

Vergleichende Proteomanalyse des Rückenmarks zur Identifizierung neuer Targets für die Schmerztherapie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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



von
Susanne Elisabeth Kunz
aus Stuttgart

Frankfurt am Main (2004)
(D F 1)

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

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

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

Datum der Disputation: 12. November 2004

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur
den Kindern, die am Rande des Wissens
hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.*

Sir Isaac Newton

Inhalte

1	EINLEITUNG	1
1.1	Physiologie und Pathophysiologie des Schmerzes	1
1.1.1	Nozizeption	1
1.1.2	Schmerzursachen, Schmerztypen	2
1.1.2.1	Entzündungsschmerzen	4
1.1.2.2	Neuropathische Schmerzen	4
1.1.3	Zentrale Sensibilisierung im Rückenmark	5
1.2	Proteomics	7
1.2.1	Das Proteom	7
1.2.2	Analyse des Proteoms	8
1.2.3	Differentielle Proteomanalyse	8
1.3	Charakterisierung zweier aus der Proteomanalyse resultierender Proteine	9
1.3.1	Neurofilament light und dessen Abbau	9
1.3.2	Aldose Reduktase	11
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Versuchstiere	15
2.2	Zellen	15
2.3	Bakterienstämme	15
2.4	Chemikalien und Reagenzien	15
2.5	Tierexperimentelle Untersuchungen	17
2.5.1	Implantation periduraler Katheter	17
2.5.2	Tiermodelle für Entzündung und Entzündungsschmerz	17
2.5.2.1	Bestimmung des Pfotenödems	18
2.5.2.2	Bestimmung der thermischen Hyperalgesie	18
2.5.3	Tiermodell für neuropathischen Schmerz	19
2.5.4	Behandlung mit Calpain Inhibitor III	20
2.5.5	Gewebeentnahme	20
2.6	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	20
2.6.1	In der Zellkultur verwendete Prüfsubstanzen	21
2.7	Kultivierung prokaryontischer Zellen	21
2.7.1	Nährmedien	21
2.7.2	Bakterienkultur	22
2.8	Proteinanalytik	22

2.8.1	Proteinextraktion	22
2.8.1.1	Extraktion aus Gewebeproben	22
2.8.1.2	Extraktion aus HeLa-Zellen	22
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.8.3	SDS-PAGE	23
2.8.4	Western Blot	24
2.8.4.1	Elektroblotting	24
2.8.4.2	Immundetektion von geblotteten Proteinen	25
2.8.5	2D-Gelelektrophorese	26
2.8.5.1	Probenvorbereitung	26
2.8.5.2	Auftrennung in der ersten Dimension	26
2.8.5.3	Auftrennung in der zweiten Dimension	26
2.8.5.4	Nachweis der aufgetrennten Proteine	27
2.8.5.5	Computergestützte Auswertung der 2D-Gele	28
2.8.6	Massenspektrometrische Proteinidentifizierung	28
2.8.6.1	Tryptischer Peptidverdau	28
2.8.6.2	MALDI-TOF-MS	29
2.8.7	Immunfluoreszenz	29
2.9	Molekularbiologische Methoden	30
2.9.1	RNA-Extraktion	30
2.9.2	PCR-Anwendungen	31
2.9.2.1	RT-PCR	31
2.9.2.2	Primer-Überhang-Mutagenese	32
2.9.3	Sequenzierung von DNA	32
2.9.4	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	33
2.9.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.9.4.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.9.5	Plasmide	34
2.9.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.9.7	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.9.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
2.9.8.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	36
2.9.8.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	37
2.9.9	Herstellung rekombinanter DNA	37
2.9.9.1	Restriktion von DNA	37
2.9.9.2	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.9.10	Transfektion von eukaryontischen Zellen	38
2.10	Antikörperproduktion	38
2.10.1	Expression eines rekombinanten Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins	38
2.10.1.1	Induktion der Fusionsproteinexpression mit IPTG	38
2.10.1.2	Aufreinigung des GST-Fusionsproteins	39
2.10.2	Gewinnung der Antiseren	39
2.11	Bestimmung der Calpain-Aktivität	39
2.12	Statistik	39
2.12.1	Western Blots	39
2.12.2	RT-PCR	40
2.12.3	Calpain-Aktivität	40
2.12.4	Thermische Hyperalgesie	40
2.12.5	Pfotenödem	40

3	ERGEBNISSE	41
3.1	Änderungen im Proteinmuster des Rückenmarks nach peripherer Entzündung	41
3.2	NF-L nach Entzündungsinduktion	43
3.2.1	NF-L Expression im Lumbalmark	43
3.2.2	NF-L Expression in der Pfote	45
3.2.3	Calpain-Aktivität nach Entzündungsinduktion	45
3.2.3.1	Calpain-Aktivität im Lumbalmark	46
3.2.3.2	Calpain-Aktivität in der Pfote	47
3.2.4	Immunfluoreszenz-Untersuchungen	47
3.2.5	Einfluss von Calpain auf die entzündungsbedingte Hyperalgesie	49
3.2.6	Einfluss von Calpain auf das zymosaninduzierte Pfotenödem	51
3.3	Aldose Reduktase nach peripherer Entzündungsinduktion	52
3.3.1	Aldose Reduktase in 2D-Gelen des Lumbalmarks	52
3.3.2	Klonierung und Expression eines AR-GST Fusionsproteins	52
3.3.3	Aldose Reduktase Expression im Lumbalmark	54
3.3.4	Klonierung einer 6xHis-gekoppelten Aldose Reduktase	55
3.3.5	Aldose Reduktase Proteinexpression in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Zytokinen	56
3.3.6	Beeinflussung der Aldose Reduktase Proteinexpression in HeLa-Zellen durch Dexamethason	57
3.3.7	Mechanismen der Herunterregulation von Aldose Reduktase	58
3.4	Änderungen im Proteinmuster des Rückenmarks im neuropathischen Schmerzmodell	61
4	DISKUSSION	63
4.1	Proteomanalyse des Rückenmarks bei Entzündung	63
4.2	Regulation von NF-L bei Entzündung	64
4.3	Regulation von Aldose Reduktase bei Entzündung	68
4.4	Proteomanalyse des Rückenmarks bei neuropathischem Schmerz	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	90
9	LEBENS LAUF	91
10	DANKSAGUNG	92

1 Einleitung

1.1 Physiologie und Pathophysiologie des Schmerzes

Die Fähigkeit, Schmerzen zu empfinden, stellt eine lebenserhaltende biologische Funktion unseres Organismus dar, indem Schmerz, insbesondere akuter Schmerz, eine nützliche Warn- und Schutzfunktion ausübt. Wiederholte oder anhaltende Schmerzen können jedoch zu bleibenden pathophysiologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem und damit zur Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses führen. Der in der Folge auftretende chronische Schmerz hat seine Funktion als Alarmsignal weitgehend verloren, so dass ihm keine biologische Aufgabe mehr zukommt. Oft losgelöst von der Grunderkrankung wird der Schmerz selbst zur Krankheit und steht für die betroffenen Personen im Vordergrund ihres Leidens.

1.1.1 Nozizeption

Die Auslösung, Weiterleitung und zentrale Verarbeitung von Schmerzimpulsen wird als Nozizeption bezeichnet. Die von sensorischen Nervenendigungen (Nozizeptoren) aufgenommenen noxischen Reize werden als Aktionspotentiale über unmyelinisierte afferente C-Fasern und dünn myelinisierte A δ -Fasern weitergeleitet und treten über die Hinterwurzel in das Hinterhorn des Rückenmarks ein (Messlinger 1997). Dort findet direkt oder indirekt über ein Zwischenneuron die synaptische Übertragung des Schmerzsignals auf „Wide-dynamic-range“-Neurone statt. Diese Neurone reagieren abgestuft auf alle sensorischen Qualitäten und Quantitäten, von leichter Berührung bis zum extremen Schmerzreiz (Messlinger 2002). Die Axone dieser sekundären Neurone kreuzen auf die Gegenseite des Rückenmarks und ziehen über den Tractus spinothalamicus lateralis zum Hirnstamm und zum Thalamus. Durch weitere Umschaltung in lateralen und medialen Kerngebieten des Thalamus gelangen die Impulsfolgen zu den sensorischen Projektionsfeldern der Großhirnrinde (siehe Abbildung 1.1). Zusammen mit dem Thalamus ist dieser Teil der Großhirnrinde für die sensorisch-diskriminative Schmerzkomponente zuständig. An der affektiv-emotionalen Bewertung des Schmerzes ist das limbische System beteiligt, während vegetative Schmerzreaktionen über den Hypothalamus gesteuert werden (Iadarola et al. 1997).

Neben diesem aufsteigenden schmerzvermittelnden System existiert ein absteigendes schmerzhemmendes System, dessen Aufgabe es ist, die Schmerzempfindung herabzusetzen. Das antinozizeptive System geht von verschiedenen Ebenen des ZNS aus und hemmt insbesondere die synaptische Erregungsübertragung im Rückenmark (siehe Abbildung 1.1). Die Stimulation von Opioidrezeptoren durch körpereigene Liganden aktiviert das antinozizeptive System. Hierbei wird die

Freisetzung von schmerzimpulsvermittelnden Neurotransmittern gehemmt und dadurch die Zahl der übergeleiteten nozizeptiven Aktionspotentiale herabgesetzt. Weiterhin führt die Stimulation der Opioidrezeptoren zu einer Hyperpolarisation der Projektionsneurone und reduziert in der Folge deren Erregbarkeit.

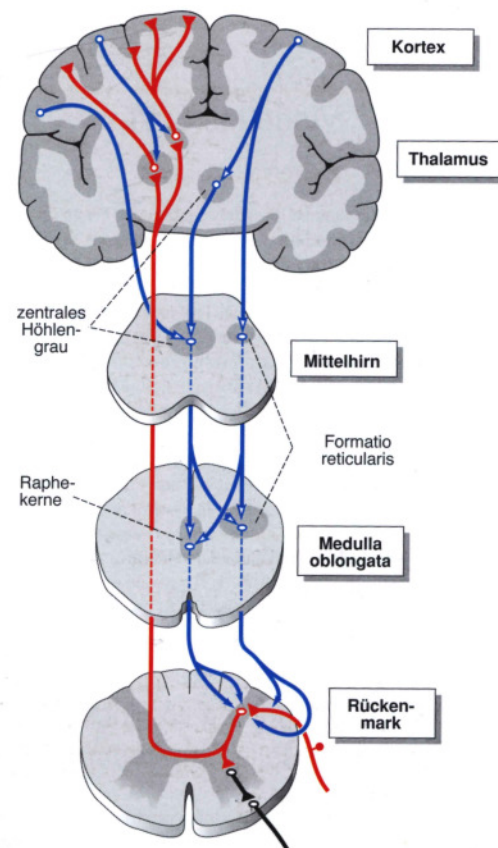


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über den Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen (rot) und der absteigenden antinozizeptiven Bahnsysteme (blau) (Deetjen 1999).

Im Rückenmark werden die nozizeptiven Afferenzen auf Neurone umgeschaltet, deren Axone zum Thalamus ziehen. Die Efferenzen der lateralen und medialen Thalamuskerns enden überwiegend im somatosensorischen Kortex.

Unmittelbar absteigende Bahnen entspringen den Raphekerne und der Formatio reticularis der Medulla oblongata. Sie greifen prä- und postsynaptisch am nozizeptiv-spinalen Eingang an und werden absteigend vom zentralen Höhlengrau, dem generalisierten thalamischen System und dem Kortex gesteuert.

1.1.2 Schmerzursachen, Schmerztypen

Neben akuten Schmerzen, die von begrenzter Dauer sind und nach Beseitigung der auslösenden Reize in der Regel rasch wieder abklingen, stellen insbesondere chronische Schmerzen eine Herausforderung an die Medizin dar. Rund 7,5 Millionen Menschen leiden hierzulande an chronischen Schmerzen – Tendenz steigend (Zimmermann 2004). Chronische Schmerzen können dabei in zwei große Gruppen

unterteilt werden. Der pathophysiologische Nozizeptorschmerz wird nach Gewebetraumen durch die Erregung von intakten Nozizeptoren hervorgerufen. Hierzu gehören insbesondere chronische Entzündungsschmerzen. Schmerzen hingegen, die durch eine Schädigung von Nerven selbst entstehen, werden als neuropathische Schmerzen bezeichnet (Abbildung 1.2).

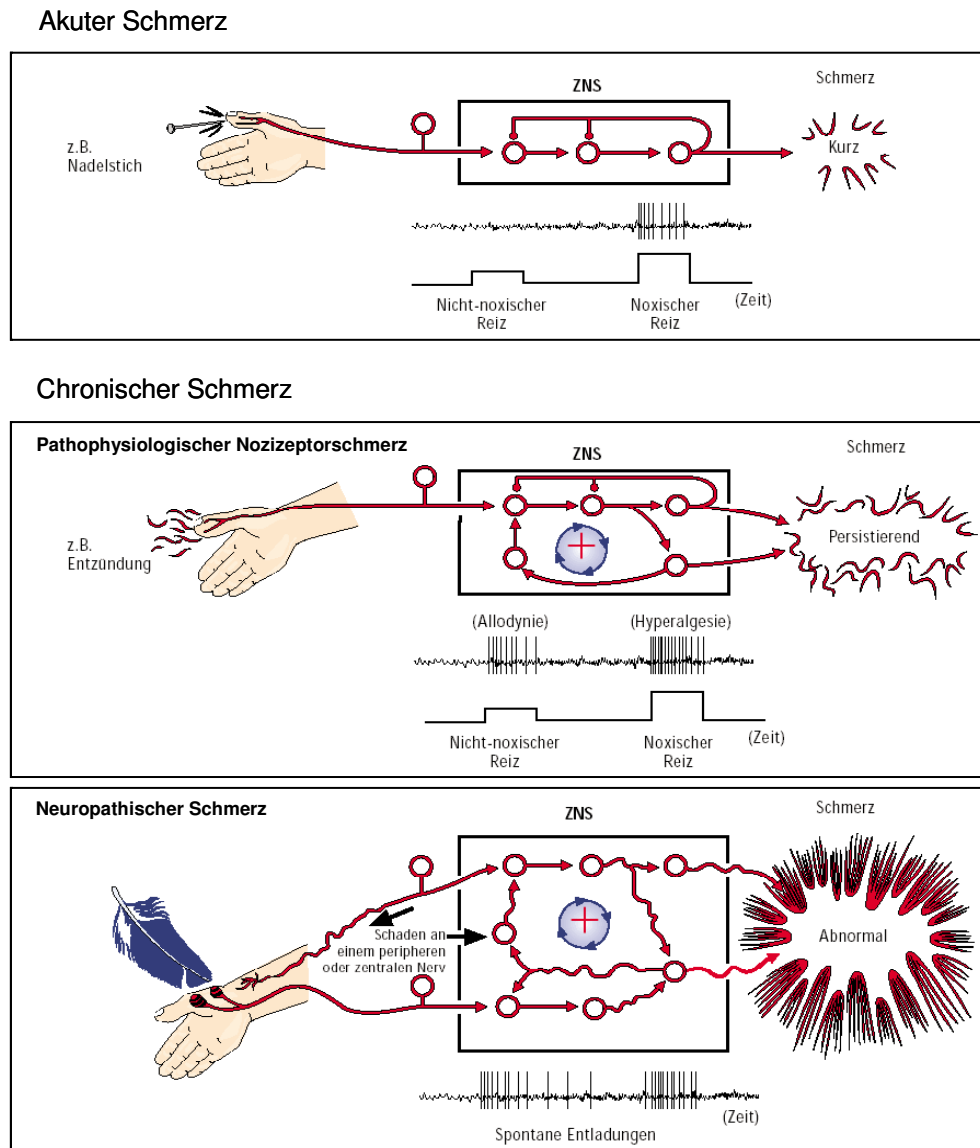


Abbildung 1.2: Schmerztypen nach ihrer Ätiologie und Pathogenese. Akuter Schmerz: Aktionspotentiale treten erst nach einem noxischen Reiz auf. Chronischer Schmerz: Beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz erhöhen plastische Veränderungen im Rückenmark und in höheren Hirnregionen die Schmerzempfindlichkeit. Dazu kann insbesondere die Reorganisation von synaptischen Verbindungen beitragen. In der Folge können bereits nicht-noxische Reize Aktionspotentiale auslösen (Allodynie) und noxische Reize führen zu einer Steigerung der Aktionspotentiale (Hyperalgesie). Beim neuropathischen Schmerz kann es infolge einer Nervenläsion ebenfalls zu Veränderungen der synaptischen Verschaltungen im ZNS kommen. Selbst intakte Berührungsaferenzen können anatomisch neue Verbindungen zu nozizeptiven Neuronen ausbilden. Des Weiteren kann es zum Verlust von Hemmprozessen der nozizeptiven Übertragung im ZNS kommen. Die Folgen sind spontane Entladungen, Allodynie und Hyperalgesie. Aus Mutschler 2001.

1.1.2.1 Entzündungsschmerzen

Schmerz (dolor) tritt neben Rötung (rubor), Schwellung (tumor), Überwärmung (calor) und gestörter Funktion (functio laesa) als eines der fünf Kardinalsymptome einer Entzündung auf. Entzündungsvorgänge gehören zu den wichtigsten Mechanismen der Schmerzentstehung. Die typischen Entzündungsschmerzen werden durch Freisetzung von Bradykinin, Histamin und Prostaglandinen mit einer Ansäuerung des Gewebes und dem Druck des Exsudats auf die Nozizeptoren ausgelöst. Diese noxischen Stimuli werden von spezifischen Membranrezeptoren an den Nozizeptoren, wie z.B. dem Vanilloidrezeptor-1, einem ligandengesteuerten und nicht-selektiven Kationenkanal, wahrgenommen. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren kann durch Depolarisation der freien Nervenendigung ein Aktionspotential generieren.

Nozizeption unterliegt anders als andere Sinnesempfindungen keiner Habituation. Im Gegensatz dazu können vorangegangene Schmerzimpulse die Verarbeitung nachfolgender Reize im Sinne einer Sensibilisierung verstärken. Kommt es z.B. durch lang anhaltende Aktivierung von Nozizeptoren im entzündeten Gewebe zu einem vermehrten Einstrom von Schmerzimpulsen ins zentrale Nervensystem, treten dauerhafte Sensibilisierungsvorgänge an den zentralen Synapsen auf. Diese zentralen Sensibilisierungsphänomene äußern sich in der Zunahme der Spontanaktivität und in stärkeren Reizantworten zentraler Neurone, deren rezeptive Felder sich ebenfalls vergrößern (Coderre et al. 1993). Diese Veränderungen im Antwortverhalten zentraler Neurone können zum Spontanschmerz und zur Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindung auf einen noxischen Reiz) beitragen, die für entzündetes Gewebe typisch sind (Yaksh et al. 1999). Zur Behandlung von Entzündungsschmerzen haben sich insbesondere nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) bewährt. Ihre Anwendung bei der Langzeittherapie chronischer Schmerzen ist jedoch durch zum Teil erhebliche unerwünschte Wirkungen, wie gastroenterale Ulzera oder toxische Nierenschädigungen, limitiert.

1.1.2.2 Neuropathische Schmerzen

Neuropathische Schmerzen entstehen, wenn periphere Nerven auf mechanische, metabolische oder entzündliche Weise geschädigt werden. Die dabei auftretenden Schmerzbilder weisen Ähnlichkeiten mit dem Entzündungsschmerz auf. Sie sind vorwiegend durch das Auftreten von Spontanschmerz, Hyperalgesie und Allodynie (Schmerz wird bereits durch nicht-noxische Reize ausgelöst) gekennzeichnet. Diese charakteristischen Reizphänomene können weiterhin von motorischen und sensorischen Ausfallerscheinungen begleitet sein. Als Folge der Läsionen kommt es zu einer vermehrten Expression von Na^+ -Kanälen und damit zur Spontanaktivität in den geschädigten Axonen und ihren Nachbaraxonen (Tal et al. 1999; England et al. 1996). Dadurch entsteht wie beim Entzündungsschmerz ein vermehrter Einstrom von Aktionspotentialen ins Rückenmark und nozizeptive Hinterhornneurone werden sekundär sensibilisiert. Die Erregbarkeit der Neurone wird

gesteigert und sie reagieren auf ankommende Reize mit einer erhöhten Entladungsfrequenz (Sandkuhler et al. 1998; Laird et al. 1993). Die Aktivität der Hinterhornneurone wird jedoch nicht nur durch die Aktivität der zugehörigen primären Afferenzen bestimmt, sondern auch, und zwar entgegengesetzt, durch die Aktivität deszendierender, inhibitorischer Neurone. Eine periphere Nervenläsion kann zu neuronalen Funktionsänderungen im Rückenmark führen, die diese Hemmfunktionen beeinträchtigen. Aus den beschriebenen Vorgängen resultiert eine verstärkte Schmerzempfindlichkeit, die zur Entwicklung von Hyperalgesie und Spontanschmerz beiträgt (Baron 2000). Zur pharmakologischen Basistherapie neuropathischer Schmerzen gehören trizyklische Antidepressiva und Antikonvulsiva, die als Monotherapie oder auch in Kombination mit Opioiden eingesetzt werden. Diese Medikamente erbringen meistens nur eine gewisse Schmerzerleichterung, während eine Schmerzfreiheit aber oftmals nicht erreicht wird. Die sich häufig einstellenden Nebenwirkungen stehen dabei Dosiserhöhungen der Arzneimittel zur Erzielung einer ausreichenden Schmerzlinderung oftmals im Wege.

1.1.3 Zentrale Sensibilisierung im Rückenmark

Zur Ausbildung einer Sensibilisierung, d.h. einer lang anhaltenden Verstärkung der Schmerzwahrnehmung, tragen sowohl periphere als auch zentrale Mechanismen bei. Die Sensibilisierung nozizeptiver Primärafferenzen, die das Gewebe innervieren, wird als periphere Sensibilisierung bezeichnet. Dieser wird die zentrale Sensibilisierung gegenübergestellt, bei der Neurone im Zentralnervensystem, vor allem spinale Neurone, aufgrund einer umfassenden neuronalen Plastizität übererregbar werden. Im Hinterhorn der grauen Substanz des Rückenmarks findet die erste synaptische Übertragung von Schmerzimpulsen aus der Peripherie auf zentrale Neurone statt. Der Transfer wird dabei vorwiegend durch Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat und verschiedener Neuropeptide, unter anderem auch Substanz P, vermittelt (Coderre et al. 1992). Postsynaptisch bindet Glutamat an AMPA- und Substanz P an NK-1-Rezeptoren und es kommt zur Depolarisation des Neurons. Erst unter fortgesetzter Stimulation und der durch AMPA- und NK-1-Rezeptoren vermittelten Vordepolarisation der postsynaptischen Membran wird der NMDA-Rezeptor durch Aufhebung eines Magnesium-Blocks aktiviert (Woolf et al. 1999b). Daraus resultiert ein vermehrter Calcium-Einstrom in das Projektionsneuron, wodurch zahlreiche intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden, u.a. eine Aktivierung der Proteinkinasen A, G und C (Aley et al. 1999; Malmberg et al. 1997; Tegeder et al. 2004). Die Phosphorylierung zahlreicher Zielmoleküle durch diese Kinasen kann auf direktem oder indirektem Weg zu einer gesteigerten Transkription verschiedener „immediate early genes“ (IEGs), wie c-fos, Zif 268 und Cyclooxygenase-2 (Cox-2), führen. Einige der durch diese Kaskade induzierten Proteine können wiederum als Transkriptionsfaktoren an Konsensussequenzen verschiedener Gene binden, die z.B. für

Rezeptorproteine kodieren. Bei massiven, lang anhaltenden Schmerzen kommt es demzufolge zu weitreichenden und nachhaltigen Veränderungen der Proteinexpression in den Hinterhornneuronen, die möglicherweise zur Chronifizierung von Schmerzen beitragen (Beiche et al. 1996; Dubner et al. 1992; Ji et al. 1994; Ji et al. 1995; Mannion et al. 1999; McCaaron et al. 1994; Woolf et al. 1999a). Um das Entstehen chronischer Schmerzen, die pharmakologisch schlecht therapierbar sind, zu verhindern, müssen die Mechanismen der zentralen Sensibilisierung blockiert werden. Die Suche nach innovativen Therapieansatzpunkten bei der Entwicklung von Arzneimitteln, die in der Lage sind, die beschriebenen Sensibilisierungsvorgänge zu unterbrechen, ist daher von entscheidender Bedeutung. Die erwähnten Signalwege der zentralen Sensibilisierung im Rückenmark sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

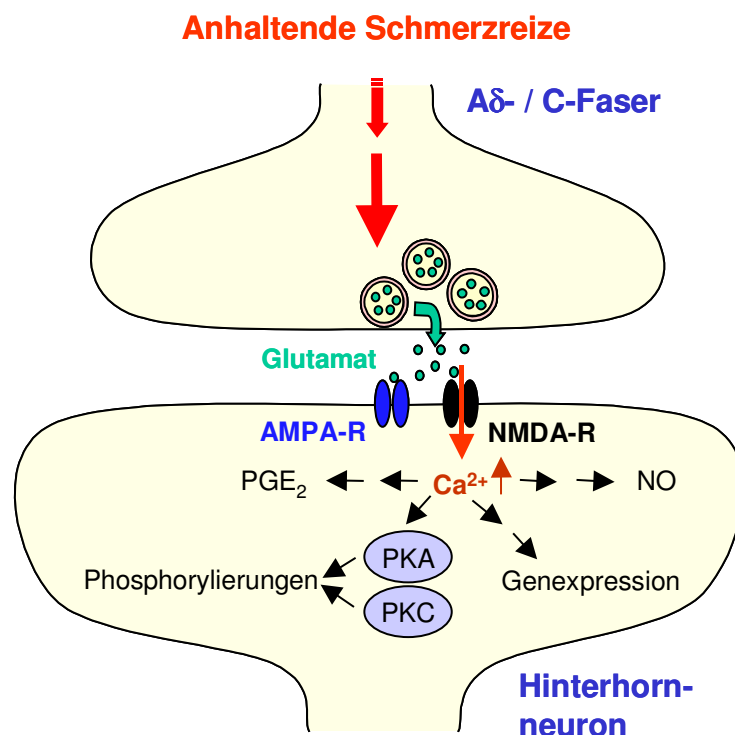


Abbildung 1.3: Vereinfachte schematische Darstellung der nozizeptiven Erregungsübertragung im Hinterhorn des Rückenmarks (Wall et al. 1999). Bei starken bzw. lang anhaltenden Schmerzreizen aus der Peripherie und einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in der Postsynapse wird das Hinterhornneuron sensibilisiert. Es kann zur Aktivierung der PKA und PKC und zur Beeinflussung der Genexpression kommen. Außerdem werden vermehrt signalverstärkende Mediatorstoffe wie PGE₂ und NO gebildet.

Abkürzungen: *AMPA-R*: α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure – Rezeptor; *NMDA-R*: N-Methyl-D-Aspartat – Rezeptor; *NO*: Stickstoffmonoxid; *PKA*: Proteinkinase A; *PKC*: Proteinkinase C.

1.2 Proteomics

1.2.1 Das Proteom

Die meisten Funktionen unseres Körpers werden von Proteinen ausgeführt. Sie sind die Träger der im Genom festgelegten Zellfunktionen. Aufgrund der Bedeutung, die den Proteinen auch bei pathophysiologischen Vorgängen zukommt, wirken nahezu alle der heute auf dem Markt befindlichen Medikamente auf Proteine als Zielmoleküle (Drews 2000).

Das Proteom ist die quantitative Darstellung der Proteinzusammensetzung einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus unter genau definierten Bedingungen (Wilkins et al. 1996). Im Gegensatz zum Genom, das ein gut definiertes und statisches Gebilde ist, reflektiert das Proteom die dynamische Proteinexpression, die durch eine große Anzahl von Parametern beeinflusst wird. So besteht zwischen der Menge einer mRNA und der dazugehörigen Proteinmenge nur eine schwache Korrelation (Gygi et al. 1999) (Abbildung 1.4). Im Proteom werden, im Gegensatz zum Genom, auch Translationsregulation, mRNA-Stabilität, Proteinstabilität und Proteinabbau erfasst. Bei höheren Organismen wird sowohl die Struktur als auch die Funktion vieler Proteine durch posttranslationale Ereignisse entscheidend beeinflusst. Sehr häufig wird das neu synthetisierte Protein prozessiert und oftmals finden auch andere posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, statt, was für die Aktivierung vieler Enzyme von entscheidender Bedeutung ist und aufgrund der Genstruktur nur bedingt vorausgesagt werden kann.

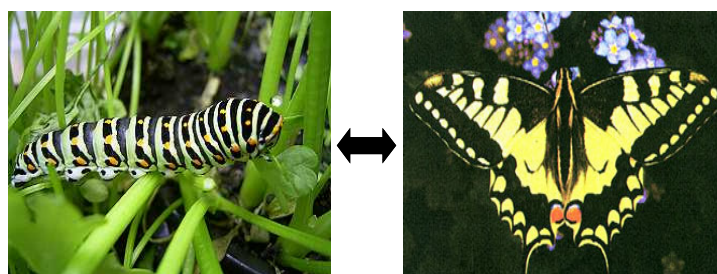


Abbildung 1.4: Ein typisches Beispiel der Veränderung eines Proteoms ist die Verwandlung einer Raupe in einen Schmetterling. Beide dargestellten Erscheinungsformen gehören zur Spezies Schwalbenschwanz. Sie besitzen das gleiche Genom, aber ein unterschiedliches Proteom.

1.2.2 Analyse des Proteoms

Um komplexe zelluläre Vorgänge verstehen zu können, ist es sinnvoll, zusätzlich zur Untersuchung des Genoms, auch das Proteom zu analysieren. Eine solche Analyse wird mit dem Begriff Proteomics umschrieben und umfasst Forschungsprojekte, die darauf gerichtet sind, das Proteinrepertoire zu erfassen und die Funktionen der Proteine und Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen aufzudecken (Anderson et al. 1998).

Die Schlüsseltechnologie zur Analyse der Proteinexpression ist die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese, mit der komplexe Proteingemische von Zellen oder Geweben in einer zweidimensionalen Matrix voneinander separiert und visualisiert werden (Gorg et al. 1995; Klose et al. 1995). Das hohe Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese beruht auf der Trennung nach zwei unabhängigen Eigenschaften von Proteinen. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte getrennt, während die Trennung in der zweiten Dimension nach der Masse der Proteine erfolgt. Nach der 2D-Gelelektrophorese können die Proteine direkt im Gel oder nach Transfer auf eine Membran durch Färbung quantifiziert werden. Die Methode der Wahl zur Identifizierung der Proteine ist die Massenspektrometrie (Burlingame et al. 1998; James 1997; McLafferty et al. 1999).

1.2.3 Differentielle Proteomanalyse

Krankheiten wie z.B. die Sichelzellanämie können durch den Austausch nur einer einzigen Base im Genom ausgelöst werden. Die meisten Erkrankungen sind jedoch komplexer gestaltet und die Aufklärung der jeweiligen Pathomechanismen ist komplizierter. In diesem Fall lassen sich grundlegende Erkenntnisse über pathophysiologische Mechanismen durch die Aufdeckung von Unterschieden in den Proteinexpressionsmustern von für das Krankheitsgeschehen relevanten Geweben gewinnen. Diese Unterschiede stellen sich dabei in Form von Intensitäts- oder Positionsveränderungen der Proteinspots in den 2D-Gelen dar. Die hierbei identifizierten Proteine, die mit dem bestimmten pathophysiologischen Zustand assoziiert sind, können dabei auch als Zielmoleküle zur Entwicklung von Arzneimitteln genutzt werden (Swindells et al. 2002).

1.3 Charakterisierung zweier aus der Proteomanalyse resultierender Proteine

Mittels vergleichender Proteomanalyse des Rückenmarks nach Induktion von peripheren, chronischen Entzündungsschmerzen wurden im Rahmen dieser Arbeit u.a. zwei vielversprechende Proteine identifiziert. Grundlegende, bereits beschriebene Erkenntnisse über diese Proteine sollen im Folgenden einführend erläutert werden.

1.3.1 Neurofilament light und dessen Abbau

Neurofilamente gehören zu den Intermediärfilamenten (IFs), die neben Mikrofilamenten und Mikrotubuli die dritte Gruppe von Zytoskelettfasern in den Zellen bilden. Neurofilamente stellen Heteropolymere aus den drei Polypeptiden NF-L (68 kDa), NF-M (150 kDa) und NF-H (200 kDa) dar, die sich wesentlich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. NF-L wird ausschließlich in Neuronen exprimiert und bildet als Homopolymer das Rückgrat der Neurofilamente, an das sich NF-H und NF-M anlagern. Die Axone von Nervenzellen sind von einem zentralen Stab von Neurofilamenten erfüllt, wobei sie die Struktur dieser Zellen stabilisieren. NF-L ist für die Dickenzunahme der Axone verantwortlich und spielt daher auch bei der Geschwindigkeit der Impulsweiterleitung, die mit dem Durchmesser der Axone im Verhältnis steht, eine wichtige Rolle (Sakaguchi et al. 1993). Es wird angenommen, dass ein Zusammenbruch des Neurofilament-Skeletts zu pathophysiologischen Vorgängen beiträgt, die im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und amyotropher Lateralsklerose ablaufen (Julien 1999). Darüber hinaus wurden das Absterben und Fehlfunktionen der Neurone nach Verletzung des Rückenmarks mit einer Abnahme von Neurofilamenten in Verbindung gebracht (Ray et al. 2000b).

Eine Degradierung der Neurofilamente wird hauptsächlich durch die Cystein-Protease Calpain vermittelt (Ray et al. 2000c; Schlaepfer et al. 1985; Stys et al. 2002). Daneben gibt es Hinweise auf eine zusätzliche, aber untergeordnete Beteiligung der Proteasen Cathepsin B und Cathepsin D am Neurofilament-Abbau (Banay-Schwartz et al. 1987; Banik et al. 2000).

Den Namen „Calpaine“ haben die im Cytosol lokalisierten und früher als neutrale, Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteasen bezeichneten Enzyme durch ihre Calmodulin-ähnlichen Ca^{2+} -Bindungseigenschaften und die Ähnlichkeit ihrer katalytischen Domäne mit der von Papain erhalten. Das katalytische Zentrum von Calpain ist aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin aufgebaut, wobei dem Cystein (Cys 108) die größte Bedeutung bei der Katalyse zukommt. Durch eine kovalente Bindung der Thiol-Gruppe des Cys 108 kommt es zur katalytischen Spaltung der Peptid-Bindung des Substrates.

In Säugetieren konnten bisher 16 verschiedene Calpain-Isoformen mit den dazugehörigen Genen identifiziert werden (<http://ag.arizona.edu/calpains>). In Abhängigkeit ihrer Verteilung im Gewebe unterscheidet man weiterhin ubiquitär oder gewebespezifisch vorliegende Calpaine. Die am besten

untersuchten Vertreter der Calpain-Familie sind μ - und m-Calpain. Diese in Säugern ubiquitär vorkommenden Heterodimere bestehen aus einer großen (80 kDa) Untereinheit, die für μ - und m-Calpain eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz aufweist, und einer kleinen (30 kDa) Untereinheit, die bei beiden Isoenzymen identisch ist (Abbildung 1.5). Eine Aktivierung von μ -Calpain wird durch mikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen ausgelöst, wohingegen m-Calpain durch millimolare Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert wird (Sorimachi et al. 1997; Mellgren 1987).

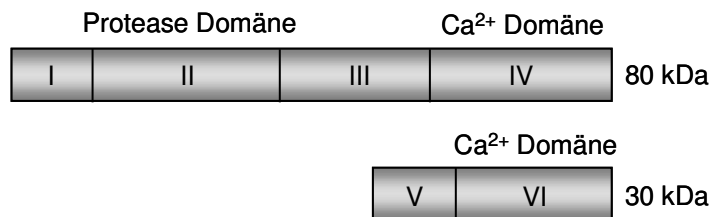


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der großen und kleinen Untereinheit von Calpain. Domäne II der großen Untereinheit ist die Protease-Domäne mit katalytischen Cystein-, Histidin- und Asparagin-Resten, die für die proteolytische Funktion verantwortlich sind. Die Domänen IV und VI sind Ca^{2+} -bindende Domänen mit einem Calmodulin-ähnlichen Aufbau (Perrin et al. 2002).

μ - und m-Calpain spielen bei verschiedenen zellulären, den zytoskelettalen Umbau betreffenden, Prozessen, aber auch bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle (Santella et al. 1998; Wang 2000; Li et al. 2002; Neumar et al. 2003; Saito et al. 1994). Neben der Aktivierung von μ - und m-Calpain unter physiologischen Bedingungen wird eine Aktivierung der Enzyme bei pathophysiologischen Prozessen, die mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einhergehen, postuliert. Dazu gehören Morbus Alzheimer, zerebrale Ischämien, Gehirntraumata und Rückenmarksverletzungen (Roberts-Lewis et al. 1994; Tsuji et al. 1998; Banik et al. 1997). Die proteolytische Calpain-Aktivität ist in diesem Zusammenhang gegen verschiedene Substrate, wie Zytoskelettproteine (z.B. Neurofilament, Spectrin, Fodrin), Mikrotubuli-assoziierte Proteine und Membranproteine (z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Ionen-Transporter), gerichtet (Chan et al. 1999; Baliova et al. 2004). Weitere Zielmoleküle von Calpain sind verschiedene Enzyme (z.B. Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen) sowie Zytokine und Transkriptionsfaktoren (Kampfl et al. 1997; Shields et al. 1998).

Zur Hemmung der gesteigerten Aktivität von Calpain, die nachweislich bei der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle spielt, wurden verschiedene Calpain Inhibitoren entwickelt. Neben der Fähigkeit, Zellmembranen überwinden zu können, sollte ein solcher Inhibitor möglichst spezifisch auf Calpain wirken. Der Wirkmechanismus

der Calpain Inhibitoren beruht auf einer kovalenten Interaktion zwischen der Thiol-Gruppe des Cystein 108 im katalytischen Zentrum des Enzyms und einem elektrophilen Teil des Inhibitors. Zwei Klassen solcher Calpain Inhibitoren stellen die Oxirane und die Aldehyde dar. Der Prototyp der Oxiran-Inhibitoren, E-64, besitzt geladene Gruppen, die bei der Synthese von E-64-d modifiziert wurden. E-64-d wird dadurch zellmembrangängig, inhibiert jedoch auch andere Cystein-Proteasen (Shoji-Kasai et al. 1988). Der Prototyp der Aldehyd-Inhibitoren, Leupeptin, zeigt ebenfalls eine mangelnde Selektivität. Calpain Inhibitor I und Calpain Inhibitor II sind Tripeptid-Aldehyde, die neben Calpain auch das Proteasom hemmen (Figueiredo-Pereira et al. 1994; Tsubuki et al. 1996). Bei den Substanzen Calpain Inhibitor III und Calpeptin handelt es sich um Dipeptid-Aldehyde. Sie stellen kleine, hydrophobe Moleküle dar, die durch passive Diffusion zellmembrangängig sind. Calpain Inhibitor III (Carbobenzoxy-valyl-phenylalanyl, MDL 28170) (Abbildung 1.6) ist weiterhin ein potenter und nahezu selektiver Inhibitor von μ - und m-Calpain (Rami et al. 1997; Chatterjee et al. 1998). Neben Calpain ist die Substanz jedoch in sehr viel geringerem Umfang auch gegen Cathepsin B inhibitorisch wirksam, da sich die katalytischen Domänen dieser beiden Enzyme stark ähneln (Sasaki et al. 1990).

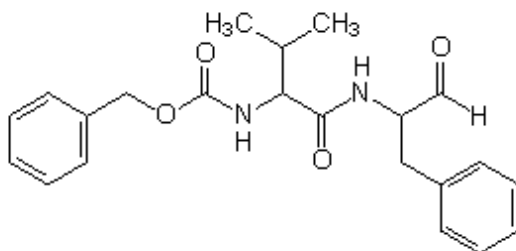


Abbildung 1.6: Strukturformel des Calpain Inhibitors III (MDL 28170).

Calpastatin (110 kDa) stellt neben den beschriebenen synthetischen Calpain Inhibitoren einen endogenen Inhibitor des Calpains dar. Dieses Protein ist jedoch zu groß, um Zellmembranen überwinden zu können und wird bei einem gesteigerten Verhältnis von Calpain zu Calpastatin als Suizid-Substrat von Calpain abgebaut (Saido et al. 1997; Blomgren et al. 1999). Calpastatin ist daher nicht zum therapeutischen Gebrauch geeignet.

1.3.2 Aldose Reduktase

Die Aldose Reduktase (AR) ist ein Mitglied der Aldo-Keto-Reduktase Familie und katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion verschiedener aromatischer und aliphatischer Aldehyde, einschließlich Glukose und Galaktose (Bhatnagar et al. 1992).

Bei unzureichender Insulinregulierung kann es kurzfristig zu stark erhöhten Blutzuckerspiegeln kommen. Dadurch steigt die Glukosekonzentration in Zellen, deren Glukoseaufnahme insulinunabhängig ist, auf unphysiologisch hohe Werte an. Unter diesen Bedingungen erreicht der normalerweise beschrittene glykolytische Abbau, der mit der Hexokinase-reaktion beginnt, eine Sättigung und überschüssige Glukose wird über den Polyol-Stoffwechselweg umgesetzt. Auf diesem Pfad verläuft der Abbau der Glucose durch die AR zu Sorbitol, das dann weiter zu Fruktose umgewandelt wird (Abbildung 1.7).

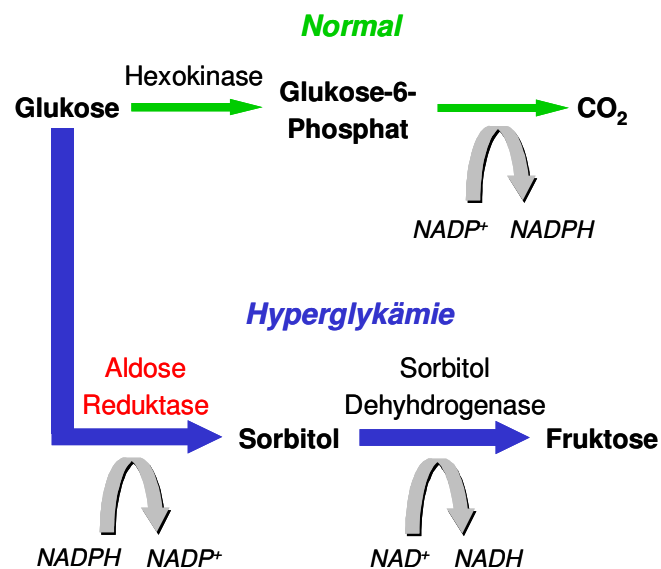


Abbildung 1.7: Abbau von Glukose unter normalen Bedingungen und beim Vorliegen einer Hyperglykämie durch den Sorbitol-Stoffwechselweg unter Beteiligung der Aldose Reduktase.

Die vermehrte Bildung und Anhäufung von osmotisch aktivem Sorbitol in den Zellen wird mit der Entstehung diabetischer Spätschäden, wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie, in Verbindung gebracht (Yabe-Nishimura 1998). Eine weitere Rolle bei der Entstehung von Folgeschäden des Diabetes mellitus spielt der vermehrte Verbrauch an NADPH durch die AR unter hyperglykämischen Bedingungen. Der Mangel an diesem Kofaktor beeinträchtigt insbesondere die Funktion der Glutathion-Reduktase, die für den Abbau von oxidativem Stress verantwortlich ist (Lee et al. 1999). Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass Aldehyde, die hydrophober sind als Glukose, die eigentlich bevorzugten Substrate der AR darstellen (Srivastava et al. 1999). Viele dieser Aldehyde sind toxisch und werden im Rahmen der Lipidperoxidation gebildet. Durch die AR werden diese Substrate zu inaktiven Metaboliten reduziert, was auf schützende und antioxidative Eigenschaften der AR hindeutet (Spycher et al. 1997; Rittner et al. 1999) (Abbildung 1.8).

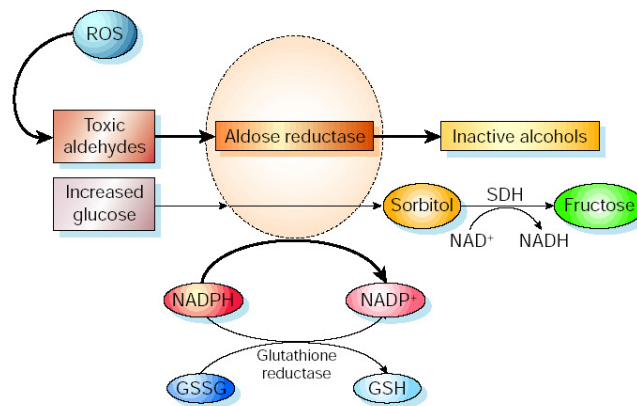


Abbildung 1.8: Neben Glukose reduziert Aldose Reduktase toxische Aldehyde, die aus reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) entstehen, zu inaktiven Alkoholen. Als Kofaktor dient NADPH. In Zellen mit erhöhter Aldose Reduktase-Aktivität wird die Konzentration an reduziertem Glutathion verringert, was verstärkt zu oxidativem Stress führt (Brownlee 2001).

Darüber hinaus wurde unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, Stickstoffmonoxid (NO) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine gesteigerte Expression von AR nachgewiesen (Iwata et al. 1999; Ruef et al. 2000; Seo et al. 2000). Diese Erkenntnisse deuten auf eine Beteiligung der AR bei Wachstums- und Entzündungsprozessen hin.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Chronische Schmerzen können mit den derzeit zur Verfügung stehenden Arzneistoffen oftmals nur unzureichend oder unter Inkaufnahme von zum Teil erheblichen Nebenwirkungen therapiert werden. Bei der Ausbildung der zentralen Sensibilisierung im Rahmen von Chronifizierungsprozessen spielen Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der Hinterhornneurone eine wichtige Rolle. Zahlreiche Proteine, die auf spinaler Ebene zur Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen beitragen, sind bereits bekannt. Es besteht allerdings noch ein hoher Forschungsbedarf bei der Suche nach alternativen Proteinen, die an den plastischen Veränderungen im Rückenmark beteiligt sind und möglicherweise als innovative pharmakologische Zielmoleküle genutzt werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse Proteine zu identifizieren, deren Regulation im Rahmen von spinalen Sensibilisierungsvorgängen bisher nicht erforscht wurde. Als Schwerpunkte sollten der chronische Entzündungsschmerz und der neuropathische Schmerz im Tiermodell untersucht und die auftretenden Regulationen aufgrund der beiden verschiedenen Schmerzzustände miteinander verglichen werden. Darauf aufbauend sollten weiterhin die molekularen Mechanismen, durch die die identifizierten Proteine in das Schmerzgeschehen eingreifen, eingehender beleuchtet werden.

Aufgrund der so gewonnenen Kenntnisse wurde nachfolgend die pharmakologische Wirkung eines Inhibitors der Protease Calpain in einem Entzündungsmodell *in vivo* getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Ratten, deren neuroanatomische Strukturen und neurophysiologische Mechanismen des Schmerzgeschehens vergleichbar mit denen des Menschen sind, haben sich für die Schmerzforschung als geeignete Versuchstiere herausgestellt. Die Untersuchungen wurden mit männlichen Sprague Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere wurden unter konstanten Umweltbedingungen gehalten (Raumtemperatur $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$; Belichtungszeitraum 6-18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Leitungswasser ad libitum. Alle Experimente wurden von der zuständigen Ethikkommission für Tierversuche (Regierungspräsidium Darmstadt) befürwortet.

2.2 Zellen

Für die Expression von rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen wurde die permanente humane Zervix-Karzinom Zelllinie HeLa verwendet. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, aus deren Karzinom die Zellen isoliert wurden, zurück.

2.3 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der *E. coli*-Stamm DH5 α und zur Proteinexpression der *E. coli*-Stamm BL21 (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
1,4-Dithiothreit	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Agarose NEEO	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumthiocyanat	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe

APS	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
CTAB	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
EDTA (Idranal [®] III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Isopropanol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver (Nutaflor [®])	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Manganchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc [®] SC	Qbiogene-Alexis, Grünberg
PEG 400	Caelo, Hilden
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
PMSF	Perbio Science, Bonn
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt

Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Sarkosyl	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TFA	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt
Urea	Carl Roth, Karlsruhe
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

2.5 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.5.1 Implantation periduraler Katheter

Zur periduralen Applikation von Calpain Inhibitor III (siehe auch Kapitel 2.5.4) wurden Ratten entsprechende Katheter implantiert. Dazu wurden die Tiere mit 60 mg/kg i.p. Ketamin (Ketanest[®] S, Parke-Davis, Freiburg) und 0,5-1 mg/kg i.p. Midazolam (Midazolam ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm) narkotisiert. Die Haut oberhalb der Wirbelsäule (Th13 bis L3) wurde durchtrennt und das Muskelgewebe im Bereich L2-L3 entfernt. Bei L3 wurde der Dornfortsatz entfernt und die Okzipitalmembran bei L2 durchtrennt. Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, neoLab, Heidelberg) wurden in den Periduralraum so weit eingeführt, bis die Spitze des Katheters bei Th12 zu liegen kam. Der Katheter wurde mit Cyanacrylat-Klebstoff fixiert und in der Nackenregion nach außen geführt. Anschließend wurde die Wunde vernäht. Die Implantation der Katheter wurde von Herrn Dr. O. Coste durchgeführt. Es wurden ausschließlich Ratten, die nach der Implantation keine neurologischen Ausfälle oder sonstige Verhaltensauffälligkeiten zeigten, für die folgenden Versuche herangezogen.

2.5.2 Tiermodelle für Entzündung und Entzündungsschmerz

Ausschlaggebend für den Erfolg eines Wirkstoffes auf dem Weg in die klinische Entwicklung ist seine Wirksamkeit in indikationsrelevanten Tiermodellen.

Die Injektion von phlogistischen Substanzen in die Hinterpfote von Ratten kann je nach Versuchsdesign als Entzündungs- oder Hyperalgesie-Modell verwendet werden. Zur Auslösung des Entzündungsreizes mit Ödembildung wurden 1,25 mg Zymosan A (aus *Saccharomyces cerevisiae*) in 100 μ l PBS Dulbecco's (Invitrogen, Karlsruhe) suspendiert und in die Plantarseite einer Hinterpfote subkutan injiziert (Meller et al. 1997).

2.5.2.1 Bestimmung des Pfortenödems

Das zymosaninduzierte Ödem wurde durch Messung des Pfortenvolumens mit einem Plethysmometer (Ugo Basile, Varese, Italien) quantifiziert. Hierzu wird die Pfote bis zu einer Markierung am Knöchel als anatomischen Fixpunkt in eine wassergefüllte Küvette getaucht und die Volumenverdrängung durch die entzündete Pfote automatisch ermittelt (Bileviciute et al. 1998; Sawynok et al. 1997). Die Bestimmung des Pfortenvolumens wurde zur Ermittlung des Leerwertes vor und 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 und 24 h nach der Zymosanapplikation durchgeführt. Für die Auswertung des Versuches wurde jeweils der Mittelwert von fünf Messungen zu jedem Zeitpunkt verwendet.



Abbildung 2.1: Versuchsaufbau zur Bestimmung des zymosaninduzierten Pfortenödems.

2.5.2.2 Bestimmung der thermischen Hyperalgesie

Zur Ermittlung entzündungsbedingter thermischer Hyperalgesie wurde der Hargreaves-Test nach Zymosaninjektion in die Pfote angewandt (Hargreaves et al. 1988). Als Maß für die Hyperalgesie wird hierbei die Latenzzeit der nozifensiven Reaktion auf eine thermische Reizung hin herangezogen. Die Messungen wurden mittels eines Basile Plantar Test (Ugo Basile, Varese, Italien) durchgeführt. Dabei wurden Ratten vor Beginn der Versuche 60 min lang an die Plexiglas-Testkäfige mit einem Boden aus

Maschendraht gewöhnt. Die Plantarseiten der Hinterpfoten wurden mit einem feinen Wärmestrahler thermisch stimuliert und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote mittels eines in das Gerät eingebauten Bewegungssensors automatisch gemessen. Die Latenzzeit der Wegziehreaktion beider Hinterpfoten wurde zur Ermittlung des Leerwertes vor und anschließend 8 h lang nach der Zymosaninjektion alle 60 min bestimmt. Eine weitere Messung wurde nach 24 h durchgeführt. Als Messwert diente jeweils der Mittelwert von 3 Messungen, die im Abstand von 2 min durchgeführt wurden.

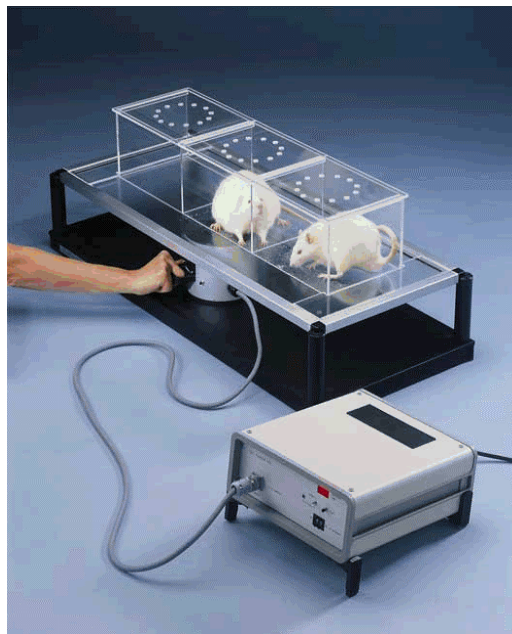


Abbildung 2.2: Versuchsaufbau zur Bestimmung der zymosaninduzierten thermischen Hyperalgesie.

2.5.3 Tiermodell für neuropathischen Schmerz

In Ratten lässt sich durch die unilaterale chronische Ligatur des Nervus ischiadicus (CCI = chronic constriction injury) eine Neuropathie mit Symptomen chronischer Schmerzzustände erzeugen (George et al. 2000; Bennett et al. 1988). Dabei werden die Bedingungen einer chronischen Nervenkompression, wie sie z.B. im Rahmen eines Bandscheibenvorfalles auftreten, nachgeahmt.

Während des Eingriffs wurden die Tiere, wie unter Kapitel 2.5.1 beschrieben, narkotisiert. Die Haut wurde über dem Flexor caudae longus eingeschnitten und der Ischiasnerv vom umliegenden Gewebe befreit, ohne dabei die perineuralen Gefäße zu beschädigen. Dann wurde der Nervus ischiadicus proximal seiner Trifurkation durch drei lockere Ligaturen so lange abgeschnürt, bis eine Zuckung der betroffenen Pfote beobachtet wurde. Nach Setzen der Ligaturen wurden die Wunden verschlossen. Die Operationen wurden von Frau PD Dr. I. Tegeder durchgeführt.

Die so induzierte neuropathische Symptomatik, die post operationem anhand verschiedener nozizeptiver Tests ermittelt wurde, war nach einer Woche am stärksten ausgeprägt und blieb bis drei Wochen nach dem Eingriff erhalten. Am 21. Tag wurden die Tiere getötet und das Rückenmark entnommen.

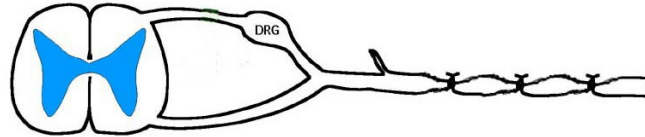


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Ligatur des Nervus ischiadicus nach dem CCI-Modell.

2.5.4 Behandlung mit Calpain Inhibitor III

Calpain Inhibitor III (MDL 28170) (Calbiochem, Schwalbach/Ts.) wurde in PEG 400/DMSO (1:1 vol/vol) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Substanz wurde 20 min vor der Zymosaninjektion i.p. in Dosierungen von 12,5 und 25 mg/kg verabreicht. Zur periduralen Applikation wurde eine Dosierung von 1 mg/kg gewählt. Die Kontrolltiere erhielten jeweils das gleiche Volumen an reinem Vehikel (PEG 400/DMSO; 1:1).

2.5.5 Gewebeentnahme

Nach Abschluss der jeweiligen Experimente wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und mittels kardialer Punktion entblutet. Nach Freilegen des Rückenmarks wurde zunächst der lumbale Teil des Rückenmarks (Segmente L3-L5) und anschließend die entsprechenden Hinterwurzelganglien entnommen. Von den Pfoten wurde das entzündete Gewebe an der Fußsohle (Subkutis, Muskulatur) entfernt. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.6 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die HeLa-Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit PBS Dulbecco's (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt. Zum Einfrieren wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO im üblichen Nährmedium)

resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Nährmedium	1 l	RPMI 1640 Medium with Glutamax-I with Hepes (Invitrogen, Karlsruhe)
	50 ml	FBS (Life Technologies, Paisley, Schottland)
	6 ml	Penicillin Streptomycin Lösung (Invitrogen, Karlsruhe)

2.6.1 In der Zellkultur verwendete Prüfsubstanzen

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

Name	Hersteller	Konzentration	Eigenschaften
IL-1 β	Cell Concepts, Umkirch	1 nM	Zytokin
IFN- γ	Cell Concepts, Umkirch	10 ng/ml	Zytokin
TNF- α	Cell Concepts, Umkirch	10 ng/ml	Zytokin
Dexamethason	Sigma, Steinheim	0,5 μM	Kortikosteroid
Lacatacystin	Biomol, Hamburg	5 μM	Proteasom-Inhibitor
Cycloheximid	Calbiochem, Schwalbach/Ts.	2,5 $\mu\text{g/ml}$	Translationshemmer

Alle Substanzen wurden in Aqua purificata gelöst und anschließend steriltriiert. Zur Inkubation der Zellen wurde das Nährmedium mit den entsprechenden Lösungen versetzt.

2.7 Kultivierung prokaryontischer Zellen

2.7.1 Nährmedien

Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Bertrani Medium (LB-Medium). Zur Herstellung wurden 20 g LB Broth Base (Life Technologies, Paisley, Schottland) in 1 l Aqua purificata gelöst und das Medium vor der Verwendung autoklaviert.

Für die Plattenkultur wurden 32 g LB Agar (Life Technologies, Paisley, Schottland) in 1 l Aqua purificata gelöst, das Medium anschließend autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen.

2.7.2 Bakterienkultur

E. coli-Zellen wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den frisch gewachsenen Kolonien wurden Flüssigkulturen in Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C aerob angezogen. Kleinere Volumina (2 ml) wurden in Eppendorfgefäßen und größere Volumina (bis zu 500 ml) in Erlenmeyerkolben bei 170 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert. Bei Bedarf wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension zur Stammhaltung 1:1 mit DMSO 7 % versetzt und bei -80°C gelagert.

2.8 Proteinanalytik

2.8.1 Proteinextraktion

2.8.1.1 Extraktion aus Gewebeproben

Die Extraktion der Proteine aus den Geweben erfolgte in Gewebe-Lysispuffer (ca. 15 mg/ml) unter Eiskühlung. Das Rückenmark wurde dabei mittels eines konischen Gewebe-Handhomogenistators (neoLab, Heidelberg) und das Pfortengewebe mit einem UltraTurrax[®] (T18 basic, IKA Works, Wilmington, USA) homogenisiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 15°C) wurden die Extrakte nochmals in einer Optima[®] TLX-Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA) 60 min bei 40000 rpm und 15°C geklärt. Die Proteinlysate wurden bis zur endgültigen Verwendung bei -80°C gelagert.

Gewebe-Lysispuffer	9 M	Harnstoff
	2 %	CHAPS
	1 %	DTT
	4 mM	Pefabloc [®] SC

2.8.1.2 Extraktion aus HeLa-Zellen

Die Zellen wurden zunächst auf der Zellkulturschale mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde 1 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in Zell-Lysispuffer resuspendiert. Mittels Ultraschall (zweimal 10 sec) (Branson Sonifier 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) wurden die Zellen lysiert und das Lysat zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C). Der die Proteine enthaltende Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt.

Zell-Lysispuffer	20 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	1 mM	EDTA
	1 mM	2-Mercaptoethanol
	5 %	Glycin
	1 mM	PMSF
	3 mM	DTT

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Proteinproben wurden mit Aqua purificata 1:10 verdünnt. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden diente die Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (4, 3, 2, 1 und 0 mg/ml). Auf einer 96-well Microtiter[®]-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) wurden jeweils 200 µl des Bradford-Reagenzes zu 10 µl der verdünnten Proteinlösungen und der Standards gegeben. Anschließend erfolgte die photometrische Auswertung bei 595 nm mit dem SpectraFluor Plus[®]-Instrument und der X-Fluor[®]-Software (Tecan, Crailsheim).

Bradford-Reagenz	0,01 %	Coomassie brilliant blue G250
	5 %	Ethanol
	10 %	Phosphorsäure 85 %

2.8.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine nach ihrer Größe. Die Polypeptidketten werden dazu mit dem anionischen Detergenz SDS entfaltet und bilden Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit, die im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Die Methode erfolgte nach Laemmli (Laemmli 1970). Zur Trennung wurden diskontinuierliche Gele mit einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem feinporigen Trenngel (pH 8,8) verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben 1:4 in 4 x Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert (Thermomixer compact[®], Eppendorf, Hamburg). Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (SeeBlue[®], Invitrogen, Karlsruhe) in Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100V. Die Arbeiten wurden mit dem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean[®] 3 (Bio-Rad, München) durchgeführt.

Gele	Trenngel	10 %	Acrylamidlösung (37,5:1) (Rotiphorese [®] Gel 30, Roth, Karlsruhe)
		0,375 M	Tris-HCl (pH 8,8)
		0,1 %	SDS
		polymerisiert mit je 0,05 % APS und TEMED	

	Sammelgel	3 % 0,125 M 0,1 % polymerisiert mit je 0,05 % APS und TEMED	Acrylamidlösung (37,5:1) (Rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe) Tris-HCl (pH 6,8) SDS
Puffer	Laufpuffer	25 mM 0,2 M 0,1 % pH 8,3	Tris-Base Glycin SDS
	4 x Probenpuffer	0,2 M 10 % 0,004 % 40 % 20 %	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Bromphenolblau Glycerol 2-Mercaptoethanol

2.8.4 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens wird das Bandenmuster elektrophoretisch aufgetrennter Proteine von dem Trenngel auf eine inerte Filtermembran übertragen und – im Falle eines Immuno Blots – mittels Antikörper spezifisch angefärbt. So wird das Auffinden eines bestimmten Proteins in einer komplexen Mischung ermöglicht.

2.8.4.1 Elektroblotting

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace® NT, Pall, Dreieich) überführt (Towbin et al. 1979). Dabei wurde das in Transferpuffer äquilibrierte Gel folgendermaßen in die Apparatur eingeschichtet: Minus-Pol, Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm, Plus-Pol. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h in einer mit Transferpuffer gefüllten Blottingapparatur (MiniTransBlot®, Bio-Rad, München). Unmittelbar danach wurde der Proteintransfer durch Färbung der Membran mit Ponceau-Lösung kontrolliert.

Transferpuffer	39 mM 48 mM 0,037 % 20 %	Glycin Tris-Base SDS Methanol
Ponceau-Lösung	3 % 0,1 %	Trichloressigsäure Ponceau S

2.8.4.2 Immundetektion von geblotteten Proteinen

Die Membran wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert. Zur Identifizierung des gesuchten Proteins im geblotteten Bandenmuster wurde die Membran zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper in Antikörperpuffer auf einem Überkopfmischer (Reax[®] 2, Heidolph, Schwabach) für 2 h inkubiert. Auf der Membran bildet sich dabei ein Antigen-Antikörper-Komplex. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer auf einem Schüttelapparat (GFL-3005[®], GFL, Burgwedel) gewaschen und schließlich für 1 h mit an einen Infrarot-Farbstoff gekoppeltem Sekundärantikörper, der in Antikörperpuffer aufgenommen wurde, behandelt. Nach dieser Inkubation folgten drei weitere Waschschrirte mit Waschpuffer und einer mit PBS-Puffer (jeweils 10 min). Die Detektion des entsprechenden Proteins erfolgte durch Scannen des Blots mit einem Odyssey[®] Infrared Scanner (LI-COR, Lincoln, USA).

PBS-Puffer	10 g 0,25 g 1,77 g 0,25 g ad 1 l	Natriumchlorid Kaliumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Aqua purificata
Waschpuffer	0,3 %	Tween [®] 20 in PBS-Puffer
Blockpuffer	5 %	Magermilchpulver in PBS-Puffer
Antikörperpuffer	5 %	Magermilchpulver in Waschpuffer

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	Name	Verdünnung	Lieferant
Primärantikörper:	β-Aktin	1 : 10000	Sigma, Steinheim
	Alose Reduktase	1 : 5000	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
	Cox-2	1 : 1000	Cayman, Ann Arbor, USA
	GFP	1 : 1000	Roche Diagnostics, Mannheim
	NF-L	1 : 400	Sigma, Steinheim
	PentaHis	1 : 1000	Qiagen, Hilden
Sekundärantikörper:	AlexaFluor [®] 680 goat anti-mouse IgG	1 : 10000	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
	AlexaFluor [®] 680 goat anti-rabbit IgG	1 : 10000	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.8.5 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die einzelnen Proteine eines Proteingemischs in der ersten Dimension zunächst durch isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch geeignete Bedingungen erhält man eine Auflösung von mehreren hundert Proteinspots in einem Gel (O'Farrell 1975; Klose 1975). Durch den Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in der ersten Dimension ist die Methode gut reproduzierbar und stellt derzeit die Standardmethode in Proteomanalyse dar (Gorg et al. 1988; Gorg et al. 1995; Bjellqvist et al. 1982).

2.8.5.1 Probenvorbereitung

600 µg Protein wurden aus Proteinlysat mit 50 % Trichloressigsäure bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde dreimal mit Aceton gewaschen und in 290 µl Rehydratisierungslösung resuspendiert.

Rehydratisierungspuffer	8 M	Harnstoff
	2 %	CHAPS
	20 mM	DTT
	0,5 %	IPG Puffer 3-10 (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.8.5.2 Auftrennung in der ersten Dimension

Je 250 µl der Probe wurden in Streifen-Halter pipettiert und die IPG-Streifen (13 cm Immobiline DryStrips pH 3-10 linear, Amersham Biosciences, Freiburg) in dem Halter auf die Proben gelegt. Die Streifen wurden anschließend mit 500 µl Siliconöl DC 200 (Serva, Heidelberg) überschichtet. Die beschickten Halter wurden auf die Peltier-Elektrodenplatte des IPGphor® Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt und nach folgenden Programm fokussiert: 2 h Rehydrierung, 6 h bei 30 V, 3 h bei 60 V, 1 h bei 200 V, 1 h bei 500 V, 4 h bei 5000 V und 1 h bei 8000 V.

2.8.5.3 Auftrennung in der zweiten Dimension

Die IPG-Streifen wurden nacheinander in jeweils 10 ml Equilibrierungslösung 1 (Reduktion der Proteine) und 2 (Carboxamidomethylierung der Proteine) für je 15 min inkubiert.

Basis-Equilibrierungslösung	6 M	Harnstoff
	50 mM	Tris-HCl Puffer (pH 8,8)
	2 %	SDS
	30 %	Glycerol
	Spur	Bromphenolblau
Equilibrierungslösung 1	1 % DTT	in Basis-Equilibrierungslösung

Equilibrierungslösung 2 4 % Iodacetamid in Basis-Equilibrierungslösung

Die equilibrierten Streifen wurden auf die Geloberkante eines 13 %igen SDS-Gels appliziert und mit einer 1 %igen Agaroselösung in Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese der zweiten Dimension erfolgte mit einer Hoefer Electrophoresis Unit (SE600 Series, Amersham Biosciences, Freiburg) und wurde 1 h bei 2,5 W pro Gel und anschließend bei 5 W pro Gel durchgeführt.

Zusammensetzung pro Gel	5,2 ml	Aqua purificata
	6,0 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	10,4 ml	Acrylamidlösung (37,5:1) (Rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe)
	3,0 ml	SDS-Lösung (10 %)
	3,0 g	Glycerin
	24 µl	APS-Lösung (40 %)
	21,6 µl	TEMED
Laufpuffer	2,9 g	Tris
	15 g	Glycin
	1 g	SDS
	ad 1 l	Aqua purificata

2.8.5.4 Nachweis der aufgetrennten Proteine

Die Färbung der Gele erfolgte mit einer 0,1 %igen Coomassie-Blau-Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Gele zunächst für 30 min mit Entfärbelösung 1 behandelt und anschließend bei mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung 2 so lange gewaschen, bis der Hintergrund der Gele klar war. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 1 ng Protein/mm² Gel (Neuhoff et al. 1988).

Coomassie-Blau-Färbelösung	1 Tablette	PhastGel® Blue R (Amersham Biosciences, Freiburg)
	80 ml	Aqua purificata
	120 ml	Methanol
	200 ml	Essigsäure
Entfärbelösung 1	40 %	Methanol
	7 %	Essigsäure
Entfärbelösung 2	5 %	Methanol
	7 %	Essigsäure

2.8.5.5 Computergestützte Auswertung der 2D-Gele

Zur Auswertung der Gele wurden diese nach dem Färben zunächst eingescannt (UMAX PowerLook® III) und anschließend mit der ImageMaster® 3.10 Software (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers ausgewertet.

2.8.6 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

2.8.6.1 Tryptischer Peptidverdau

Zur Identifizierung der Proteine wurden die interessierenden Spots zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und dreimal mit Aqua purificata gewaschen. Zur Entfärbung der Gelstücke folgten drei weitere Waschstschritte mit 50 % Acetonitril/25 mM Ammoniumbicarbonat für jeweils 15 min (je 400 µl/Gelstück). Anschließend wurden die Gelstücke durch zweimaliges Waschen mit jeweils 100 µl reinem Acetonitril entwässert und in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) für 15 min getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden zunächst mit 400 µl Verdauopuffer versetzt, der nach 30 min gegen 400 µl Inkubationspuffer ausgetauscht wurde. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Morgen wurde der nach Zentrifugation (13000 g, 15 min) gewonnene Überstand zum Abstoppen des Verdaus mit 50 µl 100 % Acetonitril/0,5 % TFA versetzt. Zu den Gelstücken wurden ebenfalls jeweils 50 µl 100 % Acetonitril/0,5 % TFA gegeben und die Proben für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 g, 15 min) wurde der Überstand dieses Reaktionsansatzes mit dem Überstand des Verdaus vereinigt und die Proben im Vakuumkonzentrator komplett getrocknet.

Trypsin-Stocklösung	12,5 µg/ml	Trypsin (Trypsin Sequencing Grade, Roche Diagnostics, Mannheim) gelöst in 1 mM HCl
Verdauopuffer	20 µl 200 µl 10 µl 170 µl	Trypsin-Stocklösung Ammoniumbicarbonat-Lösung (100 mM) Calciumchlorid-Lösung (100 mM) Aqua purificata
Inkubationspuffer	200 µl 10 µl 190 µl	Ammoniumbicarbonat-Lösung (100 mM) Calciumchlorid-Lösung (100 mM) Aqua purificata

2.8.6.2 MALDI-TOF-MS

Zur Identifizierung der Proteine wurden die Molekularmassen der entstandenen Peptidfragmente mit einem MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometer) bestimmt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von der Firma Aventis Pharma, Industriepark Höchst, Frankfurt und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Karas, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt durchgeführt.

2.8.7 Immunfluoreszenz

Das präparierte Lumbalrückenmark und die Hinterwurzelganglien der Ratte wurden in Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Instruments, Nussloch) eingebettet und bei -80°C gelagert. 10-15 µm dünne Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Schnitte nach dem Auftauen getrocknet und 15 min mit 4 % PFA in PBS (pH 7,4) fixiert. Zur Erzielung einer guten Gewebezugänglichkeit wurden die Schnitte nach dreimaligen Waschen mit PBS 15 min in 0,1 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C in einer Präinkubationslösung (3 % BSA in PBS) zur Prävention unspezifischer Antikörperbindung geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte bei 37°C für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Antikörper wurden jeweils in 1 % BSA in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit SlowFade Antifade® (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) nach Angaben des Herstellers eingebettet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer Kappa DX20H Kamera (Kappa, Gleichen) an einem Nikon Eclipse® E600 Mikroskop (Objektiv 20x) (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	Name	Verdünnung	Lieferant
Primärantikörper:	NF-L	1 : 100	Sigma, Steinheim
	m-Calpain	1 : 50	Affinity Bioreagents, Golden, USA
Sekundärantikörper:	Anti-mouse IgG – Cy3	1 : 800	Sigma, Steinheim

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 RNA-Extraktion

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

Zur RNA-Extraktion aus Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mechanisch mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde 1 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Tri-Reagenz resuspendiert.

Zur RNA-Extraktion aus Rückenmark wurde das Gewebe mit 1 ml Tri-Reagenz versetzt und unter Eiskühlung mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator (neoLab, Heidelberg) homogenisiert.

Anschließend wurde mit beiden Arten von Proben gleich weiterverfahren. Die Lysate wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 sec kräftig geschüttelt, 15 min inkubiert und schließlich 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die obere, RNA-enthaltende Phase abpipettiert und in ein neues RNase-freies Tube überführt. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl reiner Isopropylalkohol zugegeben, 5 min inkubiert und 8 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit einem BioPhotometer® (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

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

2.9.2 PCR-Anwendungen

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist ein in-vitro Verfahren zur selektiven Anreicherung von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al. 1988).

2.9.2.1 RT-PCR

Die Analyse der mRNA erfolgte in einem einstufigen Prozess mit einer Reversen Transkription zur Synthese von cDNA und anschließender Polymerase-Kettenreaktion, bei der diese cDNA als Template dient. Die Reaktion erfolgte in einem MasterCycler® (Eppendorf, Hamburg). Der Reaktionsansatz wurde mit dem kommerziell erhältlichen OneStep® RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben angesetzt.

Reaktionsansatz (25 µl):	5 µl	5 x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	
	5 µl	5 x Q-Solution	
	1 µl	dNTP Mix (jeweils 10 mM)	
	2 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)	
	2 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)	
	1 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	
	1 µg	RNA	
Reaktionsbedingungen:	Reverse Transkription	30 min	50°C
	Initiale Aktivierung der Polymerase	15 min	95°C
	Amplifizierung (30 Zyklen)		
	Denaturierung	0,5 min	94°C
	Primer Anlagerung	0,5 min	55°C
	Verlängerung	1 min	72°C
	Finale Verlängerung	10 min	72°C

Die Primer wurden von BioSpring (Frankfurt) bezogen. Folgende Primer, die alle unter den oben genannten Bedingungen eingesetzt werden konnten, wurden verwendet:

Name	Sequenz (5'-3')
AR FP	TCCCAGGATCAAGGAAATTG
AR RP	CACCCTCCAGTTCCTGTTGT
Cox-2 FP	GCAGTTGTTCCAGACAAGCA
Cox-2 RP	AAGGGGATGCCAGTGATAGA
GAPDH FP	GGC CTC GTC TCA TAG ACA
GAPDH RP	ATG TTA GCG GGA TCG C
NF-L FP	CCG AAG AGT GGT TCA AGA GC
NF-L RP	TGT CTG CAT TCT GCT TGT CC

2.9.2.2 Primer-Überhang-Mutagenese

Durch Verlängerung der bei der PCR verwendeten Primer an ihren jeweiligen 5'-Enden lassen sich die Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments modifizieren (Scharf et al. 1986). Diese PCR-Mutagenese wurde angewendet, um PCR-Produkte mit zu bestimmten Vektoren passenden Restriktionsschnittstellen zu versehen. Der Reaktion wurde mit der HotStarTaq[®] DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach der Reinigung wurde das DNA-Fragment geschnitten und in den gewünschten Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.9.9).

Reaktionsansatz (50 µl):	5 µl	10 x PCR Buffer
	10 µl	5 x Q-Solution
	1 µl	dNTP Mix (jeweils 10 mM)
	1 µl	Primer 1
	1 µl	Primer 2
	0,25 µl	HotStarTaq DNA Polymerase
	1 µg	DNA

Reaktionsbedingungen:	Initiale Aktivierung der Polymerase	15 min	95°C
	Amplifizierung (35 Zyklen)		
	Denaturierung	0,5 min	94°C
	Primer Anlagerung	0,5 min	60°C
	Verlängerung	2 min	72°C
	Finale Verlängerung	10 min	72°C

Folgende Primer wurden verwendet:

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstellen
AR 1	TTGCAG <u>TCGAC</u> ATGGCTAGCCATCTGG	<i>SalI</i>
AR 2	TGCAAGCGGCCCGCCAGTGCAGAGG	<i>NotI</i>
AR 3	TCAGTA <u>AAGCTT</u> <u>GCGGCCG</u> CCAGTGCAGAG	<i>HindIII</i> ; <i>NotI</i>

Die aufgelisteten Primer wurden von der Firma BioSpring (Frankfurt) synthetisiert und konnten unter den genannten Bedingungen verwendet werden. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.9.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977). Dabei bindet ein Primer spezifisch an eine einzelsträngige DNA-Matrize und ermöglicht dadurch die Synthese des komplementären DNA-Stranges. In Anwesenheit von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da eine OH-Gruppe in 3'-Position der

Nukleotide für eine Verlängerung der DNA notwendig ist. Bei einem bestimmten Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen Fragmente werden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten ddNTPs markiert. Da jede der vier DNA-Basen einen anderen Farbstoff trägt, können alle Basen in einem Ansatz sequenziert werden.

Die automatisierten DNA-Sequenzbestimmungen wurden mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Darmstadt), der die vier mit fluoreszierendem Farbstoff markierten ddNTPs und die AmpliTaq® DNA Polymerase FS enthält, durchgeführt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Neben den Primern AR1 und AR2 wurden folgende Primer (BioSpring, Frankfurt) zur Sequenzierung von AR-cDNA verwendet:

Name	Sequenz (5'-3')
AR4	GCCGTTGTTGAGTTCCAGAT
AR5	CAGGAGGAGACTTCCAGGTG

Reaktionsansatz (10 µl):	2 µl	Ready Reaction Mix
	1 µl	Primer (10 pmol/µl)
	7 µl	Aqua purificata

Reaktionsbedingungen:	Amplifizierung (25 Zyklen)		
	Denaturierung	10 sec	96°C
	Primer Anlagerung	5 sec	55°C
	Verlängerung	90 sec	60°C

Das Reaktionsprodukt wurde durch Ethanol-fällung präzipitiert. Dazu wurde die Probe mit 90 µl Aqua purificata, 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6) und 250 µl reinem Ethanol versetzt und anschließend abzentrifugiert (15000 rpm, 20 min). Das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol 70 % gewaschen, erneut zentrifugiert (15000 rpm, 5 min) und schließlich in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 25 µl TSR (Template Suppression Reagent) aufgenommen, 2 min bei 95°C denaturiert und dem Sequenzierautomaten zugeführt.

2.9.4 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

2.9.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten werden diese in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung der linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld beruht

auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der negativ geladenen DNA antiproportional zum Logarithmus der Basenpaare ist (Meyers et al. 1976). Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in Doppelstrang-DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

In der Regel wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1 % verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und die Gelkammer eines Sub-Cell® GT Agarose-Gelelektrophorese-Systems (Bio-Rad, München) gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Apparatur mit 1xTAE-Puffer gefüllt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin) vermischt und zusammen mit einem Größenstandard (1 kb Plus® DNA Ladder, Life Technologies, Paisley, Schottland) in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe des Gels bei einer Spannung von 60-100 V. Die DNA-Banden konnten mittels UV-Meter (Gel Doc® Geldokumentationssystem und QuantityOne®-Software, Bio-Rad, München) detektiert werden.

TAE-Puffer	4,84 g	Tris
	1,14 ml	Essigsäure
	2 ml	0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0
	ad 1l	Aqua purificata

2.9.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Elektrophorese wieder aus dem Gel zurückzugewinnen, wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden). Das Experiment wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.9.5 Plasmide

pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences, Freiburg): Expressionvektor für N-terminale GST-Fusionen. Das Plasmid wurde zur Überexpression eines Aldose Reduktase-GST-Fusionsproteins in BL21-Zellen verwendet.

pQE31 (Qiagen, Hilden): Dieser Expressionsvektor wurde verwendet, um Aldose Reduktase N-terminal mit einem 6xHis-tag zu fusionieren.

pcDNA 3 (Invitrogen, Karlsruhe): Dieser Vektor dient der konstitutiven Genexpression in Säugerzellen, kann aber auch in *E. coli* vermehrt werden. Das Plasmid wurde zur Expression von 6xHis gekoppelter Aldose Reduktase in HeLa-Zellen verwendet.

Die Selektion der verwendeten Plasmide erfolgte auf Ampicillin-Resistenz. Das Antibiotikum wurde den Medien in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Zur Kultur der BL21-Bakterien, die eine Chloramphenicol-Resistenz aufweisen, wurden zusätzlich 50 µg/ml dieses Antibiotikums zum Medium gegeben.

2.9.6 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Fremde Vektor-DNA kann sehr effizient in *E. coli*-Zellen eingeschleust werden, wenn die Zellmembran mit bivalenten Kationen in der Kälte behandelt wird (Cohen et al. 1972). Durch kurzzeitiges Erhitzen des Gemisches aus Vektor-DNA und Bakterienzellen („Hitzeschock“) lässt sich die Effizienz dieser sogenannten Transformation erhöhen (Hanahan 1983).

Aus einer DMSO-Kultur des *E. coli*-Stammes DH5α wurde ein Aliquot Zellen entnommen und über Nacht in 2 ml LB-Medium inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,3$ inkubiert. Die Zellen wurden in Aliquote von 50 ml aufgeteilt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien (2500 rpm, 5 min, 4°C) wurde jedes Sediment auf Eis in je 16 ml Transformationspuffer 1 suspendiert und erneut 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) erfolgte eine Suspendierung in je 4 ml Transformationspuffer 2. Die Suspension wurde in Aliquote zu 300 µl aufgeteilt, die entweder direkt zur Transformation eingesetzt wurden oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden.

Transformationspuffer 1	100 mM 50 mM 50 mM 15 % pH 5,8 sterilfiltriert	Rubidiumchlorid Manganchlorid Calciumchlorid Glycerin
Transformationspuffer 2	10 mM 10 mM 75 mM 15 % pH 6,8 sterilfiltriert	MOPS Rubidiumchlorid Calciumchlorid Glycerin

2.9.7 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch die Transformation werden Plasmide in kompetente *E. coli*-Zellen übertragen. Da die verwendeten Vektoren ein Resistenz-Gen für Ampicillin enthielten, konnten nur solche Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten wachsen, die das Plasmid aufgenommen hatten.

Zur Transformation wurden je 300 µl kompetenter Zellen mit dem Ligationsansatz (siehe Kapitel 2.9.9.2) gemischt und 40 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Suspension 45 sec auf 42°C erhitzt wurde, folgte eine Kühlung auf Eis für 5 min. Die transformierten Bakterien wurden nun mit 1 ml LB-Medium versetzt und 45 min bei 37°C geschüttelt. 300 µl des Ansatzes wurden auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.9.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmide wurden aus *E. coli*-Kulturen isoliert, die aus Einzelkolonien von einer LB-Agarplatte abgeimpft und über Nacht bei 37°C in LB-Medium (supplementiert mit Ampicillin) geschüttelt worden waren. Für die Plasmidpräparation aus *E. coli* wurden zwei Methoden angewandt:

2.9.8.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (1 min, 10000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Zum Lysieren der Bakterien wurden der Suspension 10 µl Lysozym (50 mg/ml) (Sigma, Taufkirchen) hinzugefügt und 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 45 sec auf 95°C erhitzt, um bakterielle Proteine und hochmolekulare DNA zu denaturieren. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C) und mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 10 µl einer 5 %igen CTAB-Lösung hinzugefügt und das Präzipitat pelletiert (5 min, 14000 rpm, 4°C). Die DNA wurde in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst und mit 750 µl Ethanol präzipitiert. Nach dem Pelletieren (10 min, 14000 rpm, 4°C), Waschen mit Ethanol 70 % und Trocknen (20 min, 37°C) wurde das DNA-Sediment in 40 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgenommen.

STET-Puffer	8 %	Saccharose
	0,1 %	Triton X-100
	50 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA

2.9.8.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde der QIAfilter® Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Prinzip besteht in einer alkalischen Lyse der Zellen und anschließendem Binden der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschermatrix unter Niedrigsalzbedingungen. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA unter Hochsalzbedingungen von der Matrix eluiert. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.9.9 Herstellung rekombinanter DNA

2.9.9.1 Restriktion von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit TypII-Restriktionsendonukleasen. Durch die Spaltung an der Erkennungssequenz entstehen glatte oder einzelsträngige überhängende Enden.

Die in TE-Puffer gelöste DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen, dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und Albumin versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme: *SalI*, *NotI*, *HindIII* und *EcoRI* (New England Biolabs, Frankfurt). Die Reaktionen wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.9.4.1) überprüft.

Reaktionsansatz:	1 µg	DNA
	1 µl	Restriktionsendonuklease 1 (20 U/µl)
	1 µl	Restriktionsendonuklease 2 (20 U/µl)
	2 µl	10 x NEBuffer
	2 µl	BSA-Lösung (1 mg/ml)
	13 µl	Aqua purificata

2.9.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Enden von doppelsträngigen DNA-Fragmenten können mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft werden (Weiss et al. 1968).

Vektor- und Insert-DNA wurden zu gleichen Teilen in Bezug auf deren Molaritäten eingesetzt, wobei die Gesamtmenge an linearisiertem Plasmid ca. 100 ng betrug. Entsprechend der Insertlänge variierte die benutzte Menge an Insert-DNA.

Reaktionsansatz:	X ng	Vektor-DNA
	Y ng	Insert-DNA
	2 µl	10 x T4-Ligase-Puffer
	2 µl	T4-Ligase (10 U/µl) (Sigma, Taufkirchen)
	ad 20 µl	Aqua purificata

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation in *E. coli*-Bakterien verwendet.

2.9.10 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Die Transfektion von HeLa Zellen mit cDNA für Aldose Reduktase und GFP (green fluorescent protein) erfolgt durch Lipofektion (Felgner et al. 1987) mittels FuGENE® 6 Transfektionsreagenz, das eine Mischung verschiedener Lipide und anderer Zusätze in 80 % Ethanol darstellt (Roche Diagnostics, Mannheim). Zur Transfektion wurde eine 6 cm-Zellkulturplatte mit 50 % konfluenten HeLa-Zellen verwendet. Das Zellmedium wurde vor der Transfektion durch serumfreies Medium ausgetauscht. 3 µl FuGENE® 6 Reagenz wurden direkt in 100 µl serumfreies Medium pipettiert und anschließend 2 µg der gewünschten pcDNA3-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem Vollmedium inkubiert.

2.10 Antikörperproduktion

2.10.1 Expression eines rekombinanten Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins

2.10.1.1 Induktion der Fusionsproteinexpression mit IPTG

Das GST-Fusionsprotein wurde mit Hilfe des pGEX-4T-3-Vektors im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert. Die Induktion der Expression mit IPTG (0,1 mM) erfolgte bei einer optischen Dichte der Bakteriensuspension von 0,6 bei 600 nm. Die induzierten Bakterien wurden weitere 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen und die Bakterien mittels Ultraschall vollständig lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand zur Aufreinigung des GST-Fusionsproteins weiterverwendet. Die Induktion der Proteinexpression wurde mit SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.8.3) und anschließender Färbung des Gels mit Coomassie-Blau (siehe Kapitel 2.8.5.4) überprüft.

Resuspensionspuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	150 mM	NaCl
	50 mg/ml	Lysozym
	0,7 %	Sarkosyl
	2 %	Triton X-100

2.10.1.2 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Der Überstand wurde für 1 h mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde sechs mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 x Probenpuffer gekocht, der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.8.3) und die gereinigte Proteinbande durch eine Färbung mit Coomassie-Blau dargestellt (siehe Kapitel 2.8.5.4). Die entsprechende Proteinbande (ca. 1 mg Protein) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zur Herstellung des Antiserums verwendet.

2.10.2 Gewinnung der Antiseren

Die Immunisierung eines Kaninchens wurde, mit dem für die Antikörperproduktion bestimmten Protein, von Sequence Laboratories, Göttingen durchgeführt. Die Injektion des Antigens wurde 21 und 49 Tage nach der ersten Immunisierung wiederholt. Blut wurde vor der Immunisierung (Präimmenserum) und 35, 53 und 60 Tage nach der ersten Injektion entnommen. Für weitere Experimente wurde das Serum der letzten Blutentnahme verwendet.

2.11 Bestimmung der Calpain-Aktivität

Die Bestimmung der Calpain-Aktivität wurde mit einem speziellen Calpain Activity Assay Kit (Biocat, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Testprinzip beruht hierbei auf der fluorometrischen Erfassung der Spaltung des Calpain Substrats Ac-LLY-AFC, das blaues Licht aussendet ($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$). Nach der Spaltung dieses Substrats durch Calpain entsteht freies AFC. Das durch dieses Reaktionsprodukt emittierte gelb-grüne Fluoreszenzlicht ($\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$) wurde mit einem Fluorometer (SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim) quantitativ erfasst.

2.12 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel® 2000 und SPSS® 9.0 for Windows.

2.12.1 Western Blots

Die densitometrische Analyse der Bandenstärke erfolgte mit der Odyssey® Application Software 2.1 (LI-COR, Lincoln, USA). Die Bandenstärke des Zielproteins wurde durch die Bandenstärke der

Ladungskontrolle dividiert und das Ergebnis prozentual zu dem Quotienten der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt. Die so ermittelten Werte wurden entweder bei mehr als zwei Versuchsgruppen mit einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) oder bei lediglich zwei Versuchsgruppen mittels T-Test nach Student auf Signifikanz getestet.

2.12.2 RT-PCR

Die Stärke der DNA-Banden wurde mit der Software QuantityOne[®] (Bio-Rad, München) ermittelt. Zur Bestimmung der relativen mRNA-Mengen und dem Vergleich der Testgruppen untereinander wurde, wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben, vorgegangen.

2.12.3 Calpain-Aktivität

Die Aktivität von Calpain wurde als Intensität des fluorometrisch erfassten Signals ermittelt. Die resultierenden Zahlenwerte wurden in Prozent im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle umgerechnet und einer univariaten ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) unterzogen.

2.12.4 Thermische Hyperalgesie

Zur Erfassung der thermischen Hyperalgesie wurde die prozentuale Differenz in der Latenzzeit der Pfotenwegziehreaktion (paw withdrawal latency, PWL) zwischen der mit Zymosan behandelten rechten und der unbehandelten linken Pfote mit der folgenden Formel berechnet: $\Delta\text{PWL} = (\text{rechts} - \text{links})/\text{links} \times 100$. Die Gesamt-AUC ($\text{AUC}_{\Delta\text{PWL}}$) wurde als Summe der Einzel-AUCs nach der Trapezregel berechnet. Die $\text{AUC}_{\Delta\text{PWL}}$ beider Versuchsgruppen wurde mittels T-Test nach Student miteinander verglichen.

2.12.5 Pfotenödem

Das Ausmaß einer Entzündung wurde anhand der Zunahme des Pfotenvolumens (paw volume, PV) vor und nach der Injektion von Zymosan (ΔPV) erfasst. Die Gesamtfläche unter der Kurve ΔPV versus Zeit nach Zymosan ($\text{AUC}_{\Delta\text{PV}}$) wurde mit der Trapezregel berechnet. Der Einfluss der Vorbehandlung mit Calpain Inhibitor wurde mit einer univariaten ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) auf Signifikanz getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Änderungen im Proteinmuster des Rückenmarks nach peripherer Entzündung

Zur Identifizierung von Proteinen im Rückenmark, die mit einem Entzündungsgeschehen in der Peripherie korreliert sind, wurde eine differentielle Proteomanalyse des Lumbalmarks von Ratten durchgeführt. Dabei wurden die Proteinmuster dieses Gewebes von unbehandelten Kontrolltieren mit dem Rückenmark von Tieren nach Induktion einer peripheren Entzündung verglichen. Mittels 2D-Gelelektrophorese konnten auf jedem Gel mindestens 500 Proteinspots aufgetrennt werden. Das Molekulargewicht der Proteine reichte dabei von 10 bis 100 kDa und die isoelektrischen Punkte von 3 bis 10. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blau detektiert. Die Induktion einer peripheren Entzündung durch Zymosaninjektion in eine Hinterpfote führte zu einer reproduzierbaren und deutlichen Regulation (n=3; mindestens 25 prozentige Zu- oder Abnahme der Spotintensität) von mindestens neun der detektierten Proteinspots in den 2D-Gelen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 3.1). Dabei kam es zur Zunahme in der Intensität von zwei Spots (Abbildung 3.1; Spot 2B und 8), die weiteren sieben modulierten Proteinspots waren nach Induktion des Entzündungsschmerzes herunterreguliert.

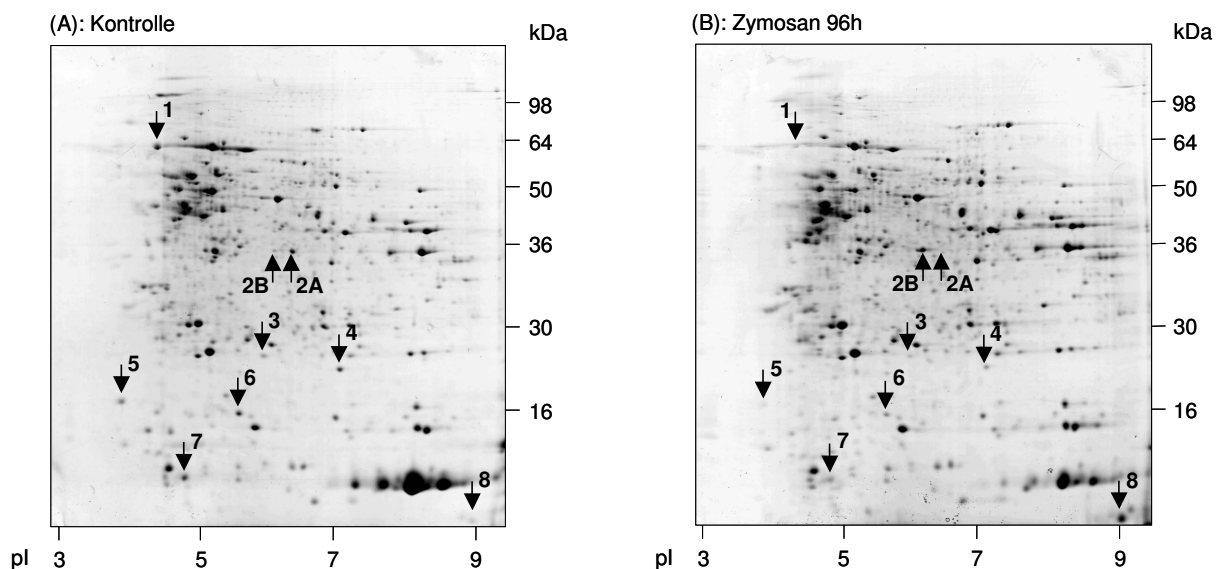


Abbildung 3.1: 2D-Gele von Lumbalmark der Ratte mit (B) und ohne (A) Induktion einer Entzündung durch Zymosan in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde nach 96 h entnommen. Die markierten Spots stellen Proteine dar, deren Expression durch die Applikation von Zymosan reguliert wurde. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Diese entzündungsassoziierten Proteinspots wurden anschließend durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Die Ergebnisse erbrachten hierbei acht verschiedene Proteine, deren Funktionen bei der zentralen Sensibilisierung im Rückenmark bislang unbekannt sind (Tabelle 3.1). Zwei der identifizierten Proteine (Neurofilament light und Aldose Reduktase), die besonders deutliche und charakteristische Regulationen zeigten, wurden nachfolgend im Zusammenhang mit Entzündungsschmerzen genauer untersucht.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der Proteine, deren Expression im Rückenmark der Ratte unter Entzündungsbedingungen reguliert wurde.

Nr.	Protein Identität	NCBI Nummer	Eigenschaft/ Funktion	MW/ pI ^{*)}	MW/ pI ^{**)}	Regulation ^{***)}
1	Neurofilament light (NF-L)	GI 13929098	Intermediärfilament	61,3/4,6	61,5/4,7	Abnahme (auf 11,7 %)
2A	Aldose Reduktase	GI 6978491	Aldo-Keto-Reduktase	35,8/6,3	36,0/6,3	Abnahme (auf 12,8 %)
2B	Aldose Reduktase	GI 6978491	Aldo-Keto-Reduktase	35,8/6,3	36,0/6,1	Zunahme (auf 344,3 %)
3	ATP Synthase D	GI 9506411	Protonentransport in der Atmungskette	18,8/6,2	21,9/5,8	Abnahme (auf 35,5 %)
4	α-Crystallin	GI 117388	Kleines Hitzeschockprotein	20,1/6,8	20,0/6,9	Abnahme (auf 21,2 %)
5	β-Synuclein	GI 18373326	Präsynaptisches Phosphoneuroprotein	14,5/4,5	18,2/4,6	Abnahme (auf 15,2 %)
6	Stathmin	GI 8393696	Mikrotubuli-destabilisierendes Phosphoprotein	17,3/5,8	17,0/5,7	Abnahme (auf 48,3 %)
7	Cytochromoxidase Va	GI 117100	Elektronentransport in der Atmungskette	16,1/6,1	12,5/4,8	Abnahme (auf 32,5 %)
8	Diazepam binding inhibitor	GI 13937379	Endogener Ligand an GABA-Rezeptoren	10,0/8,8	10,2/8,8	Zunahme (auf 300,8 %)

^{*)} Theoretisches Molekulargewicht (in kDa) und theoretischer isoelektrischer Punkt, aus der SWISS-PROT Datenbank (www.expasy.org/sprot) entnommen.

^{**)} Tatsächliches Molekulargewicht (in kDa) und tatsächlicher isoelektrischer Punkt der Proteine in den 2D-Gelen, unter Verwendung der ImageMaster[®] 2D-Software errechnet.

^{***)} Die Prozentangaben wurden mittels densitometrischer Auswertung der Proteinspots unter Verwendung der ImageMaster[®] 2D-Software ermittelt. Angegeben ist die mittlere Stärke der jeweiligen Proteinspots 96 h nach Zymosaninjektion, bezogen auf die Intensität der jeweiligen unbehandelten Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde.

3.2 NF-L nach Entzündungsinduktion

3.2.1 NF-L Expression im Lumbalmark

Die Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote bewirkte eine Abnahme der Intensität des NF-L Spots in den Coomassie gefärbten 2D-Gelen des Lumbalmarks nach 24 und 48 h. 96 h nach der Zymosanapplikation war der Proteinspot fast vollständig verschwunden (Abbildung 3.2).

Die Abnahme der NF-L Proteinkonzentration im Lumbalmark nach Zymosanjektion über die Zeit konnte auch mittels Western-Blot-Analyse und densitometrischer Auswertung der Blots bestätigt werden (Abbildung 3.3).

Um zu untersuchen, ob die nach der Zymosanjektion beobachteten Änderungen des NF-L Proteingehaltes im Lumbalmark mit einer veränderten NF-L Transkription verbunden waren, wurde die Expression der NF-L mRNA mittel RT-PCR untersucht. Die Konzentration der NF-L mRNA im Lumbalmark zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrolltieren und Ratten, die eine durch Zymosan induzierte Entzündung in einer Hinterpfote hatten (Abbildung 3.4).

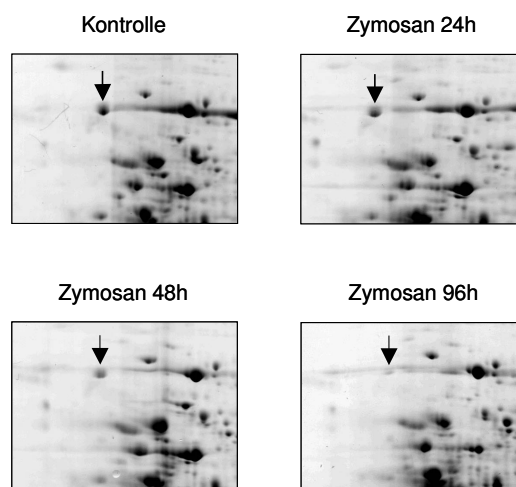


Abbildung 3.2: Ausschnitte aus 2D-Gelen von Lumbalmark der Ratte nach Zymosanjektion (1,25 mg) in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Der markierte Proteinpunkt stellt NF-L dar. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

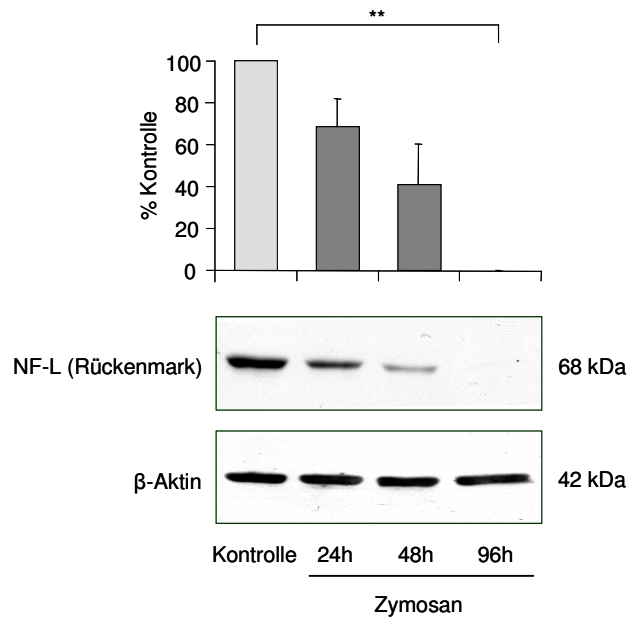


Abbildung 3.3: Western Blot von NF-L im Lumbalmark der Ratte nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist die mittlere Stärke des NF-L Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle β -Aktin \pm SD, die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Die zwei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

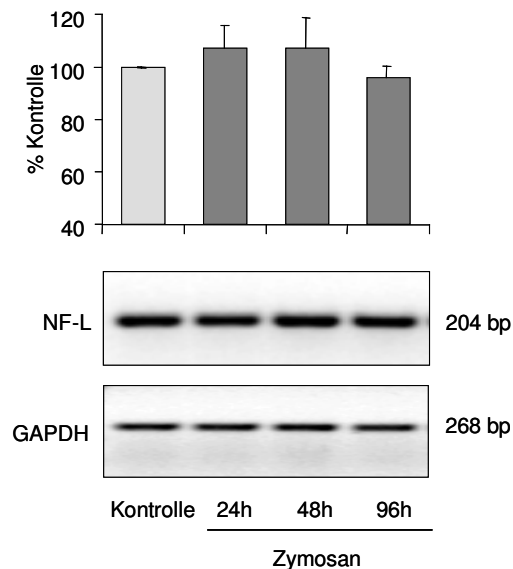


Abbildung 3.4: Bestimmung der NF-L mRNA im Lumbalmark der Ratte nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote durch RT-PCR. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist die mittlere Stärke des NF-L Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle GAPDH \pm SD, die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

3.2.2 NF-L Expression in der Pfote

Zur Überprüfung, ob die Zymosan-induzierten Veränderungen der NF-L Proteinkonzentration auch in der Peripherie - am Ort der Entzündung - auftreten, wurden Western Blots mit Proteinlysat des weichen Pfortengewebes (Subkutis, Muskulatur) angefertigt. Dabei zeigte sich, dass eine signifikante Abnahme der NF-L Proteinkonzentration 96 h nach Induktion der Entzündung in einer Hinterpfote nicht nur auf zentraler Ebene im Lumbalmark, sondern auch im peripheren Gewebe auftritt (Abbildung 3.5).

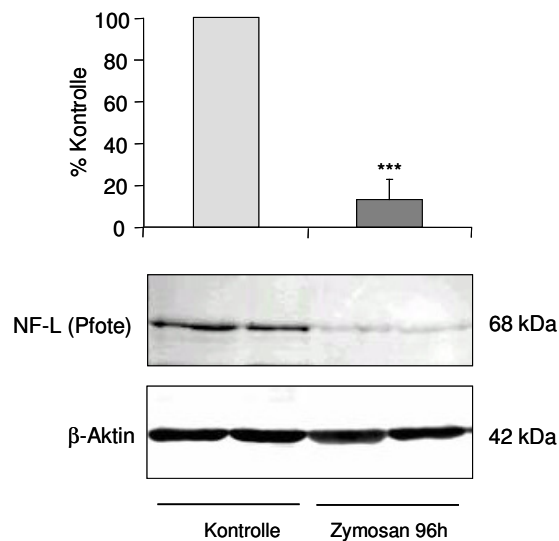


Abbildung 3.5: Western Blot von NF-L im entzündeten Pfortengewebe der Ratte 96 h nach Zymosanjektion in eine Hinterpfote. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist die mittlere Stärke des NF-L Signals im Verhältnis zur Ladungskontrolle β -Aktin \pm SD, die Bande des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Die drei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.2.3 Calpain-Aktivität nach Entzündungsinduktion

Die beobachtete Abnahme der NF-L Proteinkonzentration in Verbindung mit unveränderten mRNA-Konzentrationen nach Zymosanjektion deutet auf einen Abbau des Proteins hin. Eine Degradierung der Neurofilamente ist bereits mehrfach mit einer Aktivierung der Protease Calpain in Verbindung gebracht worden (Ray et al. 2000c; Schlaepfer et al. 1985; Stys et al. 2002). Durch den Abbau der Neurofilament Proteine könnte diese Protease demzufolge eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit spielen.

Um die Bedeutung von Calpain im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen bewerten zu können, wurde der Einfluss einer Zymosanbehandlung auf die Aktivität der NF-L-abbauenden Protease

untersucht. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch fluorometrische Erfassung des Spaltproduktes AFC eines spezifischen Calpain Substrates (Ac-LLY-AFC). Die Calpain-Aktivität wurde sowohl von Proteinlysate aus Lumbalmark als auch aus entzündetem Pfortengewebe gemessen.

3.2.3.1 Calpain-Aktivität im Lumbalmark

Im Rückenmark war die Calpain-Aktivität 96 h nach der Applikation von Zymosan signifikant erhöht (Abbildung 3.6 A). Durch Vorbehandlung der Tiere mit 25 mg/kg Calpain Inhibitor III i.p. 20 min vor der Zymosanjektion konnte diese Aktivierung von Calpain signifikant gehemmt werden (Abbildung 3.6 B). Calpain Inhibitor III ist ein potenter und nahezu selektiver Inhibitor von μ - und m - Calpain, der nach systemischer Applikation rasch die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Li et al. 1998; Markgraf et al. 1998).

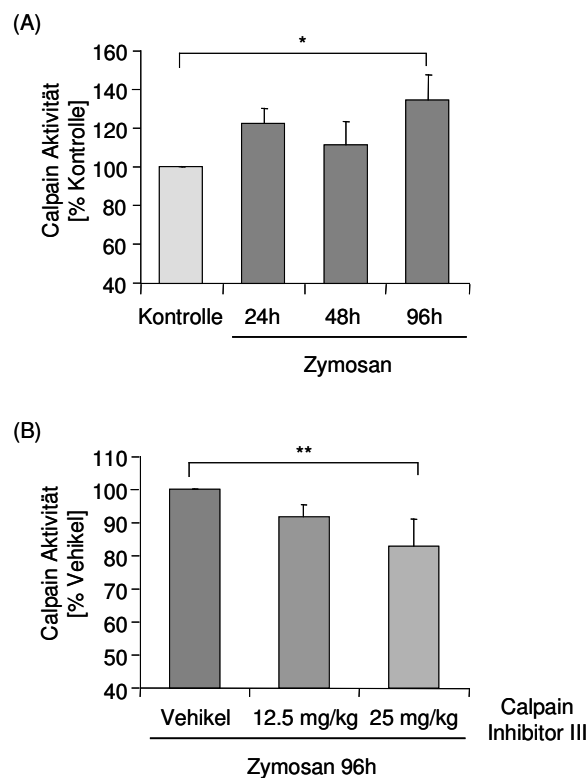


Abbildung 3.6: Bestimmung der Calpain-Aktivität im Lumbalmark der Ratte nach Zymosanjektion in eine Hinterpfote.

(A): Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Aktivität des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD von vier unabhängigen Experimenten. Der Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$.

(B): Calpain Inhibitor III wurde 20 min vor der Zymosanjektion in den angegebenen Dosierungen i.p. appliziert und 96 h danach das Lumbalmark entnommen. Die Aktivität des mit Vehikel behandelten Tieres wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD ($n=6$ für Vehikel, $n=3$ für Calpain Inhibitor III 12,5 mg/kg, $n=6$ für Calpain Inhibitor III 25 mg/kg). Die zwei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,01$.

3.2.3.2 Calpain-Aktivität in der Pfote

Ebenso wie im Lumbalmark konnte auch im Pfortengewebe durch Zymosan nach 96 h eine Zunahme der Calpain-Aktivität gezeigt werden, die sogar noch deutlich stärker ausgeprägt war als auf zentraler Ebene. Die i.p. Verabreichung von 25 mg/kg Calpain Inhibitor III 20 min vor der Zymosaninjektion führte ebenfalls in der Pfote zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung der Protease unter Entzündungsbedingungen (Abbildung 3.7).

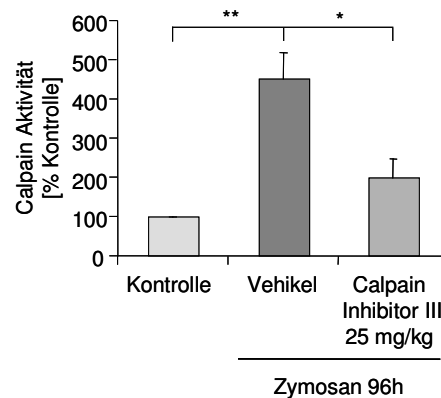


Abbildung 3.7: Bestimmung der Calpain-Aktivität im entzündeten Pfortengewebe der Ratte 96 h nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote. 25 mg/kg Calpain Inhibitor III wurden 20 min vor der Zymosaninjektion i.p. appliziert. Die Aktivität im Pfortengewebe des unbehandelten Kontrolltieres wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD (n=2 für Kontrolle, n=5 für Zymosan, n=3 für Calpain Inhibitor III 25 mg/kg). Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$).

3.2.4 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Immunreaktives NF-L war in Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Schnitten des Lumbalmarks 96 h nach Zymosaninjektion im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Entzündung deutlich reduziert (Abbildung 3.8 A Mitte). Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.3) und der 2D-PAGE (Abbildung 3.2). Die Abnahme des immunreaktiven NF-L war bei den mit Calpain Inhibitor III (25 mg/kg i.p.) vorbehandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich geringer (Abbildung 3.8 A rechts). Die NF-L Immunreaktivität war im gesamten Rückenmarksquerschnitt detektierbar, allerdings war sie in den Neuronen im Hinterhorn des Lumbalmarks besonders ausgeprägt.

Weiterhin war die Menge an immunreaktivem m-Calpain 96 h nach Zymosaninjektion leicht erhöht (Abbildung 3.8 B Mitte). Das lässt vermuten, dass eine vermehrte m-Calpain Proteinexpression nach Entzündungsinduktion an der gesteigerten Calpain-Aktivität im Lumbalmark, wie in Abbildung 3.6 A dargestellt, beteiligt ist. Diese Zunahme an immunreaktivem m-Calpain wurde durch Vorbehandlung der Ratten mit Calpain Inhibitor III (25 mg/kg i.p.) nicht beeinflusst (Abbildung 3.8 B rechts).

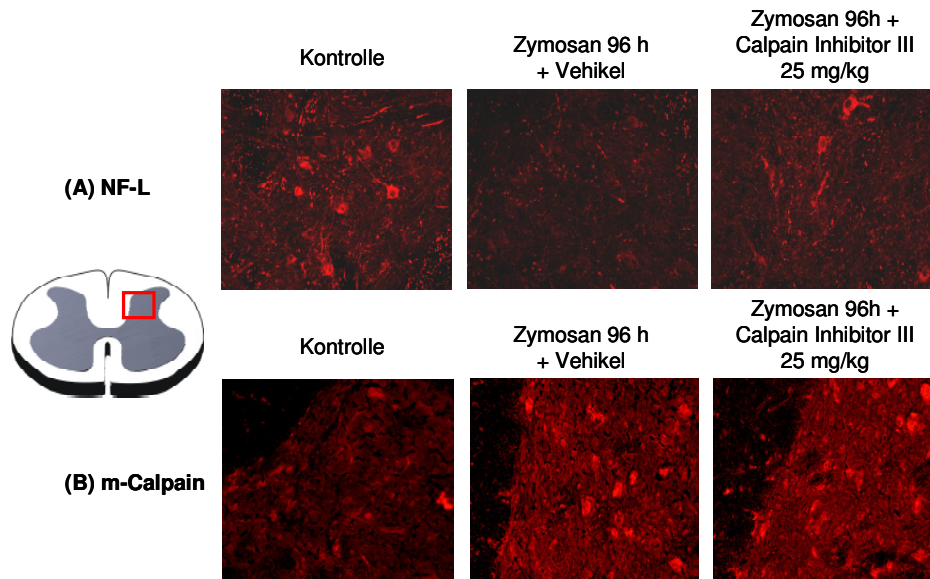


Abbildung 3.8: Immunfluoreszenz von NF-L (A) und m-Calpain (B) im Lumbalmark der Ratte. Die Tiere wurden wie angegeben behandelt und 96 h danach das Lumbalmark entnommen. Die Rückenmarksschnitte wurden jeweils zunächst mit monoklonalen Antikörpern gegen NF-L oder m-Calpain und anschließend mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Das Schema auf der linken Seite zeigt die in den immunhistochemischen Färbungen 200-fach vergrößert dargestellte Region der Rückenmarksschnitte.

Gewebeschnitte von Hinterwurzelganglien der Segmente L4 und L5 wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Rückenmarksschnitte (Abbildung 3.8 A) zeigte sich auch in den Hinterwurzelganglien, welche die Zellkörper der afferenten Neurone darstellen, 96 h nach Zymosaninjektion eine Abnahme an immunreaktivem NF-L (Abbildung 3.9 Mitte). Diese Abnahme konnte wie im Lumbalmark durch Vorbehandlung mit Calpain Inhibitor III (25 mg/kg i.p.) reduziert werden (Abbildung 3.9 rechts).

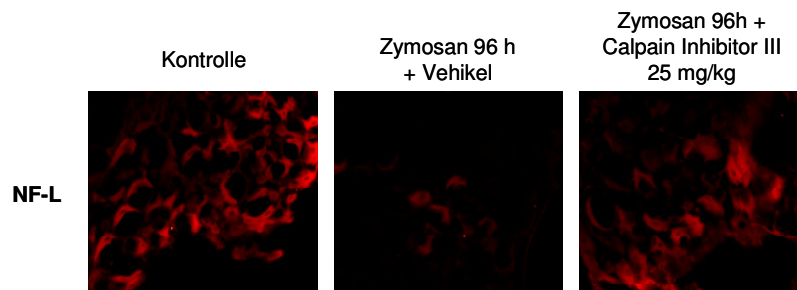


Abbildung 3.9: Immunfluoreszenz von NF-L in Hinterwurzelganglien der Ratte. Die Tiere wurden wie angegeben behandelt und 96 h danach die Hinterwurzelganglien entnommen. Die Schnitte der Hinterwurzelganglien wurden zunächst mit einem monoklonalen NF-L-Antikörper und anschließend mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Die dargestellte Region der Schnitte der Hinterwurzelganglien ist 200-fach vergrößert. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.2.5 Einfluss von Calpain auf die entzündungsbedingte Hyperalgesie

Zur Abklärung der funktionellen Bedeutung der beobachteten Aktivierung von Calpain und des daraus resultierenden NF-L Abbaus wurde untersucht, ob eine Hemmung der Calpain-Aktivierung die Entwicklung einer Hyperalgesie beeinflussen kann. Dazu wurden Ratten entweder i.p. (25 mg/kg) oder peridural (1 mg/kg) 20 min vor Zymosaninjektion mit Calpain Inhibitor III vorbehandelt. Für die peridurale Applikation des Inhibitors wurde eine deutlich niedrigere Dosis gewählt, da es hier, im Vergleich zur intraperitonealen Gabe, nur zu einer äußerst geringen Verteilung der Substanz im Organismus kommt. Anschließend wurde ein Hargreaves-Test zur Erfassung der thermischen Hyperalgesie durchgeführt. Als Maß für die thermische Hyperalgesie wird hierbei die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote auf einen thermischen Reiz hin ermittelt. Sowohl die systemische (Abbildung 3.10 A) als auch die peridurale (Abbildung 3.10 B) Applikation des Calpain Inhibitors bewirkte eine signifikante Zunahme der Latenzzeit bis zum Zurückziehen der entzündeten Hinterextremität im Vergleich zu Tieren, die lediglich mit Vehikel behandelt wurden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Calpain Inhibitor III antihyperalgetisch wirksam ist und dieser Effekt zumindest zum Teil auf zentralen Mechanismen beruht.

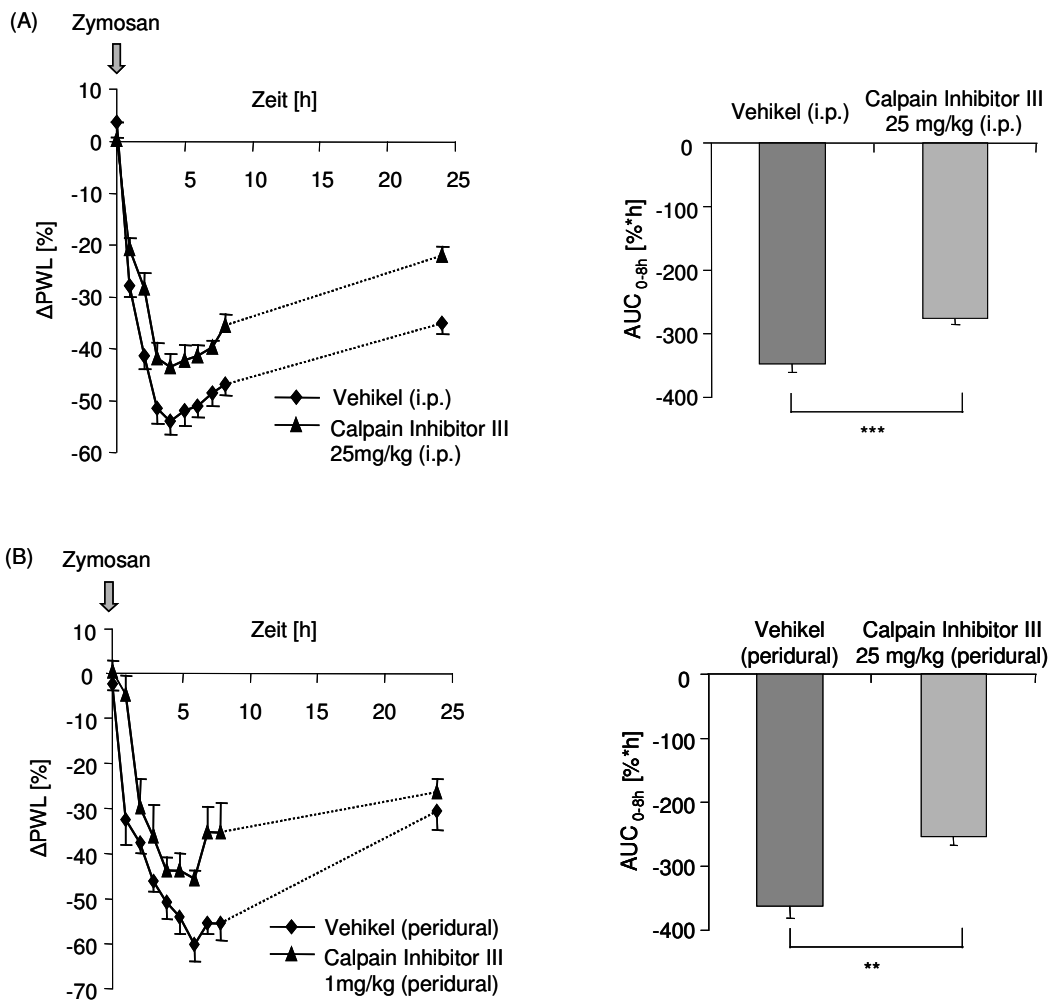


Abbildung 3.10: Hargreaves-Test zur Ermittlung der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote (paw withdrawal latency, PWL). Untersucht wurden Ratten, die mit Zymosan und Calpain Inhibitor III behandelt wurden (▲) im Vergleich zu Kontrolltieren, die Zymosan und Vehikel erhalten hatten (◆).

(A): Die Vorbehandlung der Tiere erfolgte mit 25 mg/kg Calpain Inhibitor III intraperitoneal. Die Daten des Zeitverlaufs sind zur Berücksichtigung eines Lerneffektes der Tiere als relative Differenz zwischen der mit Zymosan behandelten rechten und der unbehandelten linken Hinterpfote dargestellt, berechnet als : $\Delta\text{PWL} = (\text{rechts} - \text{links})/\text{links} \times 100$. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM (n=7 für beide Gruppen). Das Diagramm stellt die Flächen unter den Kurven \pm SEM (ΔPWL versus Zeit nach Zymosan (0-8h)) dar. Die drei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,001$.

(B): Die Vorbehandlung der Tiere erfolgte mit 1 mg/kg Calpain Inhibitor III peridural. Die Daten wurden wie unter (A) beschrieben berechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5 für beide Gruppen). Das Diagramm stellt die Flächen unter den Kurven \pm SEM (ΔPWL versus Zeit nach Zymosan (0-8h)) dar. Die drei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,001$.

3.2.6 Einfluss von Calpain auf das zymosaninduzierte Pfotenödem

Um zu untersuchen, ob Calpain Inhibitor III neben den beobachteten antihyperalgetischen auch antiinflammatorische Effekte zeigt, wurde die Zunahme des Pfotenvolumens einer mit Zymosan behandelten Hinterpfote nach Vorbehandlung durch Vehikel oder Calpain Inhibitor III (12,5 mg/kg und 25 mg/kg i.p.) zeitabhängig ermittelt. Die Zunahme des Pfotenvolumens wird hierbei als Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes der Entzündung herangezogen. Tiere, die mit Vehikel behandelt wurden, hatten 4 h nach der Applikation von Zymosan ein maximales Pfotenvolumen von $229 \pm 5,9$ (Mittelwert \pm SEM) %. Durch Vorbehandlung mit 25 mg/kg Calpain Inhibitor III i.p. konnte das zymosaninduzierte Pfotenödem signifikant reduziert werden (Abbildung 3.11).

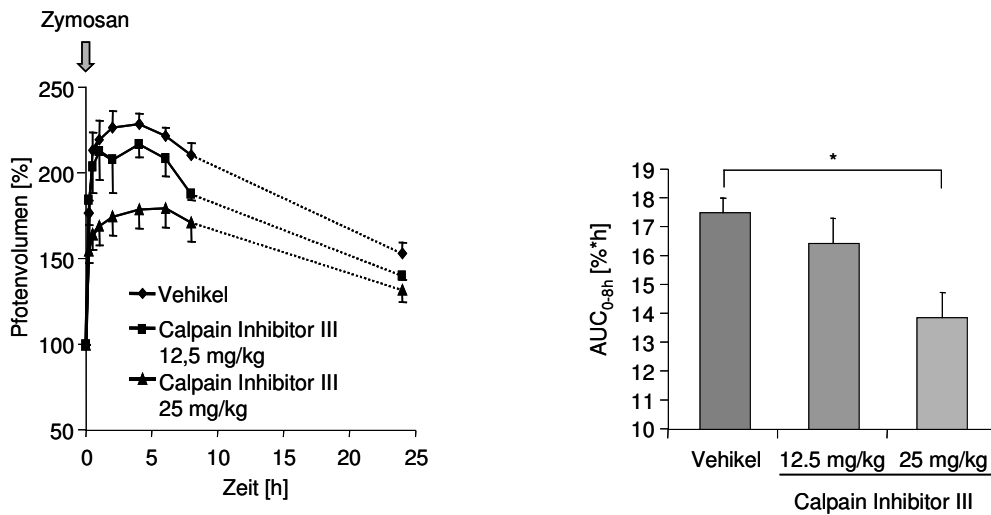


Abbildung 3.11: Zeitverlauf der Änderung des Pfotenvolumens nach Zymosaninjektion und Vorbehandlung der Ratten mit Vehikel (◆, n=7), Calpain Inhibitor III 12,5 mg/kg i.p. (■, n=3) oder 25 mg/kg i.p. (▲, n=6). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM. Das Diagramm stellt die Flächen unter den Kurven \pm SEM (% Pfotenvolumen versus Zeit nach Zymosan (0-8h)) dar. Der Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$.

3.3 Aldose Reduktase nach peripherer Entzündungsinduktion

3.3.1 Aldose Reduktase in 2D-Gelen des Lumbalmarks

Im Rahmen der Proteomanalyse des Rückenmarks nach Induktion von chronischem Entzündungsschmerz wurden zwei der detektierten Proteinspots mit gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten als Aldose Reduktase (AR) identifiziert. Die Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote führte in den Coomassie gefärbten 2D-Gelen des Lumbalmarks bereits nach 24 h zu einer deutlichen Abnahme der Intensität des AR-Spots mit dem höheren isoelektrischen Punkt ($pI \sim 6,3$; rechts). Gleichzeitig nahm die Intensität des AR-Spots mit dem niedrigeren isoelektrischen Punkt ($pI \sim 6,1$; links) sichtlich zu. Diese Modulation der Proteinspots war auch 48 und 96 h nach der Zymosanapplikation detektierbar (Abbildung 3.12).

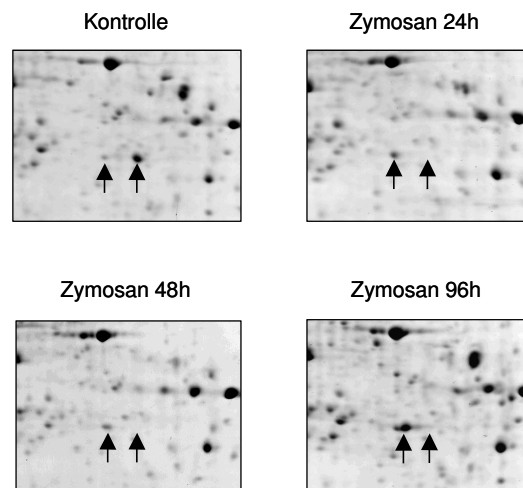


Abbildung 3.12: Ausschnitte aus 2D-Gelen von Lumbalmark der Ratte nach Zymosanjektion (1,25 mg) in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die markierten Proteinpunkte stellen AR dar. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.3.2 Klonierung und Expression eines AR-GST Fusionsproteins

Zur Herstellung eines Aldose Reduktase-Antikörpers wurde zunächst das entsprechende Antigen in ausreichender Menge hergestellt. Dazu wurde im ersten Schritt das Gen für Aldose Reduktase mittels PCR amplifiziert und im Leserahmen an den N-Terminus des Glutathion-S-Transferase (GST) - Gens in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert (Abbildung 3.13).

Anschließend wurde das rekombinante AR-GST-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert (Abbildung 3.14 A), aufgereinigt (Abbildung 3.14 B) und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet.

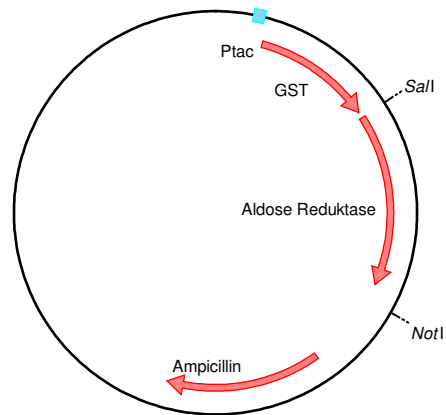


Abbildung 3.13: Schematisch gezeigt ist das AR-Gen, das über *SalI* und *NotI* in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert ist (6006 bp). Die Schnittstellen für diese Restriktionsenzyme wurden zuvor durch PCR mit dem modifizierten Primerpaar AR1/AR2 in das AR-Gen eingefügt.

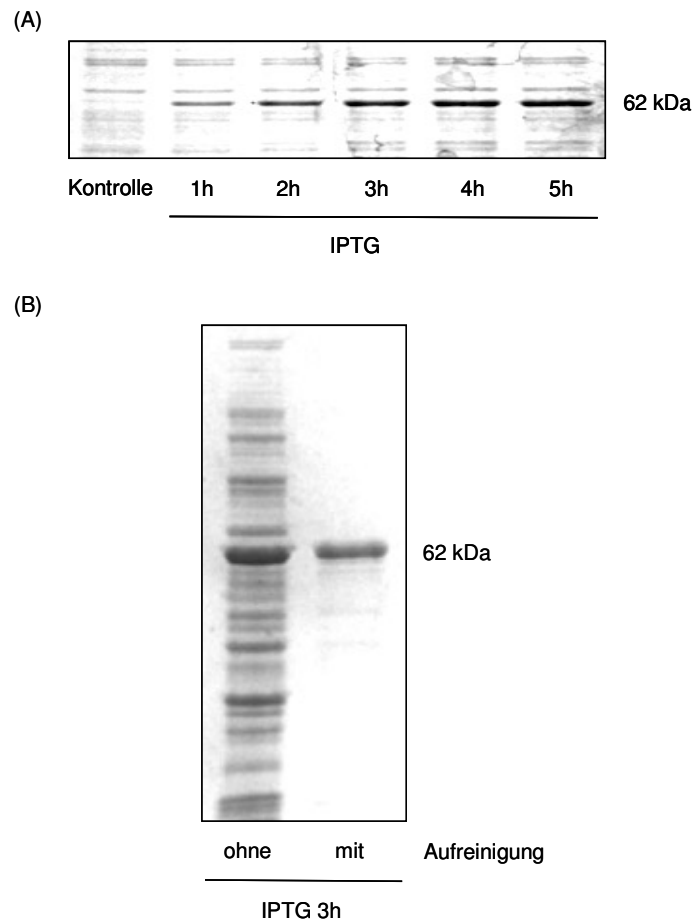


Abbildung 3.14: SDS-PAGE von BL21-Bakterienlysat. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blau detektiert.

(A): Überprüfung der induzierten Expression von AR-GST-Fusionsprotein vor und nach Behandlung der Bakterien mit 0,1 mM IPTG. Die Bakterien wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und aufgearbeitet.

(B): Überstand des Bakterienlysats vor und nach Aufreinigung des AR-GST-Fusionproteins mit Glutathion-Sepharose 4B. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch 3-stündige Behandlung mit 0,1 mM IPTG induziert.

3.3.3 Aldose Reduktase Expression im Lumbalmark

Mit dem, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, gewonnenen Antiserum konnte die AR in Western-Blot Experimenten detektiert werden. Hierbei wurde keine Regulation der gesamten AR-Proteinkonzentration im Lumbalmark nach Induktion einer Entzündungsreaktion beobachtet (Abbildung 3.15 A). Die Untersuchung der Konzentrationen der AR-mRNA mittels RT-PCR zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrolltieren und Ratten, denen Zymosan in eine Hinterpfote injiziert worden war (Abbildung 3.15 B). Da für die AR somit weder eine Regulation der Proteinsynthese noch der Gentranskription beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Verschiebung der AR-Spots in den 2D-Gelen auf einer posttranslationalen Modifikation der AR beruht. Die Veränderungen im Proteinmuster deuten dabei auf eine Phosphorylierung des Proteins hin. Ein Phosphorylierungsschritt der AR erhöht das Molekulargewicht dieses Proteins lediglich von 35,80 kDa auf 35,88 kDa. Eine solch geringfügige Änderung im Molekulargewicht lässt sich mittels Western-Blot-Analyse nicht detektieren, da die Auftrennung hierzu nicht hoch genug ist. Zur Durchführung einer Immunpräzipitation, die eine Detektion von Phosphorylierungen ermöglicht, war der hergestellte Antikörper nicht geeignet.

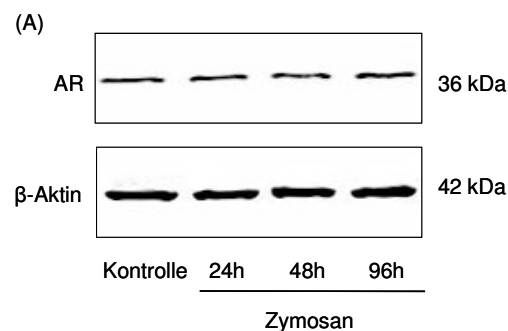


Abbildung 3.15 (A): Western Blot von AR im Lumbalmark der Ratte nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

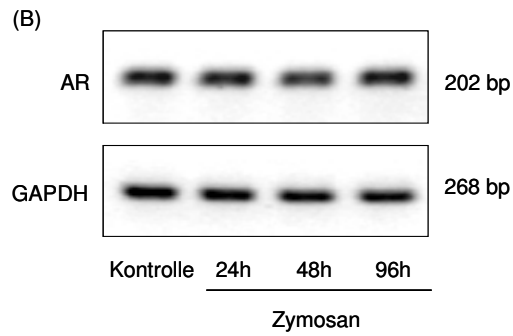


Abbildung 3.15 (B): Bestimmung der AR mRNA im Lumbalmark der Ratte nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote durch RT-PCR. Das Rückenmark wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.3.4 Klonierung einer 6xHis-gekoppelten Aldose Reduktase

Um eine Modulation der AR unter Entzündungsbedingungen weiterhin in Zellkulturexperimenten untersuchen zu können, wurden HeLa-Zellen transient mit AR-DNA transfiziert. Dazu wurde das Gen für AR zunächst mittels PCR amplifiziert und modifiziert (Primerpaar AR1/AR3) und zur Kopplung an ein 6xHis-tag über *SalI* und *HindIII* in einen pQE31-Vektor kloniert. Anschließend wurde dieses Fusionskonstrukt aus der AR und dem 6xHis-tag aus dem pQE31-Vektor im Leserahmen in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (Abbildung 3.16). Diese rekombinante DNA wurde anschließend zur transienten Transfektion von HeLa-Zellen verwendet.

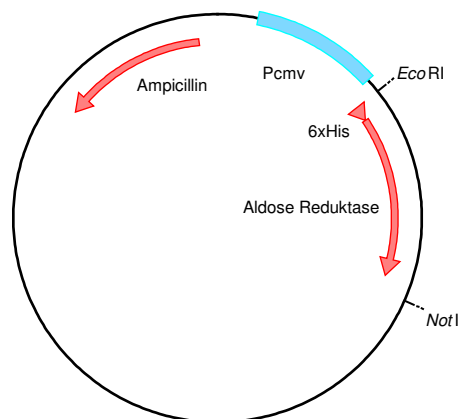


Abbildung 3.16: Schematisch gezeigt ist das 6xHis-AR-Fusionskonstrukt, das über *EcoRI* und *NotI* in pcDNA3 kloniert ist (6555 bp).

3.3.5 Aldose Reduktase Proteinexpression in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Zytokinen

Um eine Entzündungsreaktion in der Zellkultur nachzuahmen, wurden sowohl mit dem Vektor (pcDNA3) als auch mit dem AR-Konstrukt (AR/pcDNA3) transfizierte HeLa-Zellen 24 h mit einem Zytokin-Gemisch, bestehend aus Interleukin-1 β (IL-1 β), Gamma-Interferon (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit diesen proinflammatorischen Zytokinen bewirkte in den mit AR-DNA transfizierten HeLa-Zellen eine signifikante Abnahme der AR-Proteinkonzentration im Vergleich zu den nicht mit Zytokinen behandelten Kontrollzellen. Bei den ausschließlich mit dem Vektor transfizierten Zellen war erwartungsgemäß kein AR-Signal zu erkennen. Die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen äußerte sich weiterhin in einer gesteigerten Cox-2 Expression der HeLa-Zellen, die als Kontrolle für die Entzündungsreaktion detektiert wurde (Abbildung 3.17).

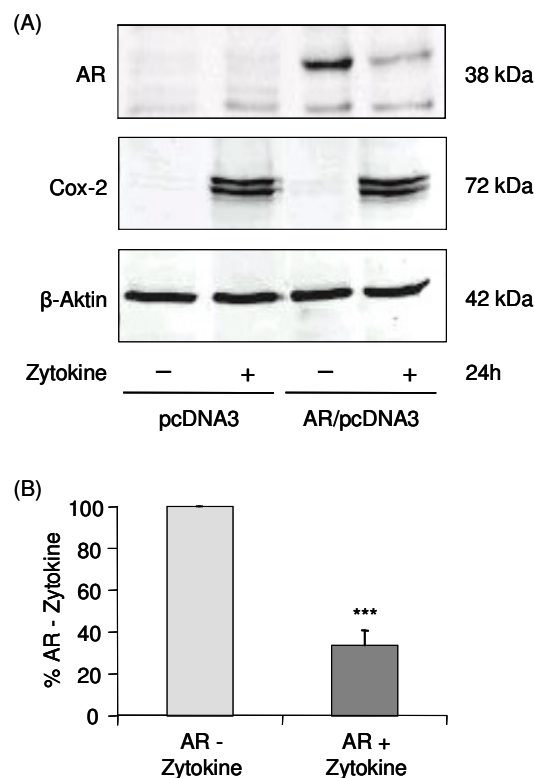


Abbildung 3.17: AR-Proteinexpression nach Behandlung mit Zytokinen.

(A): Western Blot von AR in mit pcDNA3 bzw. AR/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-1 β (1 nM), IFN- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml). Der Nachweis von Cox-2 diente als Kontrolle der entzündlichen Stimulation und β -Aktin als Ladungskontrolle.

(B): Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden der mit AR/pcDNA3 transfizierten Zellen. Dargestellt ist die mittlere Stärke des AR-Signals \pm SEM (n=5) im Verhältnis zur Ladungskontrolle β -Aktin. Die Bande der nicht mit Zytokinen behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die drei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,001$.

Zur Überprüfung, ob dieser Effekt für AR spezifisch ist oder ob es sich um ein Artefakt handelt, wurden HeLa-Zellen transient sowohl mit dem Vektor pcDNA3 alleine als auch mit GFP/pcDNA3-DNA transfiziert und ebenfalls für 24 h mit dem Zytokin-Gemisch behandelt. In diesem Fall konnte keine Reduktion der GFP (green fluorescent protein) - Proteinkonzentration festgestellt werden. Ausschließlich mit dem Vektor transfizierte Zellen zeigten erwartungsgemäß kein GFP-Signal (Abbildung 3.18). Die Abnahme der AR-Proteinkonzentration in den entsprechend transfizierten Zellen (Abbildung 3.17) scheint daher für die AR spezifisch zu sein.

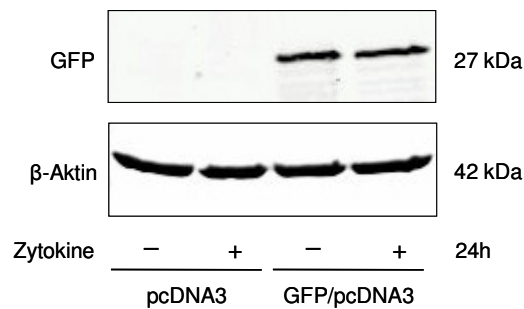


Abbildung 3.18: Western Blot von AR in mit pcDNA3 bzw. GFP/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-1 β (1 nM), IFN- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml). β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.3.6 Beeinflussung der Aldose Reduktase Proteinexpression in HeLa-Zellen durch Dexamethason

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Reduktion an AR-Protein unter Entzündungsbedingungen durch die Behandlung mit Dexamethason aufheben lässt. Dazu wurden die mit AR-DNA transient transfizierten Zellen zusätzlich zum Zytokin-Gemisch mit dem entzündungshemmenden Glukokortikoid Dexamethason inkubiert. Die Zytokin-induzierte Abnahme der AR-Proteinkonzentration konnte dabei signifikant abgeschwächt werden. Die AR-Konzentration der nicht mit Zytokinen behandelten Zellen wurde durch den Zusatz des Glukokortikoids Dexamethason jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 3.19). Es ist daher davon auszugehen, dass Dexamethason keine generelle Wirkung auf die Expression der AR ausübt, sondern vielmehr gezielt der Reduktion der AR-Proteinkonzentration unter dem Einfluss des Zytokin-Gemisches entgegenwirkt.

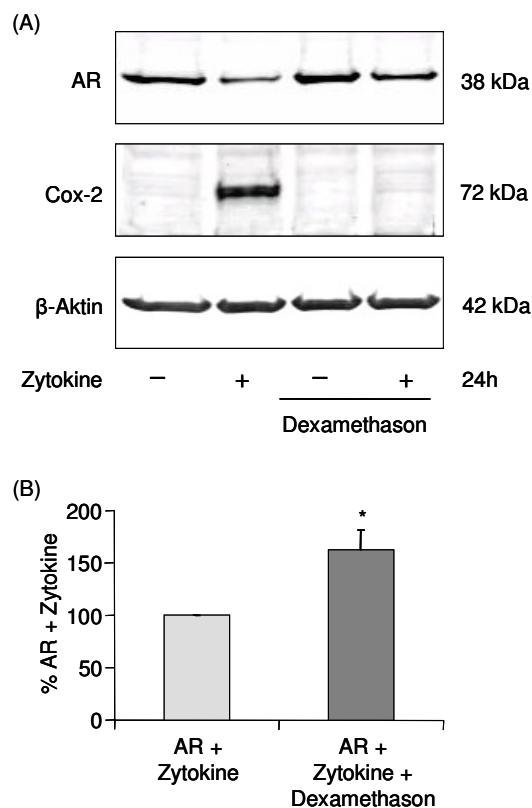


Abbildung 3.19: Beeinflussung der AR-Proteinexpression durch Dexamethason

(A): Western Blot von AR in mit AR/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β (1 nM), IFN- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml)) und Dexamethason (0,5 μ M). Der Nachweis von Cox-2 diente als Kontrolle der entzündlichen Stimulation und β -Aktin als Ladungskontrolle.

(B): Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden der mit dem Zytokin-Gemisch inkubierten Zellen. Dargestellt ist die mittlere Stärke des AR-Signals \pm SEM (n=5) im Verhältnis zur Ladungskontrolle β -Aktin. Die Bande der nicht mit Dexamethason behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Der Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$.

3.3.7 Mechanismen der Herunterregulation von Aldose Reduktase

Zur Klärung, wodurch die nach der Inkubation mit Zytokinen beobachteten Änderungen des AR-Proteingehaltes in den mit AR-DNA transfizierten HeLa-Zellen zustande kommt, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die nachfolgend beschrieben sind.

Um den Einfluss der Zytokine auf die Transkription des AR-Gens zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der AR-mRNA mittels RT-PCR untersucht. Die Zytokin-Stimulation der Zellen, die entweder mit dem Vektor pcDNA3 alleine oder mit dem AR-Konstrukt (AR/pcDNA3) transfiziert worden waren, bewirkte jedoch keine signifikante Regulation der AR-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Eine Regulation der AR-Gentranskription kann daher ausgeschlossen werden. Bei den ausschließlich mit dem Vektor transfizierten Zellen war erwartungsgemäß kein AR-Signal zu erkennen (Abbildung 3.20).

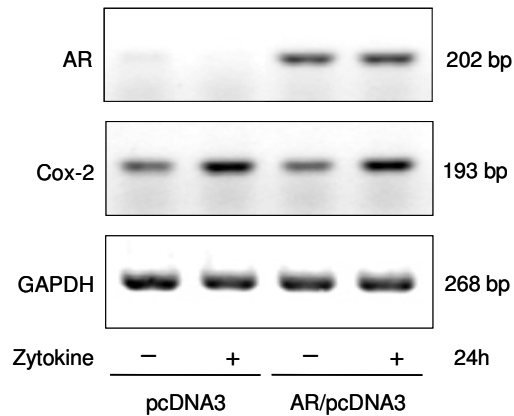


Abbildung 3.20: Bestimmung der AR-mRNA in mit pcDNA3 bzw. AR/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-1 β (1 nM), IFN- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) durch RT-PCR. Der Nachweis von Cox-2 diente als Kontrolle der entzündlichen Stimulation und GAPDH als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Um den Einfluss der Zytokine auf die AR-Translation zu analysieren, wurde die 24-stündige Zytokinbehandlung der mit AR/pcDNA3 transfizierten Zellen in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid (CHX) durchgeführt. Der Verlust an AR-Protein infolge der entzündlichen Stimulation war unter der Cycloheximidbehandlung vergleichbar mit der Abnahme an AR unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.21). Daraus kann geschlossen werden, dass die Herunterregulation der AR nicht durch eine Reduktion der Proteinsynthese vermittelt wird.

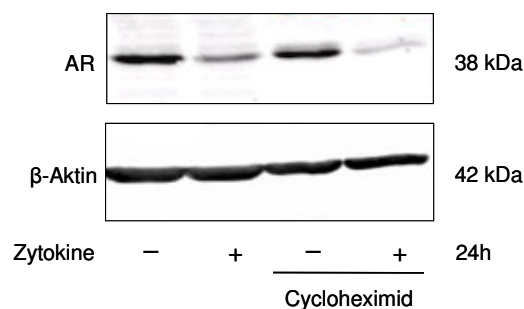


Abbildung 3.21: Western Blot von AR in mit AR/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β (1 nM), IFN- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml)) und Cycloheximid (2,5 μ g/ml). β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Die unveränderten mRNA-Konzentrationen und der fehlende Einfluss auf die Proteinsynthese ließen vermuten, dass die AR unter dem Einfluss von Zytokinen abgebaut wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die mit AR-DNA transfizierten HeLa-Zellen mit Lactacystin, einem spezifischen

Inhibitor des Proteasoms behandelt (Fenteany et al. 1995). Die gleichzeitige Inkubation mit Zytokinen und diesem Inhibitor für 24 h konnte die Abnahme des AR-Proteingehaltes infolge der Stimulation mit dem Zytokin-Gemisch deutlich reduzieren (Abbildung 3.22). Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion an AR-Protein nach Zytokinbehandlung durch eine proteasomale Degradierung des Proteins zustande kommt.

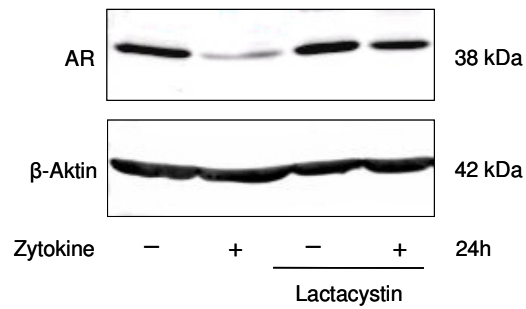


Abbildung 3.22: Western Blot von AR in mit AR/pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β (1 nM), Interferon- γ (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml)) und Lactacystin (5 μ M). β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.4 Änderungen im Proteinmuster des Rückenmarks im neuropathischen Schmerzmodell

Die Identifizierung von Proteinen, die im Rückenmark durch neuropathische Schmerzen modifiziert werden, erfolgte durch vergleichende Proteomanalyse von Lumbalmark aus Kontrolltieren und Tieren, denen neuropathische Schmerzen induziert wurden. Die Proteinexpressionsmuster wurden dabei mittels 2D-Gelelektrophorese dargestellt. Zur Induktion des neuropathischen Schmerzes wurde eine Nervenläsion nach dem CCI-Modell durchgeführt. Auf jedem 2D-Gel konnten mindestens 500 Proteinspots aufgetrennt werden, wobei das Molekulargewicht der Proteine von 10 bis 100 kDa und die isoelektrischen Punkte von 3 bis 10 reichten. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Färbung der 2D-Gele mit Coomassie Blau. Die subtraktive Analyse der 2D-Gele vom Lumbalmark un behandelter Kontrolltiere und dem Rückenmark von Ratten, bei denen neuropathischer Schmerz induziert worden war, zeigte reproduzierbare und deutliche Unterschiede (n=3; mindestens 25 prozentige Zu- oder Abnahme der Spotintensität) bei mindestens fünf der insgesamt detektierten Proteinspots. Dabei kam es zur Zunahme in der Intensität eines Spots, die weiteren vier modulierten Proteinspots waren nach Induktion des neuropathischen Schmerzes herunterreguliert (Abbildung 3.23).

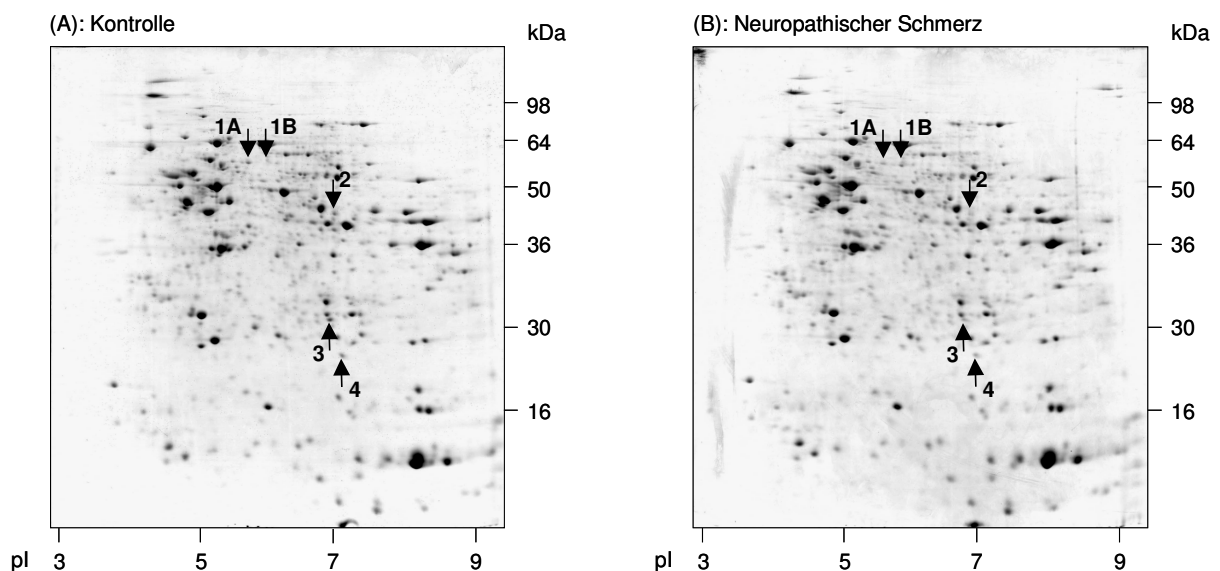


Abbildung 3.23: 2D-Gele von Lumbalmark der Ratte mit (B) und ohne (A) Induktion von neuropathischem Schmerz. Das Rückenmark wurde am 21. Tag nach dem operativen Eingriff entnommen. Die markierten Spots stellen Proteine dar, deren Expression durch den neuropathischen Schmerz reguliert wurde. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Die Identifikation der mit dem neuropathischen Schmerz assoziierten Proteinspots erfolgte durch MALDI-TOF Massenspektrometrie (Tabelle 3.2). Die hierbei identifizierten Proteine wurden bislang nicht mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht. In weiterführenden Studien könnte die funktionelle Relevanz dieser Proteine beim Schmerzgeschehen infolge einer Nervenläsion aufgeklärt und ihr Potential als pharmakologische Zielmoleküle beurteilt werden.

Tabelle 3.2: Charakterisierung der Proteine, deren Expression im Rückenmark der Ratte bei neuropathischen Schmerzen reguliert wurde.

Nr.	Protein Identität	NCBI Nummer	Eigenschaft/ Funktion	MW/ pI ^{*)}	MW/ pI ^{**)}	Regulation ^{***)}
1A	Protein Disulfid-Isomerase	GI 1352384	Proteinfaltung durch Bildung von Disulfidbrücken	57,0/5,9	57,1/5,7	Abnahme (auf 54,6 %)
1B	Protein Disulfid-Isomerase	GI 1352384	Proteinfaltung durch Bildung von Disulfidbrücken	57,0/5,9	57,1/5,9	Zunahme (auf 308,2 %)
2	Kreatin-Kinase MM	GI 6978661	Energiebereitstellung	43,2/6,6	43,0/6,7	Abnahme (auf 63,1 %)
3	Ubichinol Cytochrom C-Reduktase	GI 136708	Elektronentransport in der Atmungskette	28,0/8,9	30,2/6,6	Abnahme (auf 48,1 %)
4	α -Crystallin	GI 117388	Kleines Hitzeschockprotein	20,1/6,8	20,3/6,9	Abnahme (auf 74,5 %)

^{*)} Theoretisches Molekulargewicht (in kDa) und theoretischer isoelektrischer Punkt, aus der SWISS-PROT Datenbank (www.expasy.org/sprot) entnommen.

^{**)} Tatsächliches Molekulargewicht (in kDa) und tatsächlicher isoelektrischer Punkt der Proteine in den 2D-Gelen, unter Verwendung der ImageMaster[®] 2D-Software errechnet.

^{***)} Die Prozentangaben wurden mittels densitometrischer Auswertung der Proteinspots unter Verwendung der ImageMaster[®] 2D-Software ermittelt. Angegeben ist die mittlere Stärke der jeweiligen Proteinspots 21 Tage nach Induktion einer Nervenläsion, bezogen auf die Intensität der jeweiligen unbehandelten Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde.

Beim Vergleich der auftretenden Veränderungen im Proteinmuster des Rückenmarks aufgrund neuropathischer Schmerzen mit den Veränderungen nach Induktion von chronischen Entzündungsschmerzen wurde übereinstimmend eine Herunterregulation des Proteins α -Crystallin beobachtet. Die weiteren Proteine, die jeweils infolge der beiden Schmerzzustände moduliert wurden, waren jedoch spezifisch für das jeweilige Schmerzmodell.

4 Diskussion

4.1 Proteomanalyse des Rückenmarks bei Entzündung

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass anhaltender Einstrom von Schmerzsignalen aus der Peripherie die Proteinexpression im Rückenmark beeinflusst (Woolf et al. 1999a; Ji et al. 1995; Dubner et al. 1992). Die dabei auftretenden Regulationen der Proteinsynthese werden insbesondere für den Übergang von kurzfristigen Funktionsänderungen zu einer andauernden gesteigerten Erregbarkeit der Hinterhornneurone verantwortlich gemacht. Sie spielen demnach bei der Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass die resultierenden plastischen Veränderungen an den zentralen Synapsen zu einer Chronifizierung von Entzündungsschmerzen beitragen (Woolf et al. 2000; Zimmermann et al. 1996).

Im Hinblick auf die Bedeutung, die den Änderungen der Proteinexpression in diesem Zusammenhang zukommt, wurden in dieser Arbeit die Proteinexpressionsmuster vom Lumbalmark vor und nach Induktion einer anhaltenden Pfotenentzündung zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen. Dazu wurde eine subtraktive Proteomanalyse durchgeführt und neun Proteinspots, die nach Induktion der Entzündung moduliert wurden, durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1).

Bei den meisten der acht verschiedenen identifizierten Proteinen stimmen die tatsächlichen Werte für das Molekulargewicht und die isoelektrischen Punkte in den 2D-Gelen weitgehend mit den theoretischen, aus der Datenbank „Swiss-Prot“ entnommenen Werten überein. Die Proteine β -Synuclein, Aldose Reduktase (Spot 2B), ATP Synthase D und Cytochromoxidase Va zeigen jedoch Abweichungen davon. Solche Unterschiede in den isoelektrischen Punkten und dem Molekulargewicht der Proteine können durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Glykosylierung, durch das Vorhandensein verschiedener Isoformen oder durch eine Prozessierung der jeweiligen mRNA zustande kommen.

Für β -Synuclein z.B., das in präsynaptischen Nervenendigungen angereichert ist und zur Ausbildung einer neuronalen Plastizität beiträgt (Murphy et al. 2000), wurde bereits eine O-Glykosylierung des Proteins beschrieben (Cole et al. 2001). Diese Modifikation, die in Nervenendigungen beobachtet wurde und dort möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen spielt, könnte eine Erklärung dafür sein, dass der identifizierte β -Synuclein-Spot bei einem höheren Molekulargewicht (ca. 18,2 statt 14,5 kDa) und dabei nahezu unverändertem isoelektrischen Punkt in den 2D-Gelen vorliegt. Eine mögliche Modifikation der Aldose Reduktase, die zur Verschiebung des Proteinspots zu einem niedrigeren isoelektrischen Punkt führt, wird nachfolgend in Kapitel 4.3 diskutiert.

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese ist die wichtigste Separationstechnik zur Proteomanalyse von komplexen Proteingemischen aus Zellen oder Geweben (Rabilloud 2002). Lediglich Proteine mit extremen Eigenschaften (Membranproteine, sehr große oder kleine Proteine, stark saure oder basische Proteine) sind in den 2D-Gelen unterrepräsentiert. Gewisse Einschränkungen dieser Technik ergeben sich weiterhin aus der unvollkommenen Quantifizierung und der geringen Dynamik, d.h. sehr gering exprimierte Proteine können nicht gleichzeitig neben sehr stark exprimierten Proteinen dargestellt werden (Gygi et al. 2000).

Bei denen im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteinen handelt es sich zum Großteil um cytosolisch exprimierte Proteine, die mit physiologischen Metabolisierungs- und Stabilisierungsprozessen der Zelle in Zusammenhang stehen. Sie können aber auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle spielen. Eine Beteiligung der identifizierten Proteine bei der Schmerzverarbeitung im Rückenmark wurde jedoch bislang nicht beschrieben. Sie können somit möglicherweise als neue Angriffspunkte bei der Suche nach innovativen analgetischen Wirkprinzipien dienen.

4.2 Regulation von NF-L bei Entzündung

Eines der Proteine, das im Verlauf der peripheren Entzündung im Lumbalmark drastisch herunter reguliert wurde, ist das Neurofilament light (NF-L) (Abbildungen 3.2 und 3.3). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde berichtet, dass NF-L im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen deutlich vermindert vorliegt (Lariviere et al. 2004). Aufgrund der naheliegenden Hypothese, dass es im Verlauf einer chronischen Entzündung zu ähnlichen Änderungen kommt, wie sie in Verbindung mit neurodegenerativen Prozessen stattfinden, wurde die Regulation dieses Proteins anhand verschiedener Experimente näher beleuchtet.

Allgemein stellen Neurofilamente eine wichtige Gruppe von Zytoskelettproteinen dar, die in Neuronen an der Kontrolle des Durchmessers der Axone, der Stabilisierung ihrer Struktur und dem axoplasmatischen Transport beteiligt sind (Perrone Capano et al. 2001). Es wird daher angenommen, dass ein Mangel an Neurofilamenten die Funktion der Neurone beeinträchtigen kann. Abnormitäten der Neurofilamente führen weiterhin zu einem selektiven Abbau und Absterben von Motoneuronen (O'Hanlon et al. 2003; Houseweart et al. 1999) und werden daher auch mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Julien 1999). Neurofilament-Abbau, der vorwiegend durch Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Cystein-Protease Calpain vermittelt wird, wurde sowohl bei Verletzungen des Rückenmarks (Leski et al. 2001; Ray et al. 2001) als auch unter Sauerstoffmangel und ischämischen Bedingungen beschrieben (Li et al. 1998; Stys et al. 2002). Für weitere Cystein- oder Aspartat-Proteasen, wie Cathepsin B, Cathepsin D und Caspase-3, wurde

ebenfalls eine Beteiligung am Abbau der Neurofilamente postuliert. Die genannten Proteasen scheinen in diesem Zusammenhang jedoch eine deutlich untergeordnete Rolle zu spielen (Posmantur et al. 1998).

Nach Induktion einer Entzündung in der Peripherie wurde in den Experimenten dieser Arbeit keine Modulation der NF-L mRNA-Expression im Rückenmark beobachtet (Abbildung 3.4). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Abnahme an NF-L Protein auch hier nicht durch eine Regulation auf transkriptioneller Ebene sondern durch eine vermehrte Degradierung des Proteins durch Calpain zustande kommt. Für die gesteigerte Calpain-Aktivität im Lumbalmark nach einer Zymosaninjektion (Abbildung 3.6.A) scheint eine vermehrte Expression von m-Calpain zumindest mitverantwortlich zu sein (Abbildung 3.8 B).

Bei der Aktivierung von Calpain lassen sich Parallelen zwischen den Vorgängen erkennen, die durch eine Pfotenentzündung im Rückenmark ausgelöst werden und Ischämien oder Rückenmarksverletzungen. Die gesteigerte Calpain-Aktivität und der daraus resultierende Abbau von Neurofilament könnte demnach eine allgemein verbreitete Folge von Glutamat-vermittelter Toxizität sein.

Der Einstrom von Schmerzreizen aus der Peripherie, z.B. aufgrund einer Entzündung, führt im Rückenmark zur Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, insbesondere der exzitatorischen Aminosäure Glutamat und dem Neuropeptid Substanz P. Diese aktivieren sowohl spannungsabhängige Calciumkanäle als auch ionotrope und metabotrope Rezeptoren und ermöglichen auf diese Weise den Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Ionenkanäle und zusätzlich auch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Der dadurch bedingte Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration führt zu einer vermehrten Expression und Aktivierung einer Vielzahl von Proteinen, z.B. der nNOS, PKA, PKC und der Phospholipase A₂, und einer daraus resultierenden Bildung von proinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. NO und PGE₂ (Yaksh et al. 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Zunahme der Aktivität und Expression der Ca²⁺-abhängigen Cysteinprotease Calpain könnte ebenfalls eine direkte oder indirekte Folge der Akkumulation von Calcium in den Zellen sein (Pal et al. 2001; Ray et al. 2003).

Die während Entzündungsvorgängen in Astrozyten und Zellen des Immunsystems gesteigerte Bildung von Zytokinen, insbesondere von Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), könnte ebenfalls für die Aktivierung und Hochregulation von Calpain mitverantwortlich sein (Banik et al. 2000).

Weiterhin wurde anhand von in-vitro Experimenten gezeigt, dass die Bildung und Aktivität von Calpain unter Stressbedingungen in Gliazellen, Neuronen und Lymphozyten erhöht ist (Ray et al. 1999; Ray et al. 2000a).

Calpain ist an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, zu denen die neuronale Plastizität (Vanderklish et al. 2000) und Zelltod von Neuronen zählen (Chera et al. 2002), beteiligt. Zu den Substraten von Calpain gehören z.B. Zytoskelettproteine (z.B. Neurofilament),

Mikrotubuli-assoziierte Proteine und Membranproteine. Die Lokalisierung der Calpain Substrate in den prä- und postsynaptischen Endigungen von Neuronen ist ein Hinweis darauf, dass diese Proteine in Mechanismen eingebunden sind, die zur Plastizität der synaptischen Übertragung beitragen (Chan et al. 1999).

Es liegen bereits mehrere Berichte über eine Beteiligung von Calpain an der Verarbeitung inflammatorischer Signale vor. Vieles deutet z.B. darauf hin, dass es bei einer Aktivierung von Calpain zum proteasomalen Abbau von I κ B kommt. Calpain ist somit an der Regulation des entscheidenden Translokationsschrittes des nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) vom Zytosol in den Zellkern beteiligt (Chen et al. 2000; Saido et al. 1994). Durch Hemmung der Calpain Aktivität unter Verwendung von Calpain Inhibitor I konnte diese Aktivierung von NF- κ B und die daraus resultierende vermehrte Bildung von iNOS und Cox-2 verhindert werden (Cuzzocrea et al. 2000).

Darüber hinaus wurde anhand von Tiermodellen gezeigt, dass die systemische Gabe von Calpain Inhibitor I Organschädigungen der Lunge oder der Gelenke im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen reduziert. Als Entzündungsmodelle wurden hierbei eine Carrageenan-induzierte Brustfellentzündung und eine Kollagen-induzierte Arthritis untersucht. Das Ausmaß akuter und chronischer Entzündungsprozesse war dabei in den mit Calpain Inhibitor I behandelten Versuchstieren signifikant erniedrigt (Cuzzocrea et al. 2000).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von Indomethacin, einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum, das beide Cyclooxygenasen hemmt und demzufolge die Bildung von Prostaglandinen unterdrückt, auf die Aktivität von Calpain untersucht. In Zellkulturexperimenten übte Indomethacin dabei einen hemmenden Effekt auf die Calpain-Aktivität aus (Banik et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es nach Induktion einer Pfotenentzündung durch Zymosan nicht nur zu einer Abnahme der NF-L Proteinkonzentration im Lumbalmark sondern auch in den Hinterwurzelganglien kommt (Abbildungen 3.8 A und 3.9). Hinterwurzelganglien sind die Zellkörper der afferenten nozizeptiven Neurone und stehen durch den axoplasmatischen Fluss mit den peripheren und zentralen Axonterminalen in engem Kontakt. Durch die systemische Applikation von Calpain Inhibitor III konnte die beobachtete Degradierung von NF-L sowohl im Lumbalmark als auch in den Hinterwurzelganglien verhindert werden (Abbildungen 3.8 A und 3.9), was darauf hindeutet, dass die Wirkung des Calpain Inhibitors III sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem zustande kommt. Ein hemmender Effekt des Inhibitors auf die Expression von m-Calpain im Lumbalmark konnte dabei nicht beobachtet werden (Abbildung 3.8 B), so dass seine Wirkung wahrscheinlich eher auf einer Hemmung der proteolytischen Aktivität von Calpain beruht.

Es ist anzunehmen, dass die Verabreichung des Calpain Inhibitors neben der Proteolyse von NF-L unter Entzündungsbedingungen auch den Abbau weiterer Calpain Substrate hemmt. Da jedoch mittels 2D-Gelelektrophorese keine Regulationen von weiteren Calpain Substraten, außer der von NF-L im Lumbalmark, beobachtet werden konnten, scheint insbesondere die Proteolyse dieses

Zytoskelettproteins eine entscheidende Rolle im Rahmen der pronozizeptiven Eigenschaften von Calpain zu spielen.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Calpain-Aktivität nicht nur im Lumbalmark sondern auch im entzündeten Pfortengewebe nach der Injektion von Zymosan in die Pfote erhöht ist (Abbildungen 3.6 A und 3.7). Im Pfortengewebe kam es in Folge der Entzündungsreaktion, wie schon für das Rückenmark beschrieben, zu einer deutlichen Reduktion der NF-L Proteinkonzentration (Abbildungen 3.5). In beiden Geweben konnte der Anstieg der Calpain-Aktivität durch Vorbehandlung mit Calpain Inhibitor III abgeschwächt werden (Abbildungen 3.6 B und 3.7), was die Annahme einer sowohl zentralen als auch peripheren Wirkung des Inhibitors bestätigt.

Darüber hinaus kam es nach Verabreichung des Calpain Inhibitors III zu einer Reduktion der Nozizeption (Abbildung 3.10) und Entzündung (Abbildung 3.11) im Tiermodell, wodurch die funktionelle Relevanz der gewonnenen Erkenntnisse unterstrichen wird. Der Inhibitor wurde zur Bestimmung der thermischen Hyperalgesie sowohl intraperitoneal als auch peridural appliziert. Die peridurale Verabreichung des Calpain Inhibitors III führte bei niedrigerer Dosierung zu einer gleichwertigen Reduktion der thermischen Hyperalgesie im Vergleich zur intraperitonealen Gabe (Abbildungen 3.10 A und 3.10 B). Da die peridurale Applikation mit einer Dosierung des Inhibitors erfolgte, die nicht zu systemisch wirksamen Konzentrationen führen kann, lässt dies den Schluss zu, dass die antinozizeptiven Effekte des Calpain Inhibitors zumindest zum Teil durch eine Hemmung der Calpain Aktivität im Rückenmark und in den Hinterwurzelganglien zustande kommen.

Zusammenfassend wurde anhand der Ergebnisse in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass durch eine einmalige Gabe von Calpain Inhibitor III sowohl die Entwicklung einer zymosaninduzierten thermischen Hyperalgesie als auch das Ausmaß einer Pfortenentzündung durch Zymosan bei Ratten reduziert wird (Abbildungen 3.10 und 3.11). Dabei kam es ebenfalls zu einer Hemmung des damit offenbar eng verbundenen Abbaus von NF-L im Lumbalmark und den Hinterwurzelganglien (Abbildungen 3.8 A und 3.9). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Calpain ein bedeutendes Protein bei der Verarbeitung nozizeptiver Signale darstellt und die Hemmung einer erhöhten Calpain Aktivität möglicherweise als neuartiges Wirkprinzip zur Entwicklung innovativer Analgetika genutzt werden kann.

Die potentiellen NF-L und Calpain relevanten Signalwege sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

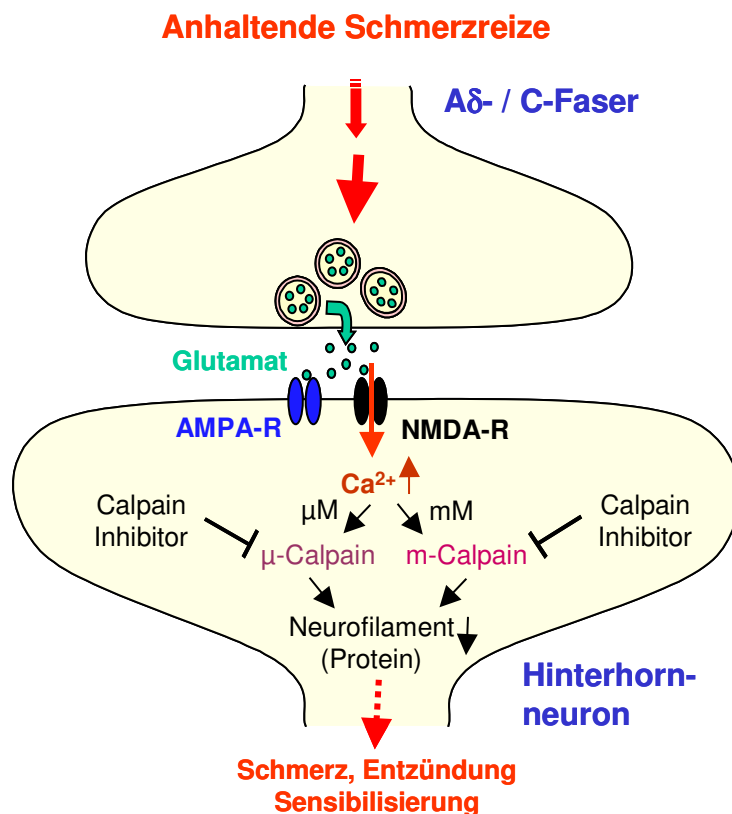


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der potentiellen Signaltransduktionswege nach nozizeptiver Stimulation des Rückenmarks unter Berücksichtigung des möglichen Wirkmechanismus von Calpain Inhibitor III.

Bei starken bzw. lang anhaltenden Schmerzreizen aus der Peripherie kommt es möglicherweise infolge des Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in der Postsynapse zu einer Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Cystein-Protease Calpain. Die Hemmung der Aktivität dieser Protease durch Calpain Inhibitor III reduziert den Abbau des Calpain Substrates NF-L. Dabei kommt es ebenfalls zu, damit offenbar in Zusammenhang stehenden, antiinflammatorischen und antihyperalgetischen Effekten.

4.3 Regulation von Aldose Reduktase bei Entzündung

Zwei der Proteinspots, die neben NF-L nach Induktion einer peripheren Entzündung am deutlichsten reguliert wurden, wurden beide als Aldose Reduktase (AR) identifiziert.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die AR an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB beteiligt ist. AR könnte somit bei Regulationen der Signaltransduktion im Rahmen von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen (Ramana et al. 2003). In ihrer Funktion als Aldo-Keto-Reduktase reduziert die AR überschüssige Glukose zu Sorbitol. Aufgrund dieser Eigenschaft, die osmotische und oxidative Effekte nach sich zieht, wurde die AR mit der Entwicklung diabetischer Folgeschäden, wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie, in Verbindung gebracht (Yabe-Nishimura 1998). Da die AR ebenfalls toxische Aldehyde reduziert, die durch

Lipidperoxidation entstehen, werden ihr auf der anderen Seite auch antioxidative Effekte zugeschrieben (Rittner et al. 1999; Spycher et al. 1997).

Die zwei detektierten AR-Spots wiesen in den 2D-Gelen annähernd das gleiche Molekulargewicht, aber eine Differenz von ca. 0,2 in ihren isoelektrischen Punkten auf (Abbildung 3.12). Bereits 24 h nach der Zymosaninjektion wurde eine deutliche Abnahme in der Intensität des Spots mit dem höheren isoelektrischen Punkt und eine Zunahme in der Intensität des Spots mit dem niedrigeren isoelektrischen Punkt beobachtet. Unter Verwendung des „Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculators“ (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) wurde errechnet, dass die AR infolge eines Phosphorylierungsschrittes eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes von 6,26 zu 6,07 bei nahezu unverändertem Molekulargewicht erfahren würde, was den hier generierten Daten entspricht und somit auf eine mögliche Phosphorylierung der AR nach Induktion der peripheren Entzündung hindeutet. Die Untersuchung der AR auf potentielle Phosphorylierungsstellen mit Hilfe der Bioinformatik-Datenbank „NetPhos“ (Version 2.0); (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) ergab neun mögliche Phosphorylierungsstellen der AR (sieben Serin-, eine Threonin- und eine Thyrosin-gebunden). Diese Befunde legen nahe, dass es sich bei der Positionsänderung des AR-Spots in den 2D-Gelen wahrscheinlich um eine Phosphorylierung des Proteins handelt. Eine solche Phosphorylierung ist möglicherweise mit einer Aktivierung der AR verbunden. Als antinozizeptives Prinzip könnte daher eine Hemmung der AR-Aktivität genutzt werden. Eine positive Wirkung von AR-Inhibitoren auf die Symptome einer diabetischen Neuropathie wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt (Greene et al. 1999; Hotta 1997). Eine Untersuchung zum Einfluss von AR-Inhibitoren auf die Nozizeption nicht-diabetischer Versuchstiere zeigte hingegen ein uneinheitliches Bild (Calcutt et al. 1995).

Bei anhaltendem Einstrom von Schmerzsignalen ins Rückenmark, z.B. im Rahmen einer peripheren Entzündungsreaktion, kommt es in den Hinterhornneuronen zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Dadurch werden u.a. die Proteinkinasen A, G und C aktiviert (Aley et al. 1999; Malmberg et al. 1997; Tegeder et al. 2004), was schließlich zur Phosphorylierung zahlreicher Zielmoleküle führt. Auch die Phosphorylierung der AR könnte eine Folge der Aktivierung dieser Kinasen darstellen. Eine Phosphorylierung der AR wurde bereits in Tumorgewebe von Rattenleber und in transformierten Leberzellen der Ratte beschrieben (Zeindl-Eberhart et al. 1994). Diese Modifikation der AR scheint daher bei der Karzinogenese von Lebertumoren eine Rolle zu spielen.

Western-Blot Experimente dieser Arbeit zeigten keine Regulation der AR-Proteinkonzentration im Lumbalmark nach Entzündungsinduktion (Abbildung 3.15 A). Auch die Menge an AR-mRNA wurde dabei nicht moduliert (Abbildung 3.15 B).

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die AR im Rückenmark bei chronischem Entzündungsschmerz weder auf Transkriptions- noch auf Translationsebene reguliert wird, sondern dass vielmehr eine posttranslationale Modifikation des Proteins unter Entzündungsbedingungen vorliegt. Einiges deutet dabei auf eine Phosphorylierung des Proteins hin, die jedoch aus methodischen

Gründen mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten AR-Antikörper nicht dargestellt werden konnte.

Um eine mögliche Modulationen der AR unter Entzündungsbedingungen näher zu untersuchen, wurden daher HeLa-Zellen mit AR-DNA transient transfiziert. Zur Nachahmung einer Entzündungsreaktion im Zellkulturexperiment, wurden die transfizierten Zellen mit einem Zytokingemisch bestehend aus Interleukin-1 β (IL-1 β), Gamma-Interferon (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) behandelt.

Diese inflammatorische Zytokine wurden zur Stimulation der Zellen verwendet, da sie als Mediatoren bei Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle spielen (Ferreira 1993; Dray 1995). Bei einer Entzündungsreaktion sind die Konzentrationen dieser Zytokine im Körper sowohl am Ort des geschädigten Gewebes als auch im Blutkreislauf und im ZNS erhöht. Ihre Wirkung kommt durch eine Aktivierung der Arachidonsäurekaskade zustande. Diese führt zu einer Induktion der Cox-2-Expression und nachfolgend zu einer gesteigerten Bildung von Prostaglandinen (Kelso 2000).

Im Western-Blot konnte nach einer 24-stündigen Behandlung mit einem Gemisch aus den Zytokinen IL-1 β , IFN- γ und TNF- α eine deutliche Abnahme von AR-Protein in transfizierten HeLa-Zellen detektiert werden (Abbildung 3.17). Dieser Effekt konnte unter den gleichen Bedingungen nicht für das Kontrollprotein GFP in entsprechend transfizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.18) und scheint daher spezifisch für die AR zu sein.

In Gegenwart des antiphlogistisch wirksamen Glukokortikoids Dexamethason war die Reduktion der AR-Konzentration weniger stark ausgeprägt (Abbildung 3.19). Zu der antiphlogistischen Wirkung der Glukokortikoide wie Dexamethason trägt u.a. die Hemmung der Prostaglandin-Synthese durch Blockade der Cox-2-Induktion bei (Hatz 1998). Dieser Effekt konnte ebenfalls in den mit Dexamethason inkubierten Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Abnahme der AR-Proteinkonzentration tatsächlich mit der Entzündungsreaktion im Zusammenhang steht.

Unter den selben Versuchsbedingungen, unter denen die Abnahme von AR-Protein beobachtet wurde, ergaben sich jedoch keine Änderungen der AR-mRNA-Konzentrationen (Abbildung 3.20). Demzufolge lässt sich die Abnahme auf Proteinebene nicht auf eine veränderte Gentranskription zurückführen. Weiterhin konnte der Rückgang der AR-Proteinkonzentration nicht durch eine Hemmung der de novo Proteinsynthese erklärt werden, da es in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der AR kam (Abbildung 3.21). Die Hemmung der Proteintranslation unter Cycloheximid kommt dabei durch eine Blockade der Peptidyltransferase-Aktivität des eukaryontischen Ribosoms zustande. Da weder eine Reduktion der Transkription noch eine Verminderung der Translation für die Abnahme der AR Proteinkonzentration verantwortlich zu sein scheint, ist vielmehr von einem Abbau des Proteins unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auszugehen.

Bei der Verarbeitung von zytosolischen Proteinen spielt insbesondere der Proteasomkomplex eine wichtige Rolle (Rock et al. 1994). Substrate sind zumeist Proteine, die als Regulatoren in verschiedensten zellulären Prozessen, wie Metabolismus (Bercovich et al. 1993), Transkription (Treier et al. 1994) und Zellzykluskontrolle (Seufert et al. 1995), fungieren. Der katalytische 20S-Kern des Proteasoms besteht aus 28 Untereinheiten, die in vier heptamerischen Ringen angeordnet sind. Die Untereinheiten der inneren Ringe des Komplexes können nach Stimulation mit IFN- γ ausgetauscht werden. Durch diesen Vorgang wird das 20S-Proteasom strukturell umorganisiert und gelangt in einen „Immunproteasom“ genannten Zustand, in dem die Substratspezifität verändert und das Peptidrepertoire erweitert wird (Griffin et al. 1998). In diesem Zustand wird der Abbau Ubiquitin-markierter Proteine zu Peptiden katalysiert (Kloetzel 2001).

Die Gegenwart eines spezifischen Inhibitors des Proteasoms, Lactacystin (Dick et al. 1997), wirkte dem Abbau der AR infolge der Zytokininkubation entgegen (Abbildung 3.22). Diese Befunde legen nahe, dass die beobachtete Abnahme an AR-Protein zumindest teilweise auf einem Abbau des Proteins durch den Proteasomkomplex beruht.

Der Abbau einiger proinflammatorischer Substrate durch das Proteasom kann aber auch zu deren Aktivierung beitragen. Auf diese Weise wird z.B. der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, der in der Folge verschiedene Zytokine, Enzyme und Adhäsionsmoleküle hochreguliert (Epinat et al. 1999). Wird die Aktivierung von NF- κ B durch Behandlung mit einem Proteasominhibitor verhindert, erreicht man daher antiinflammatorische Effekte, die in diesem Fall möglicherweise zum Teil für die Hemmung des Abbaus der AR mitverantwortlich sind.

Es gibt weiterhin Hinweise darauf, dass durch eine Behandlung mit Dexamethason die Aktivierung des Proteasoms ebenfalls gehemmt werden kann (Dallaporta et al. 2000; Beyette et al. 1998). Es wäre daher möglich, dass dieser Effekt des Dexamethasons teilweise zu einer Verminderung des Abbaus der AR in Gegenwart von proinflammatorischen Zytokinen beiträgt.

Die unterschiedlichen Regulationen der AR unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro* ergeben sich möglicherweise daraus, dass sich die Komplexizität einer Entzündungsreaktion in einem Zellkulturexperiment nicht vollständig nachahmen lässt.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass es nach Induktion einer Entzündung in der Peripherie zu einer Verschiebung in der Konzentration zwischen zwei Varianten der AR im Lumbalmark kommt (Abbildung 3.12). Diese verschiedenen Formen der AR kommen vermutlich durch eine posttranslationale Modifikation des Proteins, wahrscheinlich eine Phosphorylierung, zustande. Weiterhin wurde in einem Zellkulturmodell gezeigt, dass die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu einem Abbau der AR führt, der wahrscheinlich hauptsächlich durch das Proteasom vermittelt wird (Abbildung 3.22). Diese Degradierung ließ sich in Gegenwart von Dexamethason reduzieren (Abbildung 3.19).

4.4 Proteomanalyse des Rückenmarks bei neuropathischem Schmerz

Bei neuropathischen Schmerzen bewirkt die fortdauernde nozizeptive Aktivität in geschädigten peripheren C-Fasern eine gesteigerte Expression von „immediate early genes“ (IEGs), wie z.B. c-fos, c-jun und krox-24, in Hinterhornneuronen des Rückenmarks. Diese Proteine tragen zur Regulation der Expression von nachgeschalteten Genen und zu weiteren neuroplastischen Veränderungen im zentralen Nervensystem bei. Als Folgen der auftretenden Änderungen in der Proteinsynthese kann es zur zentralen Sensibilisierung, zur Apoptose von Hinterhornneuronen und zur Beeinträchtigung der spinalen Hemmfunktionen kommen. Diese Prozesse können schließlich zu einer Chronifizierung des neuropathischen Schmerzes führen (Woolf et al. 1999b; Zimmermann 2001).

Der proteomanalytische Ansatz in dieser Arbeit ermöglichte die Aufdeckung von Unterschieden in den Proteinmustern des Lumbalmarks von Ratten bei neuropathischem Schmerz im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 3.23). Die regulierten Proteine sind möglicherweise in Mechanismen der zentralen Sensibilisierung im Rahmen von neuropathischen Schmerzen involviert und könnten somit als Grundlage für weitere Untersuchungen zur Entwicklung von neuen Therapieansätzen herangezogen werden (Mullner et al. 1998). Im Hinblick darauf, dass die zur Zeit verfügbaren Arzneimittel zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen häufig unzureichend wirksam sind oder mit unakzeptablen Nebenwirkungen einhergehen (Koltzenburg 1998; Kingery 1997), ist die Identifizierung neuer Zielmoleküle, die bei dieser Schmerzform eine Rolle spielen, von besonderer Bedeutung.

Durch 2D-Gelelektrophorese und anschließende Massenspektrometrie wurden vier Proteine identifiziert, deren Regulation mit der Induktion von neuropathischen Schmerzen korreliert (Tabelle 3.2).

Zwei der detektierten Proteinspots mit gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten, wurden als Protein Disulfid-Isomerase (PDI) identifiziert. Dieses Protein ist an der Bildung, Isomerisierung und Reduktion von Disulfidbrücken beteiligt (Freedman et al. 1994; Gilbert 1997). In den 2D-Gelen kommt es in Assoziation mit dem neuropathischen Schmerz zu einer Verschiebung in der Intensität zwischen den zwei Spots, was wahrscheinlich auf eine posttranslationale Modifikation der PDI zurückzuführen ist. Unter Verwendung des „Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculators“ (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) wurde errechnet, dass die PDI infolge eines Phosphorylierungsschrittes eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes von 5,88 zu 5,78, bei nahezu unverändertem Molekulargewicht, erfährt. Da der PDI-Spot zu einem höheren isoelektrischen Punkt verschoben wird, ist eine Dephosphorylierung des Proteins wahrscheinlich. Es wäre daher möglich, dass die PDI unter Kontrollbedingungen in phosphorylierter Form vorliegt und nach Induktion des neuropathischen Schmerzes dephosphoryliert

wird. Eine ähnliche Regulation der PDI ist bereits nach Ischämie und Reperfusion des Herzens beobachtet worden (Sakai et al. 2003).

Weiterhin wurde eine Abnahme in der Intensität des als α -Crystallin identifizierten Proteinspots detektiert. Dieses kleine Hitzeschock-Protein ist ein molekulares Chaperon, das falsche Faltungen von Proteinen, wie sie unter Stresssituationen auftreten können, korrigiert (MacRae 2000). Eine Herunterregulation von α -Crystallin wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nach Induktion einer peripheren Entzündung durch Zymosaninjektion beobachtet. α -Crystallin könnte daher bei Sensibilisierungsvorgängen im Rückenmark sowohl beim neuropathischen Schmerz als auch beim chronischen Entzündungsschmerz eine Rolle spielen. In der Literatur wurde eine Abnahme von α -Crystallin bereits für das Myokard nach einer Ischämie und anschließender Reperfusion beschrieben (Schwertz et al. 2002).

Eine Reduktion in der Intensität wurde ebenfalls bei dem als Kreatin-Kinase MM identifizierten Proteinspot detektiert. Diese ursprünglich als Muskel-spezifisch angesehene Isoform der Kreatin-Kinase wurde ebenfalls im ZNS nachgewiesen (Hamburg et al. 1990). Das Isoenzym Kreatin-Kinase BB wurde bereits sowohl mit neuropathischem Schmerz (Lee et al. 2003) als auch mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer (Aksenov et al. 2000) und Amyotropher Lateralsklerose (Wendt et al. 2002), in Verbindung gebracht. Hinweise auf eine Beteiligung der Kreatin-Kinase MM liegen in diesem Zusammenhang jedoch bislang nicht vor.

Weiterhin wurde infolge der Nervenläsion eine Abnahme des als Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase identifizierten Proteins beobachtet. Eine solche Reduktion wurde bereits im Rahmen verschiedener neuropsychologischer Erkrankungen beschrieben (Johnston-Wilson et al. 2000). Die anhand der 2D-Gele ermittelten Werte für die Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase, insbesondere für den isoelektrischen Punkt und auch für das Molekulargewicht, weichen jedoch deutlich von den theoretischen Werten ab. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dem identifizierten Proteinspot um eine Variante der Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase handelt.

Die auftretenden Regulationen in der Proteinexpression sind beim neuropathischen Schmerz im Gegensatz zum chronischen Entzündungsschmerz in den Hinterwurzelganglien stärker ausgeprägt und vielfältiger als im Rückenmark (Herdegen et al. 1998). Nach der Nervenläsion konnten daher im Rahmen dieser Arbeit möglicherweise insgesamt weniger und schwächer modulierte Proteinspots im Lumbalmark detektiert werden als nach Induktion einer Pfotenentzündung durch Zymosaninjektion. Demzufolge könnten in weiterführenden Studien, zusätzlich zum Lumbalmark, auch die Hinterwurzelganglien der Segmente L4 und L5 proteomanalytisch untersucht werden, um weitere Hinweise auf Sensibilisierungsvorgänge im Rahmen von neuropathischen Schmerzen zu gewinnen.

Außer der übereinstimmenden Regulation von α -Crystallin wurden jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten in den Veränderungen der Proteinmuster nach Induktion von neuropathischen Schmerzen und Entzündungsschmerzen beobachtet. Dieser Befund spricht dafür, dass sich diese beiden Formen des chronischen Schmerzes nicht nur in bezug auf ihre Entstehungsmechanismen

sondern auch bezüglich der plastischen Veränderungen im Hinterhorn des Rückenmarks deutlich unterscheiden. Weiterhin wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie berichtet, dass auch bei der vergleichenden Proteomanalyse der Zerebrospinalflüssigkeit nach Induktion von neuropathischen Schmerzen und Entzündungsschmerzen keine gemeinsamen Änderungen auf diese unterschiedlichen Schmerzreize hin detektiert werden konnten (Gineste et al. 2003). Diese Differenzen sind wahrscheinlich mitverantwortlich dafür, dass zur adäquaten Behandlung dieser beiden Schmerzzustände vollkommen unterschiedliche therapeutische Strategien angewandt werden müssen. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine könnten dabei zukünftig als Zielmoleküle zur Entwicklung spezifischer Therapieansätze zur Behandlung chronischer Entzündungsschmerzen und neuropathischer Schmerzen genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Durch anhaltende Entzündungsvorgänge oder Nervenläsionen kommt es zu einem vermehrten nozizeptiven Einstrom ins Rückenmark, was lang anhaltende Sensibilisierungsvorgänge an den zentralen Synapsen zur Folge hat. Auf molekularer Ebene kommt es dabei zur Regulation verschiedenster Proteinsynthesen. Diese plastischen Veränderungen im Zellstoffwechsel der Hinterhornneurone können eine Chronifizierung der zentralen Vorgänge bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels vergleichender Proteomanalyse Proteine identifiziert, die aufgrund chronischer Entzündungsschmerzen und neuropathischer Schmerzen im Lumbalmark reguliert werden.

In Folge einer durch Zymosan induzierten Pfotenentzündung konnten mittels 2D-Gelelektrophorese des Lumbalmarks der Ratte bei neun Proteinspots eine Regulation festgestellt werden. Diese Proteine sind möglicherweise an Mechanismen der zentralen Sensibilisierung in Hinterhornneuronen beteiligt und könnten als innovative Therapieansatzpunkte von Bedeutung sein. Ein Zusammenhang zwischen den identifizierten Proteinen und Mechanismen der Schmerzentstehung und -verarbeitung wurde bislang nicht beschrieben.

Eines der Proteine, bei dem es zu einem deutlichen zeitabhängigen Abbau nach Zymosaninjektion kam, wurde massenspektrometrisch als Neurofilament light (NF-L) identifiziert. NF-L spielt insbesondere für die strukturelle Stabilität der Neurone und den axoplasmatischen Transport eine wichtige Rolle. Ein Abbau von Neurofilamenten im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wurde bereits mehrfach beschrieben. Für die Degradierung von NF-L wird hierbei hauptsächlich die Protease Calpain verantwortlich gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Aktivierung von Calpain nach Zymosaninjektion sowohl im Lumbalmark als auch im entzündeten Pfotengewebe nachgewiesen. Der entzündungsassoziierte Abbau von NF-L im Rückenmark und den Hinterwurzelganglien konnte durch die einmalige Verabreichung eines spezifischen Inhibitors von Calpain verhindert werden. Eine Vorbehandlung der Tiere mit dem Calpain Inhibitor zeigte darüber hinaus antiinflammatorische und antihyperalgetische Effekte im Entzündungsmodell. Die antinozizeptive Wirkung des Inhibitors war dabei unabhängig davon, ob die Substanz systemisch (i.p.) oder am Rückenmark (peridural) appliziert wurde. Zusammenfassend zeigen die bisher genannten Ergebnisse, dass die Hemmung einer pathophysiologischen Aktivierung von Calpain ein neues, bislang nicht beschriebenes Wirkprinzip zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen darstellen könnte.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde das Protein Aldose Reduktase (AR), das ebenfalls nach Induktion einer peripheren Entzündung reguliert wurde, näher beleuchtet. Bislang wurde die AR vorwiegend mit der Entstehung diabetischer Spätschäden in Verbindung gebracht. Im Proteinmuster des Lumbalmarks zeigte sich dieses Protein durch zwei verschiedene Spots, wobei nach der

Zymosaninjektion eine Verschiebung in der Intensität zwischen diesen beiden Varianten der AR beobachtet wurde. Da die AR nach der Entzündungsinduktion weder auf Transkriptions- noch auf Translationsebene reguliert wurde, ist von einer posttranslationalen Modifikation des Proteins auszugehen, wobei eine Phosphorylierung naheliegend erscheint. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass die AR nach einer Stimulation der transfizierten Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen abgebaut wird, wobei hierfür eine Aktivierung des Proteasoms verantwortlich zu sein scheint. Eine Hemmung des Abbaus konnte dabei nicht nur durch einen Proteasominhibitor sondern zum Teil auch durch Dexamethason erzielt werden. Die AR scheint daher bei Entzündungsprozessen auf verschiedene Arten reguliert zu werden.

Weiterhin wurden Änderungen im Lumbalmark nach Induktion von neuropathischen Schmerzen proteomanalytisch untersucht. Beim Vergleich der Proteinexpressionsmuster zeigten sich bei vier Proteinen Regulationen infolge der Nervenläsion. Keines dieser Proteine wurde bislang mit neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht. Eines der identifizierten Proteine, α -Crystallin, wurde sowohl bei neuropathischem Schmerz als auch bei chronischem Entzündungsschmerz herunterreguliert. Dieses Protein scheint daher mit beiden dieser chronischen Schmerzzustände korreliert zu sein. Die ansonsten beobachteten Änderungen waren jedoch spezifisch für das jeweilige Schmerzmodell, so dass davon ausgegangen werden kann, dass deutliche Unterschiede in den spinalen Sensibilisierungsvorgängen infolge einer Entzündung oder einer Nervenläsion bestehen.

Mit der Identifizierung und Charakterisierung von schmerz- und entzündungsassoziierten Proteinen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Aufklärung bislang unbekannter Mechanismen der zentralen Sensibilisierung geleistet. Diese Erkenntnisse könnten in der Zukunft als Grundlage zur Entwicklung innovativer Therapieansätze für die Schmerztherapie genutzt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Aldose Reduktase
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
CCI	chronic constriction injury
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
Cox	Cyclooxygenase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FBS	Fötale bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde (hour)
HCl	Salzsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilo-Dalton
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NaCl	Natriumchlorid
NF-L	Neurofilament-light
NK-1	Neurokinin-1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzungsverzeichnis

PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pI	isoelektrischer Punkt
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
q.s.	quantum satis (soviel wie nötig)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Aksenov, M., M. Aksenova, D. A. Butterfield and W. R. Markesbery (2000). "Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain." *J Neurochem* 74(6): 2520-7.
- Aley, K. O. and J. D. Levine (1999). "Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain." *J Neurosci* 19(6): 2181-6.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (1998). "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words." *Electrophoresis* 19(11): 1853-61.
- Baliova, M., H. Betz and F. Jursky (2004). "Calpain-mediated proteolytic cleavage of the neuronal glycine transporter, GlyT2." *J Neurochem* 88(1): 227-32.
- Banay-Schwartz, M., D. Dahl, K. S. Hui and A. Lajtha (1987). "The breakdown of the individual neurofilament proteins by cathepsin D." *Neurochem Res* 12(4): 361-7.
- Banik, N. L., D. Matzelle, E. Terry, G. Gantt-Wilford and E. L. Hogan (2000). "Inhibition of proteolysis by a cyclooxygenase inhibitor, indomethacin." *Neurochem Res* 25(11): 1509-15.
- Banik, N. L., D. C. Matzelle, G. Gantt-Wilford, A. Osborne and E. L. Hogan (1997). "Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury." *Brain Res* 752(1-2): 301-6.
- Baron, R. (2000). "Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms." *Clin J Pain* 16(2 Suppl): S12-20.
- Beiche, F., S. Scheuerer, K. Brune, G. Geisslinger and M. Goppelt-Struebe (1996). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation." *FEBS Lett* 390(2): 165-9.
- Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." *Pain* 33(1): 87-107.
- Bercovich, Z. and C. Kahana (1993). "Involvement of the 20S proteasome in the degradation of ornithine decarboxylase." *Eur J Biochem* 213(1): 205-10.
- Beyette, J., G. G. Mason, R. Z. Murray, G. M. Cohen and A. J. Rivett (1998). "Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes." *Biochem J* 332 (Pt 2): 315-20.
- Bhatnagar, A. and S. K. Srivastava (1992). "Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme." *Biochem Med Metab Biol* 48(2): 91-121.
- Bileviciute, I., C. Stenfors, E. Theodorsson and T. Lundeberg (1998). "Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw." *Br J Pharmacol* 125(6): 1304-12.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier and W. Postel (1982). "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." *J Biochem Biophys Methods* 6(4): 317-39.
- Blomgren, K., U. Hallin, A. L. Andersson, M. Puka-Sundvall, B. A. Bahr, A. McRae, T. C. Saido, S. Kawashima and H. Hagberg (1999). "Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a

- suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia.*" J Biol Chem 274(20): 14046-52.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-54.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature 414(6865): 813-20.
- Burlingame, A. L., R. K. Boyd and S. J. Gaskell (1998). "Mass spectrometry." Anal Chem 70(16): 647R-716R.
- Calcutt, N. A., L. Li, T. L. Yaksh and A. B. Malmberg (1995). "Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin E." Eur J Pharmacol 285(2): 189-97.
- Chan, S. L. and M. P. Mattson (1999). "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death." J Neurosci Res 58(1): 167-90.
- Chatterjee, S., Z. Q. Gu, D. Dunn, M. Tao, K. Josef, R. Tripathy, R. Bihovsky, S. E. Senadhi, T. M. O'Kane, B. A. McKenna, S. Mallya, M. A. Ator, D. Bozyczko-Coyne, R. Siman and J. P. Mallamo (1998). "D-amino acid containing, high-affinity inhibitors of recombinant human calpain I." J Med Chem 41(15): 2663-6.
- Chen, F., L. M. Demers, V. Vallyathan, Y. Lu, V. Castranova and X. Shi (2000). "Impairment of NF-kappaB activation and modulation of gene expression by calpastatin." Am J Physiol Cell Physiol 279(3): C709-16.
- Chera, B., K. E. Schaecher, A. Rocchini, S. Z. Imam, S. K. Ray, S. F. Ali and N. L. Banik (2002). "Calpain upregulation and neuron death in spinal cord of MPTP-induced parkinsonism in mice." Ann N Y Acad Sci 965: 274-80.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques 15(3): 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.
- Coderre, T. J., J. Katz, A. L. Vaccarino and R. Melzack (1993). "Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence." Pain 52(3): 259-85.
- Coderre, T. J. and R. Melzack (1992). "The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury." J Neurosci 12(9): 3665-70.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 69(8): 2110-4.
- Cole, R. N. and G. W. Hart (2001). "Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals." J Neurochem 79(5): 1080-9.
- Cuzzocrea, S., M. C. McDonald, E. Mazzon, D. Siriwardena, I. Serraino, L. Dugo, D. Britti, G. Mazzullo, A. P. Caputi and C. Thiemermann (2000). "Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation." Am J Pathol 157(6): 2065-79.

- Dallaporta, B., M. Pablo, C. Maise, E. Daugas, M. Loeffler, N. Zamzami and G. Kroemer (2000). "*Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis.*" *Cell Death Differ* 7(4): 368-73.
- Deetjen, P., E. J. Speckmann (1999). "*Physiologie.*" Urban & Fischer Verlag.
- Dick, L. R., A. A. Cruikshank, A. T. Destree, L. Grenier, T. A. McCormack, F. D. Melandri, S. L. Nunes, V. J. Palombella, L. A. Parent, L. Plamondon and R. L. Stein (1997). "*Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells.*" *J Biol Chem* 272(1): 182-8.
- Dray, A. (1995). "*Inflammatory mediators of pain.*" *Br J Anaesth* 75(2): 125-31.
- Drews, J. (2000). "*Drug discovery: a historical perspective.*" *Science* 287(5460): 1960-4.
- Dubner, R. and M. A. Ruda (1992). "*Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation.*" *Trends Neurosci* 15(3): 96-103.
- England, J. D., L. T. Happel, D. G. Kline, F. Gamboni, C. L. Thouron, Z. P. Liu and S. R. Levinson (1996). "*Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas.*" *Neurology* 47(1): 272-6.
- Epinat, J. C. and T. D. Gilmore (1999). "*Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway.*" *Oncogene* 18(49): 6896-909.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "*Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7413-7.
- Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey and S. L. Schreiber (1995). "*Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin.*" *Science* 268(5211): 726-31.
- 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.
- Figueiredo-Pereira, M. E., N. Banik and S. Wilk (1994). "*Comparison of the effect of calpain inhibitors on two extralysosomal proteinases: the multicatalytic proteinase complex and m-calpain.*" *J Neurochem* 62(5): 1989-94.
- Freedman, R. B., T. R. Hirst and M. F. Tuite (1994). "*Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding.*" *Trends Biochem Sci* 19(8): 331-6.
- George, A., M. Marziniak, M. Schafers, K. V. Toyka and C. Sommer (2000). "*Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin.*" *Pain* 88(3): 267-75.
- Gilbert, H. F. (1997). "*Protein disulfide isomerase and assisted protein folding.*" *J Biol Chem* 272(47): 29399-402.
- Gineste, C., L. Ho, P. Pompl, M. Bianchi and G. M. Pasinetti (2003). "*High-throughput proteomics and protein biomarker discovery in an experimental model of inflammatory hyperalgesia: effects of nimesulide.*" *Drugs* 63 Suppl 1: 23-9.
- Gorg, A., G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch and W. Weiss (1995). "*Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-*

- Dalt*): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems." Electrophoresis 16(7): 1079-86.
- Gorg, A., W. Postel and S. Gunther (1988). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." Electrophoresis 9(9): 531-46.
- Greene, D. A., J. C. Arezzo and M. B. Brown (1999). "Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group." Neurology 53(3): 580-91.
- Griffin, T. A., D. Nandi, M. Cruz, H. J. Fehling, L. V. Kaer, J. J. Monaco and R. A. Colbert (1998). "Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits." J Exp Med 187(1): 97-104.
- Gygi, S. P., G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon and R. Aebersold (2000). "Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology." Proc Natl Acad Sci U S A 97(17): 9390-5.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza and R. Aebersold (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Mol Cell Biol 19(3): 1720-30.
- Hamburg, R. J., D. L. Friedman, E. N. Olson, T. S. Ma, M. D. Cortez, C. Goodman, P. R. Puleo and M. B. Perryman (1990). "Muscle creatine kinase isoenzyme expression in adult human brain." J Biol Chem 265(11): 6403-9.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-80.
- Hargreaves, K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores and J. Joris (1988). "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." Pain 32(1): 77-88.
- Hatz, H. J. (1998). "Glucocorticoide - Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." Brain Res Brain Res Rev 28(3): 370-490.
- Hotta, N. (1997). "New concepts and insights on pathogenesis and treatment of diabetic complications: polyol pathway and its inhibition." Nagoya J Med Sci 60(3-4): 89-100.
- Houseweart, M. K. and D. W. Cleveland (1999). "Bcl-2 overexpression does not protect neurons from mutant neurofilament-mediated motor neuron degeneration." J Neurosci 19(15): 6446-56.
- Iadarola, J. M. and R. M. Caudle (1997). "Good pain, bad pain." Science 278(5336): 239-40.
- Iwata, T., S. Sato, J. Jimenez, M. McGowan, M. Moroni, A. Dey, N. Ibaraki, V. N. Reddy and D. Carper (1999). "Osmotic response element is required for the induction of aldose reductase by tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem 274(12): 7993-8001.
- James, P. (1997). "Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics." Q Rev Biophys 30(4): 279-331.

- Ji, R. R., X. Zhang, Z. Wiesenfeld-Hallin and T. Hokfelt (1994). "*Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation.*" J Neurosci 14(11 Pt 1): 6423-34.
- Ji, R. R., X. Zhang, Q. Zhang, A. Dagerlind, S. Nilsson, Z. Wiesenfeld-Hallin and T. Hokfelt (1995). "*Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation.*" Neuroscience 68(2): 563-76.
- Johnston-Wilson, N. L., C. D. Sims, J. P. Hofmann, L. Anderson, A. D. Shore, E. F. Torrey and R. H. Yolken (2000). "*Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium.*" Mol Psychiatry 5(2): 142-9.
- Julien, J. P. (1999). "*Neurofilament functions in health and disease.*" Curr Opin Neurobiol 9(5): 554-60.
- Kampfll, A., R. M. Posmantur, X. Zhao, E. Schmutzhard, G. L. Clifton and R. L. Hayes (1997). "*Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update.*" J Neurotrauma 14(3): 121-34.
- Kelso, A. (2000). "*Cytokines and their receptors: an overview.*" Ther Drug Monit 22(1): 40-3.
- Kingery, W. S. (1997). "*A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes.*" Pain 73(2): 123-39.
- Kloetzel, P. M. (2001). "*Antigen processing by the proteasome.*" Nat Rev Mol Cell Biol 2(3): 179-87.
- Klose, J. (1975). "*Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.*" Humangenetik 26(3): 231-43.
- Klose, J. and U. Kobalz (1995). "*Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.*" Electrophoresis 16(6): 1034-59.
- Koltzenburg, M. (1998). "*Painful neuropathies.*" Curr Opin Neurol 11(5): 515-21.
- Laemmli, U. K. (1970). "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*" Nature 227(259): 680-5.
- Laird, J. M. and G. J. Bennett (1993). "*An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy.*" J Neurophysiol 69(6): 2072-85.
- Lariviere, R. C. and J. P. Julien (2004). "*Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease.*" J Neurobiol 58(1): 131-48.
- Lee, A. Y. and S. S. Chung (1999). "*Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract.*" Faseb J 13(1): 23-30.
- Lee, S. C., T. G. Yoon, Y. I. Yoo, Y. J. Bang, H. Y. Kim, D. I. Jeoung and H. J. Kim (2003). "*Analysis of spinal cord proteome in the rats with mechanical allodynia after the spinal nerve injury.*" Biotechnol Lett 25(24): 2071-8.
- Leski, M. L., F. Bao, L. Wu, H. Qian, D. Sun and D. Liu (2001). "*Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments--an oxidation target.*" Free Radic Biol Med 30(6): 613-24.

- Li, G. and R. Iyengar (2002). "*Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/beta -catenin-regulated cell proliferation.*" Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13254-9.
- Li, P. A., W. Howlett, Q. P. He, H. Miyashita, M. Siddiqui and A. Shuaib (1998). "*Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia.*" Neurosci Lett 247(1): 17-20.
- MacRae, T. H. (2000). "*Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas.*" Cell Mol Life Sci 57(6): 899-913.
- Malmberg, A. B., C. Chen, S. Tonegawa and A. I. Basbaum (1997). "*Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma.*" Science 278(5336): 279-83.
- Mannion, R. J., M. Costigan, I. Decosterd, F. Amaya, Q. P. Ma, J. C. Holstege, R. R. Ji, A. Acheson, R. M. Lindsay, G. A. Wilkinson and C. J. Woolf (1999). "*Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity.*" Proc Natl Acad Sci U S A 96(16): 9385-90.
- Markgraf, C. G., N. L. Velayo, M. P. Johnson, D. R. McCarty, S. Medhi, J. R. Koehl, P. A. Chmielewski and M. D. Linnik (1998). "*Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats.*" Stroke 29(1): 152-8.
- McCarson, K. E. and J. E. Krause (1994). "*NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception.*" J Neurosci 14(2): 712-20.
- McLafferty, F. W., E. K. Fridriksson, D. M. Horn, M. A. Lewis and R. A. Zubarev (1999). "*Techview: biochemistry. Biomolecule mass spectrometry.*" Science 284(5418): 1289-90.
- Meller, S. T. and G. F. Gebhart (1997). "*Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat.*" Eur J Pain 1: 43-52.
- Mellgren, R. L. (1987). "*Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes?*" Faseb J 1(2): 110-5.
- Messlinger, K. (1997). "*[What is a nociceptor?]*." Anaesthesist 46(2): 142-53.
- Messlinger, K. (2002). "*Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentscheidung.*" Manuelle Medizin 40(1): 13-21.
- Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell and S. Falkow (1976). "*Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid.*" J Bacteriol 127(3): 1529-37.
- Mullner, S., T. Neumann and F. Lottspeich (1998). "*Proteomics--a new way for drug target discovery.*" Arzneimittelforschung 48(1): 93-5.
- Murphy, D. D., S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2000). "*Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons.*" J Neurosci 20(9): 3214-20.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "*Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.*" Electrophoresis 9(6): 255-62.

- Neumar, R. W., Y. A. Xu, H. Gada, R. P. Guttmann and R. Siman (2003). "*Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis.*" J Biol Chem 278(16): 14162-7.
- O'Farrell, P. H. (1975). "*High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.*" J Biol Chem 250(10): 4007-21.
- O'Hanlon, G. M., P. D. Humphreys, R. S. Goldman, S. K. Halstead, R. W. Bullens, J. J. Plomp, Y. Ushkaryov and H. J. Willison (2003). "*Calpain inhibitors protect against axonal degeneration in a model of anti-ganglioside antibody-mediated motor nerve terminal injury.*" Brain 126(Pt 11): 2497-509.
- Pal, G. P., J. S. Elce and Z. Jia (2001). "*Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium.*" J Biol Chem 276(50): 47233-8.
- Perrin, B. J. and A. Huttenlocher (2002). "*Calpain.*" Int J Biochem Cell Biol 34(7): 722-5.
- Perrone Capano, C., R. Pernas-Alonso and U. di Porzio (2001). "*Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration.*" Bioessays 23(1): 24-33.
- Posmantur, R. M., X. Zhao, A. Kampfl, G. L. Clifton and R. L. Hayes (1998). "*Immunoblot analyses of the relative contributions of cysteine and aspartic proteases to neurofilament breakdown products following experimental brain injury in rats.*" Neurochem Res 23(10): 1265-76.
- Rabilloud, T. (2002). "*Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains.*" Proteomics 2(1): 3-10.
- Ramana, K. V., D. Chandra, S. Srivastava, A. Bhatnagar and S. K. Srivastava (2003). "*Aldose reductase mediates the mitogenic signals of cytokines.*" Chem Biol Interact 143-144: 587-96.
- Rami, A., D. Ferger and J. Krieglstein (1997). "*Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity.*" Neurosci Res 27(1): 93-7.
- Ray, S. K., M. Fidan, M. W. Nowak, G. G. Wilford, E. L. Hogan and N. L. Banik (2000a). "*Oxidative stress and Ca²⁺ influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells.*" Brain Res 852(2): 326-34.
- Ray, S. K., E. L. Hogan and N. L. Banik (2003). "*Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors.*" Brain Res Brain Res Rev 42(2): 169-85.
- Ray, S. K., D. C. Matzelle, G. G. Wilford, E. L. Hogan and N. L. Banik (2000b). "*E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats.*" Brain Res 867(1-2): 80-9.
- Ray, S. K., D. D. Matzelle, G. G. Wilford, E. L. Hogan and N. L. Banik (2001). "*Cell death in spinal cord injury (SCI) requires de novo protein synthesis. Calpain inhibitor E-64-d provides neuroprotection in SCI lesion and penumbra.*" Ann N Y Acad Sci 939: 436-49.
- Ray, S. K., G. G. Wilford, S. F. Ali and N. L. Banik (2000c). "*Calpain upregulation in spinal cords of mice with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease.*" Ann N Y Acad Sci 914: 275-83.
- Ray, S. K., G. G. Wilford, C. V. Crosby, E. L. Hogan and N. L. Banik (1999). "*Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells.*" Brain Res 829(1-2): 18-27.

- Rittner, H. L., V. Hafner, P. A. Klimiuk, L. I. Szweda, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (1999). "Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis." *J Clin Invest* 103(7): 1007-13.
- Roberts-Lewis, J. M., M. J. Savage, V. R. Marcy, L. R. Pinsker and R. Siman (1994). "Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain." *J Neurosci* 14(6): 3934-44.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang and A. L. Goldberg (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* 78(5): 761-71.
- Ruef, J., S. Q. Liu, C. Bode, M. Tocchi, S. Srivastava, M. S. Runge and A. Bhatnagar (2000). "Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7): 1745-52.
- Saido, T. C., S. Kawashima, E. Tani and M. Yokota (1997). "Up- and down-regulation of calpain inhibitor polypeptide, calpastatin, in postischemic hippocampus." *Neurosci Lett* 227(2): 75-8.
- Saido, T. C., H. Sorimachi and K. Suzuki (1994). "Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement." *Faseb J* 8(11): 814-22.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91.
- Saito, Y., T. C. Saido, K. Sano and S. Kawashima (1994). "The calpain-calpastatin system is regulated differently during human neuroblastoma cell differentiation to Schwannian and neuronal cells." *FEBS Lett* 353(3): 327-31.
- Sakaguchi, T., M. Okada, T. Kitamura and K. Kawasaki (1993). "Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail." *Neurosci Lett* 153(1): 65-8.
- Sakai, J., H. Ishikawa, S. Kojima, H. Satoh, S. Yamamoto and M. Kanaoka (2003). "Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis." *Proteomics* 3(7): 1318-24.
- Sandkuhler, J. and X. Liu (1998). "Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury." *Eur J Neurosci* 10(7): 2476-80.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Santella, L., K. Kyojuka, L. De Riso and E. Carafoli (1998). "Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle." *Cell Calcium* 23(2-3): 123-30.
- Sasaki, T., M. Kishi, M. Saito, T. Tanaka, N. Higuchi, E. Kominami, N. Katunuma and T. Murachi (1990). "Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins." *J Enzyme Inhib* 3(3): 195-201.
- Sawynok, J., M. R. Zarrindast, A. R. Reid and G. J. Doak (1997). "Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine." *Eur J Pharmacol* 333(1): 1-7.

- Scharf, S. J., G. T. Horn and H. A. Erlich (1986). "*Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences.*" *Science* 233(4768): 1076-8.
- Schlaepfer, W. W., C. Lee, V. M. Lee and U. J. Zimmerman (1985). "*An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis.*" *J Neurochem* 44(2): 502-9.
- Schwartz, H., T. Langin, H. Platsch, J. Richert, S. Bomm, M. Schmidt, H. Hillen, G. Blaschke, J. Meyer, H. Darius and M. Buerke (2002). "*Two-dimensional analysis of myocardial protein expression following myocardial ischemia and reperfusion in rabbits.*" *Proteomics* 2(8): 988-95.
- Seo, H. G., T. Nishinaka and C. Yabe-Nishimura (2000). "*Nitric oxide up-regulates aldose reductase expression in rat vascular smooth muscle cells: a potential role for aldose reductase in vascular remodeling.*" *Mol Pharmacol* 57(4): 709-17.
- Seufert, W., B. Futcher and S. Jentsch (1995). "*Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins.*" *Nature* 373(6509): 78-81.
- Shields, D. C., W. R. Tyor, G. E. Deibler, E. L. Hogan and N. L. Banik (1998). "*Increased calpain expression in activated glial and inflammatory cells in experimental allergic encephalomyelitis.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5768-72.
- Shoji-Kasai, Y., M. Senshu, S. Iwashita and K. Imahori (1988). "*Thiol protease-specific inhibitor E-64 arrests human epidermoid carcinoma A431 cells at mitotic metaphase.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(1): 146-50.
- Sorimachi, H., S. Ishiura and K. Suzuki (1997). "*Structure and physiological function of calpains.*" *Biochem J* 328(Pt 3): 721-32.
- Spycher, S. E., S. Tabataba-Vakili, V. B. O'Donnell, L. Palomba and A. Azzi (1997). "*Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells.*" *Faseb J* 11(2): 181-8.
- Srivastava, S., S. J. Watowich, J. M. Petrash, S. K. Srivastava and A. Bhatnagar (1999). "*Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase.*" *Biochemistry* 38(1): 42-54.
- Stys, P. K. and Q. Jiang (2002). "*Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons.*" *Neurosci Lett* 328(2): 150-4.
- Swindells, M. B. and J. P. Overington (2002). "*Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets.*" *Drug Discov Today* 7(9): 516-21.
- Tal, M., P. D. Wall and M. Devor (1999). "*Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transection in the rat.*" *Brain Res* 824(2): 218-23.
- Tegeder, I., D. Del Turco, A. Schmidtko, M. Sausbier, R. Feil, F. Hofmann, T. Deller, P. Ruth and G. Geisslinger (2004). "*Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "*Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Treier, M., L. M. Staszewski and D. Bohmann (1994). "*Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain.*" *Cell* 78(5): 787-98.

- Tsubuki, S., Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito and S. Kawashima (1996). "*Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine.*" J Biochem (Tokyo) 119(3): 572-6.
- Tsuji, T., S. Shimohama, J. Kimura and K. Shimizu (1998). "*m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains.*" Neurosci Lett 248(2): 109-12.
- Vanderklish, P. W., L. A. Krushel, B. H. Holst, J. A. Gally, K. L. Crossin and G. M. Edelman (2000). "*Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer.*" Proc Natl Acad Sci U S A 97(5): 2253-8.
- Wall, P. D. and R. Melzack (1999). "*Textbook of pain.*" Hartcourt Publishers Ltd.
- Wang, K. K. (2000). "*Calpain and caspase: can you tell the difference?*" Trends Neurosci 23(1): 20-6.
- Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed and C. C. Richardson (1968). "*Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4.*" J Biol Chem 243(17): 4543-55.
- Wendt, S., A. Dedeoglu, O. Speer, T. Wallimann, M. F. Beal and O. A. Andreassen (2002). "*Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice.*" Free Radic Biol Med 32(9): 920-6.
- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams and D. F. Hochstrasser (1996). "*From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.*" Biotechnology (N Y) 14(1): 61-5.
- Woolf, C. J. and M. Costigan (1999a). "*Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain.*" Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7723-30.
- Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999b). "*Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.*" Lancet 353(9168): 1959-64.
- Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). "*Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.*" Science 288(5472): 1765-9.
- Yabe-Nishimura, C. (1998). "*Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications.*" Pharmacol Rev 50(1): 21-33.
- Yaksh, T. L., X. Y. Hua, I. Kalcheva, N. Nozaki-Taguchi and M. Marsala (1999). "*The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input.*" Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7680-6.
- Zeindl-Eberhart, E., P. R. Jungblut, A. Otto and H. M. Rabes (1994). "*Identification of tumor-associated protein variants during rat hepatocarcinogenesis. Aldose reductase.*" J Biol Chem 269(20): 14589-94.
- Zimmermann, M. (2001). "*Pathobiology of neuropathic pain.*" Eur J Pharmacol 429(1-3): 23-37.
- Zimmermann, M. (2004). "*[Chronic pain. Epidemiology and management in Germany].*" Orthopade 33(5): 508-14.

Zimmermann, M. and T. Herdegen (1996). "*Plasticity of the nervous system at the systematic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia.*" Prog Brain Res 110: 233-59.

8 Publikationen und Tagungsbeiträge

Kunz, S., E. Niederberger, C. Ehnert, O. Coste, A. Pfenninger, J. Kruip, T. M. Wendrich, A. Schmidtko, I. Tegeder and G. Geisslinger (2004). „*The calpain inhibitor MDL 28170 prevents inflammation-induced neurofilament light chain (NFL) breakdown in the spinal cord and reduces thermal hyperalgesia.*” Pain 110(1-2): 409-418.

Kunz, S., I. Tegeder, A. Pfenninger, C. Corvey, G. Geisslinger and E. Niederberger (2004). „*Differential analysis of the rat spinal cord proteome following inflammatory versus neuropathic pain.*” (submitted).

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

Kunz, S., C. Ehnert, A. Pfenninger, J. Kruip, A. Schmidtko, I. Tegeder, G. Geisslinger and E. Niederberger. „*Inhibition of the Protease Calpain By MDL 28170 Prevents Inflammation-induced Neurofilament Light Chain (NFL) Breakdown in the Spinal Cord and Reduces Thermal Hyperalgesia*”. Proteomic Forum '03 (International Meeting on Proteome Analysis), September 14-17, 2003.

Kunz, S., C. Ehnert, A. Pfenninger, J. Kruip, A. Schmidtko, I. Tegeder, G. Geisslinger and E. Niederberger. „*Hemmung der Protease Calpain reduziert Hyperalgesie und Neurofilament-Abbau im Rückenmark und der Peripherie bei Entzündungsprozessen*“. 45. Frühjahrstagung der DGPT, März 09-11, 2004.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Susanne Kunz

Lindenstr. 34
60325 Frankfurt am Main

geboren am 31.05.1975 in Stuttgart

Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule in Stuttgart-Sillenbuch
1985 – 1994	Evangelisches Heidehof Gymnasium in Stuttgart

Hochschulausbildung

1994 – 1995	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1995 – 2000	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1999 – 2000	Praktische Ausbildung am Department of Pharmaceutics (Direktor: Prof. Dr. Derendorf) der University of Florida in Gainesville, USA
2000	Praktische Ausbildung in der Westend-Apotheke in Stuttgart (Leiter: Herr Beck)
2001	Approbation als Apothekerin
2001 – 2004	Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. Geißlinger) der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

10 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität erstellt. Herrn Prof. Dr. Dr. Geißlinger möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Steinhilber bedanke ich mich dafür, dass er die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

Besonders möchte ich Frau Dr. Niederberger für die engagierte Betreuung danken. Darüber hinaus bist Du Ellen über die Zeit eine echte Freundin geworden.

Der gesamten molekularbiologischen Arbeitsgruppe kann ich nicht genug danken für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung, die entscheidend zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Einige von Euch sind mir in dieser Zeit besonders ans Herz gewachsen. Danke auch für alles, was wir außerhalb der Arbeit zusammen erlebt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern im Tierstall und allen weiteren Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich zusammengearbeitet habe und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen „Mentoren“ Herrn Dr. Vogel, Herrn Prof. Dr. Derendorf und Herrn Prof. Dr. Doering bedanke ich mich für ihre wertvolle Unterstützung bei berufsbezogenen Fragestellungen.

Ein besonders herzlicher Dank soll an dieser Stelle an meine Eltern gehen. Euch verdanke ich so viel, viel mehr, als ich hier zusammenfassen kann.

Martin, danke für die Liebe, die wir teilen.