytokinen bei inflammatorischen Krankheiten und ist ein wichtiger Marker für nozizeptive Sensibilisierungsmechanismen im Rückenmark (TU ET AL., 2013). CD68 ist ein intrazelluläres Glykoprotein von 110 kD, das in erster Linie mit den zytoplasmatischen Granula und in einem geringeren Maß mit den Membranen von Makrophagen assoziiert ist. Marker für das CD68-Antigen werden hauptsächlich zur Identifizierung von Makrophagen herangezogen, v.a. um normale, wie auch pathologische Makrophagen kenntlich zu machen. Atherosklerotische Läsionen beispielsweise zeigten eine positive Reaktion mit dem CD68-Antikörper (COJOCARU ET AL., 2012). Allerdings ist CD68 auch in Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und großen Lymphozyten nachweisbar. CD68 hat eine wichtige Aufgabe bei der Entwicklung von Antigenen und bei der phagozytischen Rolle der Gewebe-Makrophagen, unter anderem bei Zell-Pathogen Interaktionen (STROJNIK ET AL., 2009).

Ein starker Effekt hat sich nur bei der Expression von c-Fos manifestiert. Hier ist nach entzündlicher Stimulation eine deutliche statistisch signifikante Hochregulation in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ Mäusen zu erkennen, die jedoch in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tieren geringer ausfiel.

Interessant war, dass c-Fos in den Wildtypen genauso stark hochreguliert wurde wie in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die verminderte c-Fos-Expression der $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tiere hauptsächlich über einen weiteren TBK1-vermittelten Signalweg gesteuert wird. Durch die MAPK-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*) kann möglicherweise der starke Effekt von c-Fos Einfluss auf die Entzündungs- und Schmerzreaktion nehmen. In zahlreichen Studien wurde eine Korrelation zwischen schmerzhaften Reizen und einem Anstieg der Expression des c-Fos-Proteins in den zugehörigen Teilen des Rückenmarks nachgewiesen. Zellulärer Stress oder die Stimulierung des MAP-Kinase-Signalwegs durch Bindung des Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) an seinen Rezeptor aktivieren die de-novo-Expression von „immediate early genes“, zu deren Hauptvertretern unter anderem c-Fos gehört (HUNT ET AL., 1987; KARIN ET AL. 1997; WAGNER, 2010; TU ET AL., 2013). Darüber hinaus wirkt der MAPK-Signalweg über Phosphorylierung auf zytosolische Enzymaktivitäten und Transkriptionsfaktoren ein (XIAO ET AL., 2002). Die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos kann im Rückenmark in recht kurzer Zeit (1-2 h) durch Phosphorylierung durch die MAPK hochreguliert werden (KARIN ET AL., 1997). Je schädigender und je schmerzhafter ein peripherer Reiz ist, desto mehr c-Fos-Protein wird gebildet, d.h. die Menge an c-Fos-Protein im Hinterhorn des Rückenmarkes steigt mit der Intensität des einwirkenden thermischen, mechanischen oder chemischen Stimulus an (MESSERSMITH ET AL., 1998). Die c-Fos-Expression wird daher als wichtiger Marker für nozizeptive Sensibilisierungsmechanismen im Rückenmark angesehen.

4.6

Pharmakologische Ansätze zur TBK1-Hemmung

Zusätzlich zu TBK-Knockout Mäusen wurde in früheren Versuchen ein antinozizeptiver Effekt des TBK1/IKK ϵ Inhibitors BX-795 beobachtet (MÖSER ET AL., 2011). BX-795 hemmt die Autophosphorylierung von überexprimiertem TBK1 und IKK ϵ an Ser172 und folglich die Aktivierung dieser Proteinkinasen.

Des Weiteren wird die Einwanderung von IRF3 in den Zellkern als auch die Transkription IRF3-abhängiger Gene inhibiert. Folglich findet in stimulierten Makrophagen keine Synthese von IFN β statt. BX-795 hat jedoch in *in-vitro* Versuchen keinen Einfluss auf den klassischen NF κ B-Signalweg (CLARK ET AL., 2009). In Zellkulturversuchen sollten nun weitere Erkenntnisse über die von BX-795 modulierten Signalübertragungswege gewonnen werden.

Für die Versuche wurden RAW 264.7 Makrophagen mit LPS mit und ohne Zugabe von BX-795 behandelt. In RAW 264.7 Maus-Makrophagen konnten nach Behandlung mit BX-795 kaum Unterschiede in der Expression von TBK1, IKK ϵ und I κ B α beobachtet werden. Auffällig ist allerdings die Regulation bei IRF3. Es wurde nicht nur eine Phosphorylierung von IRF3 durch LPS erwartet, sondern vor allem eine Hemmung der Phosphorylierung und die damit verbundene verminderte IRF3-Expression nach Zugabe des Inhibitors. Der Inhibitor BX-795 hemmt IKK ϵ und TBK1 und somit folglich die Phosphorylierung und die Translokation von IRF3 in den Nukleus (SHIMADA ET AL., 1999; CLARK ET AL., 2009).

Hier kam es jedoch nach BX-795 Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der IRF-3 Expression. Hier bleibt jedoch zu beachten, dass Proteinlysate aus der gesamten Zelle und keine ausschließlichen Kernextrakte verwendet wurden, und dass die Effekte erst nach 8 und 24 Stunden auftraten und so möglicherweise einen Rückkopplungsmechanismus darstellen. Um jedoch eine eindeutige Aussage treffen zu können, ist es notwendig, noch weitere Versuche durchzuführen. Zum Beispiel könnte man durch eine spezifische siRNA eine gezielte Abschaltung eines IRF3-abhängigen Gens hervorrufen und somit die Expression des von ihm codierten Proteins näher betrachten. Durch eine weitere Methode, die Überexpression, könnte eine erhöhte Synthese des gesuchten Proteins erzeugt werden, welches durch dieses IRF3-abhängige Gen codiert wird und somit näher auf seine Regulierung hin analysiert werden.

Ableitend aus den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich, dass die TBK1-Hemmung grundsätzlich ein hoffnungsvoller pharmakologischer Ansatz ist, da dadurch viele Signalwege in der Schmerzentstehung und -verarbeitung beeinflusst werden könnten und es somit zu antinozizeptiven Reaktionen kommen könnte bzw. zu dauerhaften antiinflammatorischen Reaktionen. Da die

TBK1-Knockout-Mäuse ohne einen ausgeschalteten TNF α -R-Hintergrund embryonal letal sind, stellt sich die Frage, ob der Knockout von TNF α die Effekte der jeweiligen Versuche verfälschte, und somit für die reduzierte Expression verantwortlich sein könnte.

Um die eventuellen fälschlichen Effekte durch den TNF α -Knockout zu unterbinden, wäre ein spezifischer Inhibitor für TBK1 sehr von Vorteil. Neue Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass der Inhibitor Amlexanox, welcher in Japan und den USA für die Behandlung von Asthama und Apthen schon zugelassenen ist, TBK1 und IKK ϵ inhibiert. Amlexanox ist ein entzündungshemmender und antiallergisch wirkender Arzneistoff aus der Klasse der Immunmodulatoren. Es wird vermutet, dass Amlexanox an ganz zentraler Stelle in das pathogenetische Geschehen eingreift. Der Wirkstoff blockiert die beiden Gene, unter deren Einfluss es bei sehr fettreicher Ernährung zu Entzündungsreaktionen in Fett- und Leberzellen kommt. Entzündungsreaktionen scheinen auch eine wichtige Rolle bei der metabolischen Gegenregulation zu spielen, die eine Gewichtsabnahme bei Übergewicht schwierig macht. Diese Gegenregulation lässt sich unterdrücken, wenn man IKK ϵ und TBK1 ausschaltet und folglich den Transkriptionsfaktor NF- κ B blockiert, der das Ablesen proinflammatorischer Gene steuert. Dies konnte am Tiermodell der Adipositas diverse gezeigt werden, bei dem schlanke Mäuse unter Amlexanox trotz fettreicher Nahrung nicht zunahmen. Des Weiteren kam es bei adipösen Mäusen zur Gewichtsabnahme und die Insulinresistenz ging zurück (REILLY ET AL, 2013).

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten, Apoptose und Entzündungen sowie bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen. Ein pharmakologischer Eingriff in die NF- κ B-Aktivierungskaskade könnte daher eine Schmerzhemmung bewirken und so Ansätze für die Entwicklung neuer Therapien für pathophysiologische Schmerzen liefern. Verschiedene IKKs regulieren die Aktivität von NF- κ B über die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B oder über die direkte Phosphorylierung von NF- κ B. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TBK1 bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung näher untersucht. TBK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der angeborenen Immunantwort spielt, v.a. bei viralen Infektionen und anderen Pathogen-assoziierten Entzündungen. TBK1 ist Bestandteil der IKK-Familie, welche die Expression von Typ-I Interferone induziert und den NF- κ B Signalweg beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass TBK1 in schmerzrelevanten Geweben des zentralen und des peripheren Nervensystems der Maus konstitutiv exprimiert wird. Im Rückenmark konnte die Lokalisation von TBK1 vor allem im Dorsalhorn, wo die Umschaltung von nozizeptiven Afferenzen aus der Peripherie auf zentrale Bahnen stattfindet, nachgewiesen werden, wie auch in kleinen nozizeptiven Neuronen in den Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia (DRGs)). Nach peripherer entzündlich nozizeptiver Stimulation mit Formalin oder Zymosan kam es im Lumbalmark zu einem signifikanten Anstieg der TBK1-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Diese Beobachtungen machten eine Beteiligung von TBK1 an der Prozessierung von Schmerz sehr wahrscheinlich. Um die Rolle von TBK1 während der Schmerzentstehung und -verarbeitung besser beurteilen zu können wurde das Verhalten von TBK1-defizienten Mäusen, allerdings mit einem TNF α -R^{-/-}-Background, in inflammatorischen Schmerzmodellen charakterisiert. Mäuse, die nur eine TBK1-Deletion aufweisen sind embryonal letal. Es konnte gezeigt werden, dass TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} Mäuse zu einem signifikant verringerten nozizeptiven Verhalten im Formalintest und einer Hemmung der mechanischen Hyperalgesie nach Zymosaninjektion im

Vergleich zu $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - bzw. Wildtyp-Mäusen führte. Das verringerte nozizeptive Verhalten der $\text{TNF}\alpha/\text{TBK1}$ -defizienten Mäuse im Formalintest ging unter anderem mit einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung im Rückenmark einher. Darüber hinaus konnte zwar eine signifikant verringerte mRNA-Expression des NF- κ B-abhängigen Gens Cyclooxygenase-2 (COX-2), das an der Regulation von Entzündungsschmerzen beteiligt ist, bei TBK1-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im Rückenmark festgestellt werden, jedoch ist eine signifikant erhöhte Expression von COX-2 in TBK1-Knockout Mäusen nachweisbar. Aus diesem Grund wurde die mechanische Hyperalgesie im Zymosan-Modell zusätzlich nach Behandlung mit dem selektiven COX-2-Hemmstoff Celecoxib bestimmt. TBK1-Knockout Mäuse zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle eine signifikante Reduktion der nozizeptiven Antwort, die durch Celecoxib nur geringfügig, aber doch verstärkt werden konnte, was darauf hindeutet, dass ein Teil der TBK1-vermittelten Effekte über COX-2 geregelt wird, aber noch weitere Signalwege daran beteiligt sein müssen. Bei weiteren Untersuchungen konnte Adora_{2A} als ein Gen identifiziert werden, das über TBK1 reguliert wird und als Entzündungshemmer wirkt. Weitere Erkenntnisse der TBK1-abhängigen Signalübertragung lieferte auch das entzündungsrelevante NF- κ B-unabhängige Gen c-Fos, das nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin eine statistisch signifikante Hochregulation in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ Mäusen zeigte, die jedoch geringer ausfiel als in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypen. Da c-Fos in den Wildtypen genauso stark hochreguliert wurde wie in den $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen, gibt dies einen Hinweis darauf, dass die verminderte c-Fos-Expression der $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Tiere hauptsächlich über einen weiteren TBK1-vermittelten Signalweg gesteuert wird. Möglicherweise durch die MAPK-Kaskade kann der starke Effekt von c-Fos Einfluss auf die Entzündungs- und Schmerzreaktion nehmen, da MAPK in die Kontrolle der c-Fos-Expression involviert ist und auch mehrfach mit nozizeptiven Antworten in Verbindung gebracht wurde.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich somit schlussfolgern, dass TBK1 an der Schmerzentstehung und -verarbeitung bei Entzündungen beteiligt zu sein scheint. Dabei wirkt TBK1 sowohl über NF- κ B-abhängige als auch NF- κ B-unabhängige Mechanismen. In diesem Punkt unterscheidet sich TBK1 von

IKK ϵ , welches bei Schmerzen hauptsächlich über NF- κ B-abhängige Signalwege wirkt. Folglich stellt sich die Frage, ob TBK1 tatsächlich mit IKK ϵ im Komplex agiert oder ob die beiden Proteine eventuell unabhängig voneinander wirken. Um dies zu klären, sind jedoch weitere Studien notwendig.

Abstract

The transcription factor NF- κ B plays an important role in the regulation of immune response apoptosis and inflammation. It is further influencing the development as well as the processing of pain. A pharmacological encroachment upon the NF- κ B-activation cascade could cause an inhibition of pain and thus form the basis for the development of new therapies against pathophysiologically indicated. Different IKKs are regulating the activity of NF- κ B through phosphorylation of the inhibitory protein I κ B or else through direct phosphorylation of NF- κ B. The thesis presented examines the influence of TBK1 on the development as well as the processing of pain. TBK1 as a serine/threonine kinase plays an important role in the innate immune response and other pathogen associated inflammations. Being part of the IKK family it induces the expression of type-I interferons and affects the NF- κ B signal transduction pathway. Evidence was found stating that TBK1 is constitutively expressed in the pain relevant tissues of the central and peripheral nervous system of the mouse. The localization of TBK1 in the spinal cord could be stated particularly in the dorsal horn, where the change-over of nociceptive afferences from the periphery takes place on central clearing, as also in small nociceptive neurons in the dorsal root ganglia. A peripheral inflammatory nociceptive stimulation with Formalin or Zymosan in the spinal cord resulted a significant increase of the TBK1-expression both on mRNA- and protein level. These observations suggest a participation of TBK1 in the processing of pain. For a more detailed analysis of the role of TBK1 during the pain emergence and -processing, the behavior of TBK1-deficient mice with a TNF α -R $^{-/-}$ -background in inflammatory pain models has been closely examined. Mice which solely exhibit a TBK1-deletion, are lethally embryonic. It could be proved that TNF α $^{-/-}$

$TBK1^{-/-}$ -mice show a significantly reduced nociceptive behavior in the formalin test and an inhibition in the mechanical hyperalgesia after zymosan injection compared to $TNF\alpha^{-/-}$ and wildtype-mice. The reduced nociceptive behavior of the $TNF\alpha/TBK1$ -deficient mice in the formalin test was accompanied - among other things - by an inhibition of the NF- κ B-activation in the spinal cord. What could also be identified in the spinal cord is a significant reduced mRNA-expression of the NF- κ B-dependent gene Cyclooxygenase-2 (COX-2), which is involved in the regulation of inflammation pain. The obviously reduced COX-2-induction in $TBK1$ -knockout mice compared to wild-types leads to the assumption that an inhibition of the $TBK1$ could lead to antinociceptive effects via an influence of the COX-2 production. Nevertheless a significantly increased COX-2 expression has also been proved in $TBK1$ -knockout mice which is why the mechanical hyperalgesia were determined additionally in the zymosan-model after treatment with the selective COX-2 inhibitor Celecoxib. $TBK1$ -knockout mice showed in comparison to wildtypes a significant reduction of the nociceptive answer strengthened by Celecoxib. This leads to the assumption that a part of the $TBK1$ -mediated effects is obtained by COX-2, yet further pathways must be considered as relevant here. In further investigations $Adora_{2A}$ could be identified as a further gene involved in the $TBK1$ -mediated signal transmission, which has an anti-inflammatory effect. Further knowledge about the $TBK1$ -dependent signal submission was delivered by the inflammation-relevant NF- κ B-independent gene c-Fos, causing a significant upregulation within $TNF\alpha^{-/-}$ as well as $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -mice as a response to a nociceptive formalin stimulation. However this upregulation within the mice mentioned was far less significant within $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -types. C-Fos in wildtypes was highregulated to just the same extend as it was within $TNF\alpha^{-/-}$ -mice, leading to the belief that the decreased c-Fos-expression in $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -animals is mainly controlled over a further $TBK1$ -mediated pathway. The strong effect of c-Fos can potentially influence the inflammation and pain reaction through the MAPK-cascade, because the MAPK is involved into control of the c-Fos-expression and is associated with nociceptive responses.

On the basis of the presented data the conclusion can be drawn that TBK1 seems to be involved in pain emergence and -processing in inflammations and works both over NF- κ B-dependent and -independent mechanisms. Thus it differs from IKK ϵ which is mainly operating in pain about NF- κ B-dependent mechanisms. The question of whether TBK1 is actually operating in connection with IKK ϵ or whether the two proteins are acting independently arises. This remains to be answered in the course of further studies on that subject.

6. Literaturverzeichnis

Adli M, Baldwin AS. (2006). *IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation*. J Biol Chem. **281**(37):26976-84.

Ahn KS, Aggarwal BB. (2005). *Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals*. Ann N Y Acad Sci. **1056**:218-33.

Akira S, Kishimoto T. (1997). *NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation*. Adv Immunol. **65**:1-46.

Akira, S., S. Uematsu, O. Takeuchi. (2006). *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell. **124**(4):783-801.

Arbabi, S., Maier, R.V. (2002). *Mitogen-activated protein kinases*. Crit.Care Med. **30**(1 Supp):S74-S79.

Arikawa M, Kakinuma Y, Handa T, Yamasaki F, Sato T. (2011). *Donepezil, anti-Alzheimer's disease drug, prevents cardiac rupture during acute phase of myocardial infarction in mice*. PLoS One. **6**(7):e20629. doi: 10.1371/ journal.pone.0020629.

Atreya I, Atreya R, Neurath MF. (2008). *NF-kappaB in inflammatory bowel disease*. J Intern Med. **263**(6):591-6. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01953.x.

Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM. (1995). *Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes*. Proc Natl Acad Sci USA. **92**(25):11657-61.

Au WC, Yeow WS, Pitha PM. (2001). *Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3*. Virology. **280**(2):273-82.

Aupperle, K.R., Yamanishi, Y., Bennett, B.L., Mercurio, F., Boyle, D.L., Firestein, G.S. (2001). *Expression and regulation of inducible IkappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes*. Cell Immunol. **214**(1):54-59.

Baba, H., Kohno, T., Moore, K.A., Woolf, C.J. (2001). *Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2*. J Neurosci. **21**(5):1750-1756.

- Baby J, Pickering BF, Vashisht Gopal YN, Van Dyke MW. (2007). *Constitutive and inducible nuclear factor-kappaB in immortalized normal human bronchial epithelial and non-small cell lung cancer cell lines*. Cancer Lett. **255**(1):85-94.
- Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. (1996). *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci USA. **93**(15):7849-54.
- Baldwin AS Jr. (1996). *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol. **14**:649-83.
- Ballou, L.R., Botting, R.M., Goorha, S., Zhang, J., Vane, J.R. (2000). *Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci USA. **97**(18):10272-10276.
- Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B. (1997). *Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells*. J Clin Invest. **100**(12):2961-9.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell. **139**, 267-284.
- Barnes PJ, Karin M. (1997). *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N Engl J Med. **336**(15):1066-71.
- Barnes B, Lubyova B, Pitha PM. (2002). *On the role of IRF in host defense*. J Interferon Cytokine Res. **22**(1):59-71.
- Baugh JA, Bucala R. (2002). *Macrophage migration inhibitory factor*. Crit Care Med. **30**(1 Supp):S27-S35.
- Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. (2003). *Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway*. FASEB J. **17**(15):2221-30.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D. (1995). *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. Nature. **376**(6536):167-170.

- Beiche, F., Klein, T., Nusing, R., Neuhuber, W., Goppelt-Struebe, M. (1998). *Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord*. J Neuroimmunol. **89**(1-2):26-34.
- Belvin, M.P., K.V. Anderson. (1996). *A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway*. Annu Rev Cell Dev Biol. **12**:393-416.
- Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. (1994). *Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF)*. Biochemistry. **33**(47):14144-55.
- Bian, K., Ke, Y., Kamisaki, Y., Murad, F. (2006). *Proteomic modification by nitric oxide*. J Pharmacol Sci. **101**(4):271-279.
- Bloom BR, Bennett B. (1966). *Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity*. Science. **153**(3731):80-2.
- Bonetti B, Stegagno C, Cannella B, Rizzuto N, Moretto G, Raine CS. (1999). *Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology*. Am J Pathol. **155**(5):1433-8.
- Bonizzi G, Karin M. (2004). *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol. **25**(6):280-8.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie´, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W.J., Elia AJ, Shillinglaw W, Mak TW, Cao Z, Yeh WC. (2000). *Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription*. EMBO J. **19**(18):4976-85.
- Bradford MM. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. **72**:248-54.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., Bethea, J.R. (2005). *Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury*. J Exp Med. **202**(1):145-156.
- Brivanlou AH, Darnell JE Jr. (2002). *Signal transduction and the control of gene expression*. Science. **295**(5556):813-8.

- Brodsky, I.E., D. Monack. (2009). *NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens*. *Semin Immunol.* **21**(4):199-207.
- Brown GC, Neher JJ. (2010). Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* **41**(2-3):242-7. doi: 10.1007/s12035-010-8105-9.
- Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. (2004). *Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription*. *J Biol Chem.* **279**(53):55633-43.
- Caillaud A, Hovanessian AG, Levy DE, Marié IJ. (2005). *Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7*. *J Biol Chem.* **280**(18):17671-7.
- Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. (1994). *The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor*. *J Exp Med.* **179**(6):1895-902.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. (1995). *MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production*. *Nature.* **377**(6544):68-71.
- Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. (1998). *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**(19):11383-8.
- Cervero, F., Laird, J. (1991). *One Pain or Many Pains?* *News Physiol Sci* 6, 268-273.
- Chan CF, Sun WZ, Lin JK, Lin-Shiau SY. (2000). *Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia*. *Eur J Pharmacol.* **402**(1-2):61-8.
- Chang, L., Karin, M. (2001). *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature.* **410**(6824):37-40.

Chau TL, Gioia R, Gatot JS, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle JP, O'Neill L, Beyaert R, Piette J, Chariot A. (2008). *Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated?* Trends Biochem Sci. **33**(4):171-80.

Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. (2001). *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene.* Genes Dev. **15**(17):2203-8.

Civas, A., Genin, P., Morin, P., Lin, R., Hiscott, J. (2006). *Promoter organization of the interferon-A genes differentially affects virus-induced expression and responsiveness to TBK1 and IKKepsilon.* J Biol Chem. **281**(8):4856-4866.

Clark K, Plater L, Peggie M, Cohen P. (2009). *Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation.* J Biol Chem. **284**(21):14136-46. doi: 10.1074/jbc.M109.000414.

Clark K, Peggie M, Plater L, Sorcek RJ, Young ER, Madwed JB, Hough J, Mclver EG, Cohen P. (2011). *Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity.* Biochem J. **434**(1):93-104. doi: 10.1042/BJ20101701.

Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S., Cohen, P. (2011). *The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**(41):17093-8. doi: 10.1073/pnas.1114194108.

Clément JF, Meloche S, Servant MJ. (2008). *The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis.* Cell Res. **18**(9):889-99.

Clément, JF., Bibeau-Poirier, A., Gravel, SP., Grandvaux, N., Bonneil, E., Thibault, P., Meloche, S., Servant, MJ. (2008). *Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association.* Journal of virology. **82**:3984-96.

Coderre, T.J., Melzack, R. (1992). *The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury.* J Neurosci. **12**(9): 3665-3670.

Coderre, T.J., Yashpal, K., Henry, J.L. (1994). *Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test*. Neuroreport. **5**(11):1337-1340.

Cojocaru E, Trandafirescu M, Leon M, Cotuțiu C, Foia L. (2012). Immunohistochemical expression of anti-CD68 antibody in atherosclerotic plaque. Rom J Morphol Embryol. **53**(1):61-6.

Cronstein BN, Naime D, Firestein G. (1995). *The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine*. Arthritis Rheum. **38**(8):1040-5.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (2005). *A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice*. Proc Natl Acad Sci USA. **102**(5):1755-1760.

David JR. (1966). *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. Proc Natl Acad Sci USA. **56**(1):72-7.

Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. (2000). *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor*. Clin Pharmacokinet. **38**(3):225-42.

Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. (2005). *The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells*. Cell Signal. **17**(11):1343-51.

Deng GM, Verdrengh M, Liu ZQ, Tarkowski A. (2000). *The major role of macrophages and their product tumor necrosis factor alpha in the induction of arthritis triggered by bacterial DNA containing CpG motifs*. Arthritis Rheum. **43**(10):2283-9. PMID: 11037888.

Doyle SL, Jefferies CA, O'Neill LA. (2005). *Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide*. J Biol Chem. **280**(25):23496-501.

Dubuisson, D., 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**(2):161-174.

Edward G. McIver, Justin Bryans, Kristian Birchall, Jasveen Chugh, Thomas Drake, Stephen J. Lewis, Joanne Osborne, Ela Smiljanic-Hurley, William Tsang, Ahmad Kamal, Alison Levy, Michelle Newmana, Debra Taylor, J. Simon. Arthur, Kristopher Clark Philip Cohen. (2012). *Synthesis and structure–activity relationships of a novel series of pyrimidines as potent inhibitors of TBK1/IKKe kinases*. *Bioorg Med Chem Lett*. **22**(23):7169-73. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.09.063.

Eroshkin A, Mushegian A. (1999). *Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens*. *J Mol Med (Berl)*. **77**(5):403-5.

Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J. (2006). *DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues*. *Adv Exp Med Biol*. **557**:25-53.

Ferreira, S.H. (1993). *The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics*. *Drugs*. 46 Suppl **1**:1-9.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., Maniatis, T. (2003). *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. *Nat Immunol*. **4**(5):491-496.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2001). *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. *Pharmacol Rev*. **53**(4):527-52.

Fu X, Zhu ZH, Wang YQ, Wu GC. (2007). *Regulation of proinflammatory cytokines gene expression by nociceptin/orphanin FQ in the spinal cord and the cultured astrocytes*. *Neuroscience*. **144**(1):275-85.

Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Yang ZQ, Bethea JR. (2007). *Transgenic glial nuclear factor-kappa B inhibition decreases formalin pain in mice*. *Neuroreport*. **18**(7):713-7.

Funakoshi-Tago M, Shimizu T, Tago K, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, Kasahara T. (2008). *Celecoxib potently inhibits TNFalpha-induced nuclear translocation and activation of NF-kappaB*. *Biochem Pharmacol*. **76**(5):662-71. doi: 10.1016/j.bcp.2008.06.015.

Gabriel, S.E., Jaakkimainen, L., Bombardier, C. (1991). *Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis*. *Ann Intern Med*. **115**(10):787-796.

Gatot JS, Gioia R, Chau TL, Patrascu F, Warnier M, Close P, Chapelle JP, Muraille E, Brown K, Siebenlist U, Piette J, Dejardin E, Chariot A. (2007). *Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF*. J Biol Chem. **282**(43):31131-46.

Geisslinger, G., Ferreira, S.H., Menzel, S., Schlott, D., Brune, K. (1994). *Antinociceptive actions of R(-)-flurbiprofen-a non-cyclooxygenase inhibiting 2-arylpropionic acid-in rats*. Life Sci. **54**(10):PL173-177.

Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. (1998). *The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol. **10**(3):353-9.

Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. (1999). *Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts*. Oncogene. **18**(49):6888-95.

Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998). *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol. **16**:225-260.

Ghosh, S., Karin, M. (2002). *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell. **109** Suppl:S81-96.

Ghosh, S., Hayden, M.S. (2008). *New regulators of NF-kappaB in inflammation*. Nat Rev Immunol. **8**(11):837-848.

Goncalves, A.; Burckstummer, T.; Dixit, E.; Scheicher, R.; Gorna, M. W.; Karayel, E.; Sugar, C.; Stukalov, A.; Berg, T.; Kralovics, R.; Planyavsky, M.; Bennett, K. L.; Colinge, J.; Superti-Furga, G. (2011). *Functional dissection of the TBK1 molecular network*. PloS one. **6**(9):e23971.

Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. (1996).
New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.

Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, Gerondakis S. (1998). *B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells*. J Exp Med. **187**(5):663-74.

Guhring, H., Gorig, M., Ates, M., Coste, O., Zeilhofer, H.U., Pahl, A., Rehse, K., Brune, K. (2000). *Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice.* J Neurosci. **20**(17):6714-6720.

Guo B, Cheng G. (2007). *Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKK ϵ adaptor protein TANK.* J Biol Chem. **282**(16):11817-26.

Hacker, H., Karin, M. (2006). *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases.* Sci STKE. **2006**(357):re13.

Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. (2012). *Synoviocyte innate immune responses: TANK-binding kinase-1 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford). **51**(4):610-8. doi: 10.1093/rheumatology/ker154.

Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. (1998). *AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis.* Autoimmunity. **28**(4):197-208.

Harris, J., Olieri, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., Grandvaux, N. (2006). *Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK ϵ .* J Immunol. **177**(4):2527-2535.

Hayden, M.S., Ghosh, S. (2004). *Signaling to NF-kappaB.* Genes Dev. **18**(18):2195-2224.

Hayden MS, Ghosh S. (2008). *Shared principles in NF-kappaB signaling.* Cell. **132**(3):344-62. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.

Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S. (2004). *The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection.* J Exp Med. **199**(12):1641-50.

Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, Tenover BR, Servant MJ, Lin R. (2003). *Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis.* Ann N Y Acad Sci. **1010**:237-48.

- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., Karin, M. (1999). *Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase*. Science. **284**(5412):316-320.
- Hu PJ, Yu J, Zeng ZR, Leung WK, Lin HL, Tang BD, Bai AH, Sung JJ. (2004). *Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats*. Gut. **53**(2):195-200.
- Hunt SP, Pini A, Evan G. (1987). *Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation*. Nature. **328**(6131):632-4.
- Hutti, J.E., Shen, R.R., Abbott, D.W., Zhou, A.Y., Sprott, K.M., Asara, J.M., Hahn, W.C., Cantley, L.C. (2009). *Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation*. Mol. Cell. **34**(4):461-72. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.031.
- Huynh, Q.K., Kishore, N., Mathialagan, S., Donnelly, A.M., Tripp, C.S. (2002). *Kinetic mechanisms of IkappaB-related kinases (IKK) inducible IKK and TBK-1 differ from IKK-1/IKK-2 heterodimer*. J Biol Chem. **277**(15):12550-12558.
- Iadarola, J.M., Caudle, R.M. (1997). *Good pain, bad pain*. Science. **278**(5336):239-240.
- Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., Sandkuhler, J. (2003). *Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia*. Science. **299**(5610):1237-1240.
- Ikeda F, Hecker CM, Rozenknop A, Nordmeier RD, Rogov V, Hofmann K, Akira S, Dötsch V, Dikic I. (2007). *Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes*. EMBO J. **26**(14):3451-62.
- Jahns M. (2010). *Über die Rolle von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) bei der murinen Hauttumorgenese*. Medizinischen Klinik und Poliklinik III, München.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002). *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science. **298**(5600):1911-2.
- Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY. (2011). *Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1*. J Immunol. **186**(1):499-507. doi: 10.4049/jimmunol.0903534.

Julius D, Basbaum AI. (2001). *Molecular mechanisms of nociception*. Nature. **413**(6852):203-10.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. (1994). *Constitutive NF-kappa B activity in neurons*. Mol Cell Biol. **14**(6):3981-92.

Kaltschmidt, B., Linker, R.A., Deng, J., Kaltschmidt, C. (2002). *Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB*. BMC Mol Biol. **3**:16.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. (2005). *Signaling via NF-kappaB in the nervous system*. Biochim Biophys Acta. **1745**(3):287-99.

Karin M, Liu Zg, Zandi E. (1997). *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol. **9**(2):240-6.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. (2002). *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. Nat Rev Cancer. **2**(4):301-10.

Karin, M., Yamamoto, Y., Wang, Q.M. (2004). *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development*. Nat Rev Drug Discov. **3**(1):17-26.

Karin M, Greten FR. (2005). *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol. **5**(10):749-59.

Karin, M. (2006). *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature. **441**:431-436.

Karin M, Ben-Neriah Y. (2000). *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol. **18**:621-63.

Karin M. (2009). *NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **1**(5):a000141. doi: 10.1101.

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. (2005). *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol. **6**(10):981-8.

Kawai T, Akira S. (2005). *Toll-like receptor downstream signaling*. Arthritis Res Ther. **7**(1):12-9.

Kawai T, Akira S. (2005). *Pathogen recognition with Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol. **17**(4):338-44.

Kawai, T.; Akira, S. (2007). *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends in molecular medicine. **13**:460-9.

Kawai, T. and Akira S. (2008). *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci. **1143**:1-20.

Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. (1988). *Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA. **85**(13):4700-4.

Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. (2003). *Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol. **170**(9):4465-74.

Khanna A, Plummer M, Bromberek K, Woodliff J, Hariharan S. (2002). *Immunomodulation in stable renal transplant recipients with concomitant tacrolimus and sirolimus therapy*. Med Immunol. **1**(1):3.

Kim, J.M., Oh, Y.K., Lee, J.H., Im, D.Y., Kim, Y.J., Youn, J., Lee, C.H., Son, H., Lee, Y.S., Park, J.Y., Choi, I.H. (2005). *Induction of proinflammatory mediators requires activation of the TRAF, NIK, IKK and NF-kappaB signal transduction pathway in astrocytes infected with Escherichia coli*. Clin Exp Immunol. **140**(3):450-460.

Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C. (2000). *Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells*. Leukemia. **14**(3):399-402.

Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Schwamborn, K., Mercurio, F., Ulevitch, R.J. (2003). *IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli*. The Journal of biological chemistry. **278**(29):26612-26619.

Kunz, S., Tegeder, I., Coste, O., Marian, C., Pfenninger, A., Corvey, C., Karas, M., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2005). *Comparative proteomic analysis of the rat spinal cord in inflammatory and neuropathic pain models*. Neuroscience letters. **381**(3):289-293.

- Langman, M.J., Weil, J., Wainwright, P., Lawson, D.H., Rawlins, M.D., Logan, R.F., Murphy, M., Vessey, M.P., Colin-Jones, D.G. (1994). *Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Lancet*. **343**(8905):1075-1078.
- Larabi A1, Devos JM, Ng SL, Nanao MH, Round A, Maniatis T, Panne D. (2013). *Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1*. *Cell Rep*. **3**(3):734-46. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.034.
- Latremoliere A, Woolf CJ. (2009). *Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity*. *J Pain*. **10**(9):895-926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- Ledeboer A, Gamanos M, Lai W, Martin D, Maier SF, Watkins LR, Quan N. (2005). *Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation*. *Eur J Neurosci*. **22**(8):1977-86.
- Lee SB, Melkova Z, Yan W, Williams BR, Hovanessian AG, Esteban M. (1993). *The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells*. *Virology*. **192**(1):380-5.
- Lee JI, Burckart GJ. (1998). *Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target*. *J Clin Pharmacol*. **38**(11):981-93.
- Lee, K.M., Kang, B.S., Lee, H.L., Son, S.J., Hwang, S.H., Kim, D.S., Park, J.S., Cho, H.J. (2004). *Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity*. *Eur J Neurosci*. **19**(12):3375-3381.
- Leech M, Metz C, Santos L, Peng T, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. (1998). *Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis*. *Arthritis Rheum*. **41**(5):910-7.
- Leung, T.H., Hoffmann, A., Baltimore, D. (2004). *One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers*. *Cell*. **118**(4):453-464.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., Verma, I.M. (1999). *Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene*. *Science*. **284**(5412):321-5.
- Li, Q., Verma, I.M. (2002). *NF-kappaB regulation in the immune system*. *Nat Rev Immunol*. **2**(10):725-734.

- Li Q, Withoff S, Verma IM. (2005). *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol. **26**(6):318-25.
- Li J, Huang J, Jeong JH, Park SJ, Wei R, Peng J, Luo Z, Chen YT, Feng Y, Luo JL. (2013). *Selective TBK1/IKKi dual inhibitors with anticancer potency*. Int J Cancer. **134**(8):1972-80. doi: 10.1002/ijc.28507.
- Lilienbaum A, Israël A. (2003). *From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons*. Mol Cell Biol. **23**(8):2680-98.
- Lin R, Génin P, Mamane Y, Hiscott J. (2000). *Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7*. Mol Cell Biol. **20**(17):6342-53.
- Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. (2005). *Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer*. Br J Cancer. **93**(12):1372-81.
- Ma QP, Woolf CJ. (1996). *Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat*. Pain. **67**(2-3):307-16.
- Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, Bowman KK, Starovasnik MA, Dueber EC. (2012). *Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation*. Proc Natl Acad Sci USA. **109**(24):9378-83. doi: 10.1073/pnas.1121552109. Epub 2012 May 22.
- Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L., Leza, J.C. (2001). *Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms*. J Neurochem. **76**(2): 532-538.
- Mahajan K, Mahajan NP (2012). *PI3K-independent AKT activation in cancers: A treasure trove for novel therapeutics*. J. Cell. Physiol. **227**(9):3178-84. doi: 10.1002/jcp.24065.
- Manning BD, Cantley LC. (2007). *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. Cell. **129**(7):1261-74.
- Mantovania A., Locatib M., Vecchia A., Sozzania S., Allavena P. (2001). *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. Trends Immunol. **22**(6):328-36.

Marchlik E, Thakker P, Carlson T, Jiang Z, Ryan M, Marusic S, Goutagny N, Kuang W, Askew GR, Roberts V, Benoit S, Zhou T, Ling V, Pfeifer R, Stedman N, Fitzgerald KA, Lin LL, Hall JP. (2010). *Mice lacking Tbk1 activity exhibit immune cell infiltrates in multiple tissues and increased susceptibility to LPS-induced lethality.* J Leukoc Biol. **88**(6):1171-80. doi: 10.1189/jlb.0210071.

Marié I, Smith E, Prakash A, Levy DE. (2000). *Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain.* Mol Cell Biol. **20**(23):8803-14.

Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M., Schmitz, M.L. (2006). *Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon.* J Biol Chem. **281**(10):6175-6183.

Mattson MP, Camandola S. (2001). *NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders.* J Clin Invest. **107**(3):247-54.

Mattson, M.P., Meffert, M.K. (2006). *Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease.* Cell Death Differ. **13**(5): 852-860.

McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Dambach, D.M., Pattoli, M.A., Lu, P., Zhou, X.D., Qiu, Y., Zusi, F.C., Burke, J.R. (2003). *A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collageninduced arthritis in mice.* Arthritis Rheum. **48**(9):2652-2659.

McIver EG, Bryans J, Birchall K, Chugh J, Drake T, Lewis SJ, Osborne J, Smiljanic-Hurley E, Tsang W, Kamal A, Levy A, Newman M, Taylor D, Arthur JS, Clark K, Cohen P. (2012). *Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of pyrimidines as potent inhibitors of TBK1/IKKε kinases.* Bioorg Med Chem Lett. **22**(23):7169-73. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.09.063.

McWhirter, S. M.; Fitzgerald, K. A.; Rosains, J.; Rowe, D. C.; Golenbock, D. T.; Maniatis, T. (2004). *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci USA. **101**(1):233-8.

Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., Baltimore, D. (2003). *NFkappa B functions in synaptic signaling and behavior.* Nat Neurosci. **6**(10):1072-1078.

Meller, S.T., Gebhart, G.F. (1997). *Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat*. European journal of pain. **1**(1):43-52.

Messersmith DJ¹, Kim DJ, Iadarola MJ. (1998). *Transcription factor regulation of prodynorphin gene expression following rat hindpaw inflammation*. Brain Res Mol Brain Res. **53**(1-2):260-9.

Messlinger, K. (2002). *Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentscheidung*. Manuelle Medizin. **40**(1):13-21.

Metz CN, Bucala R. (1997). *Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response*. Adv Immunol. **66**:197-223.

Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. (1990). *Molecular cloning and characterization of the human doublestranded RNA-activated protein kinase induced by interferon*. Cell. **62**(2):379-90.

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. (2005). *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature. **437**(7062):1167-72.

Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R. (1997). *Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice*. J Immunol. **158**(11):5514-7.

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. (1999). *Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action*. J Biol Chem. **274**(25):18100-6.

Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. (2002). *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response*. Proc Natl Acad Sci USA. **99**(1):345-50.

Miyahira AK, Shahangian A, Hwang S, Sun R, Cheng G. (2009). *TANK-binding kinase-1 plays an important role during in vitro and in vivo type I IFN responses to DNA virus infections*. J Immunol. **182**(4):2248-57.

Möser CV, Kynast K, Baatz K, Russe OQ, Ferreirós N, Costiuk H, Lu R, Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G, Niederberger E. (2011). *The protein kinase IKKε is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia*. J Immunol. **187**(5):2617-25. doi: 10.4049/jimmunol.1004088.

Monaco C, Paleolog E. (2004). *Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis*. Cardiovasc Res. **61**(4):671-82.

Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD. (2002). *Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations*. Rheumatology (Oxford). **41**(5):558-62.

de Mos M, Laferrière A, Millecamps M, Pilkington M, Sturkenboom MC, Huygen FJ, Coderre TJ. (2009). *Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I)*. J Pain. **10**(11):1161-9. doi: 10.1016/j.jpain.2009.04.012.

Mosialos G. (1997). *The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription*. Semin Cancer Biol. **8**(2):121-9.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Narayanan R, Yepuru M, Coss CC, Wu Z, Bauler MN, Barrett CM, Mohler ML, Wang Y, Kim J, Snyder LM, He Y, Levy N, Miller DD, Dalton JT. (2013). *Discovery and preclinical characterization of novel small molecule TRK and ROS1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer and inflammation*. PLoS One. **8**(12):e83380. doi: 10.1371/journal.pone.0083380. eCollection 2013.

Nathan CF, Karnovsky ML, David JR. (1971). *Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes*. J Exp Med. **133**(6):1356-76.

Neugebauer V, Geisslinger G, Rümenapp P, Weiretter F, Szelenyi I, Brune K, Schaible HG. (1995). *Antinociceptive effects of R(-)- and S(+)-flurbiprofen on rat spinal dorsal horn neurons rendered hyperexcitable by an acute knee joint inflammation*. J Pharmacol Exp Ther. **275**(2):618-28.

- Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C., Brautigam, L., Grosch, S., Geisslinger, G. (2001). *Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB*. *Faseb J.* **15**(9):1622-1624.
- Niederberger, E., Tegeder, I., Schafer, C., Seegel, M., Grosch, S., Geisslinger, G. (2003). *Opposite effects of rofecoxib on nuclear factor-kappaB and activating protein-1 activation*. *J Pharmacol Exp Ther.* **304**(3):1153-1160.
- Niederberger E, Manderscheid C, Grösch S, Schmidt H, Ehnert C, Geisslinger G. (2004). *Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells*. *Biochem Pharmacol.* **68**(2):341-50.
- Niederberger, E., Manderscheid, C., Geisslinger, G. (2006). *Different COX-independent effects of the COX-2 inhibitors etoricoxib and lumiracoxib*. *Biochem Biophys Res. Commun.* **342**(3):940-948.
- Niederberger, E., Schmidtko, A., Gao, W., Kuhlein, H., Ehnert, C., Geisslinger, G. (2007). *Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NFkappaB*. *Eur J Pharmacol.* **559**(1):55-60.
- Niederberger, E., Geisslinger, G. (2008). *The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy?* *Faseb J.* **22**(10):3432-3442.
- Niederberger E, Geisslinger G. (2013). *Proteomics and NF-κB: an update*. *Expert Rev Proteomics.* **10**(2):189-204. doi: 10.1586/epr.13.5.
- Niederberger E, Möser CV, Kynast KL, Geisslinger G. (2013). *The non-canonical IκB kinases IKKε and TBK1 as potential targets for the development of novel therapeutic drugs*. *Curr Mol Med.* **13**(7):1089-97.
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. (2006). *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. *Nature.* **439**(7073):208-11.
- Ou YH, Torres M, Ram R, Formstecher E, Roland C, Cheng T, Brekken R, Wurz R, Tasker A, Polverino T, Tan SL, White MA. (2011). *TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation*. *Mol Cell.* **41**(4):458-70. doi: 10.1016/j.molcel.2011.01.019.

- Palmer, T. M.; Stiles, G. L. (1995). *Adenosine Receptors*. *Neuropharmacology*. **34**(7):683-94.
- Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC. (2007). *Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch*. *J Biol Chem*. **282**(31):22816-22.
- Perkins ND. (2000). *The Rel/NF-kappa B family: friend and foe*. *Trends Biochem Sci*. **25**(9):434-40.
- Perkins, N.D. (2007). *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**(1): 49-62.
- Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. (2004). *Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection*. *J Exp Med*. **199**(12):1651-8.
- Peters, R.T., Liao, S.M., Maniatis, T. (2000). *IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex*. *Mol. Cell*. **5**(3):513-22.
- Peters, R.T., Maniatis, T. (2001). *A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases*. *Biochim Biophys Acta*. **1471**(2):M57-62.
- Pichlmair, A.; Reis e Sousa, C. (2007). *Innate recognition of viruses*. *Immunity*. **27**(3):370-83.
- Pierce, J.W., Read, M.A., Ding, H., Luscinskas, F.W., Collins, T. (1996). *Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration*. *J Immunol*. **156**(10): 3961-3969.
- Podolin, P.L., Callahan, J.F., Bolognese, B.J., Li, Y.H., Carlson, K., Davis, T.G., Mellor, G.W., Evans, C., Roshak, A.K. (2005). *Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of IkappaB Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation*. *J Pharmacol Exp Ther*. **312**(1):373-381.
- Pomerantz, J.L., Baltimore, D. (1999). *NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase*. *EMBO J*. **18**(23):6694-704.

Presley RW, Menetrey D, Levine JD, Basbaum AI. (1990). *Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord*. J Neurosci. **10**(1):323-35.

Ralevic, V.; Burnstock, G. (1998). *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol. Rev. **50**(3):413-92.

Ralph P, Nakoinz I. (1977). *Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS*. J Immunol. **119**(3):950-54. Famlexanox

Reilly SM, Chiang SH, Decker SJ, Chang L, Uhm M, Larsen MJ, Rubin JR, Mowers J, White NM, Hochberg I, Downes M, Yu RT, Liddle C, Evans RM, Oh D, Li P, Olefsky JM, Saltiel AR. (2013). *An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-ε improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice*. Nat Med. **19**(3):313-21. doi: 10.1038/nm.3082.

Ren, K., Dubner, R. (2008). *Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity*. Curr Opin Anaesthesiol. **21**(5):570-579.

Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C, Frieler RA, Triebel RC, Lucchesi BR, Smith WL. (2010). *Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1*. Proc Natl Acad Sci USA. **107**(1):28-33. doi: 10.1073/pnas.0909765106.

Russe OQ, Möser CV, Kynast KL, King TS, Stephan H, Geisslinger G, Niederberger E. (2013). *Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception*. J Pain. **14**(11):1330-40. doi: 10.1016/j.jpain.2013.05.012.

Ryzhakov G, Randow F. (2007). *SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK*. EMBO J. **26**(13):3180-90.

Saccani S, Pantano S, Natoli G. (2003). *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. Mol Cell. **11**(6):1563-74.

Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G. (2006). *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. EMBO J. **25**(14):3257-63.

Salmon JE, Cronstein BN. (1990). *Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory.* J Immunol. **145**(7):2235-40.

Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Inoue N, Fujita F, Nakanishi M, Seya T. (2005). *Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation.* J Immunol. **174**(1):27-30.

Schaible, H.G., Ebersberger, A., Von Banchet, G.S. (2002). *Mechanisms of pain in arthritis.* Ann N Y Acad Sci. **966**:343-354.

Schaible, H.G., Richter, F. (2004). *Pathophysiology of pain.* Langenbecks Arch Surg. **389**(4): 237-243.

Schmidtko, A., Tegeder, I., Geisslinger, G. (2009). *No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing.* Trends Neurosci. **32**(6): 339-346.

Scholz, J., Woolf, C.J. (2002). *Can we conquer pain?* Nat Neurosci. **5** Suppl: 1062-1067.

Schulte G., Fredholm B.B. (2003). *Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases.* Cell Signal. **15**(9):813-27.

Seguin L, Kato S, Franovic A, Camargo MF, Lesperance J, Elliott KC, Yebra M, Mielgo A, Lowy AM, Husain H, Cascone T, Diao L, Wang J, Wistuba II, Heymach JV, Lippman SM, Desgrosellier JS, Anand S, Weis SM, Cheresch DA. (2014). *An integrin β 3-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition.* Nat Cell Biol. **16**(5):457-68. doi: 10.1038/ncb2953.

Sen, R., Baltimore, D. (1986). *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism.* Cell. **47**(6):921-928.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., Karin, M. 2001a. *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway.* Science. **293**(5534):1495-1499.

- Senftleben, U., Li, Z.W., Baud, V., Karin, M. 2001b. *IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis*. *Immunity*. **14**(3):217-230.
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R., Hiscott, J. (2003). *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. *Science*. **300**(5622):1148-1151.
- Shen RR, Hahn WC. (2011). *Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer*. *Oncogene*. **30**(6):631-41. doi: 10.1038/onc.2010.493.
- Shen, R.R., Zhou, A.Y., Kim, E., Lim, E., Habelhah, H., and Hahn, W.C. (2012). *Ikb kinase ϵ phosphorylates TRAF2 to promote mammary epithelial cell transformation*. *Mol. Cell. Biol.* **32**(23):4756-68. doi: 10.1128/MCB.00468-12.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., Akira, S. (1999). *IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases*. *Int. Immunol.* **11**(8):1357-62.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994). *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. *Annu Rev Cell Biol.* **10**:405-55.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. (2004). *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. *Pharmacol Rev.* **56**(3):387-437.
- Singh, G. (1998). *Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy*. *Am J Med.* **105**(1B):31S-38S.
- Song G, Ouyang G, Bao S. (2005). *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. *J Cell Mol Med.* **9**(1):59-71.
- Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J. (2011). *Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor α in a model of peripheral neuropathy*. *J Neuroinflammation.* **8**:177. doi: 10.1186/1742-2094-8-177.
- Stamp LK, Hazlett J, Roberts RL, Frampton C, Highton J, Hessian PA. (2012). *Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: a basis for methotrexate action*. *Arthritis Res Ther.* **14**(3):R138. doi: 10.1186/ar3871.

Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ. (2012). *Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*. **51**(10):1796-803.

St-Pierre, Y., Couillard, J., Van Themsche, C. (2004). *Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases*. *Expert Opin Ther Targets*. **8**(5): 473-489.

Strojnik T, Kavalar R, Zajc I, Diamandis EP, Oikonomopoulou K, Lah TT. (2009). *Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma*. *Anticancer Res*. **29**(8):3269-79.

Sweeney, S. E., D. Hammaker, D. L. Boyle, G. S. Firestein. (2005). *Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes*. *J. Immunol*. **174**(10):6424-30.

Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L., Goeddel, D.V. (1999). *Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice*. *Immunity*. **10**(4):421-429.

Tak PP, Firestein GS. (2001). *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. *J Clin Invest*. **107**(1):7-11.

Tao, F., Tao, Y.X., Mao, P., Zhao, C., Li, D., Liaw, W.J., Raja, S.N., Johns, R.A. (2003). *Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. *Neuroscience*. **120**(3):847-854.

Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Guhring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., Grosch, S., Geisslinger, G. (2001). *Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen*. *Faseb J*. **15**(1): 2-4.

Tegeder I, Niederberger E, Schmidt R, Kunz S, Gühring H, Ritzeler O, Michaelis M, Geisslinger G. (2004). *Specific Inhibition of IkappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats*. *J Neurosci*. **24**(7):1637-45.

Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M. (2000). *NAK is an IkappaB kinase-activating kinase*. *Nature*. **404**(6779):778-782.

- Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, Li Y, Dunn GP, Chan E, Thai T, Yang S, Ficarro SB, Marto JA, Jeon H, Hahn WC, Barbie DA, Eck MJ. (2013). *Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1*. Cell Rep. **3**(3):747-58. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.033.
- Tu YC, Huang DY, Shiah SG, Wang JS, Lin WW. (2013). *Regulation of c-Fos Gene Expression by NF- κ B: A p65 Homodimer Binding Site in Mouse Embryonic Fibroblasts but Not Human HEK293 Cells*. PLoS One. **8**(12):e84062. doi: 10.1371/journal.pone.0084062. eCollection 2013.
- Ueda Y, Richmond A. (2006). *NF- κ B activation in melanoma*. Pigment Cell Res. **19**(2):112-24.
- Vane JR, Botting RM. (1996). *Mechanism of action of anti-inflammatory drugs*. Scand J Rheumatol. Suppl. **102**:9-21.
- Vanegas, H., Schaible, H.G. (2001). *Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord*. Prog Neurobiol. **64**(4): 327-363.
- Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, Beyaert R. (2013). *I κ B kinase ϵ (IKK ϵ): a therapeutic target in inflammation and cancer*. Biochem Pharmacol. **85**(7):873-80. doi: 10.1016/j.bcp.2013.01.007.
- Vogel C, Stallforth S, Sommer C. (2006). *Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice*. J Peripher Nerv Syst. **11**(4):294-303.
- Wagner EF. (2010). *Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun)*. Ann Rheum Dis. 69 Suppl. 1:i86-88. doi: 10.1136/ard.2009.119396.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. (1995). *Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms*. Life Sciences. **57**(11), 1011-26.
- Weng, M.W., Hsiao, Y.M., Chen, C.J., Wang, J.P., Chen, W.C., Ko, J.L. (2004). *Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF- κ B in rat astrocytes*. Toxicol Lett. **151**(2):345-355.
- Wietek C, Cleaver CS, Ludbrook V, Wilde J, White J, Bell DJ, Lee M, Dickson M, Ray KP, O'Neill LA. (2006). *I κ B kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65*. J Biol Chem. **281**(46):34973-81.

- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. (2007). *Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications*. *Curr Pharm Des.* **13**(18):1925-8.
- Winnall WR, Muir JA, Liew S, Hirst JJ, Meachem SJ, Hedger MP. (2008). *Effects of chronic celecoxib on testicular function in normal and lipopolysaccharide-treated rats*. *Int J Androl.* **32**(5):542-55. doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00895.x.
- Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., Singh, G. (1999). *Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *N Engl J Med.* **340**(24):1888-1899.
- Woolf, C.J. (1983). *Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity*. *Nature.* **306**(5944):686-688.
- Woolf CJ. (1991). *Generation of acute pain: central mechanisms*. *Br Med Bull.* **47**(3):523-33.
- Woolf CJ. (1994). *Generation of acute pain: central mechanisms*. *47 Suppl* **5**:1-9; discussion 46-7.
- Woolf CJ, Costigan M. (1999). *Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**(14):7723-30.
- Woolf CJ, Max MB. (2001). *Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development*. *Anesthesiology.* **95**(1):241-9.
- Woolf, C.J. (2004). *Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management*. *Ann Intern Med.* **140**(6):441-451.
- Woolf, C.J. (2011). *Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain*. *Pain.* **152**(3 Suppl):S2-15. doi: 10.1016/j.pain.2010.09.030.
- Xiao YQ, Malcolm K, Worthen GS, Gardai S, Schiemann WP, Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. (2002). *Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta*. *J.Biol.Chem.* **277**(17):14884-93.
- Xie X, Zhang D, Zhao B, Lu MK, You M, Condorelli G, Wang CY, Guan KL. (2011). *IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**:6474–6479.

- Xu J, Zhu MD, Zhang X, Tian H, Zhang JH, Wu XB, Gao YJ. (2014). *NFκB-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice*. J Neuroinflammation. **11**:38. doi: 10.1186/1742-2094-11-38.
- Yaksh, T.L., Hua, X.Y., Kalcheva, I., Nozaki-Taguchi, N., Marsala, M. (1999). *The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input*. Proc Natl Acad Sci USA. **96**(14):7680-7686.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. (2003). *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science. 301(5633):640-3.
- Yin, M.J., Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. (1998). *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta*. Nature. **396**(6706):77-80.
- Yoo HG, Shin BA, Park JS, Lee KH, Chay KO, Yang SY, Ahn BW, Jung YD. (2002). *IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells*. Biochem Biophys Res Commun. **298**(2):251-6.
- Yu T., Yi YS., Yang Y., Oh J., Jeong D., Cho JY. (2012). *The Pivotal Role of TBK1 in Inflammatory Responses Mediated by Macrophages*. Mediators Inflamm. **2012**:979105. doi: 10.1155/2012/979105.
- Zhang L, Berta T, Xu ZZ, Liu T, Park JY, Ji RR. (2011). *TNF-α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2*. Pain. **152**(2):419-27. doi: 10.1016.
- Zhao LX, Jiang BC, Wu XB, Cao DL, Gao YJ. (2014). *Ligustilide attenuates inflammatory pain via inhibition of NFκB-mediated chemokines production in spinal astrocytes*. Eur J Neurosci. **39**(8):1391-402. doi: 10.1111/ejn.12502.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die nozizeptive Übertragung. Die Nozizeptoren werden über unterschiedliche Schmerzreize aktiviert. Laminae I–VI sind mit römischen Ziffern beschriftet. Die Abbildung ist modifiziert nach Schmidt 2006 & Schmidtko et al. 2009. 13
- Abbildung 2: Schmerztypen nach ihrer Ätiologie und Pathogenese (nach CERVERO ET AL. und SCHAIBLE ET AL.). A. Physiologischer Nozizeptorschmerz. Aktionspotentiale treten erst nach einem noxischen Reiz auf. B. Pathophysiologischer Nozizeptorschmerz. Bereits nicht-noxische Reize lösen Aktionspotentiale aus (Allodynie), noxische Reize führen zu einem Anstieg der Aktionspotentiale (Hyperalgesie). C. Neuropathischer Schmerz. Spontane Entladungen nach Nervenläsion. (MUTSCHLER, ARZNEIMITTELWIRKUNGEN, 9. AUFLAGE, 2008). 16
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der NF- κ B-Proteinfamilie. Die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine ist rechts angegeben. Die entsprechenden Prozessierungsstellen für p100 (Aminosäure 447) und p105 (Aminosäure 433) sind mit Pfeilen markiert. Die Rel-Homologie-Domäne (RHD) ist für die DNA-Bindung und die Dimerisierung der Rel-Faktoren verantwortlich. (TAD) Transaktivierungsdomäne, (LZ) Leuzin Zipper, (GRR) Glycin-reiche Region, (ANK) Ankyrin-Sequenz, (DD) Todesdomäne (verändert nach Hayden und Ghosh, 2008). 21
- Abbildung 4: Schematischer Überblick über die verschiedenen NF- κ B-Aktivierungswege. Der Kanonische Signalweg wird durch inflammatorische Stimuli wie Zytokine (z.B. TNF α , IL-1 β) oder Chemokine aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung des klassischen IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplexes, welcher den NF- κ B-Inhibitor I κ B α phosphoryliert. Es folgt eine sofortige Ubiquitinierung von I κ B α mit anschließendem Abbau im 26S-Proteasom. Auf diese Weise wird das p50/p65-Heterodimer freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription einer Reihe von NF- κ B-abhängigen Zielgenen (z.B. COX-2, iNOS, MMP-9, TNF α) aktivieren. Ein neuer, alternativer Signalweg wird durch Lipopolysaccharid (LPS), Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) oder Zytokine induziert. Dies führt zu Aktivierung des IKK ϵ /TBK1-Komplexes. Durch Phosphorylierung von I κ B α oder IKK β des klassischen Signalwegs kommt es zur Freisetzung des p50/p65-Heterodimers, dessen Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung einer Reihe von NF- κ B-abhängigen Zielgenen (nach Niederberger und Geisslinger, 2008). 25
- Abbildung 5: Schematische Darstellung des untersuchten Rückenmark-Areals. 69
- Abbildung 6: Immunhistochemie in Schnitten des Rückenmarks von naiven C57BL/6 Mäusen. (A-C) Von links nach rechts: Immunhistochemie mit TBK1-Antikörper (grün); Immunhistochemie mit Antikörpern gegen neuronale Zellmarker (rot);

- Übereinanderlagerung der beiden Immunfärbungen. Kolokalisation (gelb). Scale Bar: 20 μ m. 69
- Abbildung 7: Immunhistochemie in Rückenmark-Schnitten von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen (Mitte) und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen (rechts) mit Antikörper gegen TBK1 (QED Bioscience). Auf der linken Seite ist eine Wildtyp-Kontrollfärbung gezeigt, bei der lediglich Sekundärintikörper verwendet wurde, Scale Bar: 20 μ m. 70
- Abbildung 8: Immunhistochemie in DRG-Schnitten von naiven C57BL/6 Mäusen. (A-C) Von links nach rechts: Immunhistochemie mit TBK1-Antikörper (rot); Immunhistochemie mit Antikörpern gegen neuronale Zellmarker (grün); Übereinanderlagerung der beiden Immunfärbungen. Scale Bar: 20 μ m. 71
- Abbildung 9: Immunhistochemie in DRGs von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - (Mitte) und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen (rechts) mit TBK1-Antikörper. Scale Bar: 40 μ m. 71
- Abbildung 10: Proteinexpression von TBK1 in Astrozyten, behandelt mit Cytokin-Mix ($\text{TNF}\alpha$ [5ng/ml], IL-1 β [1ng/ml], LPS [1 μ g/ml]) und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Astrozyten wurden nach der angegebenen Zeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Um die Kompatibilität evident zu gestalten, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $***p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Additionszeichen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Cytokin-Mix und Cytokin-Mix mit Inhibitor BX-795, $+++p < 0,001$. 73
- Abbildung 11: Proteinexpression von IKK ϵ in Astrozyten, behandelt mit Cytokin-Mix ($\text{TNF}\alpha$ [5ng/ml], IL-1 β [1ng/ml], LPS [1 μ g/ml]) und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Astrozyten wurden nach der angegebenen Zeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Das Additionszeichen kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Cytokin-Mix und Cytokin-Mix mit Inhibitor BX-795, $+p < 0,05$. 74
- Abbildung 12: Formalintest mit $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen. (A) Zeitverlauf des Leckverhaltens der $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen. Nach Formalininjektion in eine Hinterpfote wurde die Leckdauer in fünfminütigen Intervallen über 45 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. (B) Statistischer Vergleich. Die Gesamtleckzeit, die Leckzeit der ersten Phase (0-10 min) und der zweiten Phase (11-45 min) wurden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. $***p < 0,001$ kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen (Vorarbeiten Christine Möser/Katharina Altenrath) 76

Abbildung 13: Relative Konzentration der TBK1-mRNA in Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen nach 20 µl Formalininjektion [5 %] in die Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Gewebe wurde nach 2 h Stimulation entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der TBK1 und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt} -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 4 unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. 77

Abbildung 14: Proteinexpression von TBK1 im Rückenmark von WT-, $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Mäusen (A) und von C57BL/6-Mäusen nach 20 µl Formalininjektion [5 %] in die Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren (B). Das Gewebe wurde zu den angegebenen Zeiten nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals, bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$, im Vergleich zur Kontrolle. 78

Abbildung 15: Mechanische Hyperalgesie nach 20 µl Zymosaninjektion [10 mg/ml] in eine Hinterpfote bei Wildtyp -, $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit des Pfotenwegziehens. Berechnet wurde die Differenz zwischen der linken und der rechten Pfote. Nach der Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote wurde stündlich bis 8 Stunden, wie auch nach 24 und 48 Stunden die mechanische Schwelle gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 Tieren. 80

Abbildung 16: Statistischer Vergleich nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote bei Wildtyp -, $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäusen durch Bestimmung der Area under the Curve (AUC). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je mindestens 7 Tieren im Zeitraum 3 h-7 h nach Zymosaninjektion. $*p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen $TNF\alpha^{-/-}$ - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäusen. $^{##}p < 0,01$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp - und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ - Mäusen. 81

Abbildung 17: Relative Konzentration der TBK1-mRNA in Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen nach 20 µl Zymosaninjektion [10 mg/ml] in die Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Gewebe wurde nach 5 h und nach 16 h Stimulation entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der TBK1 und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt} -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten

- dargestellt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $***p < 0,001$, im Vergleich zur Kontrolle. 82
- Abbildung 18: Proteinexpression von TBK1 im Rückenmark von C57BL/6-Mäusen nach 20 μ l Zymosaninjektion [10 mg/ml] in beide Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Gewebe wurde zu den angegebenen Zeiten nach der Zymosaninjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$ bzw. $**p < 0,01$, im Vergleich zur Kontrolle. 83
- Abbildung 19: Relative Konzentration der NF- κ B-abhängigen Gene (A) COX-2, (B) MMP-9 und (C) iNOS im Rückenmark von Wildtyp (C57BL/6) -, TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in eine Hinterpfote der Tiere. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt} -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp (C57BL/6) - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen bzw. TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäuse mit $\#p < 0,05$ und $##p < 0,01$. 85
- Abbildung 20: Mechanische Hyperalgesie nach 20 μ l Zymosaninjektion [10 mg/ml] in eine Hinterpfote und nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote 30 min nach vorheriger oraler Gabe von Celecoxib [10 mg/kg KG] bei (A) Wildtyp -, (B) TNF $\alpha^{-/-}$ - und (C) TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit des Pfotenwegziehens. Berechnet wurde die Differenz zwischen der linken und der rechten Pfote. Nach der Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote wurde stündlich bis 8 Stunden, wie auch nach 24 und 48 Stunden die mechanische Schwelle gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 Tieren. 88
- Abbildung 21: Statistischer Vergleich nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote und nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote mit 30 min vorheriger oraler Zugabe von Celecoxib [10 mg/kg KG] bei Wildtyp -, TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen durch Bestimmung der Area under the Curve (AUC) im Zeitraum von 3 h-7 h nach Zymosaninjektion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je mindestens 7 Tieren. $*p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. $**p < 0,01$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp - und TNF $\alpha^{-/-}$ /TBK1 $^{-/-}$ - Mäusen. Die

- Raute kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Celecoxib-Behandlung der Wildtyp - Mäuse mit #p < 0,05. 89
- Abbildung 22: Relative Konzentration der entzündungsrelevanten Gene Adora_{2A} (**A**) und MIF (**B**) im Rückenmark von TNF α ^{-/-} - und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in die Hinterpfoten der Tiere. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der 2^{-ddCt}-Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen TNF α - und TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - Mäuse mit #p < 0,05 und ###p < 0,001. 93
- Abbildung 23: Proteinexpression von Adora_{2A} in Rückenmarkspalten von Wildtyp -, TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - und TNF α ^{-/-} - Mäusen nach Formalininjektion in die Hinterpfoten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Das Gewebe wurde 2 h nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Adora_{2A}-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von Adora_{2A}/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Der Stern kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied mit *p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle. 94
- Abbildung 24: Proteinexpression von MIF in Rückenmarkspalten von Wildtyp -, TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - und TNF α ^{-/-} - Mäusen nach Formalininjektion in die Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Gewebe wurde 2 h nach der Formalininjektion entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des MIF-Signals bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Versuchen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde der Quotient von MIF/ β -Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied mit **p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle. 95
- Abbildung 25: Relativer Proteingehalt von entzündungsrelevanten Genen **A**) Adora_{2A}, **B**) MIF und **C**) COX-2 im Rückenmark von TNF α ^{-/-}/TBK1^{-/-} - und TNF α ^{-/-} - Mäusen behandelt mit Zymosan bzw. mit Zymosan und Celecoxib im Vergleich zu Kontrolltieren; K=Kontrolle, Z=Zymosan, CZ=Celecoxib+Zymosan. Das Gewebe wurde 48 h nach der Behandlung entnommen und mittels Western-Blot untersucht. Die Balkendiagramme zeigen die densitometrische Auswertungen der Proteinexpression der einzelnen Gene bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Mäusen. Zwecks angemessener Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurde der Quotient von den einzelnen Genen/ β -

Aktin der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $**p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäuse mit $\#p < 0,05$ und $\#\#p < 0,01$. 98

Abbildung 26: Relative Konzentration der entzündungsrelevanten Gene Akt1 (A), c-Fos (B) und CD68 (C) im Rückenmark von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ - Mäusen zwei Stunden nach Formalinjektion in die Hinterpfoten der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte über die quantitative Realtime RT-PCR, bei der die verschiedenen Gene und als interner Standard GAPDH gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$ und $***p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}/\text{TBK1}^{-/-}$ -Mäusen mit $\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$ und $\#\#\#p < 0,001$. 101

Abbildung 27: Proteinexpression von TBK1 in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des TBK1-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von TBK1/ β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: (A) behandelt mit LPS und (B) zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. 103

Abbildung 28: Proteinexpression von IKK ϵ in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: (A) behandelt mit LPS und (B) zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$ und $***p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795 mit $\#p < 0,05$. 104

Abbildung 29: Proteinexpression von I κ B α in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die

Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des I κ B α -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von I κ B α / β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795 mit ### $p < 0,01$. 106

Abbildung 30: Proteinexpression von IRF3 in RAW 264.7 Maus-Makrophagen, behandelt mit LPS [10 μ g/ml] und dem Inhibitor BX-795 [100 nM]. Die Makrophagen wurden nach der angegebenen Stimulationszeit geerntet und mit Hilfe der Western-Blot Methode analysiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des IRF3-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IRF3/ β -Aktin der unbehandelten Kontrollen gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis: **(A)** behandelt mit LPS und **(B)** zusätzlich mit dem Inhibitor BX-795. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen LPS und LPS mit Inhibitor BX-795, ### $p < 0,001$. 108

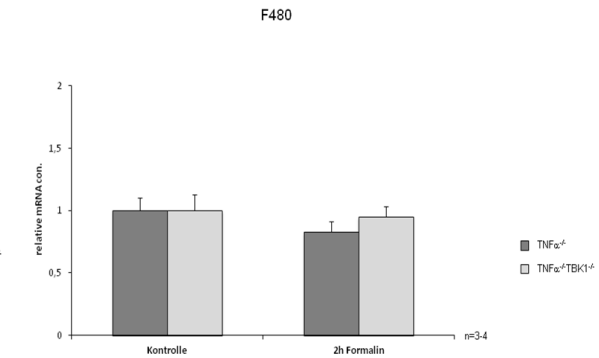
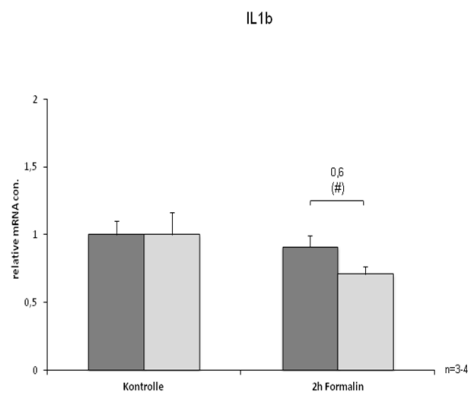
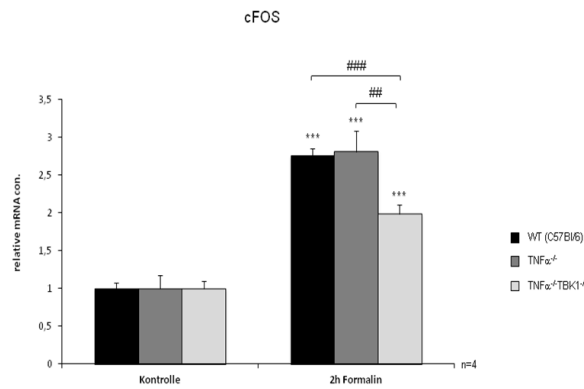
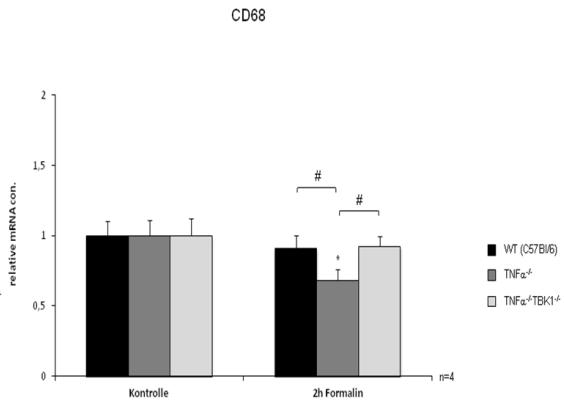
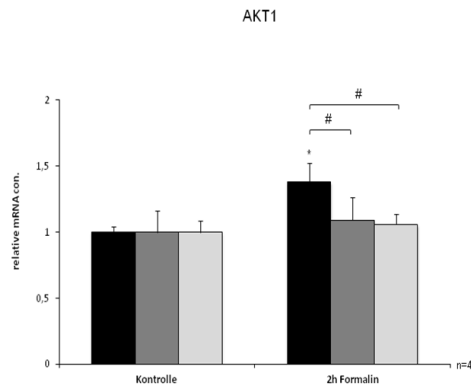
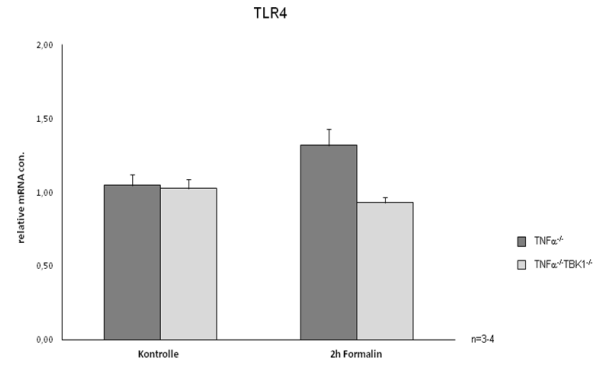
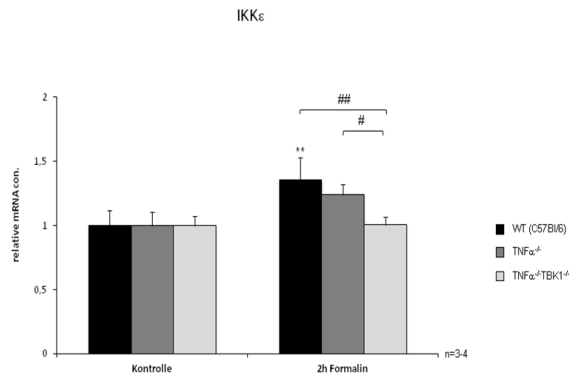
8. Anhang

8.1

mRNA-Array

Die nachstehende Tabelle zeigt die Regulationen von weiteren Genen des Arrays. Es wurde die relative Konzentration der verschiedenen mRNA in Rückenmarkspalten von C57BL/6-Mäusen nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten im Vergleich zu den Kontrolltieren $TNF\alpha^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$ -Tieren ermittelt. Das Gewebe wurde nach 2 h Stimulation entnommen. Die Bestimmung der Regulation erfolgte mit einer quantitativen Realtime RT-PCR, bei der die einzelnen Gene und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Unter der Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde die relative mRNA-Menge der unbehandelten Kontrolltiere gleich eins gesetzt. In dem Experiment sind drei unabhängige Versuche untersucht worden.

Symbol	Beschreibung	Regulation	
		$TNF\alpha^{-/-}$	$TNF\alpha^{-/-}/TBK1^{-/-}$
IKK ϵ	IKK-epsilon Kinase	↑	—
TLR4	Toll-like Rezeptor 4	↑	—
Akt 1	Serin/Threonin Protein Kinase	—	—
CD68	Makrophagen	↓	↑
c-Fos	c-Fos Onkoprotein	↑	↑
IL-1 β	Interleukin 1 beta	↓	↓
F4/80	Macrophage F4/80 Gen	↓	—



8.2

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Gerd Geißlinger bedanken, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Goethe-Universität Frankfurt am Main anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ellen Niederberger für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die interessante Themenstellung und die uneingeschränkte Unterstützung und engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für deine Hilfe und deine unermüdliche Geduld.

Bei Herrn Professor Dr. Bernhard Brüne möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Korreferats bedanken.

Ein großer Dank geht auch an Christine, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und für die Bereitschaft, mir jederzeit zu helfen und Fragen zu beantworten. Ebenso möchte ich allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken und für die Hilfe bei allen offenen Fragen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Steffi, Gerti und Christina für die ganzen Korrekturlesungen und die aufmunternden Worte bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie dafür danken, dass sie mich immer unterstützt hat und ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Mann Torben für seine enorme Geduld, seine uneingeschränkte Unterstützung gerade in Nerven zehrenden Phasen der Dissertation und dass er mich immer motiviert hat und er jederzeit für mich da ist.

8.3

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Christine V. Möser, Heike Stephan, Katharina Altenrath, Katharina L. Kynast, Otto Q. Russe, Katrin Olbrich, Gerd Geisslinger and Ellen Niederberger (2014) *TANK-binding kinase 1 (TBK1) modulates inflammatory hyperalgesia by regulation of MAP Kinases and NF- κ B dependent genes.* (submitted)

Russe OQ, Möser CV, Kynast KL, King TS, Stephan H, Geisslinger G, Niederberger E. (2013) *Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception.* J Pain. Nov;14(11):1330-40.

Möser CV, Kynast K, Baatz K, Russe OQ, Ferreirós N, Costiuk H, Lu R, Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G, Niederberger E. (2011) *The protein kinase IKK ϵ is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia.* J Immunol. Sep 1;187(5):2617-25.

Posterpräsentationen

Möser C., Kynast, K.L., Lu, R.R., Russe, O.Q., Costiuk, H., Schmidtko, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2012): *I-kappaB kinase epsilon and Tank Binding Kinase are involved in inflammatory hyperalgesia.* 14th World Congress on Pain®, Mailand, Italien.

8.4

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Rolle der Tank-Binding Kinase (TBK) 1 bei entzündlichen Schmerzreaktionen“

am Institut für Klinische Pharmakologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ellen Niederberger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (*oder werden*) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Christine V. Möser, Heike Stephan, Katharina Altenrath, Katharina L. Kynast, Otto Q. Russe, Katrin Olbrich, Gerd Geisslinger and Ellen Niederberger (2014) *TANK-binding kinase 1 (TBK1) modulates inflammatory hyperalgesia by regulation of MAP Kinases and NF- κ B dependent genes.* (submitted)

Frankfurt/Main, 21. November 2014

(Ort, Datum)



(Unterschrift)