

Funktionen der Guanylatzyklase- Isoformen NO-GC1 und NO-GC2 bei der Schmerzverarbeitung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jonas Petersen
aus Kamen

Frankfurt am Main 2018
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtko
Prof. Dr. Rolf Marschalek

Datum der Disputation: 15.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
<hr/>	
1.1 Nozizeption	1
1.1.1 Schmerzarten	2
1.1.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung	4
1.2 Neuronale Subpopulationen im Dorsalhorn des Rückenmarks	8
1.2.1 Projektionsneurone	8
1.2.2 Interneurone	9
1.2.2.1 Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften der Interneurone	10
1.2.2.2 Neurochemische Eigenschaften der Interneurone	12
1.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen	15
1.3.1 Expression und Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthasen im nozizeptiven System	17
1.3.2 Pro- und antinozizeptive Funktionen von Stickstoffmonoxid	18
1.4 Guanylatzyklen	19
1.4.1 Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylatzyklen	22
1.4.2 Expression und Funktion der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylatzyklen im nozizeptiven System	25
1.4.3 NO-/cGMP-Signalkaskaden im nozizeptiven System	26
1.5 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden	29
<hr/>	
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits	31
2.1.3 Geräte und Instrumente	32
2.1.4 Größenstandards	34
2.1.5 Oligonukleotide	34
2.1.6 Lösungen und Puffer	35
2.1.7 Polymerasen	37
2.1.8 Antikörper	37

Inhaltsverzeichnis

2.1.9	In-situ-Hybridisierungs-Sonden	38
2.1.10	Substanzen für Entzündungsmodelle und Schmerztests	39
2.1.11	Substanzen zur Anaesthetie und Analgesie	39
2.2	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1	Real-time quantitative RT-PCR	40
2.2.1.1	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	40
2.2.1.2	Real-time quantitative RT-PCR und Quantifizierung	41
2.2.1.3	In-situ-Hybridisierung	44
2.3	Proteinbiochemische Methoden	45
2.3.1	Western Blot	45
2.3.1.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	45
2.3.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	46
2.3.1.3	Antikörper-Inkubation und Auswertung	47
2.3.2	Immunfluoreszenz-Färbung von Gefrierschnitten	48
2.3.2.1	Gewebepräparation	48
2.3.2.2	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	49
2.4	Tierexperimentelle Methoden	50
2.4.1	Versuchstiere	50
2.4.1.1	Gewebeentnahme	51
2.4.2	Genotypisierung	51
2.4.3	Rota-Rod-Test	53
2.4.4	Hot-Plate-Test	53
2.4.5	Cold-Plate-Test	54
2.4.6	Formalin-Test	54
2.4.7	Capsaicin-Test	54
2.4.8	Dynamic Plantar-Test	55
2.4.9	Hargreaves-Test	55
2.4.10	Inflammatorische Schmerzmodelle	55
2.4.11	Neuropathische Schmerzmodelle	56
2.5	Software, Statistik und graphische Darstellung	58

3 Ergebnisse	60
<hr/>	
3.1 Charakterisierung der Expression und Funktion der NO-GC1 und NO-GC2 im nozizeptiven System	60
3.1.1 Zelluläre Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 im Rückenmark	60
3.1.2 Zelluläre Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 in Spinalganglien	67
3.1.3 Basale Charakterisierung von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen	69
3.1.3.1 Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien	70
3.1.3.2 Expression der $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -mRNA	72
3.1.3.3 Motorische Koordination	73
3.1.4 Nozizeptives Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen	73
3.1.4.1 Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in Modellen für akute Schmerzen	73
3.1.4.2 Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in neuropathischen Schmerzmodellen	75
3.1.4.3 Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in Inflammatorischen Schmerzmodellen	77
3.1.4.4 Verhalten von $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Formalin-Test	79
3.1.4.5 Verhalten von $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Capsaicin-Test	80
3.2 Charakterisierung von Lbx_1-$GC\alpha_1^{-/-}$- und Lbx_1-$GC\alpha_2^{-/-}$-Mäusen	81
3.2.1 Zucht der Lbx_1 - $GC\alpha_1^{-/-}$ - und Lbx_1 - $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse	81
3.2.2 Motorische Koordination	86
3.2.3 Verhalten der Lbx_1 - $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse in einem neuropathischen Schmerzmodell	86
3.2.4 Verhalten der Lbx_1 - $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse in einem inflammatorischen Schmerzmodell	87
3.3 Expression der NO-Synthasen in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen	88
3.3.1 mRNA-Regulation der NO-Synthasen im SNI-Modell	88
3.3.2 Protein-Regulation der NO-Synthasen im SNI-Modell	89
3.3.3 mRNA-Regulation der NO-Synthasen im Zymosan-Modell	91
3.4 Expression der Proteinkinasen G in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen	92
3.4.1 mRNA-Regulation der PKG-I und PKG-II im SNI-Modell	92
3.4.2 mRNA-Regulation der PKG-I und PKG-II im Zymosan-Modell	93

4 Diskussion	95
<hr/>	
4.1 Verteilung der NO-GC Isoformen im schmerzrelevanten System	95
4.2 Einfluss des spinalen NO-GC Signalweges auf die Verarbeitung chronischer Schmerzen	99
4.3 Rolle der NO-/cGMP-Signalkaskade in der Schmerzverarbeitung	104
5 Zusammenfassung	107
6 Abkürzungsverzeichnis	108
7 Literaturverzeichnis	114
8 Wesentliche Kooperationspartner	135
<hr/>	

1 Einleitung

1.1 Nozizeption

Die Fähigkeit, Schmerz zu fühlen (Nozizeption) dient dazu, den Körper vor Gewebeschädigung zu schützen. Damit nimmt sie eine bedeutende Warn- und Schutzfunktion ein. Die Nozizeption beginnt mit einem intensiven, peripheren Reiz, der in Form von thermischen, mechanischen oder chemischen Stimuli von einer Gruppe primärafferenter Neurone, den Nozizeptoren, detektiert wird (Schmidtke et al., 2009). Aber auch eine direkte Aktivierung der Nozizeptoren durch pathogene Organismen ist möglich (z.B. *Staphylococcus aureus*) und kann Infektionsschmerzen auslösen (Chiu et al., 2016). Die Zellkörper dieser Neurone erster Ordnung liegen in den Spinalganglien (**Abb. 1.1**) und nehmen die Reize von ihren primärafferenten nozizeptiven Fasern auf, die man grundlegend in zwei Klassen unterteilen kann: die dünn-myelinisierten A δ -Fasern mit mittlerem Durchmesser und die nicht-myelinisierten C-Fasern, die einen kleinen Durchmesser aufweisen. Die A δ -Fasern vermitteln dabei eine mittlere bis schnelle Reizantwort (5-30 m/s), die C-Fasern langsame Reizantworten (0,5-2 m/s). Die C-Faser Nozizeptoren sind polymodal, das bedeutet, sie können auf thermische, mechanische und chemische Stimuli reagieren. Zudem kann man sie in peptiderge und nicht-peptiderge Subpopulationen unterteilen: Peptiderge Nozizeptoren setzen Neuropeptide wie Substanz P und *Calcitonin gene related peptide* (CGRP) frei und sind durch die Expression des Rezeptors TrkA sensitiv für den Nerv-Wachstumsfaktor (NGF), während die nicht-peptidergen Nozizeptoren den Neurotrophin-Rezeptor c-Ret exprimieren und sensitiv auf den neurotrophen Faktor der Gliazellen (GDNF) reagieren (Basbaum et al., 2009; Braz et al., 2014). Als Neuron erster Ordnung besitzen die Spinalganglien bedeutenden Einfluss in der peripheren Steuerung der Schmerzwahrnehmung. Jedoch wurde erst in jüngsten Studien die Klassifizierung sensorisch funktioneller Klassen der Nozizeptoren soweit vervollständigt, dass elf distinkte, neuronale Subpopulationen definiert werden konnten, die nun zur Assoziierung mit verschiedenen Schmerztypen genutzt werden können (Usoskin et al., 2015).

Ist die Intensität des Reizes ausreichend, so senden die primärafferenten Neurone den Schmerzreiz in Form von Aktionspotentialen in das Dorsalhorn des Rückenmarks, in dem die erste synaptische Transmission stattfindet (**Abb. 1.1**). Das Dorsalhorn des Rückenmarks wurde zytoarchitektonisch in sechs unterschiedliche Laminae eingeteilt

Einleitung

(Rexed, 1952; Todd et al., 2009). In den verschiedenen Laminae enden die sensorischen Fasern der Peripherie in klar abgegrenzten Bereichen. So enden zum Beispiel die myelinisierten A δ -Fasern in Lamina I und V, während die nicht-myelinisierten C-Fasern in Lamina I und II terminieren. Die für normale Berührungsreize zuständigen A β -Fasern projizieren vorwiegend in Lamina V (Basbaum et al., 2009; Gangadharan and Kuner, 2015; Peirs and Seal, 2016).

Im Dorsalhorn des Rückenmarks kommt es im Verlauf der Schmerzreizleitung zur Freisetzung von erregenden (exzitatorischen) und hemmenden (inhibitorischen) Neurotransmittern wie Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA), aber auch von Neuropeptiden wie Substanz P und CGRP (Julius and Basbaum, 2001; Woolf, 2004; D'Mello and Dickenson, 2008; Basbaum et al., 2009; Schmidtke et al., 2009; Wang et al., 2013; Peirs and Seal, 2016). Vom Dorsalhorn des Rückenmarks wird das Schmerzsignal in verschiedene Hirnregionen geleitet, wie zur *Formatio reticularis*, zum *Thalamus* und zum *periaquäduktalen Grau (PAG)* (Abraira and Ginty, 2013; Peirs and Seal, 2016; Todd, 2017).

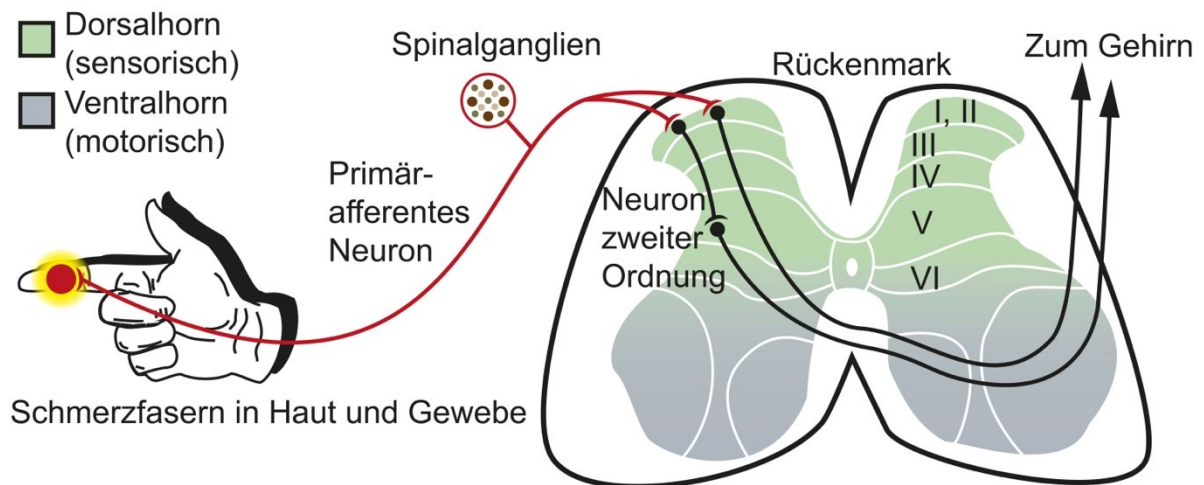


Abb. 1.1: Vereinfacht dargestellte schematische Abbildung des nozizeptiven Systems. Dargestellt sind die Transmissionswege nach Schmerzinduktion vom peripheren Neuron bis zum Gehirn.

1.1.1 Schmerzarten

Das Gefühl Schmerz ist als „unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ definiert (*International Association for the study of pain*). Dabei können Intensität, Qualität und Dauer von Schmerzen variieren (Woolf, 2004). Wie schon erwähnt, dienen Schmerzen als Warnsystem, um den Körper

vor Gewebeschädigungen zu schützen. So würde zum Beispiel bei der Berührung einer heißen Oberfläche ein schneller Rückziehreflex die Berührung beenden, um einer weiteren Gewebeschädigung vorzubeugen. Anschließend würde das betroffene Organ soweit geschont, dass die Verletzung verheilen kann. Dementsprechend lehrt der Schmerz den Menschen, Situationen und Verhaltensweisen zu umgehen, die potentiell gefährdend sind. Fehlt das System der Schmerzwahrnehmung, so ist die Lebenserwartung stark reduziert. Dieses Phänomen ist sehr selten und beispielsweise beim Menschen mit der Mutation des spannungsabhängigen Natrium-Kanals $Na_v1.7$ assoziiert, was auch in Deletionsmutanten in Mäusen reproduziert werden konnte (Cox et al., 2006; Weiss et al., 2011; Minett et al., 2012, 2015). Demgegenüber steht der chronische Schmerz, bei dem infolge von anhaltendem oder wiederkehrendem Dauerschmerz eine pathologische Veränderung im schmerzleitenden System auftritt. Durch diese Veränderung benötigt die Wahrnehmung Schmerz nicht mehr unbedingt die Stimulation der Nozizeptoren, sondern kann auch durch eine Hyperaktivität des schmerzleitenden Systems ausgelöst werden. Somit können Allodynien und Hyperalgesien auftreten, bei denen nicht-schmerzhaft Reize als schmerzhaft empfunden werden oder ein übersteigertes Schmerzempfinden auftritt (Costigan et al., 2009; Jensen and Finnerup, 2014), wodurch eine Therapie der Schmerzen unerlässlich wird. Verschiedene Studien aus den letzten Jahren haben ergeben, dass mehr als 20 % der Bevölkerung an chronischen Schmerzen leidet, was einhergeht mit einer Reduktion der Lebensqualität und einem erhöhten Suizid-Risiko (Breivik et al., 2006; Mansfield et al., 2016; Alexandre et al., 2017). Die Therapie chronischer Schmerzen ist mit den derzeit verfügbaren Therapieoptionen nur bei circa 50 % der behandelten Patienten effektiv und mit einer 50 %igen Verringerung der Schmerzintensität verbunden. Somit besteht ein hoher Bedarf an neuen, effektiven Analgetika (Finnerup et al., 2010; Basbaum and Bráz, 2016). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Schmerzverarbeitung ist eine wichtige Voraussetzung zur rationalen Entwicklung neuer Analgetika.

Pathologische Schmerzen können unter anderem in die Gruppen der inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen unterteilt werden. Deren prozentualer Anteil an dem oben genannten Auftreten chronischer Schmerzen variiert in unterschiedlichen Studien sehr stark, da die Definition der Schmerzformen meist nicht einheitlich ist (Van Hecke et al., 2014). Inflammatorische Schmerzen entstehen infolge einer Verletzung des peripheren Gewebes, die mit einer Entzündung

einhergeht, woraufhin proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet werden. Diese Mediatoren aktivieren Signalwege, die den Nozizeptor und das sensorische System sensibilisieren (Woolf and Costigan, 1999; Basbaum et al., 2009; Costigan et al., 2009). Nach der Heilung des verletzten Gewebes verschwinden inflammatorische Schmerzen in der Regel, jedoch nicht bei chronischen Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (Costigan et al., 2009). Demgegenüber entstehen neuropathische Schmerzen durch Verletzungen oder Erkrankungen von Neuronen des peripheren oder zentralen Nervensystems. Dazu gehören direkte Verletzungen der Nerven, Schlaganfälle, Virus-Infektionen, metabolische Erkrankungen, neurotoxische Chemikalien, Tumorerkrankungen und auch Chemotherapie-Behandlungen (Costigan et al., 2009; Gosselin et al., 2010; Finnerup and Attal, 2016). Die Therapie neuropathischer Schmerzen ist äußerst schwierig. Als Mittel der ersten Wahl gelten trizyklische Antidepressiva, Serotonin-/Noradrenalin-Reuptake Inhibitoren (SNRIs), Gabapentin, Pregabalin und Carbamazepin (Antikonvulsiva). Mittel zweiter und dritter Wahl sind Tramadol oder starke Opiode (Schäfers and Tölle, 2013; Finnerup et al., 2015; Finnerup and Attal, 2016).

Einige der bekannten molekularen Mechanismen der unterschiedlichen Sensibilisierungsvorgänge werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

1.1.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Aufgrund anhaltender Dauerstimulation am primärafferenten Neuron kann es zur Sensibilisierung des nozizeptiven Systems kommen. So führen die dadurch entstandenen Änderungen zu einer Modulation der Antworten auf periphere Stimuli und es entstehen Allodynien oder Hyperalgesien. Die Sensibilisierungsvorgänge können sowohl peripher am Ort der Gewebeschädigung als auch zentral im Rückenmark oder Gehirn auftreten (Woolf, 2004; Kuner, 2015). Die Sensibilisierung basiert auf strukturellen, funktionalen und chemischen Änderungen des nozizeptiven Systems.

Die periphere Sensibilisierung beschreibt die Veränderung der Eigenschaften am peripheren Nerven, die zur Reduktion des Schwellenwertes für die nozizeptive Stimulation oder zu einer verstärkten Reizantwort der Nozizeptoren führt. Den peripheren Sensibilisierungsvorgängen liegt eine Gewebeschädigung oder Entzündungsreaktion zugrunde. Die Verletzung und Schädigung der peripheren

Nerven löst eine Hyperaktivität an der betroffenen Stelle aus und kann so zur Verstärkung spontaner Feuerraten führen, die Leitfähigkeit verändern oder einen Einfluss auf die Neurotransmitter-Eigenschaften der Nervenfasern haben (Basbaum et al., 2009). Bei einer Entzündungsreaktion kommt es zur Freisetzung verschiedener Entzündungs- und Schmerzfactoren, die das umgebende Milieu am Nozizeptor verändern. Somit entsteht ein inflammatorisches Umfeld, in dem Signalmoleküle wie Neurotransmitter, Eicosanoide, Neurotrophine, Cytokine, Chemokine, extrazelluläre Proteasen und Protonen enthalten sind (Basbaum et al., 2009; Reichling et al., 2013). In den Nozizeptoren werden verschiedene Ionenkanäle exprimiert, denen eine wichtige Rolle bei der peripheren Sensibilisierung zukommt. Wichtige Beispiele sind die *transient receptor potential* (TRP-) Kanäle, wie der TRPV1- und TRPA1-Kanal, oder die spannungsabhängigen Natriumkanäle wie der Na_v1.7-, Na_v1.8- und Na_v1.9-Kanal. Zudem löst die Dauerstimulation am Nozizeptor verschiedene intrazelluläre Signalwege aus, wodurch unter anderem die Protein-Kinase C (PKC), die Protein-Kinase A (PKA), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die *extracellular-signal regulated* Kinase (ERK) und die C-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert werden. Nach der Induktion dieser Signalkaskaden kommt es zur Phosphorylierung von TRP- oder Na_v-Kanälen und somit zur Reduktion der Aktivierungsschwelle, Änderungen in der Kinetik oder einer erhöhten Integration der entsprechenden Kanäle in die Zellmembran. Zusätzlich werden vermehrt TRP-Kanäle im peripheren Nozizeptor-Terminal exprimiert, wodurch eine erhöhte Sensitivität gegenüber peripheren Stimuli entsteht (Woolf, 2004; Woolf and Ma, 2007; Reichling et al., 2013). Besonders nach der Verletzung peripherer Nerven kann es zudem zur Änderung des molekularen Charakters im Zellkörper des Nozizeptors kommen, da es infolge der axonalen Verletzung zu Veränderungen in der Transkription zahlreicher Gene kommt. Betreffen diese Veränderungen die Funktion des Nozizeptors, können sie zur Entstehung von neuropathischen Schmerzen beitragen. (Woolf and Ma, 2007).

Die zentrale Sensibilisierung wird durch verschiedene Prozesse vermittelt, wie z.B. NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Aktivierung, Veränderung der Transkription, Disinhibition und Glia-Neuron-Interaktion (Basbaum et al., 2009; Latremoliere and Woolf, 2009; Woolf, 2011; Kuner and Flor, 2016). Einige der bekannten Signalkaskaden sind exemplarisch in **Abb. 1.2** dargestellt. Ältere Studien haben auch einen Einfluss der strukturellen Reorganisation des nozizeptiven Systems an der zentralen Sensibilisierung beschrieben. So wurde beschrieben, dass im Verlaufe einer

peripheren Nervenverletzung die Projektionsfläche der A β -Fasern im Dorsalhorn des Rückenmarks umstrukturiert wird, so dass diese auch in die oberen Laminae des Dorsalhorns projizieren und damit auch zur Transmission schmerzhafter Reize beitragen (Woolf, 2004). In weiteren Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht unterstützt werden, so dass die strukturelle Reorganisation wahrscheinlich keinen Einfluss auf die zentrale Sensibilisierung hat (Hughes et al., 2003; Woodbury et al., 2008).

Der Mechanismus der NMDA-Rezeptor-Sensibilisierung im Rückenmark ist aufgrund der Ähnlichkeit zur Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus gut verstanden. Das Schmerzsignal wird hierbei auf Projektions- und Interneurone im Dorsalhorn übertragen, indem verschiedene Transmitter (z.B. Glutamat und Substanz P) ausgeschüttet und nachfolgend exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) über Glutamat- und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren induziert werden. Der inaktive NMDA-Rezeptor wird im weiteren Verlauf durch, am primärafferenten Neuron ausgeschüttete, Transmitter aktiviert und es kommt zum verstärkten Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle (Latremoliere and Woolf, 2009; Kuner, 2015). Im weiteren Verlauf werden sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert und die Aktivität dieser Rezeptoren wird gesteigert, wodurch sie schon bei geringer, normalerweise nicht ausreichender, peripherer Stimulation aktiviert werden (Scholz and Woolf, 2002; Latremoliere and Woolf, 2009). Auch verschiedene Proteinkinasen werden induziert und die Genexpression von z.B. *c-Fos*, *Cox-2*, *NK-1* oder *TrkB* wird verändert, was langfristig zur Modulation der Schmerzverarbeitung führen kann (Latremoliere and Woolf, 2009) (**Abb. 1.2 A**).

Die Hemmung inhibitorischer nozizeptiver Signale, die auch als Disinhibition bezeichnet wird, ist ein weiterer wichtiger zentraler Sensibilisierungsvorgang. Wie in **Abb. 1.2 B** dargestellt ist, kommt es dabei zu einer verstärkten Antwort des nozizeptiven Systems durch die Hemmung GABAerger und glycinerger, inhibitorischer Interneurone, die sehr dicht in den oberen Laminae im Dorsalhorns des Rückenmarks lokalisiert sind. Nach einer peripheren Nervenverletzung kommt es zur Reduktion inhibitorischer, postsynaptischer Potentiale in diesen Bereichen, wobei unter anderem der K⁺/Cl⁻-Ko-Transporter KCC2 eine zentrale Rolle einnimmt. Durch die geringere Expression des Transporters wird der Cl⁻-Gradient verändert und die Aktivierung der GABA-Rezeptoren führt nicht mehr zur Hyperpolarisation. Das Prostaglandin E2

(PGE2) induziert zusätzlich einen cAMP-PKA Signalweg, der zur Phosphorylierung des Glycin-Rezeptors Alpha 3 (GlyR α 3) führt, so dass dieser nicht mehr durch Glycin aktiviert werden kann (Woolf, 2004; Zeilhofer, 2005; Basbaum et al., 2009; Kim et al., 2012).

A Primär afferentes Neuron **B** Inhibitorisches Interneuron **C** Aktivierte Mikroglia

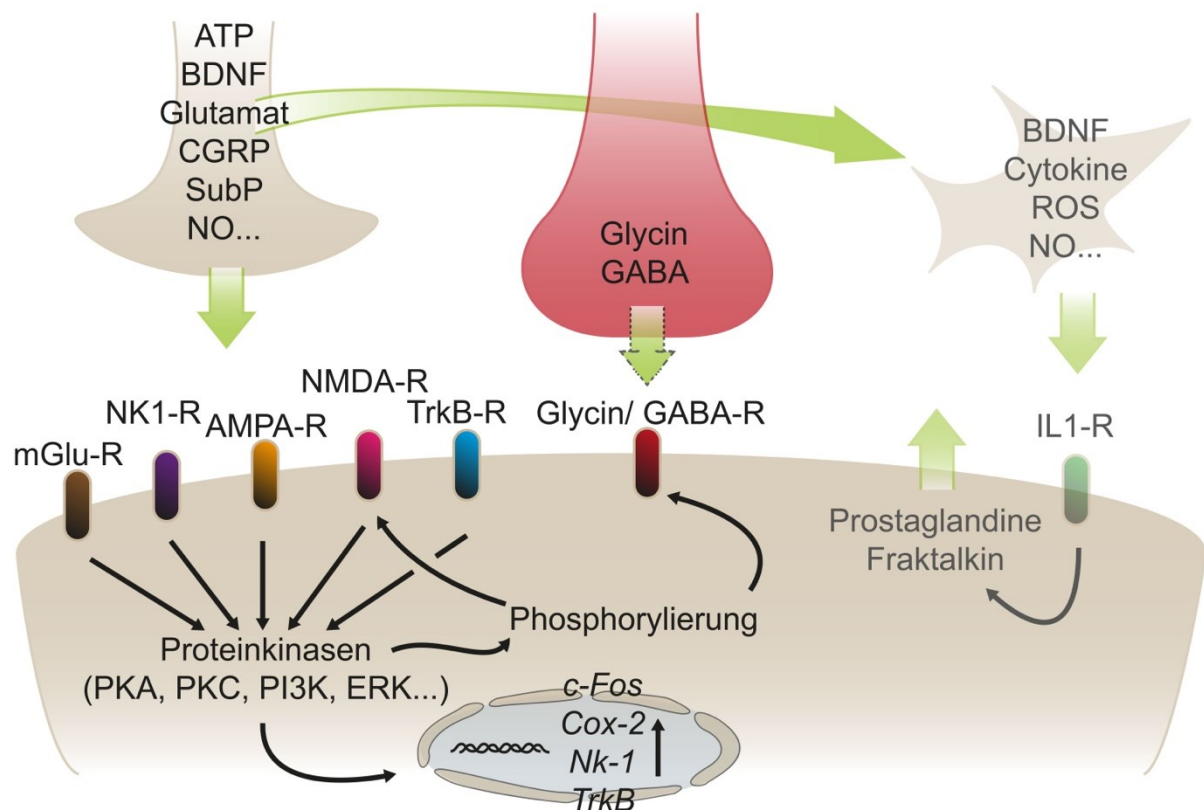


Abb. 1.2: Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung im Dorsalhorn des Rückenmarks. In **A** ist die Sensibilisierung nach Aktivierung der primär afferenten Neurone abgebildet. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade kommt es zur verstärkten Ausschüttung von Signalmolekülen an der ersten nozizeptiven Synapse, die nachfolgend an ihre Rezeptoren binden und diverse Proteinkinasen aktivieren. Dadurch wird zum einen die Transkription schmerzrelevanter Gene induziert, aber es kommt auch zur Phosphorylierung von Neurotransmitter-Rezeptoren und somit zur Veränderung der Sensitivität. In **B** ist die Disinhibition dargestellt, in deren Verlauf die inhibitorischen Interneurone bzw. deren Rezeptoren gehemmt werden, so dass die normale inhibitorische Modulation der nozizeptiven Signalwege zu den Projektionsneuronen abgeschwächt wird. Es kommt also zur Hemmung der hemmenden Signale. In **C** ist die Aktivierung der Gliazellen im nozizeptiven System dargestellt. Die Aktivierung der Gliazellen erfolgt durch verschiedene Signalmoleküle aus den primär afferenten Neuronen und aus den Projektionsneuronen und führt zur Freisetzung verschiedener Signalmoleküle aus den Gliazellen, die zur verstärkten nozizeptiven Antwort beitragen. Abkürzungen: AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure, ATP: Adenosin-Triphosphat, BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, CGRP: *Calcitonin Gene-Related Peptide*, GABA-R: γ -Aminobuttersäure-Rezeptor, IL1-R: Interleukin-1-Rezeptor, mGlu-R: Metabotrope Glutamatrezeptoren, NK1-R: Neurokinin-1-Rezeptor, NMDA-R: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, NO: Stickstoffmonoxid, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, SubP: Substanz P, TrkB-R: Tropomyosin-Receptor-Kinase-B.

Bei der Glia-Neuron-Interaktion kommt es nach peripherer Nervenverletzung zur Aktivierung und Akkumulation von Mikroglia in den oberen Laminae des Dorsalhorns sowie im Ventralhorn. Dieser Vorgang wird unter anderem durch den Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 gesteuert, der nach Nervenläsion durch neuronales Fraktalkin aktiviert und verstärkt in der Mikroglia exprimiert wird (Verge et al., 2004; Lindia et al., 2005; Mika et al., 2013). Die Aktivierung der Mikroglia induziert verschiedene Mitogen-induzierte Proteinkinasen (MAPK), die zur Synthese proinflammatorischer Mediatoren beitragen (Ji et al., 2009; Gosselin et al., 2010; Mika et al., 2013). Im weiteren Verlauf werden dann unterschiedliche Signalmoleküle ausgeschüttet, die neuronale Funktionen modulieren und zentrale Sensibilisierungsprozesse verstärken (**Abb. 1.2 C**) (Watkins et al., 2001; Basbaum et al., 2009). Daher trägt auch dieser Signalweg zur Schmerzsensibilisierung bei (Milligan et al., 2004; Mika et al., 2013).

Immer größere Bedeutung bei der Interpretation von Signalprozessen im neuronalen Gewebe nehmen die neuronalen Subpopulationen ein, da sowohl die Kommunikation zwischen den Neuronen als auch die Projektion der Signale in höhere Zentren die Signalkaskaden modulieren können. Aus diesem Grund wird im nächsten Kapitel die aktuelle Klassifizierung genauer betrachtet.

1.2 Neuronale Subpopulationen im Dorsalhorn des Rückenmarks

Die Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks können in zwei Klassen unterteilt werden: Neurone, deren Axone in die Gehirnzentren projizieren (Projektionsneurone) und Neurone, deren Axone im Rückenmark verschalten (Interneurone) (Todd, 2017).

1.2.1 Projektionsneurone

Die Projektionsneurone machen nicht mehr als 5 % der Gesamtneurone im Dorsalhorn aus, sind größtenteils schmerz- und temperaturrelevant und konnten in Lamina I und verstreut in Lamina III-VI lokalisiert werden (Abraira and Ginty, 2013; Polgár et al., 2013a). Diese Projektionsneurone gehören zum anterolateralen Trakt und leiten ihre Signale kontralateral durch die anterolaterale weiße Substanz zu dem postsynaptisch gelegenen anterolateralen System, zu dem der *Thalamus*, das periaquäduktale Grau, der laterale Parabrachialbereich und verschiedene Teile der *Formatio reticularis* gehören (McMahon and Wall, 1985; Al-Khater and Todd, 2009; Polgár et al., 2010b; Abraira and Ginty, 2013; Todd, 2017). Die Projektionsneurone sind glutamaterg

(exzitatorisch) und tragen aufgrund von Axonverzweigungen im Rückenmark zu den lokalen, exzitatorischen, synaptischen Kreisläufen bei (Szucs et al., 2010; Cameron et al., 2015; Todd, 2017). Insgesamt exprimieren ca. 80 % der Projektionsneurone den Substanz P-Rezeptor NK1 (NK1R, *Tacr1*) (Spike et al., 2003; Polgár et al., 2010a). Beachtet man, dass in Lamina I im Dorsalhorn des Rückenmarks der Maus ca. 20 % aller Neurone NK1R-positiv sind, wird der Rezeptor aber auch in einer Population von NK1R-positiven Interneuronen exprimiert (Polgár et al., 2013a).

1.2.2 Interneurone

Der Großteil der Neurone in Lamina I-III des Dorsalorns wird von Interneuronen gebildet. In Lamina II sind nur Interneurone lokalisiert, in Lamina I sind mehr als 90 % der Neurone Interneurone (Bice and Beal, 1997; Spike et al., 2003; Todd, 2017). Die Interneurone in Lamina I und II wurden in den letzten Jahren sehr gut erforscht, da sie essentiell für die Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur und Juckreiz sind (Abraira and Ginty, 2013). Den Anteil der Interneurone in Lamina III-V zu bestimmen stellt bisher immer noch eine große Herausforderung dar, da hier Projektionsneurone lokalisiert sind, die zu unterschiedlichen sensorischen Bahnen gehören. Es wird aber angenommen, dass der Großteil der Neurone in den tieferen Laminae auch Interneurone sind, die z.B. zu sensorischen Bahnen der Bewegungsabläufe gehören oder nicht-schmerzhaft Berührungsinformationen steuern (Abraira and Ginty, 2013; Todd, 2017).

Generell kann man die Interneurone in zwei große funktionelle Klassen teilen: Inhibitorische Zellen, die hemmende Wirkung in Signalkaskaden haben und exzitatorische, also erregende Zellen. Die Population der inhibitorischen Interneurone kann aufgrund ihrer primären Neurotransmitter GABA und/oder Glycin von den glutamatergen exzitatorischen Interneuronen abgegrenzt werden, wobei alle Glycin-positiven Zellen auch immer GABA-positiv sind (Todd and Sullivan, 1990; Abraira and Ginty, 2013; Todd, 2017). Im Dorsalhorn des Rückenmarks der Maus sind ca. 26 % der Neurone in Lamina I-II und ungefähr 38 % der Neurone in Lamina III inhibitorische Interneurone. Das lässt wiederum den Rückschluss zu, dass mehr als 70 % der Neurone in Lamina I-II und mehr als 60 % der Neurone in Lamina III glutamaterg sind, wobei bisher nicht zwischen Projektions- und Interneuronen unterschieden wurde (Yasaka et al., 2010; Polgár et al., 2013a; Peirs and Seal, 2016; Todd, 2017). Die

vesikulären Transporter der Neurotransmitter VGAT und VGLUT sowie das GABA-synthetisierende Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD) und der neuronale Glycin-Transporter GlyT2 werden häufig als Marker für exzitatorische bzw. inhibitorische Interneurone verwendet (Zeilhofer et al., 2012). Zudem haben die unterschiedlichen Subpopulationen der Interneurone definierte Transkriptionsfaktoren, die bestimmen, welchen neuronalen Phänotyp die Zelle entwickelt. So exprimieren inhibitorische Interneurone den Transkriptionsfaktor Pax2 und exzitatorische Interneurone den Transkriptionsfaktor Lmx1b, die immunhistochemisch sichtbar gemacht werden können (Cheng et al., 2005; Todd, 2017).

Da sowohl die inhibitorischen als auch die exzitatorischen Populationen unterschiedliche funktionelle Subgruppen beinhalten, besteht ein großes Interesse, die Neuronen zu klassifizieren, was z.B. aufgrund ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und auch ihrer neurochemischen Eigenschaften durchgeführt wird (Abraira and Ginty, 2013; Todd, 2017). In den nachfolgenden Kapiteln werden die Charakteristika der jeweiligen Subpopulation der Interneurone skizziert.

1.2.2.1 Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften der Interneurone

Wie auch in anderen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) hat sich die Bestimmung der neuronalen Morphologie als geeignetes Mittel erwiesen, um funktionelle Gruppen von Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks zu definieren (Ascoli et al., 2008; Todd, 2017). Um die Subtypen noch distinkter einzugrenzen, haben neuere Studien den Fokus auf die Korrelation der Morphologie, der genutzten Neurotransmitter und der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen gelegt (Schneider, 1992; Grudt and Perl, 2002; Prescott and De Koninck, 2002; Lu and Perl, 2003, 2005; Heinke et al., 2004; Yasaka et al., 2007, 2010; Maxwell et al., 2007; Melnick, 2008; Abe et al., 2009; Wang and Zylka, 2009; Zheng et al., 2010; Punnakkal et al., 2014). Die beste Charakterisierung aufgrund der Zellmorphologie wurde in Studien für Interneurone in Lamina II durchgeführt und beschreibt vier Hauptklassen von Interneuronen (Grudt and Perl, 2002; Todd, 2017). Inselzellen in Lamina II des Dorsalorns besitzen dendritische Verzweigungen, die langgezogen entlang der rostrocaudalen Achse lokalisiert sind, wobei die Axone in Lamina II verlaufen und nur selten in den angrenzenden Laminae enden. Dies gilt auch für die

Zentralzellen, die den Inselzellen ähneln, jedoch deutlich kleinere dendritische Äste aufweisen, und die Radialzellen, deren relativ kurze Dendriten sich entlang der rostrocaudalen und dorsoventralen Achse erstrecken. Die vierte neuronale Klasse ist die der Vertikalzellen, welche meist in der äußeren Lamina II (II_o) liegen und deren Dendriten sich kugelförmig, ventral des Zellkörpers, ausdehnen. Diese Neurone besitzen Axone, die sich in Lamina I erstrecken und Projektionsneurone des anterolateralen Trakts innervieren können (Lu and Perl, 2005). Inselzellen und einige Vertikalzellen weisen eine tonische Feuerrate, Radialzellen und einige Vertikalzellen eine Verzögerung vor dem ersten Aktionspotential auf. Auch werden die vier Klassen in unterschiedlichem Maße von den primärafferenten Fasern innerviert, erhalten in unterschiedlichem Maße primärafferente inhibitorische Signale und sind unterschiedlich involviert in der Verschaltung synaptischer Kreisläufe (Grudt and Perl, 2002; Lu and Perl, 2003, 2005; Yasaka et al., 2007; Zheng et al., 2010; Todd, 2017). Auch wenn die hier beschriebenen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften zur Klassifizierung des Großteils der Interneurone in Lamina I-III genutzt wurden, konnten 25 % der Neurone nicht in das Schema sortiert werden. In keiner Studie gelang bisher eine flächendeckende Klassifizierung (Grudt and Perl, 2002; Todd, 2010).

Zur weiteren Charakterisierung der beschriebenen Zellklassen wurde in weiteren Studien analysiert, ob die vier Klassen inhibitorischen oder exzitatorischen Populationen zugeordnet werden können. Dazu wurden die morphologischen Studien mit elektrophysiologischen Analysen kombiniert, indem der Transmitterphänotyp bestimmt wurde. Zusammengefasst beschreiben diese Studien, dass Inselzellen zur inhibitorischen und der Großteil der Vertikalen-Zellen zur exzitatorischen Population gehören, wobei auch einige Vertikalzellen inhibitorisch sind (Gobel, 1978; Lu and Perl, 2003, 2005; Heinke et al., 2004; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010; Zheng et al., 2010; Punnakkal et al., 2014). Radialzellen wurden ausschließlich in exzitatorischen Populationen lokalisiert (Todd, 2017) und Zentralzellen sind inhibitorisch und exzitatorisch (Lu and Perl, 2003, 2005; Hantman et al., 2004; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010; Zheng et al., 2010; Punnakkal et al., 2014).

In Lamina I und III ist die Klassifizierung der Interneurone sehr unvollständig. Neue Studien konnten drei morphologische Klassen identifizieren: spindelförmige Zellen, abgeflachte Zellen und multipolare Zellen (Szucs et al., 2013; Fernandes et al., 2016). Die Dendriten der spindelförmigen und abgeflachten Zellen sind großteils in Lamina I

lokalisiert, während die Dendriten der multipolaren Zellen bis in Lamina II und III reichen. Einige Zellen konnten als inhibitorisch klassifiziert werden, allerdings gehörten diese zu mehreren morphologischen Klassen, womit der Zusammenhang zwischen Morphologie und funktioneller Gruppe bisher nicht aufgezeigt werden konnte (Todd, 2017). Zusammengefasst zeigen diese Studien gemeinsam auf, dass die Morphologie und die elektrophysiologischen Eigenschaften nicht fehlerfrei zwischen verschiedenen neuronalen Klassen differenzieren können.

1.2.2.2 Neurochemische Eigenschaften der Interneurone

Ein modernerer Versuch zur Klassifizierung der Interneurone bedient sich der bildlichen Darstellung der großen Menge verschiedener neurochemischer Marker, die im Dorsalhorn des Rückenmarks exprimiert werden, darunter Neuropeptide und deren Rezeptoren, Calcium-bindende Proteine und eine Vielzahl an Enzymen. Die verschiedenen Marker zeigen eine spezifische Verteilung in den Laminae des Dorsalorns und in inhibitorischen und exzitatorischen Interneuronen. Allerdings wird die Klassifizierung dadurch erschwert, dass viele der Marker auch in primärafferenten Neuronen exprimiert werden (Todd and Spike, 1993; Todd, 2017). Verschiedene Studien konnten in den letzten Jahren aufzeigen, dass z.B. Neuropeptid Y (NPY), Galanin und Nozizeptin in inhibitorischen und Somatostatin, Neurotensin, GRP (*Gastrin-Releasing-Peptide*), Neurokinin B (NKB), Substanz P und Cholezystokinin in exzitatorischen Interneuronen exprimiert werden (Proudlock et al., 1993; Rowan et al., 1993; Todd et al., 2003, 1994; Simmons et al., 1995; Polgár et al., 2006; Bröhl et al., 2008; Xu et al., 2008, 2013; Huang et al., 2008; Sardella et al., 2011a; Duan et al., 2014; Gutierrez-Mecinas et al., 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die laminaere Verteilung der Marker unterscheidet. So werden Galanin und Substanz P in Zellen der Lamina I und Lamina II_o exprimiert, Neurotensin und NKB konnte auf beiden Seiten der Grenze zwischen Lamina II/III detektiert werden. Somatostatin wird von Neuronen in Lamina I-II und NPY wird in Zellen der Lamina I-III exprimiert (Todd and Spike, 1993; Todd, 2010).

Die Rezeptoren der Neuropeptide im Dorsalhorn des Rückenmarks zeigen ebenso eine spezifische Verteilung in Interneuronen und den Laminae. So ist z.B. der Somatostatin-Rezeptor 2a (ssr_{2A}) in der Hälfte der inhibitorischen Interneurone in Lamina I-II exprimiert (Todd et al., 1998; Polgár et al., 2013a). Der Substanz P-

Rezeptor NK1-R wird, wie oben bereits erwähnt, in Projektionsneuronen in Lamina I, aber auch wie der NPY-Y1-Rezeptor, der in Lamina I-II lokalisiert ist, in exzitatorischen Interneuronen exprimiert (Zhang et al., 1994, 1999; Brumovsky et al., 2006; Cameron et al., 2015). Der Rezeptor für GRP (GRP-R) wird in exzitatorischen Neuronen in Lamina I-II_o exprimiert, und hat eine besondere Rolle in der Transmission von Juckreiz (Sun and Chen, 2007; Sun et al., 2009b; Xu et al., 2013).

Für Calcium-bindende Proteine und weitere Enzyme konnte ebenso eine spezifische Verteilung in verschiedenen Interneuronen gezeigt werden. So ist Parvalbumin in inhibitorischen Neuronen der inneren Lamina II (II_i) und in Lamina III und Calbindin sowie Calretinin in exzitatorischen Interneuronen der Lamina I-II exprimiert (Yamamoto et al., 1989; Antal et al., 1990, 1991; Ren et al., 1993; Laing et al., 1994). Calretinin wird allerdings auch in 12 % inhibitorischer Zellen exprimiert (Antal et al., 1990, 1991; Smith et al., 2015). Eine exzitatorische neuronale Population mit einer sehr distinkten Expression in Lamina II_i und III bilden die Zellen, die positiv für die Gamma-Isoform der Protein-Kinase-C (PKC- γ) sind (Mori et al., 1990; Malmberg et al., 1997; Polgár et al., 1999; Zylka et al., 2005). Einige Studien konnten diesen Zellen großen Einfluss in der Ausbildung taktiler Allodynien zuweisen (Malmberg et al., 1997; Miraucourt et al., 2007, 2009; Lu et al., 2013). Die neuronale Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthasen (nNOS/NOS-1) wird verteilt im gesamten Dorsalhorn exprimiert, wobei der Großteil der NOS-1-positiven Neurone konzentriert im Bereich der Lamina II_i-III des Dorsalhorns liegt (Valtschanoff et al., 1992b, 1992a; Spike et al., 1993; Ruscheweyh et al., 2006; Sardella et al., 2011b; Todd, 2017). Der Großteil der NOS-1-Expression konnte in einer Subpopulation von GABAergen, inhibitorischen Interneuronen lokalisiert werden, die große Projektionsneurone in Lamina I des Dorsalhorns innervieren (Puskár et al., 2001).

Diese Studien zeigen zusammen, dass viele neurochemische Marker zur Klassifizierung der Interneurone in Lamina I-III genutzt werden könnten. Allerdings ist unklar, ob die so klassifizierten Interneurone dann wirklich eine separierte und funktionelle Gruppe darstellen (Todd, 2017). Daher wurde versucht, nicht-überlappende Populationen der inhibitorischen und exzitatorischen Interneurone zu identifizieren (Todd, 2017). Wie in **Abb. 1.3** dargestellt ist, wurden im Dorsalhorn des Rückenmarks der Ratte vier nicht-überlappende inhibitorische Populationen nachgewiesen, die positiv für NPY, Galanin, NOS-1 und Parvalbumin sind (Tiong et al., 2011; Polgár et al., 2013b). Diese vier Populationen repräsentieren die Hälfte der

inhibitorischen Interneurone in Lamina I-II (Sardella et al., 2011b). In der Maus ist die Expression dieser vier Klassen inhibitorischer Interneurone vergleichbar verteilt, auch wenn die NOS-1-positiven Neurone in geringem Maße mit Galanin und NPY überlappen (Laing et al., 1994; Tiong et al., 2011; Iwagaki et al., 2013; Polgár et al., 2013b; Chiang et al., 2015).

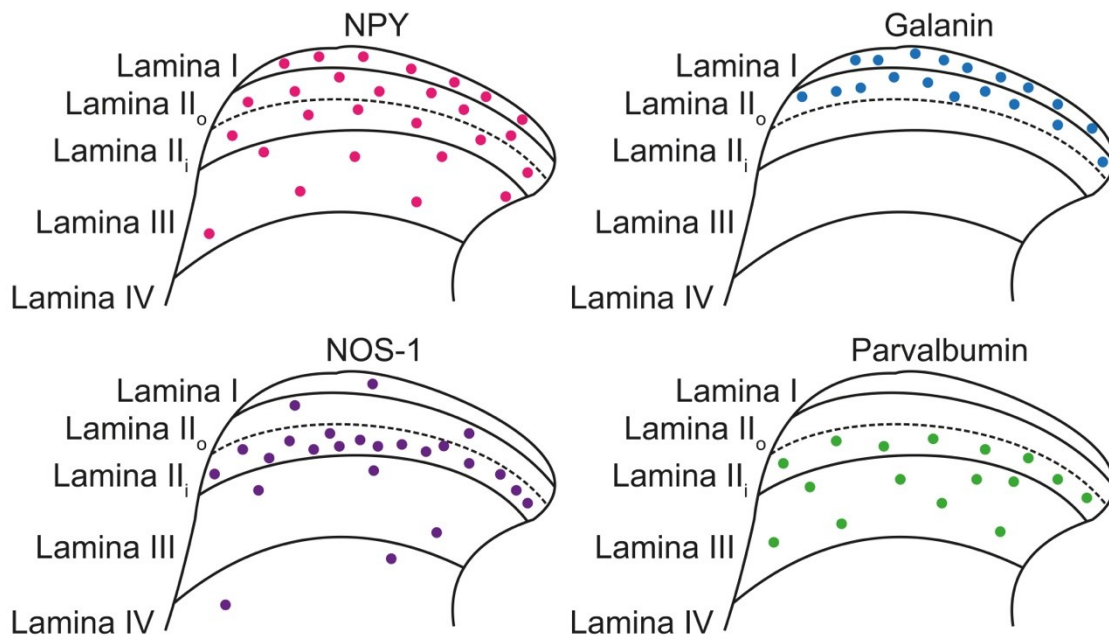


Abb. 1.3: Schematische Verteilung der vier nicht-überlappenden inhibitorischen Populationen im Rückenmark. NPY wird von Zellen in Lamina I-III exprimiert, Galanin in Zellen der Lamina I-II_o, NOS-1 liegt verteilt im gesamten Dorsalhorn vor mit einer Fokussierung auf Lamina II_i und Parvalbumin wird in Lamina II_i und Lamina III exprimiert.

Auch für die exzitatorischen Interneurone wurden vier nicht-überlappende Populationen im Dorsalhorn des Rückenmarks der Maus identifiziert. Wie in **Abb. 1.4** dargestellt ist, werden Substanz P, Neurotensin, GRP und NKB in separaten Populationen exprimiert (Todd, 2017). Diese vier Populationen repräsentieren ca. die Hälfte aller exzitatorischen Interneurone und sind unterschiedlich in den Laminae I-III exprimiert (Gutierrez-Mecinas et al., 2016).

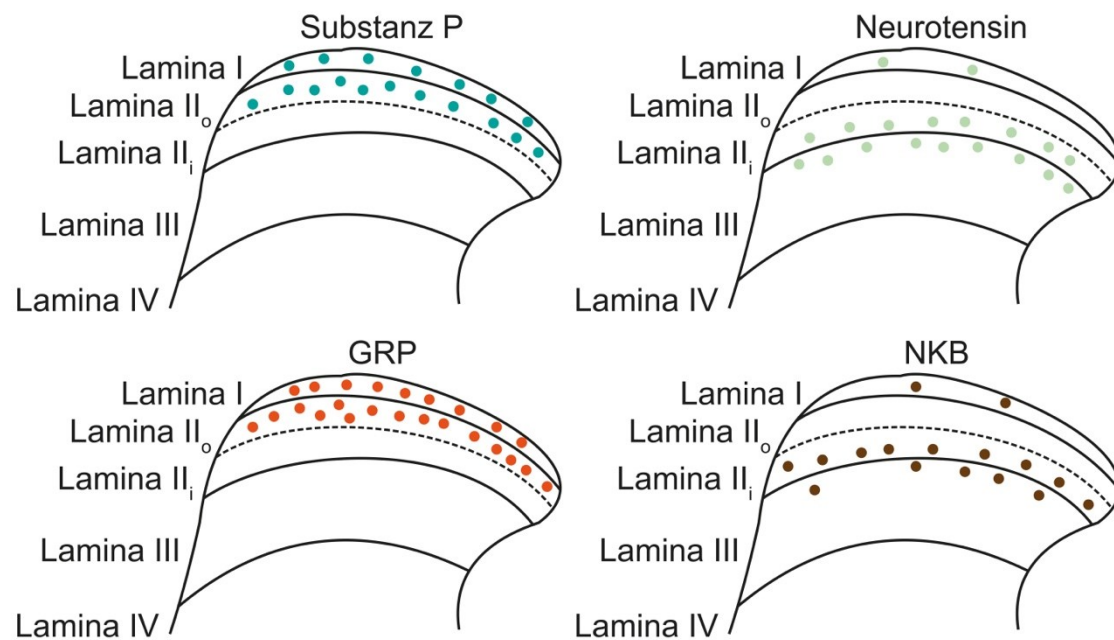


Abb. 1.4: Schematische Verteilung der vier nicht-überlappenden exzitatorischen Interneurone. Substanz P wird in Lamina I und II_o exprimiert, Neurotensin und NKB an der Grenze zwischen Lamina II und III und die GRP Expression ist sehr stark beschränkt auf Lamina I und II_o.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es theoretisch möglich ist, definierte funktionelle Gruppen der Interneurone zu separieren, dabei jedoch Vorsicht geboten ist, da es teilweise zur Überlappung der Marker zwischen verschiedenen Gruppen kommt und die transiente Expression der Gene, die hier nicht zusätzlich betrachtet wurde, auch beachtet werden muss (Todd, 2017).

1.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen

Wie bereits erwähnt, bilden die NOS-1-positiven Neurone eine distinkte Klasse der inhibitorischen Interneurone. In diesem Kapitel werden die bekannten Effekte der NO-Produktion dargestellt. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Molekül, das viele physiologische und pathophysiologische Vorgänge reguliert (Francis et al., 2010; Pan et al., 2013). NO hat eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden und kann ungehindert die Zellmembran passieren. Da NO ein Gas ist, kann es nicht in Vesikeln gespeichert und nachfolgend sezerniert werden, so dass die Signal-Funktion primär von der Expression und Aktivität der NO-Synthasen (NOS) abhängig ist. Drei unterschiedliche NOS-Isoformen konnten identifiziert werden, die durch drei unterschiedliche Gene kodiert werden. Historisch wurden diese drei Isoformen als neuronale NOS (nNOS oder NOS-1), induzierbare NOS (iNOS oder NOS-2) und endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3) klassifiziert. NOS-1 und NOS-3 werden konstitutiv exprimiert, NOS-2 wird

im Verlaufe einer Entzündungsreaktion induziert. Wie in **Abb. 1.5** links dargestellt ist, werden NOS-1 und NOS-3 durch Ca^{2+} -Influx und Ca^{2+} /Calmodulin Bindung stimuliert. Die Aktivität der NOS-2 ist nicht abhängig von intrazellulärem Calcium. NO wird von NOS aus dem Vorläufer-Molekül L-Arginin gebildet, wobei noch L-Citrullin entsteht. Die Aktivität der NOS selbst ist abhängig von verschiedenen Mechanismen, so z.B. der Phosphorylierung, Nitrosylierung, Proteininteraktion, Kofaktor/Substrat-Verfügbarkeit oder auch Veränderungen in der Transkription (Bian et al., 2006; Francis et al., 2010). Die Effekte von NO werden durch verschiedene molekulare Mechanismen erzielt, so z.B. durch Bildung von cyclischem Guanosin-Monophosphat (cGMP), Nitrosylierung von Ionen-Kanälen, ADP-Ribosylierung und Bildung von Peroxynitrit (Bian et al., 2006).

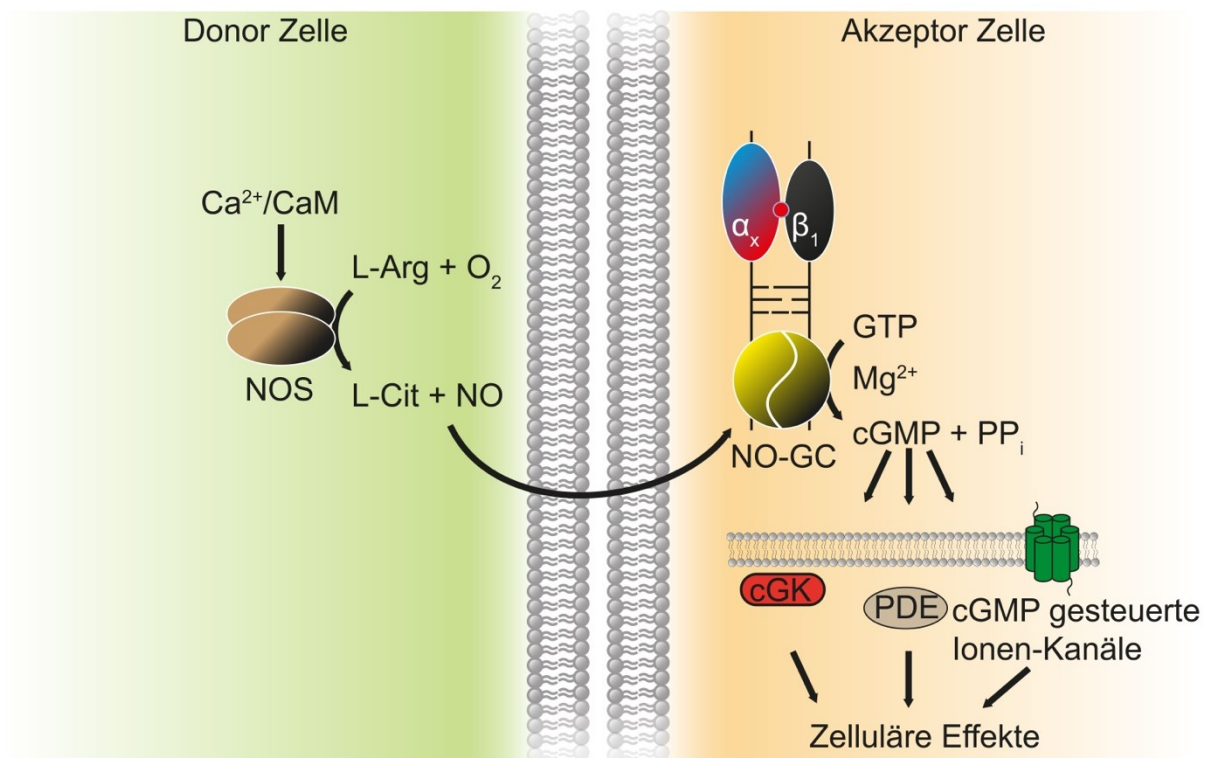


Abb. 1.5: Stimulation der NO-GC durch Stickstoffmonoxid (NO). In der Zelle die NO produziert stimulieren Calcium (Ca^{2+}) und Calmodulin (CaM) die NO-Synthasen und L-Arginin wird mit Sauerstoff (O_2) zu NO und L-Citrullin umgesetzt. NO ist gut membrangängig und kann in benachbarte Zellen diffundieren. Hier aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase (NO-GC) durch Bindung an die Häm-Gruppe der $\text{GC}\beta_1$ -Untereinheit, woraufhin cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet wird. Das produzierte cGMP kann dann nachfolgend mit cGMP gesteuerten Ionenkanälen (CNG)-Kanälen, Phosphodiesterasen (PDEs) oder cGMP abhängigen Proteinkinasen (cGKs) interagieren, wodurch verschiedene zelluläre Effekte erzielt werden.

1.3.1 Expression und Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthasen im nozizeptiven System

Viele Studien konnten zeigen, dass im Dorsalhorn des Rückenmarks NOS-1 primär für die NO-Produktion in schmerzrelevanten Prozessen zuständig ist. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, wird NOS-1 basal in wenigen Neuronen in Lamina I-III exprimiert (4-18 %) (Valtschanoff et al., 1992a; Dun et al., 1993; Zhang et al., 1993; Spike et al., 1993; Herdegen et al., 1994; Laing et al., 1994; Saito et al., 1994; Bernardi et al., 1995; Ruscheweyh et al., 2006; Sardella et al., 2011b; Gassner et al., 2013; Todd, 2017). In Spinalganglien wird NOS-1 in weniger als 5 % der primärafferenten Neurone exprimiert (Aimi et al., 1991; Valtschanoff et al., 1992a; Zhang et al., 1993; Henrich et al., 2002; Ruscheweyh et al., 2006). Im Verlaufe persistierender Schmerzprozesse wird NOS-1 im Dorsalhorn des Rückenmarks, aber auch in den DRGs hochreguliert. In unterschiedlichen Studien an Ratten und Mäusen konnte nach Injektion proinflammatorischer Substanzen (Zymosan, Formalin oder CFA) in eine Hinterpfote gezeigt werden, dass die Anzahl NOS-1-positiver Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks ansteigt (Herdegen et al., 1994; Yonehara et al., 1997; Maihöfner et al., 2000; Chu et al., 2005). Außerdem wurde beschrieben, dass nach peripherer Nervenverletzung die Anzahl NOS-1-positiver DRG-Neurone ansteigt und die NOS-1-Expression im Bereich der zentralen Endigungen im Dorsalhorn zunimmt (Zhang et al., 1993; Luo et al., 1999; Guan et al., 2007; Martucci et al., 2008). Des Weiteren hat der NO-/cGMP-Signalweg neuroprotektiven Einfluss in DRG-Neuronen (Thippeswamy et al., 2005).

Im Vergleich zur NOS-1 wird die NOS-2 basal nur sehr schwach in DRGs und im Dorsalhorn des Rückenmarks exprimiert (Wu et al., 1998; Maihöfner et al., 2000; Henrich et al., 2002; Keilhoff et al., 2002; Chu et al., 2005; Ruscheweyh et al., 2006; Tang et al., 2007; Martucci et al., 2008). Der Einfluss der NOS-2 auf die Signalkaskaden im Schmerzprozess wird nicht einheitlich und teilweise widersprüchlich beurteilt. So wurde in einigen Studien berichtet, dass NOS-2 im Dorsalhorn des Rückenmarks im Verlaufe von Entzündungsprozessen oder bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen induziert wird (Gühring et al., 2000; Tao et al., 2003; Martucci et al., 2008; Hervera et al., 2012). In anderen Studien konnte jedoch keine Induktion der NOS-2 im Schmerzprozess beobachtet werden (Keilhoff et al., 2002; Chu et al., 2005; De Alba et al., 2006; Guan et al., 2007). Zudem konnte bisher die zelluläre Lokalisation der NOS-2 im Dorsalhorn des Rückenmarks nicht aufgeklärt

werden. Für NOS-3 konnte gezeigt werden, dass sie konstant im Endothel des Rückenmarks und der DRGs exprimiert und im Verlaufe von Schmerzprozessen nicht reguliert wird (Keilhoff et al., 2002; Chu et al., 2005; Guan et al., 2007).

1.3.2 Pro- und antinozizeptive Funktionen von Stickstoffmonoxid

Die ersten Hinweise, dass NO einen Einfluss auf die Schmerzverarbeitung hat, wurden durch den Einsatz von unspezifischen NOS-Inhibitoren wie L-NAME und L-NMMA, die alle drei NOS-Isoformen inhibieren, gewonnen. Nach der intrathekalen Applikation (i.t.) der NOS-Inhibitoren konnte eine Hemmung des Schmerzverhaltens in unterschiedlichen Tiermodellen für Entzündungsschmerzen und nach Nervenverletzung beobachtet werden (Meller and Gebhart, 1993; Luo and Cizkova, 2000; Makuch et al., 2013; Choi et al., 2016; Yang et al., 2016). Durch den Einsatz selektiverer NOS-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass NOS-1 die für die Verarbeitung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen wichtigste NOS-Isoform darstellt (Tao et al., 2004; Chu et al., 2005; Guan et al., 2007; Dableh and Henry, 2011; Makuch et al., 2013). Darüber hinaus konnten inflammatorische Schmerzen in einigen Studien auch mit NOS-2-Inhibitoren reduziert werden (Gühring et al., 2000; Tao et al., 2003).

Zur weiteren Charakterisierung der schmerzrelevanten Funktion der NO-Synthasen wurden Isoform-spezifische NOS Knockout (KO)-Mäuse untersucht. NOS-1 und NOS-2 KO-Mäuse zeigten, im Gegensatz zu NOS-3-defizienten Mäusen, ein leicht reduziertes Schmerzverhalten in verschiedenen Schmerzmodellen. Jedoch wird die Interpretation dieser Ergebnisse dadurch erschwert, dass die zwei nicht-ausgeschalteten NOS-Isoformen in den KO-Mäusen kompensatorisch hochreguliert werden können (Tao et al., 2003, 2004; Boettger et al., 2007; Hervera et al., 2010). Des Weiteren wurde in vielen Studien zur Untersuchung der NOS-1-Funktion eine Mauslinie mit einer Deletion in Exon 2 verwendet, in der allerdings alternative Splice-Varianten (z.B. NOS-1 β) noch aktiv sind (Eliasson et al., 1997). Dies könnte auch den relativ schwachen Phänotyp im Schmerzverhalten der NOS-1- oder NOS-2-defizienten Mäuse erklären (Gühring et al., 2000; Tao et al., 2003, 2004; Chu et al., 2005; Boettger et al., 2007; Guan et al., 2007; Hervera et al., 2010; Kuboyama et al., 2011; Keilhoff et al., 2013).

Aufgrund der beschriebenen antinozizeptiven Effekte der NOS-Hemmung oder NOS-Deletion ist zu erwarten, dass NO-Donoren pronozizeptiv wirken. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die i.t. Injektion von NO-Donoren eine Hyperalgesie induzieren oder verstärken kann (Kitto et al., 1992; Meller et al., 1992; Machelska et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Lin et al., 1999). In anderen Studien wurden jedoch auch antinozizeptive Wirkungen von NO-Donoren beobachtet. So löst z.B. die i.t. Injektion des NO-Vorläufers L-Arginin eine Reduktion der neuronalen Aktivität im Dorsalhorn und eine Erhöhung der Reizschwelle in Schmerzmodellen aus (Haley et al., 1992; Zhuo et al., 1993). Diese dualen, pro- und antinozizeptiven Effekte konnten konzentrationsabhängig ausgelöst werden. In Ratten wurde z.B. neuropathischer und postoperativer Schmerz durch niedrige Dosen eines NO-Donors gehemmt und durch hohe Dosen verstärkt (Sousa and Prado, 2001; Kina et al., 2005). Auch Daten aus Humanstudien zeigen einen dosisabhängigen, dualen Effekt von NO: Geringe Dosen von NO können den Schmerz nach Schulter- oder Ellebogen-Verletzungen verringern (Berrazueta et al., 1996; Paoloni et al., 2003) und die Opioid-vermittelte Analgesie verstärken (Lauretti et al., 1999b, 1999a). Demgegenüber lösen hohe NO-Dosen Hyperalgesien aus (Lauretti et al., 1999a; Cadiou et al., 2007).

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass die Inhibition der NO-Produktion im Rückenmark zur Abschwächung persistierender Entzündungsschmerzen und neuropathischer Schmerzen führt. Desweiteren kann die Applikation von NO-Donoren sowohl pro- als auch antinozizeptive Effekte auslösen, was auf verschiedene NO-abhängige Signalwege hindeutet (Schmidtko et al., 2009; Schmidtko, 2015).

1.4 Guanylatzyklen

Die Gruppe der Guanylatzyklen definiert Enzyme, die nach Bindung verschiedener Liganden cGMP und Pyrophosphat aus GTP bilden, wobei Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) als Kofaktor dienen. Sowohl cGMP als auch die katalysierenden Enzyme wurden in den 1960er Jahren entdeckt (Ashman et al., 1963; Hardman and Sutherland, 1969; Schultz et al., 1969; White and Aurbach, 1969). In Säugetieren konnten vier Untereinheiten der löslichen oder Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylatzyklase (NO-GC oder sGC) nachgewiesen werden ($GC\alpha_1$, $GC\alpha_2$, $GC\beta_1$ und $GC\beta_2$). Des Weiteren gibt es sieben membrangebundene Guanylatzyklen (pGC), die GC-A, GC-B, GC-C,

Einleitung

GC-D, GC-E, GC-F und GC-G genannt werden. Im Menschen kommen nur drei NO-GC und fünf pGC Untereinheiten vor, die GC-D und GC-G sind Pseudogene (Pan et al., 2013). Die NO-GC liegt als Heterodimer und die pGC als Homodimer vor, wobei eine Ausnahme die GC-C bildet, die als Homotrimer vorkommt (Potter, 2011). Wie in **Abb. 1.6** dargestellt ist, weisen die NO-GCs eine Hämoglobin-bindende Domäne (Hb) und eine Dimerisierungs-Domäne im N-terminalen Bereich auf und katalytische Domänen im C-terminalen Bereich. Die pGCs beinhalten eine extrazelluläre Bindungsstelle für Liganden, Transmembrandomänen, Kinasen-homologe Domänen, Dimerisierungs-Domänen und C-terminale katalytische Domänen (**Abb. 1.6**). Besonders die katalytische Domäne ist hochkonserviert zwischen den verschiedenen Familienmitgliedern der Guanylatzyklen und ist homolog zur katalytischen Domäne der Adenylatzyklen (Sunahara et al., 1998; Tucker et al., 1998).

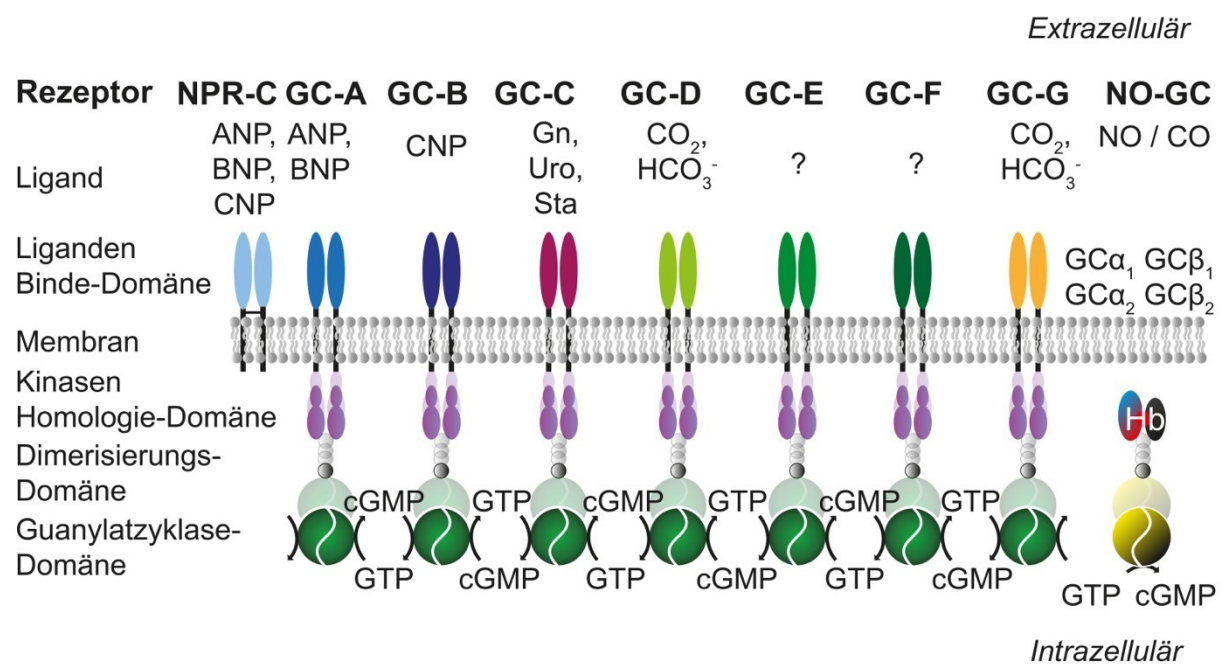


Abb. 1.6: Vereinfachte schematische Darstellung der Guanylatzyklen aus Säugetieren und deren Liganden. Insgesamt sind sieben transmembrane und vier lösliche Guanylatzyklen bekannt. Genauere Beschreibungen der Struktur und Funktion sind dem Text zu entnehmen. Gleiche Farben in der extrazellulären Domäne deuten auf vergleichbare primäre Aminosäuresequenzen der Rezeptoren hin. Abkürzungen: ANP, Atriales natriuretisches Peptid; BNP, B-Typ natriuretisches Peptid; CNP, C-Typ natriuretisches Peptid; CO, Kohlenstoffmonoxid; CO₂, Kohlenstoffdioxid; HCO₃⁻, Bikarbonat; GC, Guanylatzyklase; Gn, Guanylin; Hb, Hämoglobin; NO, Stickstoffmonoxid; NPR-C, Natriuretischer Peptidrezeptor Typ-C; Sta, Hitze-stabile Enterotoxine; Uro, Uroguanylin.

Die Liganden für die transmembranen GCs sind Peptide. Die GC-A wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) aktiviert, die GC-B durch das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) (Suga et al., 1992). Die GC-A

wird stark in der Niere und Nebenniere, in der Lunge, im Gefäßsystem, im Gehirn, in der Leber und im Endothel- sowie Fettgewebe, und schwach im Herzen exprimiert (Bryan et al., 2006; Potter et al., 2006; Dickey et al., 2007). Die Expression der GC-B konnte im Gehirn, in der Lunge, im Knochen, im Herzen, in den Eierstöcken, in Fibroblasten, in der glatten Gefäßmuskulatur und auch in den Zellkörpern der DRGs nachgewiesen werden (Schulz et al., 1989; Chrisman et al., 1993; Nagase et al., 1997; Schmidt et al., 2007; Kishimoto et al., 2008; Schmidtko et al., 2008a; Zhang et al., 2010; Loo et al., 2012). Der GC-B wurde aber auch eine wichtige Rolle in der axonalen Bifurkation der Spinalganglien zugeordnet und sie ist assoziiert mit der Schmerzwahrnehmung nach Hitzestimulation und chemischen Stimuli (Tröster et al., 2018).

Die GC-C wird durch die endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin aktiviert und ist sehr stark im Darmepithel exprimiert. Dort ist die GC-C auch der Zielrezeptor für kleine Peptide, die von pathogenen Bakterien sekretiert werden (Hitze-stabile Enterotoxine) und nachfolgend zu schwerem Flüssigkeitsverlust führen können (Potter, 2011).

In Mäusen und Ratten wurde die GC-D im Riechepithel und in Riechzilien nachgewiesen und wird durch Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Bikarbonat aktiviert (Fülle et al., 1995; Juilfs et al., 1997; Guo et al., 2009; Sun et al., 2009a). Zudem zeigten auch die Liganden Guanylin und Uroguanylin zeigten eine aktivierende Wirkung auf die GC-D (Leinders-Zufall et al., 2007).

Für die GC-E und die GC-F konnten bisher keine extrazellulären Aktivatoren identifiziert werden. Beide pGCs werden in der Retina exprimiert, die GC-E wurde zudem noch in der Zirbeldrüse nachgewiesen (Shyjan et al., 1992; Lowe et al., 1995; Yang et al., 1995).

Die GC-G-Expression konnte in der Lunge, im Darm und im Skelett-Muskel nachgewiesen werden, sowie in den Hoden von Mäusen (Kuhn et al., 2004; Potter, 2011). Die GC-G wird durch Bikarbonat und CO₂ aktiviert (Chao et al., 2010).

Im Gegensatz zu den pGCs wird die NO-GC durch das Gas NO aktiviert. Da die NO-GC im Zytosol der Zelle lokalisiert ist, wird sie auch als lösliche Guanylatzyklase bezeichnet. Die NO-GC Expression konnte in fast jedem Gewebe nachgewiesen werden, besonders stark wurde sie in den Lungen, im Gehirn, in der Niere und im Gefäßsystem detektiert (Potter, 2011). Da die NO-GCs die zentralen Proteine dieser Arbeit darstellen, werden diese Enzyme im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

1.4.1 Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylatzyklen

Das Schlüsselenzym des NO-/cGMP-Signalweges ist, wie bereits erwähnt, die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylatzyklase (NO-GC). Im Endothel führt der NO-/cGMP-Signalweg zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Dieser erste physiologische Signalmechanismus, der für NO beobachtet wurde, führte 1998 zum Nobelpreis für die verantwortlichen Wissenschaftler R. Furchgott, F. Murad und J. Ignarro.

Wie in **Abb. 1.6** dargestellt, setzt sich die NO-GC aus einer GC α - und GC β -Untereinheit zusammen und enthält eine Häm-Gruppe. Schon nach Bindung nanomolarer NO-Mengen an die Häm-Gruppe, wird cGMP aus GTP gebildet (Francis et al., 2010), wobei Mg²⁺ als Kofaktor benötigt wird (Koesling et al., 2016). Die Bindung von NO kann nachfolgend zu einem 200-fachen Anstieg der katalytischen Rate führen (Russwurm and Koesling, 2004).

In den 1980er Jahren wurde zunächst ein Heterodimer der NO-GC aus der Lunge von Ratten und Rindern aufgereinigt, der die GC α_1 - und GC β_1 -Untereinheit enthielt (Gerzer et al., 1981; Kamisaki et al., 1986). Die GC α_1 -Untereinheit wies eine molekulare Masse von 73-76 kDa, die GC β_1 -Untereinheit von 70 kDa auf. Durch den Einsatz von Algorithmen, die nach Homologien suchen, wurden zwei weitere NO-GC-Untereinheiten entdeckt, die GC α_2 - und GC β_2 -Untereinheit, wobei die Namensgebung der höheren Homologie zur GC α_1 - oder GC β_1 -Untereinheit entspricht (Yuen et al., 1990; Harteneck et al., 1991) Für die GC β_2 -Untereinheit konnte allerdings bis heute keine katalytische Aktivität beobachtet werden und *in vivo* konnte auch keine Proteinexpression bewiesen werden, so dass für diese Untereinheit bisher keine physiologische Funktion beschrieben werden konnte (Koesling et al., 2016). Für die GC α_2 -Untereinheit konnte gezeigt werden, dass sie auch die GC β_1 -Untereinheit als Dimerisierungspartner benutzt und die physiologische Funktion wurde durch die NO-stimulierte cGMP-Aktivität in den KOs der GC α_1 -Untereinheit bewiesen (Russwurm et al., 1998; Mergia et al., 2006).

Allgemein können die Untereinheiten der NO-GC in vier Domänen gegliedert werden: eine N-terminale Domäne, eine Per/Arnt/Sim (PAS)-ähnliche Domäne, eine *coiled-coil*-Domäne und eine C-terminale, katalytische Domäne (**Abb. 1.7**; (Pan et al., 2013)). Die genaue Funktion der zentralen PAS-ähnlichen und der *coiled-coil* Domäne ist bisher unbekannt, wahrscheinlich sind diese Regionen jedoch für die Bildung des

Heterodimers nötig (Derbyshire and Marletta, 2012). Wie schon in Kapitel 1.4 beschrieben, besteht eine hohe Homologie zwischen der C-terminalen Domäne der NO-GC und der entsprechenden Domäne in den partikulären Guanylatzyklasen und Adenylatzyklasen. Im C-Terminus besteht auch die höchste Homologie zwischen der $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Untereinheit. Das katalytische Zentrum der NO-GC wird von den katalytischen Domänen der $GC\alpha_1/GC\alpha_2$ - und der $GC\beta_1$ -Untereinheit gebildet (**Abb. 1.8**) (Koesling et al., 2016). Im N-Terminus dagegen ist die Homologie zwischen der $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Untereinheit extrem gering (Koesling and Friebe, 2000). In der $GC\beta_1$ -Untereinheit ist in dieser Region die Häm-bindende Domäne lokalisiert, die eine hohe Homologie zu sogenannten H-NOX-Domänen (*Heme Nitric oxide/Oxygen binding*) aufweist, die in Prokaryoten vorkommen (**Abb. 1.7**; (Koesling et al., 2016)). Durch den KO der $GC\beta_1$ -Untereinheit kommt es zum kompletten Verlust funktionsfähiger NO-GC Heterodimere in der Maus (Friebe et al., 2007).

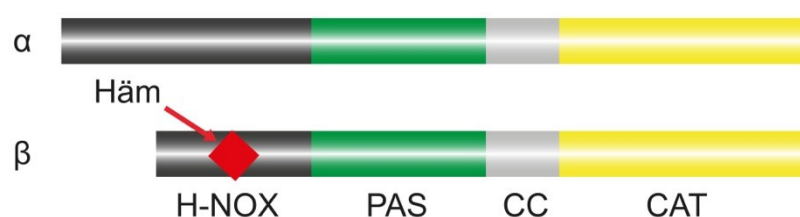


Abb. 1.7: Domänenarchitektur der $GC\alpha$ - und der $GC\beta$ -Untereinheiten. In schwarz ist die *Heme Nitric oxide/Oxygen binding* (H-NOX)-Domäne dargestellt. Die $GC\beta$ -Untereinheit bindet hier das Häm (Rot). Die zentralen Domänen sind in grün (PAS-ähnliche Domäne) und grau (*coiled-coil* Domäne (CC)) dargestellt. C-terminal ist die katalytische Domäne (CAT, gelb) abgebildet.

Wie schon im oberen Teil beschrieben, wurden in den letzten Jahren zwei katalytisch aktive Isoformen identifiziert, die NO-GC1 ($\alpha_1\beta_1$) und NO-GC2 ($\alpha_2\beta_1$), wobei die $GC\beta_1$ -Untereinheit der Dimerisierungspartner für die $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Untereinheit ist (Friebe et al., 2007; Koesling et al., 2016). In **Abb. 1.8** ist die Struktur der Heterodimere dargestellt: Jede Isoform besitzt N-terminal eine Häm-bindende Domäne, die primär von der $GC\beta_1$ -Untereinheit gebildet wird. Zentral ist die Dimerisierungs-Domäne lokalisiert, durch die eine feste Kopplung der Untereinheiten gewährleistet wird. C-terminal liegt die katalytische Domäne, die zu gleichem Anteil von den zwei GC -Untereinheiten gebildet wird (**Abb. 1.8**; (Derbyshire and Marletta, 2012; Koesling et al., 2016)). Die katalytische Effizienz der NO-GC ist abhängig von der NO-Bindung an das Hämoglobin in der H-NOX-Domäne der $GC\beta_1$ -Untereinheit. Die Selektivität der

Einleitung

NO-GC ist extrem hoch gegenüber GTP, allerdings kann auch 2'-d-GTP, GTP- γ -S, Guanosin 5'-[β , γ -imido]-Triphosphat (GMP-PNP), ITP, UTP und ATP umgesetzt werden (Derbyshire and Marletta, 2012).

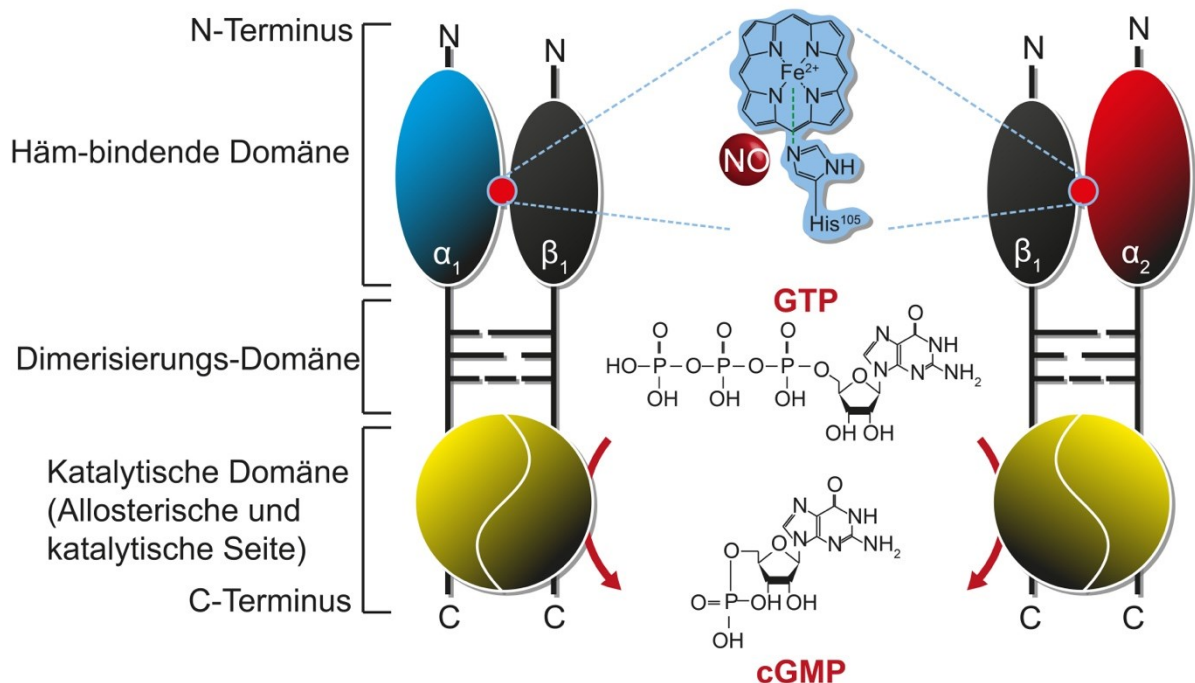


Abb. 1.8: Vereinfachte schematische Darstellung der löslichen Guanylatzyklen NO-GC1 und NO-GC2. In beiden Isoformen bindet die $\text{GC}\beta_1$ -Untereinheit eine $\text{GC}\alpha$ -Untereinheit, $\text{GC}\alpha_1$ bei der NO-GC1 und $\text{GC}\alpha_2$ bei der NO-GC2. Beide Isoformen weisen C-terminal sowohl eine katalytische Domäne als auch eine Dimerisierungs-Domäne auf. N-terminal liegt die Häm-bindende Domäne, das Häm liegt gebunden an die $\text{GC}\beta_1$ -Untereinheit vor. Bei der NO-Bindung kommt es zu einer sterischen Konformationsänderung, so dass GTP zu cGMP umgesetzt wird.

Die NO-GC2 interagiert *in vivo* mit PDZ Domänen (Russwurm et al., 2001). Die PDZ-Domänen sind Gerüstproteine, die Proteininteraktionen unterstützen bei Zielproteinen, die kurze Aminosäuresequenzen im C-Terminus aufweisen. Die Zielsequenz der NO-GC2 ist im C-Terminus der $\text{GC}\alpha_2$ -Untereinheit lokalisiert, die mit dem Protein PSD-95 interagiert. PSD-95 besitzt drei PDZ-Domänen, die mit der NOS-1 und dem NMDA-Rezeptor interagieren, so dass alle wichtigen Proteine der NO-/cGMP-Signalkaskade an einem Ort lokalisiert werden (Russwurm and Koesling, 2002).

Die Expression der NO-GC Isoformen konnte im Zytosol fast jeder Säugetierzelle nachgewiesen werden, so im Gehirn, in der Lunge, in den Aorten, in verschiedenen Bereichen des Darms, in der Plazenta, im Herz, in der Milz, in den Hoden, im Uterus, in der Niere und in der Leber (Mergia et al., 2003; Pan et al., 2013). Die mRNA der NO-GC1 Isoform wird im Vergleich besonders hoch in der Lunge exprimiert. Auch in

der Milz und in den Hoden ist die mRNA-Expression der NO-GC1 höher als die der NO-GC2, aber im Vergleich zur Lunge um das Dreifache reduziert. Im Gehirn ist die NO-GC Expression im Vergleich zur Lunge um das Sechsfache reduziert. Im Gehirn ist die mRNA-Expression der NO-GC1 und NO-GC2 vergleichbar hoch. In den restlichen Organen ist die NO-GC2 deutlich schwächer exprimiert als die NO-GC1. Im Muskel konnte weder für die NO-GC1, noch für die NO-GC2 eine Expression detektiert werden.

1.4.2 Expression und Funktion der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylatzyklasen im nozizeptiven System

Die NO-GC wird im Rückenmark von Mäusen und Ratten in Neuronen exprimiert. In Lamina I ist die NO-GC in Projektionsneuronen, aber auch in Lamina II und III in inhibitorischen und exzitatorischen Interneuronen exprimiert (Ding and Weinberg, 2006; Ruscheweyh et al., 2006; Schmidtko et al., 2008a). Allerdings wurde in diesen Studien nicht zwischen der NO-GC1 und NO-GC2 unterschieden, da immer die GC β_1 -Untereinheit detektiert wurde. In der Studie von 2008 konnte mit einem Antikörper gegen die GC β_1 -Untereinheit, der mit Hilfe von KO-Gewebe spezifiziert wurde, keinerlei Expression der NO-GC in terminalen Endigungen der primärafferenten Fasern im Rückenmark von Mäusen nachgewiesen werden (Schmidtko et al., 2008a). Auch in Ratten konnte keine NO-GC Immunoreaktivität in terminalen Endigungen der primärafferenten Fasern detektiert werden (Ding and Weinberg, 2006). In einigen Studien wurde auch eine Expression der NO-GC in DRG-Neuronen beschrieben (Maihöfner et al., 2000; Ruscheweyh et al., 2006; Luo et al., 2012). Die Studie mit GC β_1 -KO Kontrolle konnte jedoch keine Expression in den DRG-Neuronen aufzeigen (Schmidtko et al., 2008a). Allerdings zeigen alle Studien, dass die NO-GC in Satellitenzellen der DRG-Neurone exprimiert wird. Zudem konnte in DRGs von Mäusen auch eine Expression der NO-GC im Endothel detektiert werden, sowohl in Perizyten als auch in glatten Muskelzellen (Typ- α) (Schmidtko et al., 2008a; Luo et al., 2012).

1.4.3 NO-/cGMP-Signalkaskaden im nozizeptiven System

Der komplette Verlust der NO-GC in Mäusen führt nicht nur zum Verlust der NO-induzierten Hyperalgesie, sondern hat auch einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung entzündlicher und neuropathischer Schmerzen (Schmidtke et al., 2008a). Auch nach Injektion des NO-GC Inhibitors ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one) wurden sowohl in Mäusen als auch in Ratten antinozizeptive Effekte beobachtet. So konnte z.B. die lokale Applikation von ODQ im Rückenmark eine Glutamat- und NMDA-induzierte Hyperalgesie inhibieren (Ferreira et al., 1999; Kawamata et al., 1999; Tao and Johns, 2002; Song, 2005; Komatsu et al., 2009; Tanabe et al., 2009; Ding et al., 2010).

Im Vergleich zu diesen antinozizeptiven Effekten nach Inhibierung der NO-Synthasen oder der NO-GC sind die Ergebnisse für den Einsatz von cGMP-Analoga nicht konsistent, da sowohl pro- als auch antinozizeptive Effekte beobachtet wurden (Schmidtke et al., 2009; Schmidtke, 2015; Chen et al., 2017; Dallel et al., 2018). Diese Ergebnisse deuten auf einen großen Einfluss des von der NO-GC gebildeten cGMPs in der Verarbeitung pro- und antinozizeptiver Signale hin. Das cGMP kommuniziert durch verschiedene *downstream* Effektoren, wie die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle (CNG), Phosphodiesterasen (PDEs) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs) (**Abb. 1.5**; (Francis et al., 2010)). Inwieweit PDEs an der Schmerzverarbeitung durch cGMP-Signalkaskaden beteiligt sind, ist bisher sehr wenig erforscht. Allerdings wurde die Expression der PDE2, 5 und 9 im Rückenmark beschrieben (de Vente et al., 2006; Kallenborn-Gerhardt et al., 2014) und in den DRGs konnten die PDE3 und PDE5 detektiert werden (Kruse et al., 2006).

Auch verschiedene CNG-Kanäle werden im schmerzrelevanten Gewebe exprimiert (Pollock et al., 2003; Kruse et al., 2006). Dabei ist besonders interessant, dass die CNGA3-Untereinheit auch in den DRGs der Satellitenzellen exprimiert wird, ebenso wie die NO-GC (Heine et al., 2011). In der genannten Studie konnte die CNGA3 darüber hinaus in inhibitorischen Interneuronen im Rückenmark lokalisiert werden, auch hier ist die Expression konform mit der beschriebenen NO-GC Expression. Die Injektion eines NO-Donors oder von cGMP-Analoga in CNGA3 KO-Mäusen führte zudem zu einer verstärkten mechanischen Hypersensitivität, was darauf hindeutet, dass die CNGA3 ein nachgeschaltetes Zielprotein der NO-GC ist und einen inhibierenden Einfluss auf die persistierende Schmerzentsetzung hat (Schmidtke, 2015).

Eine besondere Rolle in den schmerzrelevanten cGMP-Signalwegen spielt die PKG-I, die lange Zeit als das primäres Zielprotein der NO-vermittelten cGMP-Produktion angesehen wurde (Qian et al., 1996). Diese Annahme basierte auf der großen Wichtigkeit des NO/NO-GC/cGMP/PKG-I Signalweges in anderen Geweben (Feil and Kleppisch, 2008). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die PKG-I in der Schmerzverarbeitung durch NO-unabhängige Mechanismen aktiviert wird. Die PKG-I α -Isoform wird im Großteil der DRG-Neurone exprimiert. Zudem konnte die Expression in einigen Interneuronen des Dorsalhorns gezeigt werden (Qian et al., 1996; Tao et al., 1999; Sung et al., 2006; Schmidtko et al., 2008b; Luo et al., 2012; Lorenz et al., 2014). Nach Nervenverletzung und Induktion einer Entzündung wurde gezeigt, dass die Expression der PKG-I α -Isoform in DRGs (Sung et al., 2004, 2006; Lorenz et al., 2014) und im Rückenmark erhöht wird (Tao et al., 1999; Tegeder et al., 2002; Schmidtko et al., 2003). Die globalen und Nozizeptor-selektiven KO-Tiere der PKG-I zeigten ein reduziertes Schmerzverhalten in Modellen für Entzündungsschmerzen und Neuropathien (Tegeder et al., 2004; Luo et al., 2012; Lorenz et al., 2014). Des Weiteren zeigen PKG-I-Inhibitoren antinozizeptive Effekte im Tiermodell (Tao et al., 1999; Schmidtko et al., 2003, 2009; Luo et al., 2012; Lorenz et al., 2014). Bisher konnten schon einige Zielproteine identifiziert werden, die in DRGs von der PKG-I α -Isoform phosphoryliert werden, so z.B. das Cystein-reiche Protein (CRP4, vormals als CRP2 klassifiziert (Schmidtko et al., 2008b)), das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), *myosin light chains* (MLC), der Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor 1 (IP₃R1) (Luo et al., 2012) und möglicherweise auch kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca} (Zhang et al., 2010; Lu et al., 2014)). Allerdings ist die PKG-I α in den DRGs nicht kolokalisiert mit der NO-GC, und im Rückenmark konnte nur eine sehr geringe Kolokalisation gezeigt werden (Schmidtko et al., 2008a). Andere Studien weisen bisher darauf hin, dass die PKG-I α in DRGs mit den partikulären Guanylatzyklasen GC-A und GC-B kolokalisiert und nach Stimulation mit natriuretischen Peptiden aktiviert wird (Schmidt et al., 2007; Kishimoto et al., 2008; Schmidtko et al., 2008a; Zhang et al., 2010). Zur PKG-I β und PKG-II konnten im schmerzverarbeitenden System keine Hinweise in der Literatur gefunden werden.

1.5 Zielsetzung

Das Molekül cGMP ist in Säugetieren ein sehr wichtiger *second messenger*, der jedoch bisher nur bedingt Beachtung in der Schmerzforschung findet. Studien der letzten Jahre konnten durch den Einsatz von NO-Inhibitoren, NO-GC-Inhibitoren und durch die Analyse von KO-Mäusen den NO-/cGMP-Signalweg mit der Entstehung und Ausprägung chronischer Schmerzen assoziieren. Dabei wurden sowohl pro- als auch antinozizeptive Effekte beobachtet. Besonders der separate Einfluss der zwei NO-GC Isoformen (NO-GC1 und NO-GC2) auf die NO-/cGMP-Signalkaskade im schmerzrelevanten Gewebe ist bisher völlig unklar und ebenso sind die Zielproteine des gebildeten cGMPs nicht vollständig bekannt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der zwei NO-GC Isoformen auf die beschriebenen pro- und antinozizeptiven Phänotypen der NO-/cGMP-Signalkaskaden zu untersuchen. Dazu wurden globale KO-Mäuse der Isoformen genutzt ($GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$) und in verschiedenen Modellen für akute nozizeptive, inflammatorische und neuropathische Schmerzen untersucht. Zudem wurde das Isoform-spezifische KO-Gewebe der Mäuse eingesetzt, um die Expression der jeweils nicht ausgeschalteten Isoform im schmerzrelevanten Gewebe zu untersuchen und auch die Expression der NO-GC Isoformen im Verlaufe der Schmerzentstehung zu analysieren. Des Weiteren wurden die vor- und nachgeschalteten Signalwege untersucht, um die Kaskade der NO-/cGMP-Signale genauer zu beschreiben. Die erarbeiteten Ergebnisse können dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der chronischen Schmerzverarbeitung besser zu verstehen und gezielter neue und innovative Arzneistoffe zu generieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller, Ort
Acrylamid (Rotiphorese® 30 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Albumin, IgG-frei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Borsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Bradford-Reagenz (Roti®-Quant)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Capsaicin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Complete Freund's Adjuvants (CFA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
DAPI	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation, Eugene (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
dNTPs	Qiagen GmbH, Hilden
DTT	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Essigsäure 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, AL
Formaldehyd-Lösung (37 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gasgemisch 95 % CO ₂ + 5 % O ₂	Praxair, Biebesheim am Rhein
Gefriermedium (Tissue-Tek® O.C.T.™)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt

Material und Methoden

Substanz	Hersteller, Ort
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isofluran	Abbot GmbH und Co KG, Wiesbaden
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kohlendioxid	Praxair, Biebesheim am Rhein
Roti®-Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumchlorid-Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid-Plättchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
NOC-5	Enzo Life Science GmbH, Lörrach
Odyssey® Blocking Puffer (PBS)	Li-COR Odyssey, Bad Homburg
Oligonukleotide	Biomers.net GmbH, Ulm
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Phosphosafe™ Extraction Reagenz	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
QIAZOL Lysis-Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
RNaseZap™	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation, Eugene (USA)
Roti®-Safe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti®-Load (4x)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Substanz	Hersteller, Ort
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend (37 %))	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS-Pellets (Sodium-dodecyl-sulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sudanschwarz B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED, 1,5 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
TRIS-Base	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tween®20	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Tween®80	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
WesternSure® Chemilumineszenz Lösung	Li-COR Odyssey, Bad Homburg
WesternSure® Pen	Li-COR Odyssey, Bad Homburg
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Kits	Hersteller, Ort
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNEasy Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNAse-Free DNase I Set	Qiagen GmbH, Hilden
TSA®-Fluoreszenz Kit	PerkinElmer
ViewRNA™ Tissue-Kit	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Ort
Cryomold Einbettsschalen Sakura biopsy	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Deckgläser 24x60mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Kanülen (Sterican®; G 30 1/2; G 27 1/2)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroplatte 96-well, PS, U-Boden	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Nitrozellulose Membran (Amersham™ Protran®)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhesion slides)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PCR-Platte (Hard-Shell® 96-Well PCR Plate) und Microseal® PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad, Kalifornien
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 2ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Schraubröhre 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2.1.3 Geräte und Instrumente

Geräte-/ Instrument-Name	Typ, Hersteller, Ort
Chemilumineszenz und Fluoreszenz Detektion	Odyssey® 9120 Imaging system, Li-COR Bioscience, Bad Homburg ChemiDoc XRS, Bio-Rad, Kalifornien
Dynamic Plantar Aesthesiometer	37450, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Elektrophorese-Kammer	OwlScientific, B1 Electrophoresis Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Plantar Test (Hargreaves Apparatus)	37370, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Hot-/Cold-Plate	35100, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Hybridisierungssofen	ThermoBrite®, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Kleintier-Induktionskammer	Groppler, Deggendorf
Kryotom	Cryostar™ NX50 Cryostat, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Geräte-/ Instrument-Name	Typ, Hersteller, Ort
Mikroskop	Nikon Eclipse Ni-U, Nikon GmbH, Düsseldorf Filter: Orange H Bandpass Filterset, AHF DAPI ET-Set, AHF mCherry HC-Filterset, AHF FITC-3540C-000 Brightline Filterset, Semrock Cy5-4040C-000 Brightline Filterset, Semrock Objektive: 4x Plan Fluor, Nikon 10x Plan Fluor, Nikon 20x Plan Apo λ , Nikon 40x Plan Fluor, Nikon 60x Öl, Plan Apo λ , Nikon
Mikroskop-Kamera	Nikon DS-Qi2 (Monochrom), Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop-Lichtquelle	Intensilight C-HGFI, Nikon GmbH, Düsseldorf
Mouse Rota-Rod	47600, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Multi-Plate Reader	Victor X3, PerkinElmer, Rodgau
Narkosegerät	UniVet Porta, Groppler, Deggendorf
PCR-Cycler	T100 Thermal Cycler, BioRad, Kalifornien Primus25 advanced [®] , PeqLab, Erlangen CFX96 Touch™ Real-Time System, BioRad, Kalifornien
SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Transfer Apparaturen	Mini-Protean [®] Tetra System, BioRad, Kalifornien
Spannungsgeber	PowerPac™ Basic Power Supply, BioRad, Kalifornien Power Supply EPS 301, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Stereomikroskop	GUS2 Stand und C-FMBN Fokus-Einheit, Nikon Kaltlichtquelle KL 200 LED, Schott, Mainz
UV-VIS-Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.1.4 Größenstandards

DNA-Marker	Hersteller, Ort
100 bp GeneRuler	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
1 kb GeneRuler	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Protein-Marker	Hersteller, Ort
Precision Plus Protein™ Dual Color	BioRad Laboratories, Kalifornien

2.1.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
loxP- α_1 U ₁ -fw	TGTAGAAGAGGGGATAGAAAGACC	GC- α_1 Deletion (Del)
F ₁ L ₁ -rev	TCCCGAGATGAAGTAGTTAGT	GC- α_1 Del/WT/Flox
F ₁ U ₁ -fw	ATGACAAATGAGCAGACG	GC- α_1 WT/Flox
P α_2 U ₅ -fw	AGGTGGGGCTGTCTCTGAA	GC- α_2 Del
F ₂ L ₂ -rev	GGGGGCCCTGACATTTGA	GC- α_2 Del
F ₂ U ₁ -fw	TTTGAAATTACTTGGAGATAGA	GC- α_2 WT/Flox
F ₂ L ₂ -rev	GGGGGCCCTGACATTTGA	GC- α_2 WT/Flox
fw_tomato-Cre	CTGTTCCTGTACGGCATGG	TomatoRed Reporter
rev_tomato-Cre	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	TomatoRed Reporter
fw_tomato-WT	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	TomatoRed Reporter
rev_tomato-WT	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC	TomatoRed Reporter
loxP- β_1 -U ₁	AAGATGCTGAAGGGAAGGATGC	GC- β_1 Del/WT/Flox
loxP- β_1 -L ₁	CAGCCCAAAGAAACAAGAAGAAAG	GC- β_1 Del/WT/Flox
del- β_1 -L ₁	GATGTGGGATTGTTTCTGAGGA	GC- β_1 Del/WT/Flox
CB1_fwd	GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA	CB1-Kontrolle Cre-PCR
CB1_rev	GGTGTCACCTCTGAAAACAGA	CB1-Kontrolle Cre-PCR
Cre_fwd	GAAAGCCATGTCCAATTTACTGACCGTA	Cre-PCR
Cre_rev	GCGCGCCTGAAGATATAGAAG	Cre-PCR
Mm_2Gucy1a3_Fw	AATAATCGCAGAAGAAGCAA	GC- α_1 Exon 4/5 (qPCR)
Mm_2Gucy1a3_Rv	GAGCGTGCTGAAGCTATTTA	GC- α_1 Exon 4/5 (qPCR)
Mm_2Gucy1a2_Fw	CTACGATTGTCCACTCCATT	GC- α_2 Exon 4/5 (qPCR)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Mm_2Gucy1a2_Rv	G TTCATCCA ACTTGTCCACA	GC- α_2 Exon 4/5 (qPCR)
Mm_2Gucy1b3_Fw	GATCTCTACACCCGATTTGA	GC- β_1 (qPCR)
Mm_2Gucy1b3_Rv	GATCCCGATTGTTATCTGAA	GC- β_1 (qPCR)
Mm_GAPDH_F	AAATTCAACGGCACAGTCAA	GAPDH (qPCR)
Mm_GAPDH_R	TCTCCATGGTGGTGAAGACA	GAPDH (qPCR)
NOS-1_fw	AATGGAGACCCCCAGAGAAT	NOS-1 (qPCR)
NOS-1_rv	TCCAGGAGAGTGTCCACTGC	NOS-1 (qPCR)
NOS-2_fw	ACGCTTGGGTCTTGTTCCT	NOS-2 (qPCR)
NOS-2_rv	GTCTCTGGGTCTCTGGTCA	NOS-2 (qPCR)
NOS-3_fw	AAGACAAGGCAGCGGTGGAA	NOS-3 (qPCR)
NOS-3_rv	GCAGGGGACAGGAAATAGTT	NOS-3 (qPCR)
PKGalpha_fw	CGCCAGGCGTTCCGGAAGT	PKG-I α (qPCR)
PKGalpha_rv	GTGCAGAGCTTCACGCCTT	PKG-I α (qPCR)
PKGbeta_fw	CCGCCTTCGACATCCAGGAT	PKG-I β (qPCR)
PKGbeta_rv	TCAACCTTCCCATCTTCCATG	PKG-I β (qPCR)
PKG-II_fw	GCGCACCTGGAAAGTTAC	PKG-II (qPCR)
PKG-II_rv	CAGTTCTTCTGTGAGCTCTG	PKG II (qPCR)

2.1.6 Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	
Antikörper-Puffer (WB-HRP)	Non-fat dry milk in PBST (siehe unten)	0,3 %
Blocking-Puffer (WB-HRP)	Non-fat dry milk in PBS (1x)	3 %
Glycerol (87 %)	Glycerol (autoklaviert)	87 %
NaCl-Lösung (Perfusion)	NaCl H ₂ O	0,9 % Ad 1 L
Odyssey®-Blockpuffer	Odyssey® Blocking Puffer in PBS	1:1
Odyssey®-Antikörper-Puffer	Odyssey® Blocking Puffer in PBST	1:1
PBS	NaCl	1,7 M
	KCl	34 mM
	Na ₂ HPO ₄	111 mM
	KH ₂ PO ₄	18,4 mM
PBST	Tween® 20 in PBS (1x)	0,1 %

Material und Methoden

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	
PBST	Triton X-100 in PBS (1x)	0,1 %
PFA-Lösung	Paraformaldehyd in PBS (1x) (pH 7,4)	1 - 4 %
Ponceau-S-Lösung	Trichloressigsäure	3 %
	Ponceau-S	0,1 %
Proteinase K-Puffer	Proteinase K	10 mg/ml
	1 M TRIS-HCl (pH 8)	5 ml
	CaCl ₂	0,15 g
	Glycerol	25 ml
RIPA-Puffer	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	SDS	0,1 %
	TRIS (pH 8,0)	50 mM
Sammelgel	Acrylamid	3 %
	TRIS-HCl (pH 6,8)	125 mM
	SDS	0,1 %
	APS	0,05 %
	TEMED	0,05 %
Schwanzlyse-Puffer	TRIS HCL (pH 8,5)	100 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	0,2 %
	NaCl	200 mM
SDS-Laufpuffer	TRIS-Base	25 mM
	Glycin	0,2 M
	SDS	0,1 %
TEA-Puffer	Triethanolamin	50 mM
	NaCl	50 mM
	EDTA	1mM
	(pH 7,4)	
TBE-Puffer (10x)	TRIS-Base	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O	Ad 1 L
Transferpuffer	TRIS-Base	48 mM
	Glycin	39 mM
	Methanol	20 %
	SDS	0,0037 %

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	
Trenngel	Acrylamid	8-12 %
	TRIS-HCl (pH 8,8)	375 mM
	SDS	0,1 %
	APS	0,05 %
	TEMED	0,05 %

2.1.7 Polymerasen

Name	Hersteller, Ort
iTaq Universal SYBR Green SuperMix	BioRad, Kalifornien
Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED, 1,5 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark

2.1.8 Antikörper

Sekundär-Antikörper	Verdünnung		Spezies und Immunglobulin	Hersteller, Katalognummer
	IHC	WesternBlot		
Anti-Mouse AF488	1 : 2000	—	Ziege, IgG1	Life Technologies, A21121
Anti-Mouse AF555	1 : 1000	—	Ziege, IgG1	Invitrogen, A21127
Anti-Mouse AF555	1 : 1000	—	Ziege, IgG2a	Invitrogen, A21137
Anti-Mouse AF350	1 : 800	—	Ziege, IgG2a	Invitrogen, A21130
Anti-Mouse HRP	1:500	—	Ziege	Life Tech.,A24518
Anti-Rabbit AF488	1 : 2000	—	Ziege	Invitrogen, A11008
Anti-Rabbit AF555	1 : 1000	—	Ziege	Life Tech., A21429
Anti-Rabbit HRP	1:500	—	Ziege	Sigma, A9169
Anti-Rat AF555	1 : 1000	—	Ziege, IgG (H+L)	Invitrogen, A21434
Anti-Mouse-IRDye [®] 800CW	—	1 : 10000	Ziege	LICOR, 925-32210
Anti-Rabbit-IRDye [®] 800CW	—	1 : 10000	Ziege	LICOR, 925-32211
Anti-Mouse-IRDye [®] 680LT	—	1 : 10000	Ziege, IgG1	LICOR, 926-68050
Anti-Rabbit-IRDye [®] 680RD	—	1 : 10000	Ziege	LICOR, 925-68071
α-Tubulin	—	1 : 1000	Maus, IgG1	Upstate, 05-829

Material und Methoden

Sekundär-Antikörper	Verdünnung		Spezies und Immunglobulin	Hersteller, Katalognummer
	IHC	WesternBlot		
CD31	1 : 800	—	Ratte, IgG2a	BD Pharmingen, 557355
CGRP	1 : 800	—	Kaninchen	Calbiochem, PC205L
eNOS (NOS-3)	1:100	1 : 500	Maus, IgG1	BD Pharmingen, 610296
GAD67	1 : 600	—	Maus, IgG2a	Millipore, MAB5406
GC β ₁	1:500 - 1 : 1500	1:500	Kaninchen	AG Friebe, Maximilian Universität Würzburg
Glutaminsynthase	1 : 1000	—	Maus, IgG1	GeneTex, GTX630654
IB4 - AF488 conjugated Isolectin B4	1 : 300	—	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Invitrogen, 121411
NeuN	1 : 250 - 1 : 1000	—	Maus, IgG1	Millipore, MAB377
NF200	1 : 1500	—	Maus, IgG1	Sigma, N0142
NF200	1 : 2000	—	Kaninchen	Sigma, N4142
nNOS (NOS-1)	1 : 1500	1 : 500	Kaninchen	Santa Cruz, sc-648
Peripherin	1 : 400	—	Maus, IgG1	Chemicon, MAB1527
PKC γ	1:800	—	Maus, IgG2a	Santa Cruz, sc-166385
Substance P	1 : 1500	—	Ratte, IgG2a	BD Pharmingen, 556312

2.1.9 In-situ-Hybridisierungs-Sonden

Sondenname und Label	Gen und Katalog Nr.	Hersteller
Galanin-TYPE6	<i>Gal</i> ; VB6-3199892	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation, Eugene (USA)
GC α ₁ -TYPE1	<i>Gucy1a3</i> ; VB1-17743	
GC α ₁ -TYPE6	<i>Gucy1a3</i> ; VB6-3197876	
GC α ₂ -TYPE1	<i>Gucy1a2</i> ; VB1-17742	
GC α ₂ -TYPE6	<i>Gucy1a2</i> ; VB6-3197875	
GC β ₁ -TYPE6	<i>Gucy1b1</i> ; VB6-18183	
VGLUT2-TYPE6	<i>SLC17A6</i> ; VB6-16625	
VGAT-TYPE6	<i>SLC32A1</i> ; VB6-17400	
NK1R-TYPE1	<i>Tacr1</i> ; VB1-12918	

Sondenname und Label	Gen und Katalog Nr.	Hersteller
PKG-I-TYPE1	<i>Prkg1</i> ; VB1-19757	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation, EUgene (USA)
PKG-II-TYPE1	<i>Prkg2</i> ; VB1-19758	
Scramble-control-TYPE1	Other scramble; VF1-17155	
Scramble-control-TYPE6	Unknown scramble; VB6-18580	

2.1.10 Substanzen für Entzündungsmodelle und Schmerztests

Substanz	Konzentration und Lösungsmittel	Injektionsvolumen
Capsaicin	0,5 µg/µl, 5 % EtOH, 5 % Tween80, 90 % NaCl	10 µl
Zymosan	5 mg/ml, PBS	15 µl
CFA	1 mg/ml, 85 % Paraffin Öl, 15 % Mannid Monooleate	20 µl
Formalin	0,5 %, NaCl	15 µl
NOC-5	50 nmol, NaCl	5 µl

2.1.11 Substanzen zur Anaesthesie und Analgesie

Substanz	Konzentration und Applikation	Hersteller
Caprofen (RIMADYL®)	5 mg/kg Subkutan	Zoetis, New Jersey (USA)
Isofluran CP®	Inhalations-Narkotikum	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Real-time quantitative RT-PCR

2.2.1.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Isolierung wurde in dieser Arbeit basierend auf einer Phenol-Chloroform Fällung durchgeführt (Chomczynski, 1993). Rückenmarks-, Spinalganglien- (DRG-), und Gehirnproben wurden direkt in 100 μl (DRGs in 50 μl) phenolhaltigem Qiazol-Reagenz (QLR, Qiagen oder TRIzol Reagenz, Thermo Fisher) mit Hilfe einer Mikropistille für fünf Minuten homogenisiert. Anschließend wurde mit dem Lyse-Reagenz auf 200 μl aufgefüllt und für weitere fünf Minuten mechanisch homogenisiert. Alle Schritte der Homogenisierung wurden auf Eis durchgeführt und die Proben wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Proben wurden auf 800 μl QLR aufgefüllt, gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden 160 μl Chloroform pro 800 μl QLR zugegeben und die Proben wurden 15 Sekunden durch invertieren gemischt. Nach weiterer, fünfminütiger Inkubation wurde die homogene Mischung bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Dabei bilden sich drei Phasen, eine untere, rote, organische Phase, eine mittlere, weiße Interphase und eine obere, farblos-wässrige Phase. Während Proteine und DNA in der organischen Phase und der Interphase gebunden werden, liegt die RNA in der wässrigen Phase vor. Diese wurde abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Um die Reinheit der RNA zu erhöhen wurden erneut 160 μl Chloroform zu den Proben gegeben, 15 Sekunden invertiert und diese fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur erneuten Phasen-Trennung wurden die Proben erneut bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und nachfolgend wurde erneut die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Zu jeder Probe wurden 600 μl 70 % Ethanol gegeben und die Proben wurden gevortext, um optimale Bindungskonditionen der RNA zum Säulenmaterial zu schaffen. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch auf eine RNeasy Mini Säule gegeben (maximale Volumen 700 μl), für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Die Membran der Säule besteht aus Kieselgel (Silica-Membran), an die RNA-Nukleotide binden die länger als 200 Basenpaare (bp) sind. Bei Bedarf wurde dieser Schritt wiederholt, bis die Proben vollständig aufgebraucht waren. Um vor dem Eluieren Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein DNase-Verdau nach

Angaben des Herstellers durchgeführt (DNase-I Kit, Qiagen). Dazu wurde die Säule mit 350 μ l Puffer RW1 gewaschen, für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der DNase-Verdau erfolgte mit einem Gemisch aus 10 μ l DNase-I-Stammlösung und 70 μ l RDD-Puffer, das auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Säule wurde nachfolgend mit 350 μ l Puffer RW1 gewaschen und für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, konnte die Säule mit dem Puffer RPE gewaschen werden. Hierzu wurden 500 μ l Puffer auf die Säule gegeben, diese für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der RPE-Waschschritt wurde wiederholt und die Säule wurde für zwei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Um letzte Reste des RPE-Puffers von der Säule zu entfernen und diese zu trocknen, wurde die Säule in ein leeres Reaktionsgefäß eingesetzt und für eine Minute bei 20.000 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution der RNA. Hierzu wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt, die Säule mit 30 μ l sterilem H₂O versetzt und bei 8.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Eluat wiederholt und die Konzentration der RNA wurde mit einem NanoDrop-Spektrometer (siehe Kapitel 2.1.3) bestimmt. In der Messung wurde die Konzentration in einem Mikroliter photometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm gemessen, wobei $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 μ g/ml einzelsträngiger RNA, entspricht. Des Weiteren wird durch das Messen der Verhältnisse $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt. Das Verhältnis $A_{260/280}$ sollte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Ein niedriges Verhältnis $A_{260/280}$ deutet auf eine mögliche Kontamination mit Proteinen hin, ein niedriges oder sehr hohes Verhältnis $A_{260/230}$ auf Kontamination mit Salzen oder Phenolen.

2.2.1.2 Real-time quantitative RT-PCR und Quantifizierung

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) genutzt, das eine reverse Transkriptase sowie einen RNase Inhibitor beinhaltet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, unter Verwendung von Oligo_{dT}-Primern und Random-Hexamer-Primern. Als Ausgangsmenge zur cDNA-Synthese wurden 200 ng RNA eingesetzt. Die RNA-Proben wurden fünf Minuten bei 25 °C und anschließend 60 Minuten bei 37 °C

inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben fünf Minuten auf 70 °C erhitzt.

Die Quantifizierung der cDNA-Mengen erfolgte mittels Real-time PCR unter Verwendung von SYBR-Green-I (BioRad). Die Primer wurden mit dem Online-tool Prime3Plus modelliert, als Grundlage wurde die entsprechende mRNA-Sequenz (NCBI) verwendet (Kapitel 2.1.5). SYBR-Green ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der erst bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) aktiv wird, sodass bei Bildung der PCR-Produkte ein Signal detektiert werden kann (Giulietti et al., 2001).

Zur PCR wurde folgender Probenansatz befolgt:

Tab. 2-1: Zusammensetzung der RT-qPCR Ansätze.

Zusatz	Volumen (µl)
cDNA	1 (entspricht 10 ng der Ausgangs-RNA)
iTaq-Master Mix (x2)	5
Primer forward (5 µM)	2
Primer reverse (5 µM)	2

Die Proben wurden jeweils in einer Doppelbestimmung gemessen. Zur Überprüfung auf Primer-Dimere und Verunreinigungen mit genomischer DNA wurde regelmäßig ein qPCR-Ansatz mit einer Kontrolle ohne Template und einer Kontrolle ohne reverse Transkriptase analysiert. Die PCR wurde mit einem CFX-Cycler (BioRad) durchgeführt und folgendes Protokoll wurde verwendet:

Tab. 2-2: PCR-Programm der RT-qPCR.

PCR-Schritt	°C	Zeit (Minuten)	Zyklen
UDG <i>pre-treatment</i>	50	2	1
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	40
Amplifizierung	60	1	

Die Quantifizierung der Real-time quantitativen RT-PCR erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode, wobei die Expression von GAPDH als endogene Kontrolle genutzt wurde. In Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die relative Expression dieses Gens unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht verändert.

Um die relative Genexpression der untersuchten Gene zu berechnen, wurden C_T -Werte analysiert, die eine DNA-Amplifikation in der exponentiellen Phase aufwiesen. Der C_T -Wert beschreibt dabei den Zeitpunkt der PCR, an dem das Fluoreszenz-Signal signifikant über dem Hintergrundsignal liegt (**Abb. 2.1**). Für jedes Experiment wurde ein Schwellenwert festgelegt, bei dem sich die DNA-Amplifikation der Zielgene in der exponentiellen Phase befand. Die nachfolgende Berechnung wurde dann mit den gemittelten Werten der Doppelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt der ermittelte C_T -Wert des Zielgens auf den C_T -Wert der endogenen Kontrolle normalisiert:

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

Aus den so gebildeten Werten wurde nun die Differenz zwischen den ΔC_T -Werten von behandelten und unbehandelten Proben errechnet, der ΔC_T -Wert der unbehandelten Probe diente hierfür als Kalibrator:

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

Um die relative Expressionsstärke näherungsweise zu errechnen, wurde folgende Formel genutzt:

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

Allgemein gilt während der logarithmischen Phase der PCR:

$$X_n = X_0 * E^n$$

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

Dabei gilt an den Schnittpunkten zweier Fluoreszenzsignale mit horizontaler Linie:

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

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

$$X_{n(\text{Probe})} = X_{n(\text{Kontrolle})}$$

$$X_{0(\text{Probe})} * E^{n(\text{Probe})} = X_{0(\text{Kontrolle})} * E^{n(\text{Kontrolle})}$$

$$\rightarrow X_{n(\text{Probe})} / X_{n(\text{Kontrolle})} = E^{n(\text{Kontrolle})} / E^{n(\text{Probe})} = E^{n(\text{Kontrolle}) - n(\text{Probe})}$$

Um die relative DNA-Ausgangsmenge des Zielgens Z (beispielsweise der $GC\alpha_1$ -Isoform) im Vergleich zu einem Referenzgen R (GAPDH) zu bestimmen, wird mit der Zykluszahl n am Schnittpunkt mit der horizontalen Linie wie nachfolgend berechnet:

$$Z / R = (X_{0Z(\text{Probe})} / X_{0Z(\text{Kontrolle})}) / (X_{0R(\text{Probe})} / X_{0R(\text{Kontrolle})})$$

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

Wenn man annimmt, dass die Effizienz $E = 2$ (also eine maximale Effizienz) erfüllt, gilt:

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

Setzt man die C_T -Werte in die hergeleitete Formel ein, erhält man: $Z / R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Somit kann man die n-fache Expression des Zielgens bezogen auf das Referenzgen bestimmen.

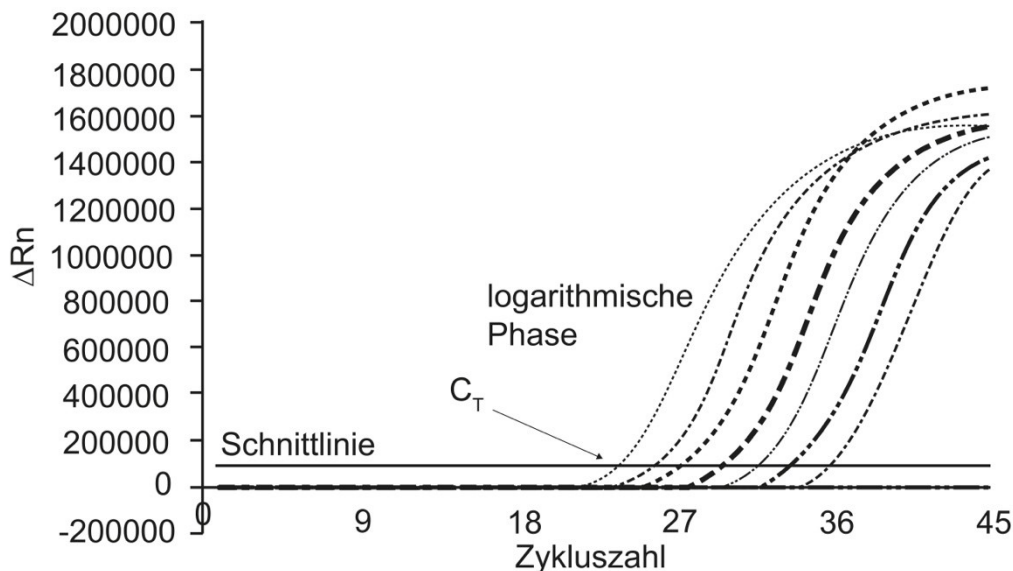


Abb. 2.1: Quantifizierung der Real-time quantitativen RT-PCR. Die Schnittpunkte der Fluoreszenzsignale an der horizontalen Schnittlinie geben den C_T -Wert wider, der zur Berechnung der relativen RNA-Menge verwendet wird. Verändert nach (Giulietti et al., 2001).

2.2.1.3 In-situ-Hybridisierung

Zur In-situ-Hybridisierung wurde das ViewRNA Tissue-Kit (Affymetrix/Thermo Fisher Scientific) verwendet. Alle eingesetzten Lösungen, bis auf den Waschpuffer, wurden autoklaviert, um endogene Phosphatase-Aktivitäten zu reduzieren. Es wurden Gefrierschnitte verwendet, die zunächst über Nacht und bei 4 °C in 4 % PFA postfixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (50 %, 70 % und 100 %) und anschließendem Backen bei 60 °C dehydriert. Nachdem die Schnitte mit einer Protease-Lösung behandelt wurden, konnten die Primär-Sonden über Nacht inkubiert werden (Kapitel 2.1.9). Am folgenden Tag wurden die Schnitte mit dem Pre-Amplifier und dem Amplifier des Kits inkubiert. Anschließend wurden die Signale entwickelt, wobei ein "Fast-red" Substrat für die Typ-1-Sonden und ein "Blue" Substrat für die Typ-6-Sonden verwendet wurde. Alle Schnitte wurden abschließend mit DAPI gefärbt. Hierzu wurde eine 300 nM Lösung in PBS hergestellt und auf die Schnitte gegeben und fünf Minuten inkubiert. Die Schnitte

wurden in PBS gewaschen und mit Fluoromount-G überschichtet. Nachfolgend wurde luftblasenfrei ein Deckglas aufgelegt und die Schnitte konnten licht- oder fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden (s. u.). Die Sonden gegen die GC α_1 und GC α_2 wurden so geplant, dass sie das Exon überspannen oder darin binden, das in den GC $\alpha_1^{-/-}$ und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tieren deletiert wurde. Zur Auswertung der In-situ-Hybridisierung wurden die Fluoreszenz-Signale am Mikroskop mit den entsprechenden Filtern detektiert, für die Type1-Sonde wurde ein Cy3-Filter, für die Type6-Sonde ein Cy5-Filter verwendet. DAPI wurde mit einem DAPI-Filter aufgenommen. Die Bearbeitung von Helligkeit, Kontrast und Tonwert erfolgte mittels der Adobe Photoshop CS6-Software, die Auszählung der Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ (open Source). Die Bilder der Doppelfärbungen wurden mit Hilfe von Photoshop Software übereinander gelagert.

Quantifizierung der NO-GC Lokalisation mit VGAT/VGLUT2:

Um die Co-Lokalisation zwischen den NO-GC-Sonden und den Sonden für inhibitorische und exzitatorische Neurone zu quantifizieren, wurden nur Signale gewertet, die eindeutig um einen DAPI-Kern lokalisiert werden konnten. Signale der NO-GC wurden nur als positiv gewertet, wenn eine deutliche Akkumulation der Signale um einen DAPI-Kern im Vergleich zum Hintergrund lokalisiert werden konnten.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Western Blot

2.3.1.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Extraktion zytosolischer Proteine aus murinem Rückenmark und DRGs erfolgte mittels TEA- (GC β_1) oder PhoshoSafe™-Puffer (Merck (Millipore) Chemicals GmbH, Darmstadt). Zudem wurde in einigen Versuchen auch der RIPA-Puffer getestet (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.6). Um einen Protease-Verdau der Proben zu verhindern, wurde ein Protease-Inhibitor-Mix (Protease Inhibitor Mini Tablets) in den Puffer gegeben (1:7 verdünnt). Für die Analyse von Dorsalhorn-Expressionen (NOS-1 und NOS-3) wurde das Rückenmark nach der Entnahme mittig zerteilt, so dass die ventrale Seite nicht mit aufgearbeitet wurde. Rückenmark wurde in 100 μ l, DRGs in 40 μ l Puffer mit einer Mikropistille (Carl Roth) zehn Minuten auf Eis homogenisiert.

Nachfolgend wurden die Proben 30 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die extrahierten Proteine im Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Proteinextrakt und Pellet wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in dem Proteinextrakt wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) eingesetzt. Diese beruht auf einer photometrischen Messung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250, der in saurer Lösung Komplexe mit den Seitenketten von Proteinen bildet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm und kann somit zur Bestimmung der Proteinmenge genutzt werden. Die Messung wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte durchgeführt, wobei die Proteinextrakte in einer Doppelbestimmung gemessen wurden. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde eine verdünnte BSA-Lösung eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden in einer 1:50 verdünnten Lösung gemessen. Als Bradfordreagenz wurde Roti-Quant® eingesetzt (Carl Roth). Sowohl die Standardreihe als auch die Proteinextrakte wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in die Mikrotiterplatte gegeben und mit je 200 µl einfach konzentriertem Bradfordreagenz vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Absorption der Proben bei 595 nm in einem Victor X3 Multi-Plate-Reader gemessen.

2.3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese Methode beruht darauf, dass Proteine in Gegenwart von SDS denaturieren und mit einer negativen Ladung versetzt werden, die proportional zur Molekülmasse ist. Daher können die Proteine nach ihrer Molekülgröße in Richtung einer Anode aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde dafür ein vertikales Elektrophorese-System (Mini-Protean® Tetra System (BioRad)) verwendet. Es wurden 1 mm dicke Gele genutzt, die aus einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem feinporigen 8 oder 12 %igem Trenngel (pH 8,8) bestanden. Zur Proteinauftrennung wurden 30 µg Proteinextrakt eingesetzt und mit einfach konzentriertem RotiLoad® fünf Minuten bei 95 °C, oder 30 Minuten bei 37 °C denaturiert. Zur Analyse der Proteinmassen wurde ein Standard (Precision Plus Protein™ Dual Color (BioRad)) eingesetzt. Die Proteinauftrennung erfolgte zunächst unter einer Spannung von 80 V für 20 Minuten, anschließend wurde eine konstante Spannung von 120 V eingesetzt.

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Protran®) übertragen. Hier wurde die MiniTrans-Blot® Blottingapparatur (BioRad) genutzt. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 90 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit PBS gewaschen und nachfolgend zur Kontrolle des Proteintransfers für zehn Minuten in einer Ponceau-S Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je zehn Minuten in A. dest. wurden die Proteinbanden sichtbar. Zur Antikörper-Inkubation wurde die Membran in PBS entfärbt.

2.3.1.3 Antikörper-Inkubation und Auswertung

In **Abb. 2.2** ist das Prinzip der Antikörper-Detektion dargestellt. Zunächst wird ein Primärantikörper gegen das gewünschte Target inkubiert. Dieser Antikörper wird nachfolgend mit einem spezifischen Sekundärantikörper detektiert, der selbst an einen Infrarot-Farbstoff (IR-dye) oder an HRP gebunden ist.

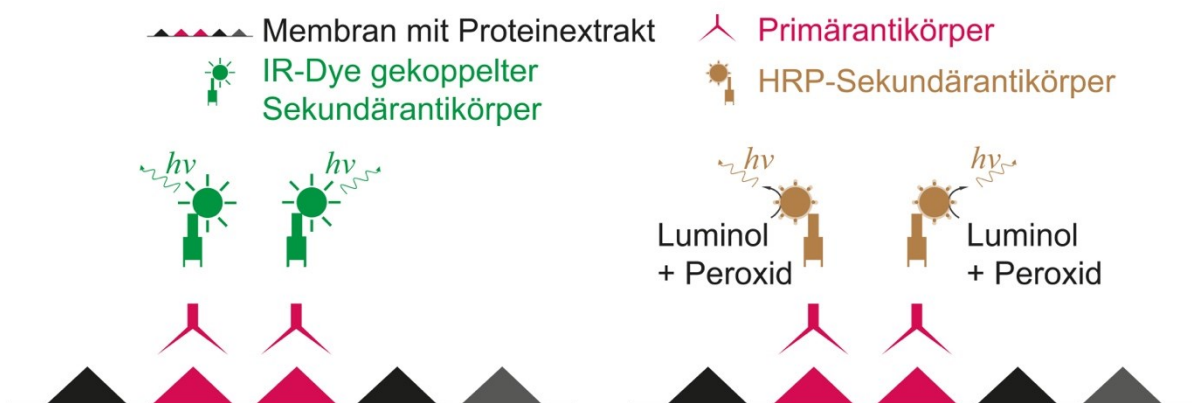


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Protein-Antikörper-Detektion des Western Blots. Auf der linken Seite ist die Detektion mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper dargestellt, auf der rechten Seite die Detektion mit einem durch die Horse Raddish Peroxidase (HRP) aktiviertem Substrat.

Vor der Inkubation des Primärantikörpers wurden unspezifische Bindungsstellen mit dem Odyssey®-Blockingpuffer oder einem selbst hergestellten Blocking-Puffer (Kapitel 2.1.6) geblockt. Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe Kapitel 2.1.8) wurde bei 4 °C über Nacht auf einem Überkopfschüttler durchgeführt. Nachfolgend wurde die Membran für 30 Minuten in PBST (0,1 % Tween20®) gewaschen und für eine Stunde mit den entsprechenden Infrarot-Farbstoff- oder HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (Kapitel 2.1.8) inkubiert. Die Antikörper wurden in

Odyssey- oder einer selbst hergestellten Antikörper-Lösung (Kapitel 2.1.6) verdünnt. Nach erneutem dreißig minütigem Waschen in PBST konnten die Infrarot-markierten Protein-Banden mit dem Odyssey® Infrared Scanner detektiert werden.

Bei den mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubierten Blots wurden die Marker-Banden mit einem speziellen Stift markiert, so dass sie in der Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar wurden. Die so behandelte Membran wurde dann mit dem Chemilumineszenz-Substrat für fünf bis zehn Minuten inkubiert. Anschließend konnte die HRP-Reaktion mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Kamera (ChemiDoc XRS (BioRad)) detektiert werden. Nach der Detektion der Protein-Banden mit dem Odyssey® Infrared Scanner oder einer Chemilumineszenz-Kamera, erfolgte die Auswertung unter Verwendung der ImageJ-Software. Die Werte der untersuchten Targets wurden mit Hilfe der Ladekontrolle (GAPDH oder α -Tubulin) normiert und in Bezug zu unbehandelten Proben oder zum Wildtyp (WT)-Gewebe gesetzt.

2.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Gefrierschnitten

2.3.2.1 Gewebepräparation

Zur Charakterisierung der Lokalisation der untersuchten Proteine im schmerzrelevanten Gewebe wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten angefertigt. Zunächst wurden die Gefrierschnitte dreimal in PBS gewaschen und für fünf Minuten in PBST (TritonX-100 (0,1 %)) permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurden die Gewebeschnitte in Blockingpuffer (3 % BSA und 10 % NGS in PBS) für eine Stunde inkubiert. In **Abb. 2.3** ist schematisch das Prinzip der Antikörper-Reaktion dargestellt. Der Primärantikörper ist gegen das Zielprotein gerichtet und kann selbst mit einem spezifischen Sekundärantikörper reagieren. Diese Sekundärantikörper sind mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelt. Die Primärantikörper wurden gemäß der in Kapitel 2.1.8 aufgeführten Konzentration in 3 % BSA in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und die Sekundärantikörper wurden gemäß der in Kapitel 2.1.8 aufgeführten Konzentration in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden mit Lichtschutz durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte weitere 30 Minuten in PBS gewaschen und dann fünf Minuten mit 0,06 %iger

Sudanschwarz-Lösung (in 70 % Ethanol) behandelt. Sudanschwarz reduziert die Lipofuszin-Eigenfluoreszenz des Gewebes (Schnell et al., 1999). Um überschüssiges Sudanschwarz zu entfernen, wurden die Schnitte erneut für 30 Minuten in PBS gewaschen und abschließend in Fluoromount-G eingedeckelt.



Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Protein-Antikörper-Detektion in der Immunfluoreszenz. Der Primärantikörper bindet an das Target und wird selbst von einem fluoreszierenden Sekundärantikörper erkannt. Dieser kann im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

2.3.2.2 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Um verschiedene Proteinfärbungen im Dorsalhorn des Rückenmarks im Modell der SNI-induzierten Nervenletzung zu quantifizieren, wurden Doppelfärbungen mit dem Marker Isolectin B4 (IB4) angefertigt, der den Bereich der Nervenverletzung kenntlich macht. Nach der Durchtrennung der Nerven im SNI-Modell degenerieren die betroffenen Nervenfasern und die terminalen Endigungen im Rückenmark gehen unter. Nach der SNI-Operation (SNI-OP) wird dann die IB4-Bande im Dorsalhorn nur noch in den lateralen Bereichen der Lamina II detektiert (Bennett et al., 1998). Hier wurden im Bereich der durchbrochenen IB4-Färbung die Neurone ausgezählt oder die Intensität der Fluoreszenz mit Hilfe der Software ImageJ analysiert. Als Kontrolle wurde die Färbung auf Gewebe von unbehandelten Tieren analysiert. Um die Intensität der Fluoreszenz zu messen, wurde in den entsprechenden Bildern im Bereich des Dorsalhorns die Pixelhelligkeit bestimmt. Als Bildgrundlage wurde das monochrome Bild der Mikroskop-Aufnahme verwendet. Dann wurden die Werte auf die Intensitäten der Kontroll-Tiere normiert. Zur Auszählung der Färbungen in DRGs wurde die Gesamtanzahl der DRG-Neurone sowie die Gesamtzahl der Marker-positiven DRG-Neurone gezählt und dann die prozentuale Verteilung errechnet. Auch hier wurden die Werte auf die Intensitäten der Kontroll-Tiere normiert.

2.4 Tierexperimentelle Methoden

2.4.1 Versuchstiere

Um den Einfluss des von der NO-GC gebildeten cGMP auf die Schmerzverarbeitung zu untersuchen, wurden verschiedene KO-Mauslinien verwendet. Ein Teil der Experimente wurde mit Tieren durchgeführt, bei denen eine der zwei bekannten Alpha-Untereinheiten global ausgeknockt wurde ($GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$) (Mergia et al., 2006). Wie in der Erstveröffentlichung beschrieben, wurden zur Produktion dieser globalen KO-Mäuse "gefloxt" Mäuse ($GC\alpha_1^{fl/fl}$ und $GC\alpha_2^{fl/fl}$) generiert, bei denen jeweils das Exon 4 der Gene *Gucy1A3* ($GC\alpha_1$) und *Gucy1A2* ($GC\alpha_2$) mit zwei loxP-Sites versehen ist. Nach der Verpaarung mit einer globalen Cre-deleter Maus (*ROSA26*) wurde das gefloxt Exon entfernt. Die Tiere wurden in einer heterozygoten Zucht verpaart, so dass WT-, KO- und heterozygote Mäuse geboren wurden. Die Tiere wurden von Frau Prof. Dr. Doris Koesling und Frau Dr. Evanthia Mergia (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurden konditionelle KO-Mäuse hergestellt, die einen gewebespezifischen KO nur in Rückenmarksneuronen aufweisen. Dazu wurden $GC\alpha_1^{fl/fl}$ - und $GC\alpha_2^{fl/fl}$ -Mäuse verwendet und mit einer Linie, die nur in Neuronen des Dorsalhorns im Rückenmark sowie des Hinterhirns die Cre-Rekombinase exprimiert (*Lbx1*, (Sieber et al., 2007)) verpaart. Die $Lbx1^{Cre/+}$ Tiere wurden von Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler (Max-Delbrück-Center, Berlin) zur Verfügung gestellt. So konnten Tiere generiert werden, die einen KO für eine der beiden Alpha-Untereinheiten der NO-GC in Neuronen des Dorsalhorns aufweisen ($Lbx1^{Cre/+}GC\alpha_1^{-/-}$ und $Lbx1^{Cre/+}GC\alpha_2^{-/-}$). Zur Charakterisierung der *Lbx1*-Expression wurden die $Lbx1^{Cre/+}$ -Tiere auch mit einer Reporter-Linie (*B6.Cg-Gt(ROSA)^{26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J}* (tdTomato Ai14, (Madisen et al., 2010)) verpaart, so dass die F1-Generation eine rote Fluoreszenz in allen Cre-exprimierenden Zellen aufwies (*Lbx1*-tdTomato). Um die RNA- und/oder Proteinexpression basal oder nach Schmerzinduktion zu untersuchen, wurden auch vier bis acht Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6N Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

2.4.1.1 Gewebeentnahme

Zur Gewebeentnahme für Western Blot- und qPCR-Analysen wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und mit Hilfe einer kardialen Punktion entblutet. Unmittelbar nach der Tötung wurde das Gewebe präpariert. Hierzu wurde zunächst die Wirbelsäule frei präpariert und diese in Höhe des Zervikalmarks durchtrennt. Von diesem Punkt aus wurden die kaudalen Wirbelbögen seitlich durchtrennt und so das Rückenmark freigelegt. Der lumbale Bereich des Rückenmarks sowie die dazugehörigen Spinalganglien (DRG L4 und L5) wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die qPCR-Analyse wurde zudem auch die Großhirnrinde und periphere Organe entnommen. Auch hier wurden die Gewebe-Proben unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Versuchstiere in CO₂ getötet. Nach Öffnen des Brustraumes wurde zunächst eine Perfusion mit isotonischer NaCl-Lösung über den linken Herzventrikel durchgeführt um das Blut zu entfernen. Zur Fixierung des Gewebes wurde eine 1, 2 oder 4 %ige Paraformaldehyd (PFA)- Lösung eingesetzt. Die Gewebeentnahme des lumbalen Rückenmarks und der lumbalen DRGs (L4 und L5) wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das entnommene Gewebe für zehn Minuten in 1, 2 oder 4 %igem PFA nachfixiert und über Nacht in einer 20 %igen D-Saccharaose-Lösung entwässert. Nachfolgend wurde das Gewebe in Gefriermedium auf Trockeneis eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Von den so vorbereiteten Gewebe-Proben wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Cryostar™, Thermo Fisher Scientific) Gefrierschnitte angefertigt (Objekt- und Kammertemperatur: -20 °C). Die Gewebe wurden in einer Dicke von 12 bis 16 µm geschnitten, für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mauslinien wurden Schwanzbiopsien oder die Gewebestücke der Ohrnummerierung verwendet. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels der alkalischen Lyse. Hierzu wurden die Gewebestücke in 500 µl Lyse-Puffer mit 1 % Proteinase-K über Nacht bei 55 °C und 550 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz

fünf Minuten bei 13 000 g zentrifugiert und der Überstand wurde in 500 µl Isopropanol (100 %) überführt. Die Ansätze wurden durch Invertieren gemischt und für zehn Minuten bei 13 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut bei 13 000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet wurde getrocknet und die DNA in 50 µl A. dest. gelöst (15 Minuten bei 55 °C). Die gelöste DNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur PCR wurde ein PCR Mix verwendet, der sowohl dNTPs als auch die Polymerase enthält (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED, Ampliqon).

Folgende PCR-Programme zur Genotypisierung wurden verwendet (**Tab. 2-3**):

Tab. 2-3: PCR-Programme der Genotypisierung mit Zyklen-Anzahl und erwarteten Bandengrößen.

GCα1 Del/WT/Flox			GCα2 Deletion		
°C	Zeit (Min.)	Zyklen	°C	Zeit (Min.)	Zyklen
94	3	1	94	3	1
94	0,5	30	94	0,5	30
58	2		61	1	
72	1		72	1	
72	7	1	72	7	1
12	∞	Hold	12	∞	Hold
Fragment- Größe:	WT: Deletion: Lox-P:	879 bp 997 bp 920 bp	Fragment- Größe:	Deletion:	513 bp
GCα2 WT/Flox			GCβ1 Del/WT/Flox		
°C	Zeit (Min.)	Zyklen	°C	Zeit (Min.)	Zyklen
94	3	1	94	3	1
94	0,5	30	94	0,5	30
55	1		60	0,75	
72	1		72	0,5	
72	7	1	72	7	1
12	∞	Hold	12	∞	Hold
Fragment- Größe:	WT: Lox-P:	760 bp 800 bp	Fragment- Größe:	WT: Deletion: Lox-P:	680 bp 830 bp 720 bp
Cre-Rekombinase			tdTomato		
°C	Zeit (Min.)	Zyklen	°C	Zeit (Min.)	Zyklen
94	5	1	94	5	1
94	1	40	94	0,5	35
55	1		65	0,75	
72	2		72	0,75	
72	10	1	72	7	1
12	∞	Hold	12	∞	Hold
Fragment- Größe:	CB1: Cre+:	400 bp 250 bp	Fragment- Größe:	WT: Cre+:	300 bp 200 bp

Zur Detektion Cre-exprimierender Zellen wurde ein Kontrollgen (CB1) mit amplifiziert, um zu überprüfen ob Template in der Probe vorlag. Die PCR wurde mittels Gel-Elektrophorese separiert, wobei die Agarose-Konzentration je nach Größe der PCR Amplifikate eingesetzt wurde. Zur Visualisierung wurde Roti-Safe® eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenz-Detektionsgerät ChemiDoc XRS (BioRad).

2.4.3 Rota-Rod-Test

Die Durchführung der nozizeptiven Verhaltenstests setzt eine normale Koordination und Motorik der Tiere voraus. Dies wurde mit Hilfe des Rota-Rod-Tests überprüft. Hierbei wurden die Versuchstiere auf eine mit einer Geschwindigkeit von 15 rpm konstant rotierende Stange (Rotarod Treadmill für Mäuse; Ugo Basile) gesetzt. Die Verweildauer der Tiere auf der rotierenden Stange wurde dokumentiert, wobei nach maximal 120 s die Messung abgebrochen wurde (Cutoff). Jedes Tier wurde in drei Durchläufen getestet. Vor der eigentlichen Messung wurden die Tiere mit einigen Trainingsläufen an die Apparatur gewöhnt.

2.4.4 Hot-Plate-Test

Das akute Schmerzverhalten nach thermischer Stimulation wurde mit Hilfe des Hot-Plate-Tests nach Eddy und Leimbach gemessen (Eddy and Leimbach, 1953). Für diesen Versuch wurden Tiere auf eine 50 °C bis 54 °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion wurde notiert. Als eine nozizeptive Reaktion wurde das Hochspringen des Tieres und das Lecken oder Schütteln einer Hinterpfote bestimmt. Um Gewebeschäden zu verhindern wurde ein Cutoff festgelegt (60 Sekunden für 50 °C, 40 Sekunden für 52 °C und 20 Sekunden für 54 °C), nach dem der Versuch beendet wurde, wenn das Tier keine Reaktion zeigte. Um eine Gewöhnung zu verhindern wurde jedes Tier nur einmal pro Temperatur gemessen (Mogil et al., 1999). Zwischen den Messungen der drei verschiedenen Temperaturen lag eine Zeitspanne von mindestens zwei Stunden und es wurden maximal zwei Temperaturen pro Tag untersucht.

2.4.5 Cold-Plate-Test

Das akute Schmerzverhalten nach Kälte-Stimulation wurde mittels des Cold-Plate-Tests bestimmt. Dazu wurden die Tiere auf eine 2 °C kalte Platte gesetzt und die Zeit bis zur ersten Reaktion wurde bestimmt. Daraufhin wurden die Tiere auf der Platte belassen und die Reaktionen in fünf Minuten wurden notiert (Zimmermann et al., 2007). Als Reaktionen wurde auch hier Lecken und Schütteln der Hinterpfote oder Hochspringen gewertet.

2.4.6 Formalin-Test

Als Modell für tonische Schmerzen wurde der Formalin-Test durchgeführt (Hunskar et al., 1985). Vor dem Versuch wurden die Tiere mindestens eine halbe Stunde an den Versuchsraum und die Umgebung gewöhnt. Dann wurden dem Versuchstier 15 µl einer 0,5 %igen Formaldehyd-Lösung (Formalin) subkutan in die Dorsalseite der linken Hinterpfote injiziert. Bei Mäusen kommt es dann zu einer nozizeptiven Antwort in Form von Lecken der Hinterpfote. Die Leckzeit unmittelbar nach Injektion wurde über 60 Minuten, in Fünf-Minuten-Intervallen, mit einer Stoppuhr bestimmt. Dabei sind zwei Phasen der nozizeptiven Reaktion zu beobachten, die besonders auf die Stimulation der TRPA1-Kanäle in sensorischen Neuronen zurückzuführen sind (Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007). Die erste Phase der nozizeptiven Reaktion beginnt unmittelbar nach der Injektion, dauert etwa zehn Minuten und ist auf die direkte Stimulation der Nozizeptoren, besonders der A δ -Fasern, zurückzuführen. Nach der ersten Phase kommt es zunächst zu einer kleinen Ruhephase von fünf bis zehn Minuten, dann beginnt die zweite Phase der nozizeptiven Antwort. In dieser Phase wird die Reaktion neben der Stimulation der Nozizeptoren auch durch die Entzündung und zentrale Sensibilisierungsprozesse beeinflusst, wodurch eine anhaltende Aktivierung der C-Fasern ausgelöst wird (Coderre et al., 1990; Tjølsen et al., 1992).

2.4.7 Capsaicin-Test

Der Capsaicin-Test dient der Charakterisierung der TRPV1-Aktivität (Caterina et al., 1997). Dabei kommt es durch periphere und zentrale Vorgängen zu einer thermischen Hyperalgesie an der Injektionsstelle (Willis, 2009; O'Neill et al., 2012). Zunächst wurden die Versuchstiere 30 Minuten an den Versuchsraum gewöhnt. Nachdem eine Capsaicin-Lösung (Menge und Konzentration siehe 2.1.10) dorso-plantar in eine

Hinterpfote injiziert wurde, konnte die Leckzeit per Stoppuhr über fünf Minuten gemessen werden (Sakurada et al., 1992).

2.4.8 Dynamic Plantar-Test

Zur Messung der mechanischen Reizschwelle wurde ein Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Comerico, Italien) verwendet. Zunächst wurden die Versuchstiere auf ein engmaschiges Metallgitter gesetzt und an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Dann wurde mit dem Aesthesiometer, bestehend aus einem dünnen Metall-Stab und dem Messgerät, eine Hinterpfote mit steigender Druckstärke stimuliert, bis das Tier die Pfote wegzog. Die dabei ermittelten Werte spiegelten dann die Latenzzeit der mechanischen Reizschwelle wieder, die aus fünf einzelnen Messungen ermittelt wurde. Für die Messungen wurde das Aesthesiometer so kalibriert, dass in einer ansteigenden Rampe der Druck von null auf fünf Gramm über zehn Sekunden erhöht wurde, danach wurden die fünf Gramm gehalten, der Cutoff lag bei 20 Sekunden.

2.4.9 Hargreaves-Test

Zur Bestimmung der thermischen Reizschwelle nach Hargreaves (Hargreaves et al., 1988) wurde ein Plantar-Test (Ugo Basile, Comerico, Italien) verwendet. Die Versuchstiere wurden dabei auf eine Glasplatte gesetzt und an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Dann konnte mit der Apparatur an der plantaren Seite der Hinterpfote ein lokaler Hitzereiz gesetzt werden, der beendet wurde, wenn das Tier die Pfote wegzog. Die so ermittelten Werte spiegeln die Latenzzeit der thermischen Reizschwelle wieder, die aus fünf einzelnen Messwerten gemittelt wurde. Das Plantar-Test-Gerät wurde auf eine Intensitätsstufe von 25 kalibriert. Wenn das Tier nicht reagierte, wurde die Messung nach 20 Sekunden abgebrochen (Cutoff) (Yeomans and Proudfit, 1994).

2.4.10 Inflammatorische Schmerzmodelle

Zur Charakterisierung des inflammatorischen Schmerzverhaltens wurde die Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie (Meller and Gebhart, 1997) und die Complete Freund's Adjuvant (CFA) induzierte mechanische Hyperalgesie (Ferreira et al., 2001)

untersucht. In beiden Modellen wird eine proinflammatorische Substanz subkutan in die Plantarseite einer Hinterpfote injiziert und es kommt nachfolgend zu einer Entzündung der Pfote und einer damit verbundenen Hyperalgesie. Der Verlauf der Hyperalgesie wurde mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (siehe Kapitel 2.4.8) quantifiziert. Im Zymosan-Modell wurden 15 µl einer 5 mg/ml Zymosan-Suspension injiziert. Nachfolgend wurden die Tiere für acht Stunden jede Stunde sowie 24 und 48 Stunden nach Injektion untersucht. Im CFA-Modell wurden 20 µl einer unverdünnten CFA-Lösung injiziert und die Latenzzeiten wurden eine, zwei, vier, sechs, acht, neun und 24 Stunden, sowie zwei, vier, sechs, neun, 13, 16 und 24 Tage nach Injektion bestimmt.

2.4.11 Neuropathische Schmerzmodelle

Um das neuropathische Schmerzverhalten zu untersuchen, wurden drei verschiedene Modelle angewendet:

Spared nerve injury: Im Modell der "Spared nerve injury" (SNI) (Decosterd and Woolf, 2000; Bourquin et al., 2006) werden zwei Äste des *N. ischiadicus* ligiert und durchtrennt, so dass nur ein Ast, der *N. suralis*, intakt bleibt (**Abb. 2.4**). Im lateralen Bereich der Hinterpfote, der von dem bestehenden Ast innerviert wird, entsteht eine mechanische Allodynie, die mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (siehe Kapitel 2.4.8) quantifiziert wurde. Die Tiere wurden unter tiefer Isofluran-Narkose operiert, wobei zur Analgesie des Wundschmerzes 30 Minuten vor der Operation Caprofen injiziert wurde (5 mg/kg subkutan (s.c.)). Zur Operation wurde zunächst das Fell auf der linken Beinseite rasiert und die Haut sowie die Muskulatur wurde durchtrennt. Nach Freipräparation der drei Äste des *N. ischiadicus* wurden der *N. peroneus communis* und der *N. tibialis* mit einem 0,08 mm Faden (F.S.T.) abgebunden und es wurde jeweils ein Teil der Nerven (ca. 3 mm) entfernt. Anschließend wurde die Wunde geschlossen und die entstehende Allodynie konnte vier, sieben, elf, 14, 18, 21, 24 und 27 Tage nach der Operation untersucht werden. In diesem Modell ist die Neuropathie sehr konstant, da durch die Entfernung eines Teils der Nerven eine Regeneration des *N. ischiadicus* verhindert wird.

Chronic constriction injury: Im Modell der "Chronic constriction injury" (CCI) (Bennett and Xie, 1988) werden die drei Äste des *N. ischiadicus* mit drei Fäden an untereinanderliegenden Stellen ligiert (**Abb. 2.4**). Durch die Ligation der Nerven bildet sich eine Hypersensitivität in der betroffenen Hinterpfote aus. Um das Ausmaß der mechanischen Allodynie zu bestimmen, wurde die in Kapitel 2.4.8 beschriebene Methode verwendet. Zusätzlich wurde die thermische Hyperalgesie untersucht (Kapitel 2.4.9). Zur Analgesie des postoperativen Wundschmerzes wurden die Versuchstiere 30 Minuten vor der Operation mit Caprofen prämediziert (5 mg/kg s.c.) und dann unter tiefer Isofluran-Narkose operiert. Hierzu wurde das Fell an der linken Beinseite entfernt und die Haut sowie die Muskulatur wurde im Bereich des Hüftansatzes geöffnet, in dem die drei Äste des *N. ischiadicus* gemeinsam verlaufen. Der Nerv wurde mit einem 0,08 mm Faden (F.S.T.) an drei zusammenliegenden Stellen ligiert. Die entstehende mechanische Allodynie wurde vier, sieben, elf, 14, 18, 21, 29, 34, 41, 48 und 55 Tage nach der Operation untersucht. Die thermische Allodynie wurde fünf, 12, 19, 30, 35, 43, 50 und 57 Tage nach der Operation charakterisiert. Da die Nerven in diesem Modell nur abgebunden werden, kann es zu einer partiellen Regeneration kommen.

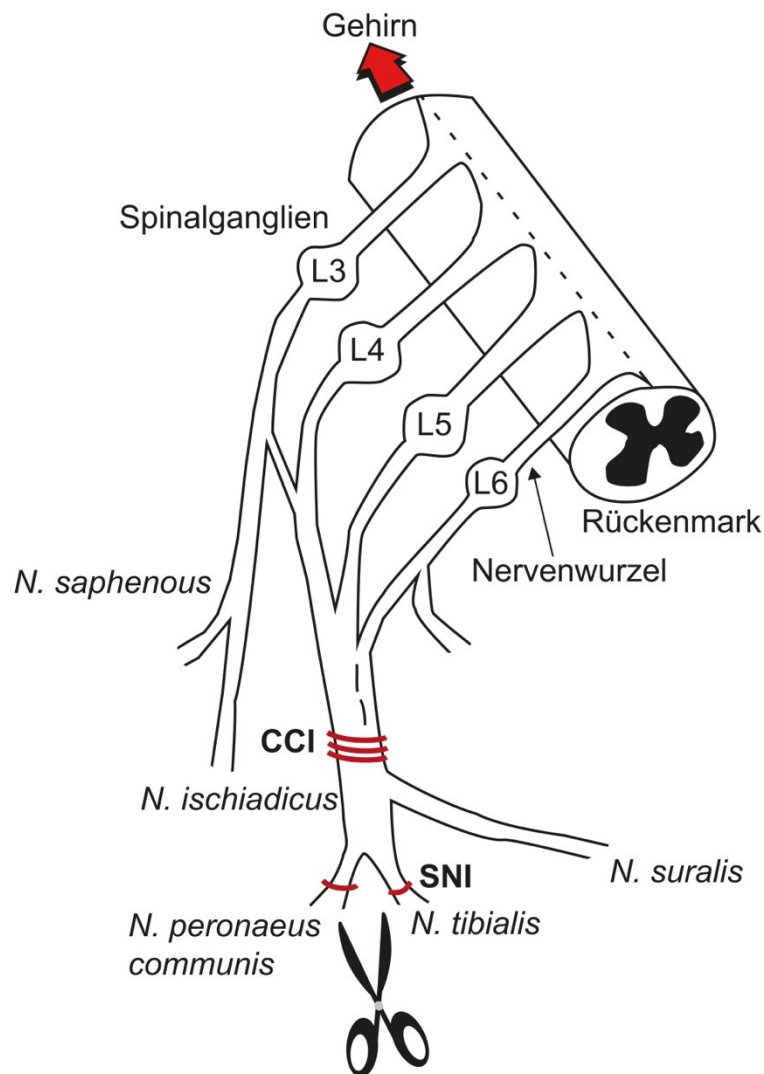


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der neuropathischen Schmerzmodelle. Im Chronic constriction injury- (CCI) Modell werden die drei Äste des *N. ischiadicus* mit drei Fäden ligiert. Für das Spared nerve injury- (SNI) Modell werden der *N. peroneus communis* sowie der *N. tibialis* ligiert und durchtrennt.

2.5 Software, Statistik und graphische Darstellung

Software und graphische Darstellung: Für die Mikroskopie mit dem Nikon-Mikroskop wurde die Nikon-Software NIS-Elements verwendet und die anschließende graphischen Darstellung der Immunfluoreszenz-Bilder wurde mit ImageJ und mit Adobe Photoshop CS durchgeführt. Zur graphischen Bearbeitung und nachfolgender Analyse der Western Blot Membranen wurde die Software Image Studio™ von Li-COR verwendet. Die Bilder der Genotypisierungen wurden mit der Software Image Lab™ von BioRad bearbeitet. Die statistischen Auswertungen der Verhaltensdaten und Quantifizierungen wurden in dieser Arbeit mit den Programmen SPSS Statistics von IBM für Windows und Microsoft Excel® 2016 durchgeführt. Die Ergebnisse der qPCR

wurden mit dem CFX-Manager™ analysiert und exportiert. Die Datenanalyse der qPCR wurde nachfolgend mit Microsoft Excel® 2016 durchgeführt.

Realtime RT-PCR: Die relative mRNA Menge wurde in jeder Probe mit der in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode bestimmt. Die so ermittelten Zahlenwerte wurden in Prozent im Verhältnis zu unbehandelten Kontrolltieren umgerechnet und einer univariaten ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$) unterzogen.

Verhaltenstests: Zunächst wurde die Normalverteilung innerhalb der Gruppe mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test betrachtet. Anschließend wurde die statistische Signifikanz mit dem Student's t-Test berechnet, oder bei einer Gruppenanzahl von größer als zwei mit der einfaktoriellen ANOVA mit dem Bonferroni Post-hoc Test. Daten mit Messwiederholungen wurden mit einer Repeated-Measurement-ANOVA auf statistische Signifikanz geprüft. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur Analyse der Daten des Rota-Rod Tests wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt und die Daten sind als Median mit Interquartilsabstand dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Expression und Funktion der NO-GC1 und NO-GC2 im nozizeptiven System

3.1.1 Zelluläre Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 im Rückenmark

Zur Expressionsanalyse der NO-GC1 und NO-GC2 im schmerzrelevanten Gewebe wurde ein spezifischer Antikörper gegen die $GC\beta_1$ -Untereinheit auf Isoform-spezifischem KO-Gewebe ($GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$) benutzt. Damit wird auf $GC\alpha_1^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC2 und auf $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC1 nachgewiesen, da die $GC\beta_1$ -Untereinheit in Abwesenheit einer $GC\alpha_2$ -Untereinheit instabil ist und degradiert wird (Mergia et al., 2006).

In **Abb. 3.1** ist die $GC\beta_1$ -Färbung (grün) im Rückenmark von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tieren dargestellt. Hierbei ist eine Anreicherung der Fluoreszenz insbesondere im Dorsalhorn zu erkennen (*A*, *B* und *D*, *E*). Interessanterweise ist auf Gewebe der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere die Fluoreszenz des $GC\beta_1$ -Antikörpers in einem schmalen Band am Rand des Dorsalorns angereichert und es ist eine Färbung von Blutgefäßen erkennbar (*C* und *F*). Zudem kann eine schwache Expression in der Region des Zentral-Kanals in den Übersichtsbildern erkannt werden (*A*, *B*, *C*). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide NO-GC Isoformen im schmerzrelevanten Bereich des Rückenmarks exprimiert werden, wobei das Expressionsmuster unterschiedlich ist.

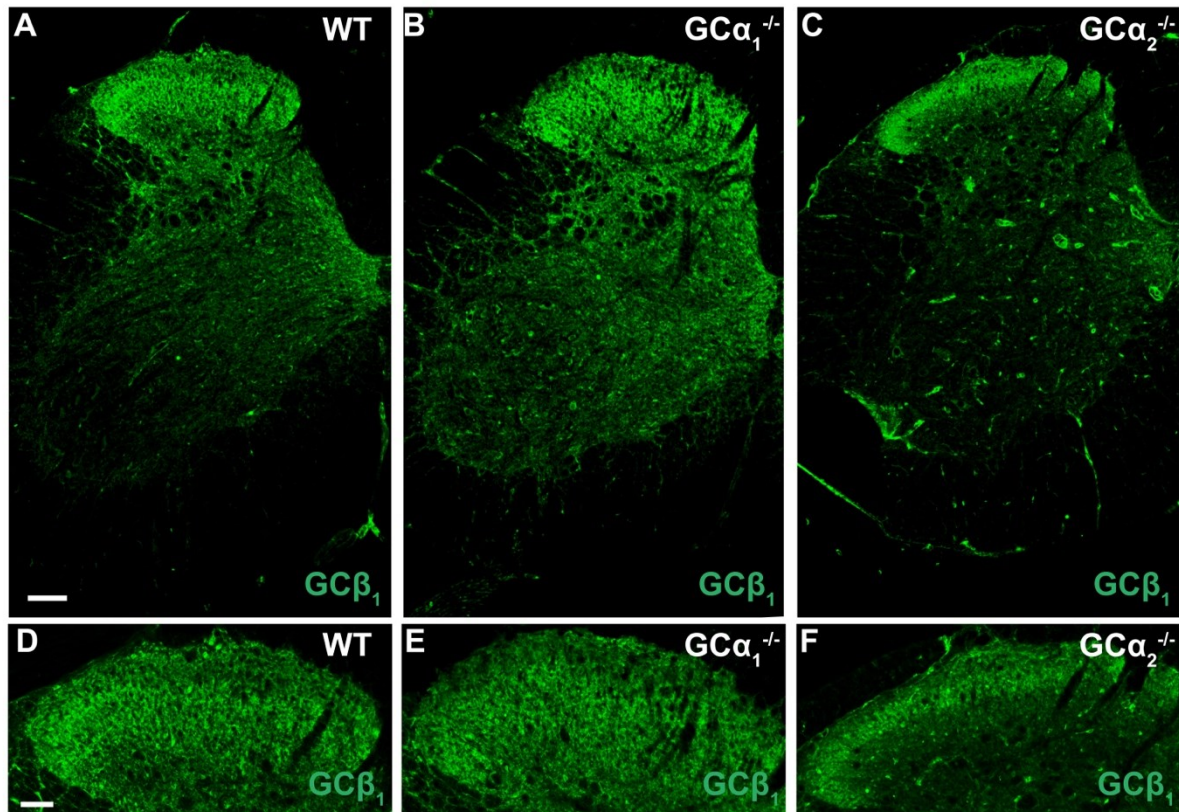


Abb. 3.1: Immunfluoreszenzfärbung der NO-GC auf Rückenmarksschnitten von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. Da ein Antikörper gegen die $GC\beta_1$ -Untereinheit verwendet wurde, ist auf $GC\alpha_1^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC2 und auf $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC1 gefärbt. A, B, C. Übersichtsaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung der NO-GC an Rückenmarksschnitten von WT- (A), $GC\alpha_1^{-/-}$ - (B) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (C). D, E, F. Detailaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung des Dorsalhorns der Rückenmarksschnitte von WT- (D), $GC\alpha_1^{-/-}$ - (E) und $GC\alpha_2^{-/-}$ - (F) Mäusen. Maßstabsbalken: (A-C) 100 μm ; (D-F) 50 μm .

In der Literatur ist beschrieben, dass die NO-GC in vaskulären Endothelzellen exprimiert wird (Schmidtke et al., 2008a; Hamilton et al., 2010; Bettaga et al., 2015). Daher wurden Doppelfärbungen mit dem $GC\beta_1$ -Antikörper und dem Endothelzell-Marker CD31 im Hinterhorn des Rückenmarks durchgeführt. In **Abb. 3.2** sind die übereinander gelagerten Bilder der $GC\beta_1$ - (grün) und CD31-Immunfluoreszenz (rot) auf WT- (A, B und C), $GC\alpha_1^{-/-}$ - (D, E und F) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe (G, H und I) dargestellt. Es kann sowohl auf dem $GC\alpha_1^{-/-}$ - als auch auf dem $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe eine Kolokalisation (gelb) der $GC\beta_1$ und CD31 erkannt werden. Somit wurde hier gezeigt, dass beide NO-GC Isoformen im Gefäßendothel des Rückenmarks exprimiert werden.

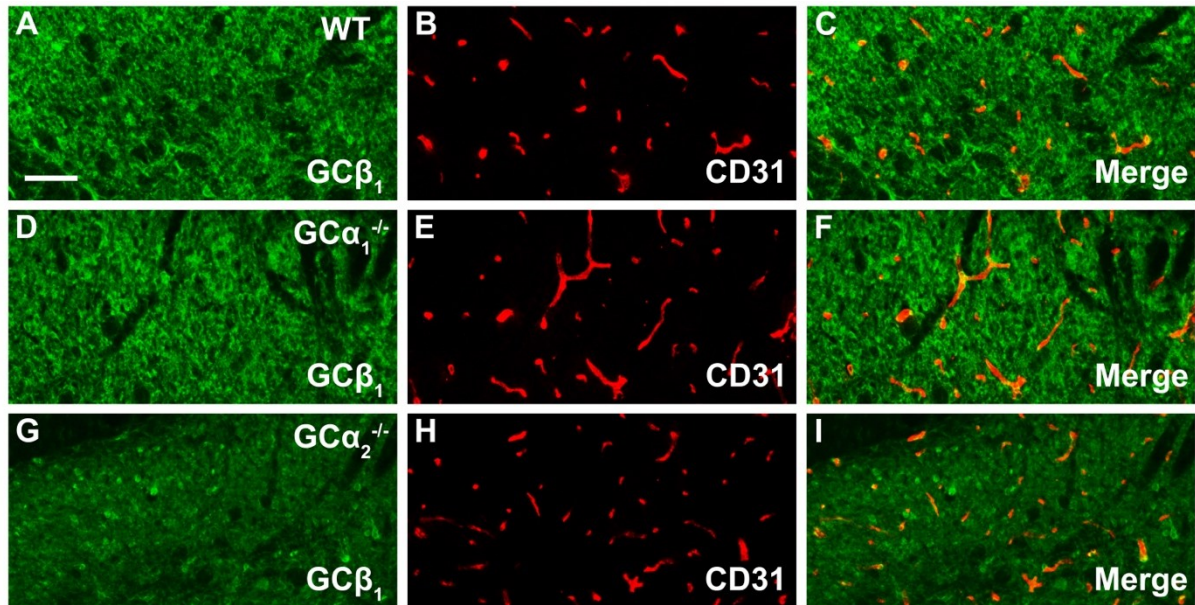


Abb. 3.2: Immunfluoreszenzfärbung der NO-GC auf Rückenmarksschnitten mit Hilfe des GC β_1 -Antikörpers und einem endothelialen Marker (CD31). Detailaufnahme der NO-GC und CD31 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung des Dorsalhorns von WT- (A, B, C), GC $\alpha_1^{-/-}$ - (D, E, F) und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (G, H, I); eine Kolokalisation wird durch eine gelbe Färbung angezeigt. Maßstabsbalken: 50 μm .

Zur Analyse, in welchen Regionen des Dorsalhorns die NO-GC1 und NO-GC2 im neuronalen Gewebe exprimiert wird, wurde die GC β_1 mit den Markern IB4 und PKC γ doppelt gefärbt. IB4 färbt die innere/dorsale Lamina II (II_{i/d}), PKC γ die innere/ventrale Lamina II (II_{i/v}) und einige Neurone in Lamina III (Abraira et al., 2017). In **Abb. 3.3** sind Doppelfärbungen der GC β_1 mit IB4 (A-F) und mit PKC γ (G-L) auf WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe gezeigt. Wie in **Abb. 3.3 A-F** dargestellt ist, beginnt die GC β_1 -Färbung (rot) unterhalb des IB4 Signals (grün) und erstreckt sich ventral davon. In **Abb. 3.3 G, J, H** und **K** wird anhand der PKC γ -Färbung (rot) deutlich, dass auf WT- und GC $\alpha_1^{-/-}$ -Gewebe GC β_1 (grün) in Lamina II_{i/v}, Lamina III und Lamina IV detektiert werden konnte. Auf dem Gewebe der GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere ist GC β_1 dagegen nur im Bereich der PKC γ -Färbung lokalisiert (I und L). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Expression der NO-GC Isoformen im Dorsalhorn unterscheidet: NO-GC2 ist v.a. in Lamina II_{i/v} bis IV exprimiert, während NO-GC1 nur in Lamina II_{i/v} angereichert ist.

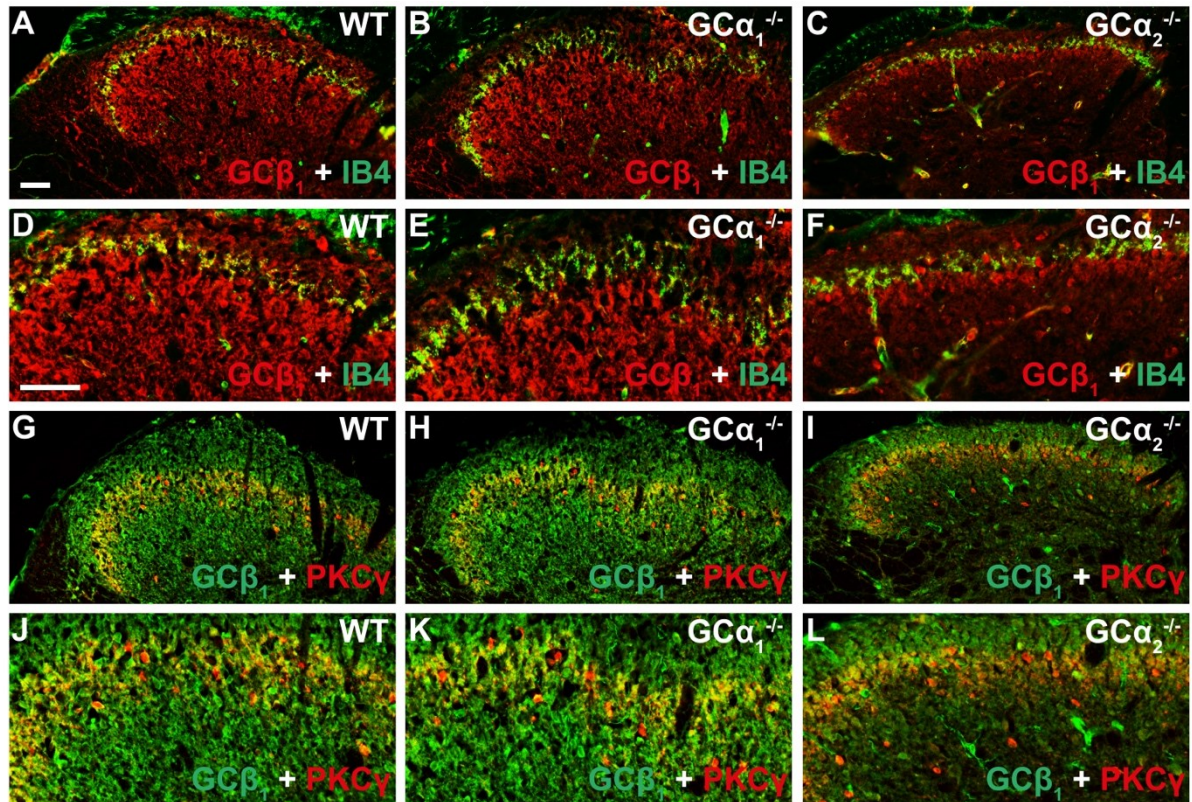


Abb. 3.3: Doppelte immunohistochemische Fluoreszenzfärbungen der NO-GC und Marker der Lamina II und III im Dorsalhorn des Rückenmarks. *A-F.* Zur Färbung der inneren/dorsalen Lamina II (Lamina II_{id}) wurde eine Doppelfärbung der NO-GC Isoformen (GCβ₁-Antikörper, rot) mit dem Isolektin B4 (IB4, grün) auf WT- (*A, D*), GCα₁^{-/-} (*B, E*) und GCα₂^{-/-}-Gewebe (*C, F*) durchgeführt. *G-L.* PKCγ (rot) wurde verwendet, um die innere/ventrale Lamina II (Lamina II_{iv}) und die äußere Lamina III (Lamina III_o) zu färben. Zur Färbung der NO-GC Isoformen wurde der GCβ₁-Antikörper (grün) auf WT- (*G, J*), GCα₁^{-/-} (*H, K*) und GCα₂^{-/-}-Gewebe (*I, L*) verwendet. Maßstabsbalken: 50 μm.

In **Abb. 3.4** ist ein exemplarischer Western Blot zum Nachweis der NO-GC mit Hilfe des GCβ₁-Antikörpers im Rückenmark von WT-, GCα₁^{-/-}- und GCα₂^{-/-}-Mäusen dargestellt (*A*). In *B* ist die dazugehörige Quantifizierung abgebildet (Mittelwerte ± SEM aus 4 Western Blots). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Western Blot bestätigt das Mengenverhältnis der NO-GC2- und NO-GC1-Expression aus der Immunfluoreszenz: Im Proteinextrakt aus GCα₁^{-/-}-Gewebe beträgt die relative GCβ₁-Expression 67 % ± 8,5 % im Vergleich zum WT-Gewebe. Im GCα₂^{-/-}-Gewebe wurden 47,5 % ± 5,2 % im Vergleich zur WT-Menge detektiert.

Ergebnisse

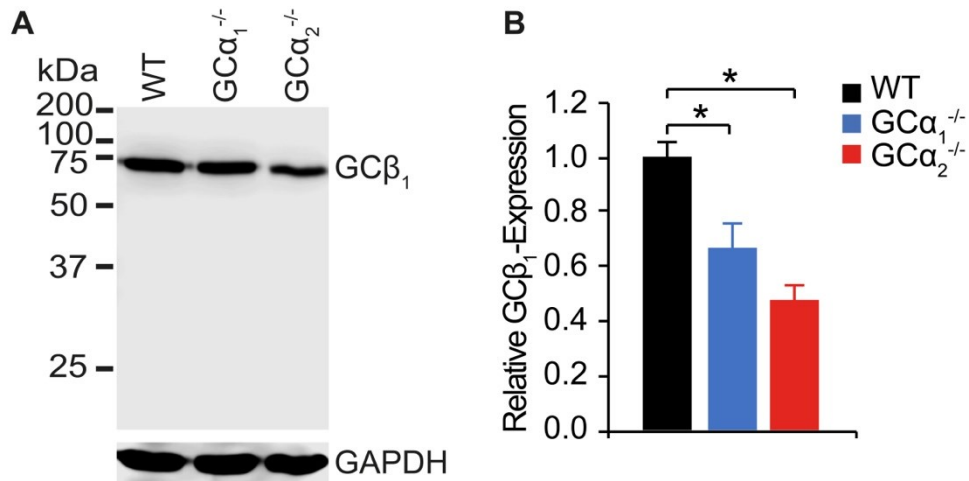


Abb. 3.4: Western Blot Analyse der Proteinexpression der NO-GC in Rückenmarkspalten von WT-, GCα₁^{-/-}- und GCα₂^{-/-}-Mäusen. Für die Detektion wurde ein Antikörper gegen die GCβ₁-Untereinheit verwendet, daher ist auf GCα₁^{-/-}- die NO-GC2 und auf GCα₂^{-/-}-Gewebe die NO-GC1 detektiert worden. **A.** Western Blot mit dem GCβ₁-Antikörper an Proteinextrakten aus WT-, GCα₁^{-/-}- und GCα₂^{-/-}-Mäusen (75 kDa) und GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle. **B.** Quantifizierung der Proteinbanden aus vier unterschiedlichen Western Blots, normiert auf den Wildtyp, dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 im Rückenmark wurde eine In-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen die GCα₁- und GCα₂-Untereinheit durchgeführt. Wie in **Abb. 3.5** gezeigt, bindet die GCα₁-Sonde nur in wenigen Zellen im Dorsalhorn des Rückenmarks (**A**) und nicht auf GCα₁^{-/-}-Gewebe (**C**). Die Sonde zur Detektion der GCα₂-Sonde bindet in deutlich mehr Zellen des Dorsalhorns auf WT-Gewebe (**B**) und nicht auf GCα₂^{-/-}-Gewebe (**D**).

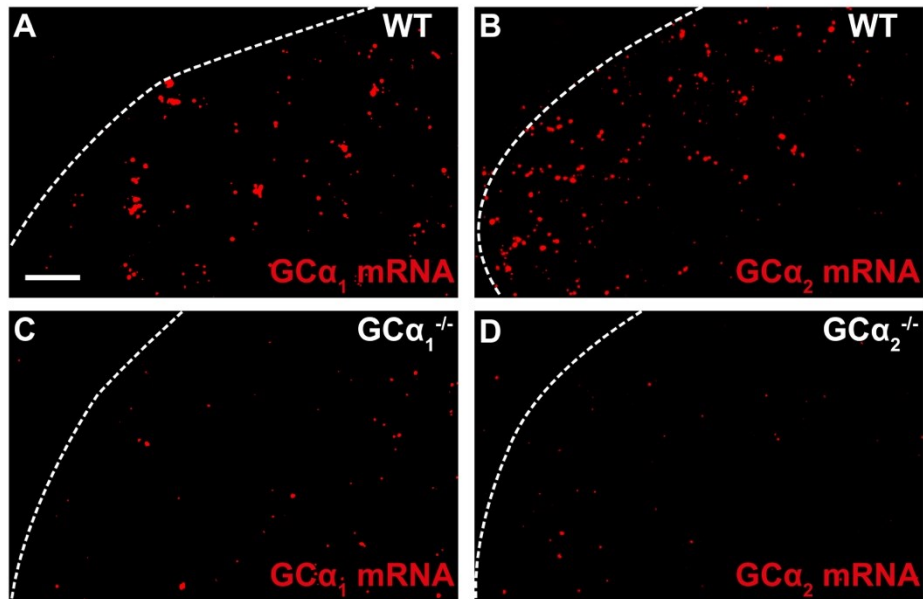


Abb. 3.5: In-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen die $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Untereinheit auf Rückenmarksschnitten von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. Die graue Substanz ist mit einer weißen Linie umrandet. In rot zu sehen ist das Hybridisierungssignal der $GC\alpha_1$ -mRNA auf WT ($GC\alpha_1$ -) (A) oder $GC\alpha_1^{-/-}$ -Schnitten (C) und der $GC\alpha_2$ -mRNA auf WT ($GC\alpha_2$ -) (B) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe (D). Maßstabsbalken: 25 μ m.

Um die Expression der NO-GC Isoformen im Rückenmark genauer zu charakterisieren, wurde die In-situ-Hybridisierung der $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Sonde mit je einer Sonde zur Detektion der größten neuronalen exzitatorischen (VGLUT2) und inhibitorischen Population (VGAT) kombiniert (**Abb. 3.6**). In beiden Subpopulationen (jeweils grün dargestellt) konnte eine Expression der $GC\alpha_1$ -mRNA (rot) detektiert werden. In C ist die prozentuale Verteilung der $GC\alpha_1$ -Expression in den inhibitorischen oder exzitatorischen Subpopulationen (VGAT- oder VGLUT2-positiv) abgebildet. Die $GC\alpha_1$ -mRNA ist zu 10,1 % \pm 2,2 % in exzitatorischen und zu 71,7 % \pm 5 % in inhibitorischen Neuronen exprimiert (n = 4-5).

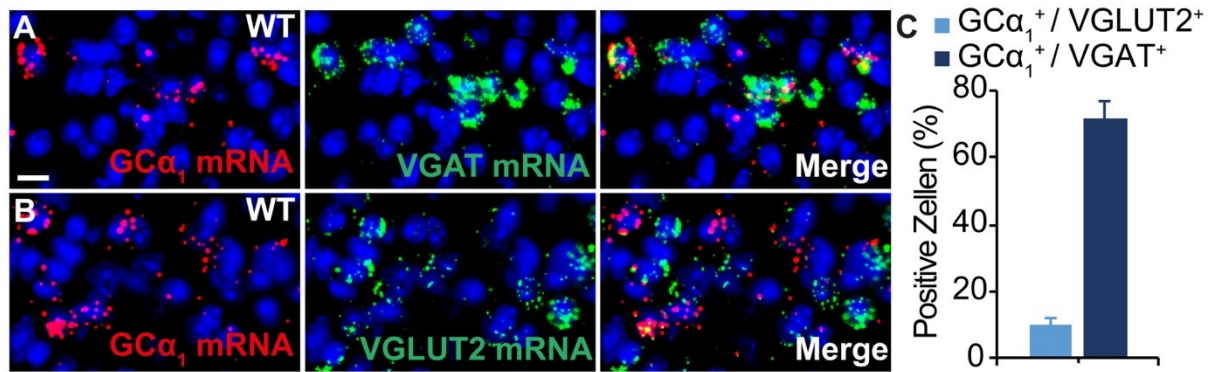


Abb. 3.6: In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde gegen die GC α_1 -Untereinheit und Sonden zur Färbung der exzitatorischen Neurone (Vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2)) und der inhibitorischen Neurone (Vesicular GABA transporter (VGAT)). A. Hybridisierungssignal der GC α_1 -mRNA (rot) und einer Sonde gegen VGAT (grün). B. Hybridisierungssignal der GC α_1 -mRNA (rot) und einer Sonde gegen VGLUT2 (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 10 μ m. (C) Quantifizierung der Expression von GC α_1 in exzitatorischen (VGLUT2) und inhibitorischen (VGAT) Neuronen (n = 4-5). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Abb. 3.7 zeigt die Expression der GC α_2 -mRNA zusammen mit den inhibitorischen (A) oder exzitatorischen Markern (B) auf WT-Gewebe. Auch die GC α_2 -Sonde (rot) kann in VGAT- und VGLUT2-positiven (jeweils grün) Neuronen detektiert werden. In C ist die prozentuale Verteilung der GC α_2 -mRNA in VGAT- und VGLUT2-positiven Neuronen abgebildet. Die GC α_2 -mRNA wird zu 54,7 % \pm 6,8 % in exzitatorischen und zu 47,9 % \pm 4 % in inhibitorischen Neuronen exprimiert (n = 3-4).

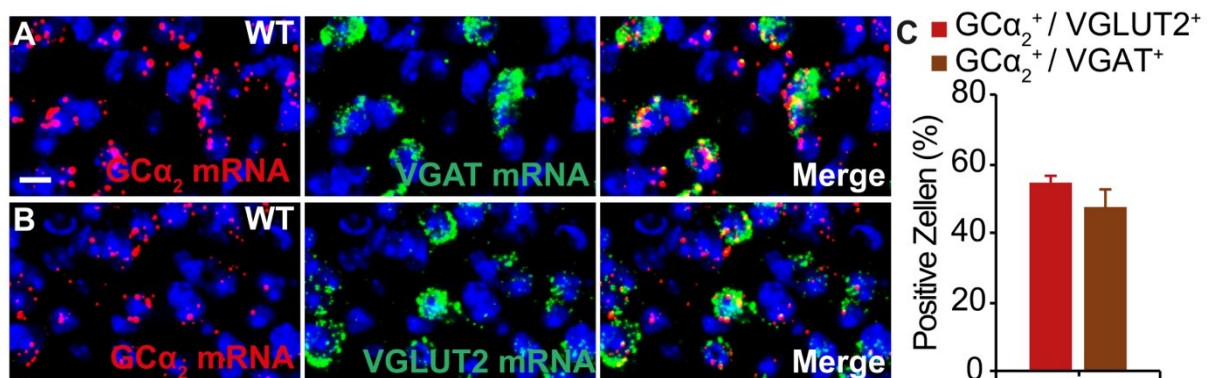


Abb. 3.7: In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde gegen die GC α_2 -Untereinheit und Sonden zur Färbung der exzitatorischen Neurone (VGLUT2) und der inhibitorischen Neurone (VGAT). A. Hybridisierungssignal der GC α_2 -mRNA (rot) und einer Sonde gegen VGAT (grün). B. Hybridisierungssignal der GC α_2 -mRNA (rot) und einer Sonde gegen VGLUT2 (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 10 μ m. (C) Quantifizierung der Expression von GC α_2 in exzitatorischen (VGLUT2) und inhibitorischen (VGAT) Neuronen (n = 3-4); die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Um die Charakterisierung der Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 im Rückenmark abzuschließen, wurde die $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -mRNA in einer doppelten In-situ-Hybridisierung mit dem NK1-Rezeptor (NK1R, *Tacr1*) gefärbt. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die $GC\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC in Projektionsneuronen exprimiert wird (Ding and Weinberg, 2006; Schmidtko et al., 2008a). Wie in der Einleitung beschrieben, liegen diese meist in Lamina I und sind zu 80 % NK1R-positiv (Spike et al., 2003). Im Vergleich zur Abb. 3.6 und 3.7 wurde für die hier gezeigten Bilder eine $GC\alpha_1$ - und $GC\alpha_2$ -Typ6-Sonde verwendet und eine NK1R-Typ1-Sonde. In **Abb. 3.8** ist eine Detailaufnahme der Doppelfärbungen dargestellt. In *A* und *B* konnte sowohl die $GC\alpha_1$ - als auch die $GC\alpha_2$ -mRNA (grün) in NK1R-positiven Neuronen nachgewiesen werden (rot).

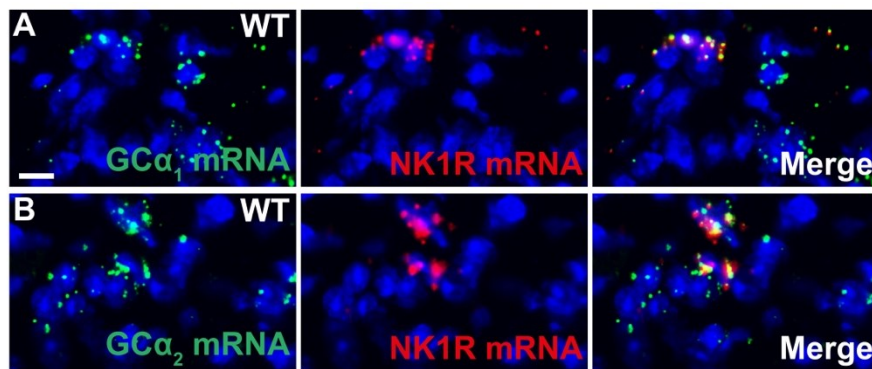


Abb. 3.8: Dargestellt ist die In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde gegen die $GC\alpha_1$ - (A) oder die $GC\alpha_2$ -Untereinheit (B) und einer Sonde zur Färbung der Projektionsneurone (NK1R). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 10 μ m.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen konnte die Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 im Hinterhorn des Rückenmarks weiter charakterisiert werden. Während die NO-GC1 vorwiegend in inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird, verteilt sich die Expression der NO-GC2 in gleichem Maße auf inhibitorische und exzitatorische Interneurone. Zudem werden beide Isoformen in den NK1R-positiven Projektionsneuronen exprimiert.

3.1.2 Zelluläre Lokalisation der NO-GC1 und NO-GC2 in Spinalganglien

Zur Aufklärung der zellulären Lokalisation der NO-GC Isoformen in Spinalganglien wurden immunhistochemische Färbungen mit dem spezifischen Antikörper gegen die $GC\beta_1$ -Untereinheit der NO-GC in Gewebe von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen

Ergebnisse

durchgeführt. Des Weiteren wurde ein Marker für Neurone (NeuN), ein endothelialer Marker (CD31) und ein Marker für Satellitenzellen (GS) eingesetzt. Wie in **Abb. 3.9 A-C** zu erkennen ist, färbt der GC β_1 -Antikörper (grün) auf WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe nur nicht-neuronale Zellen, was die Beobachtungen aus früheren Arbeiten bestätigt (Schmidtko et al., 2008a). Anhand der Doppelfärbungen mit CD31 (**Abb. 3.9 D-F**) wird deutlich, dass in WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe ein Teil der GC β_1 -Immunfluoreszenz im Gefäßendothel lokalisiert ist. Die Doppelfärbungen mit GS (**Abb. 3.9 G-I**) zeigen, dass auf WT- und GC $\alpha_1^{-/-}$ -Gewebe GC β_1 und GS kolokalisiert sind, während auf GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe keine Kolokalisation erkennbar ist.

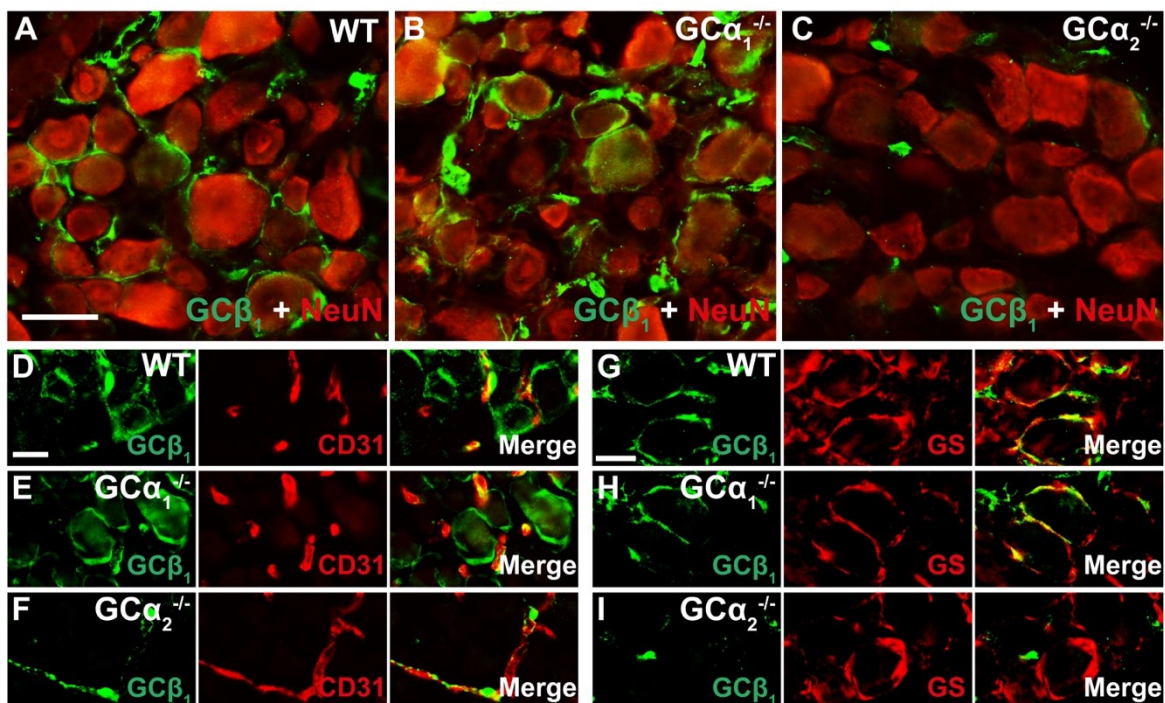


Abb. 3.9: Immunfluoreszenzfärbung der NO-GC auf Schnitten der Spinalganglien von WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind Doppelfärbungen mit einem neuronalen Marker, einem endothelialen Marker und einem Marker für Satellitenzellen. Für die NO-GC Färbung wurde ein Antikörper gegen die GC β_1 -Untereinheit verwendet (grün), so dass auf GC $\alpha_1^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC2 und auf GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe die NO-GC1 gefärbt ist. Die Marker sind in rot dargestellt. **A, B, C.** Doppelte Immunfluoreszenzfärbung der GC β_1 -Untereinheit mit dem neuronalen Marker NeuN. **D, E, F.** Doppelfärbung der GC β_1 und des Gefäßendothels (CD31). **G, H, I.** Doppelte Immunfluoreszenz der GC β_1 und der Satellitenzellen (Glutaminsynthase, GS). Eine Kolokalisation wird durch eine gelbe Färbung angezeigt. Maßstabsbalken: (A-C): 50 μm ; (D-F): 25 μm ; (G-I): 25 μm .

Die Expressionsdaten der NO-GC Isoformen in den DRGs zeigen, wie schon die Daten der Lokalisation im Rückenmark, dass die NO-GC1 und NO-GC2 ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen. Während die NO-GC2 in

Satellitenzellen und im Endothel der Spinalganglien exprimiert wird, konnte die NO-GC1 nur im Endothel detektiert werden.

3.1.3 Basale Charakterisierung von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses der NO-GC Isoformen auf die Schmerzverarbeitung, wurde das Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen und den entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwistern (WT) untersucht. Die globalen KO-Tiere sind nicht belastet, sie sind lebensfähig, vermehrungsfähig, weisen eine normale Körpergröße auf und zeigen auch sonst keine Verhaltensauffälligkeiten (Mergia et al., 2006). Da die Tiere heterozygot gezüchtet, aber nur WT- und KO-Tiere untersucht wurden, musste eine Genotypisierung (Kapitel 2.4.2) durchgeführt werden (**Abb. 3.10**). Die WT-Tiere der $GC\alpha_1^{-/-}$ -Zucht (*A*, linke Seite) weisen eine DNA-Bande bei 879 Basenpaaren (bp) auf (linke Spur). Für die Deletion wurde eine DNA-Bande mit der Größe von 997 bp amplifiziert (rechte Spur). Die amplifizierte Bande der Deletion ist im Vergleich zur WT-Bande größer, da die Primer zur Erkennung der Deletion so in der Erstpublikation verwendet wurden und in einem Locus binden, der nur in den KO-Tieren vorliegt. Heterozygote Tiere weisen beide DNA-Banden auf (mittlere Spur). Die NO-GC1-Tiere wurden mit einer Verteilung von 56 % heterozygoten, 26 % WT- und 18 % KO-Tieren geboren (*A*, rechte Seite) ($n = 117$). Die WT-Tiere der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Zucht (*B*, linke Seite) zeigen ein DNA-Fragment mit 760 bp (linke Spur). Die Deletion der NO-GC2 resultiert in einem 513 bp großen Amplifikat (rechte Spur). Auch hier weisen die heterozygoten Tiere beide Amplifikate auf (mittlere Spur). Für die $GC\alpha_2^{-/-}$ -Zucht konnte eine Geburtenrate von 57 % heterozygoten, 23 % WT- und 20 % KO-Tieren beobachtet werden (*B*, rechte Seite) ($n = 84$). Damit entsprach die Geburtenrate bei beiden KO-Linien ungefähr der Mendel'schen Verteilung.

Ergebnisse

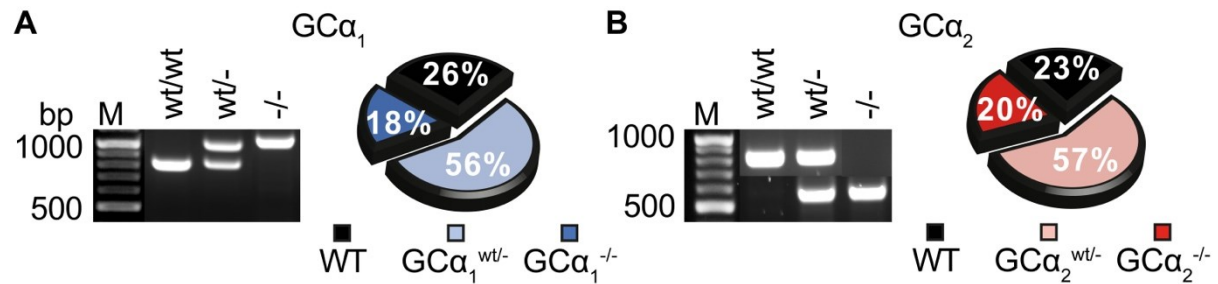


Abb. 3.10: Genotypisierung von $GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen und deren Wurfgeschwister und prozentuale Verteilung der Genotypen in der Zucht. A. Genotypisierung der $GC\alpha_1^{-/-}$ -Tiere: WT- $GC\alpha_1$: 879 bp; heterozygot: 879 + 997 bp; KO: 997 bp. Auf der rechten Seite ist die prozentuale Verteilung der Geburtenrate der NO-GC1-Zucht dargestellt (n = 117). B. Genotypisierung der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere (WT- $GC\alpha_2$: 760 bp; heterozygot: 760 + 513 bp; KO: 513 bp) und Auswertung der prozentualen Verteilung der Geburtenrate der NO-GC2-Zucht (n = 84). Dargestellt sind die Mittelwerte.

3.1.3.1 Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien

Wie in **Abb. 3.11** dargestellt ist, weist das Rückenmark der $GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse keine erkennbaren morphologischen Veränderungen im Vergleich zum WT-Gewebe auf. Um sowohl die Größe des Rückenmarks als auch die Struktur der verschiedenen "schmerzrelevanten" Laminae des Dorsalhorns zu bestimmen, wurden verschiedene bekannte Marker-Färbungen an $GC\alpha_1^{-/-}$ und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe durchgeführt und mit dem Gewebe der WT-Wurfgeschwister verglichen. Die Verteilung der Neuronen (NeuN, rot) und der Gliazellen (GFAP, grün) (A-C) und die Expression des inhibitorischen Markers GAD67 (D-F) ist im Rückenmark der KO-Tiere vergleichbar mit der Expression im WT-Gewebe. Um die ersten drei Laminae zu vergleichen, wurden CGRP (Lamina I), IB4 (Lamina II) und $PKC\gamma$ (Lamina III) auf WT- und KO-Gewebe gefärbt. In **Abb. 3.11 G-I** ist sehr gut zu erkennen, dass die Färbungen für CGRP, IB4 und $PKC\gamma$ direkt aneinander anschließen und kein Unterschied zwischen der Strukturierung der Laminae zwischen WT- (G), $GC\alpha_1^{-/-}$ (H) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (I) zu erkennen ist.

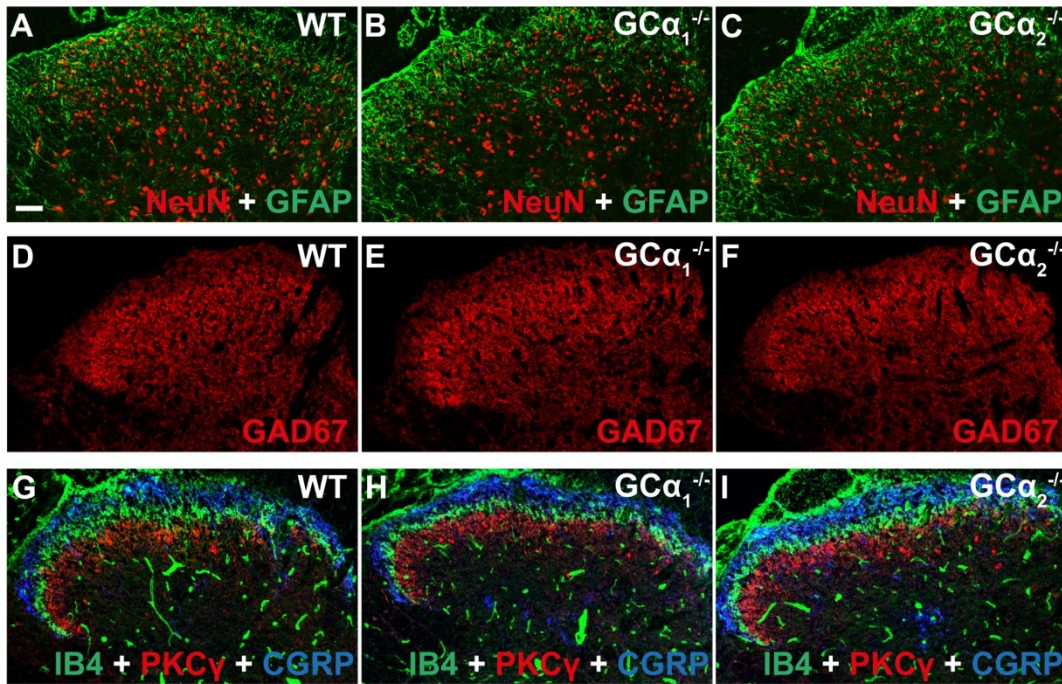


Abb. 3.11: Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung des Rückenmarks von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. A, B, C. Immunfluoreszenzfärbung der Neurone (Neuronal Nuclei (NeuN), rot) und der Astrozyten (Glial fibrillary acidic protein (GFAP), grün). D, E, F. Färbung der inhibitorischen Zellen im Rückenmark mit dem Marker Glutamat-Decarboxylase (GAD67). G, H, I. Färbung der Marker *calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP, blau), PKC γ (rot) und Isolectin B4 (IB4, grün). Maßstabsbalken: 50 μ m.

Um zu untersuchen, ob die Deletion der NO-GC1 oder NO-GC2 mit einer Regulation der NOS-1 Expression im Rückenmark verbunden ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von NOS-1 auf Schnitten von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen durchgeführt (n = 3). In **Abb. 3.12** ist in A, B und C exemplarisch die Immunfluoreszenz der NOS-1 im Dorsalhorn von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen dargestellt. Die graue Substanz ist mit einer durchgezogenen Linie und die Grenze zwischen Lamina II_o und Lamina II_{i/d} sowie zwischen Lamina II_{i/d} und Lamina II_{i/v} jeweils mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Zur Lokalisation der Lamina II wurde eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung mit IB4 durchgeführt. Es kann keine auffällige Änderung der Expression zwischen WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tieren erkannt werden. Das bestätigt auch die Quantifizierung der Immunfluoreszenz in D. Zur Quantifizierung wurden die NOS-1-positiven Neurone ausgezählt und auf die Expression im WT-Gewebe normiert.

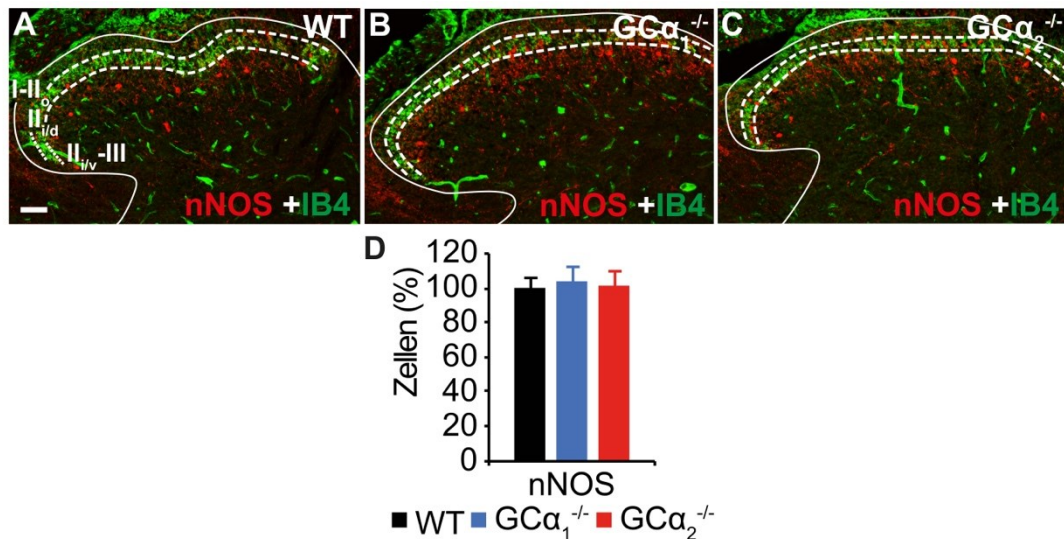


Abb. 3.12: Immunfluoreszenzfärbung der NOS-1 und IB4 im Rückenmark von WT- (A), GC $\alpha_1^{-/-}$ (B) und GC $\alpha_2^{-/-}$ (C) Tieren. Die graue Substanz ist mit einer weißen Linie abgegrenzt, die Grenzen der Lamina II_o und Lamina II_i ist mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Maßstabsbalken: 50 μ m. D. Quantifizierung der basalen NOS-1 Expression im Rückenmark der NO-GC1 und NO-GC2 KO-Tieren, bezogen auf die Expression im WT-Gewebe (n = 3; 6 Schnitte mit ca. 50 μ m Abstand); dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM

Darüber hinaus wurde auch die Verteilung unterschiedlicher neuronaler Zell- Populationen in den Spinalganglien der NO-GC1 und NO-GC2 KO-Mäuse untersucht. Der Anteil Substanz P-, IB4- und NF200-positiver DRG-Neurone war bei WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen vergleichbar (**Abb. 3.13**).

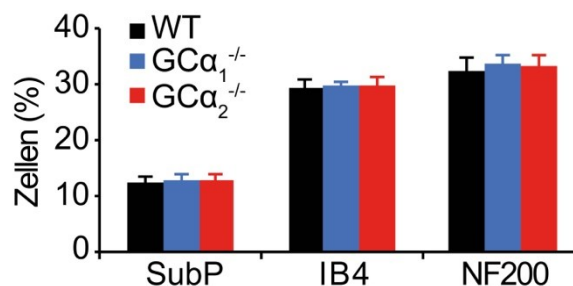


Abb. 3.13: Immunhistochemische Charakterisierung der DRG-Neuronen-Populationen an WT-, GC $\alpha_1^{-/-}$ und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Gewebe. Dargestellt ist der Anteil Marker-positiver DRG-Neurone, bezogen auf die Gesamtpopulation; es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt; n = 4.

3.1.3.2 Expression der GC α_1 - und GC α_2 -mRNA

In der Erstpublikation der NO-GC1 und NO-GC2 KO-Tiere wurde beschrieben, dass die Isoformen im Lungen- und Hirngewebe nicht kompensatorisch reguliert werden (Mergia et al., 2006). In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression der GC α_1 und GC α_2 im Rückenmark mittels qPCR analysiert (**Abb. 3.14**). Als Referenzgen wurde GAPDH

verwendet. Die Daten wurden auf die Expression der $GC\alpha_1$ normiert. Es konnte in den $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäusen keine $GC\alpha_1$ -mRNA und in den $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen keine $GC\alpha_2$ -mRNA nachgewiesen werden. In den $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen ist die jeweils andere Isoform nicht kompensatorisch hochreguliert. Die mRNA-Expression der $GC\alpha_2$ -Untereinheit liegt ca. dreifach höher im Vergleich zur $GC\alpha_1$ -Expression. Die mRNA der $GC\beta_1$ -Untereinheit wird in allen untersuchten Mauslinien gleich stark exprimiert.

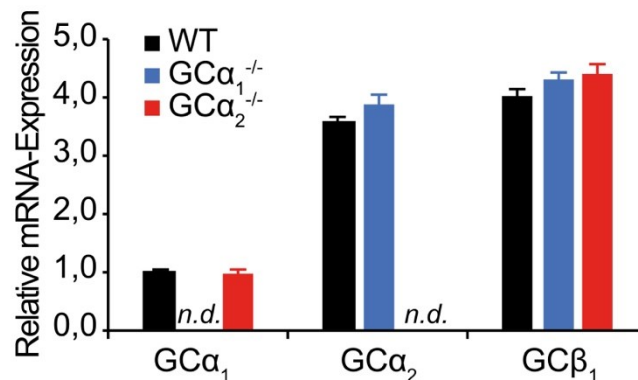


Abb. 3.14: mRNA-Expression der drei NO-GC-Untereinheiten ($GC\alpha_1$, $GC\alpha_2$, $GC\beta_1$) im Rückenmark von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. Die mRNA der $GC\alpha_1$ konnte nicht im Rückenmark der $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse, und die mRNA der $GC\alpha_2$ nicht im Gewebe der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse detektiert werden; $n = 3$; n.d. = nicht detektiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.1.3.3 Motorische Koordination

Die in dieser Arbeit gezeigten *in-vivo* Untersuchungen des Schmerzverhaltens werden mit Hilfe der motorischen Reaktionen der Versuchstiere quantifiziert. Daher ist es eine Voraussetzung, die motorische Koordination der Versuchstiere zu überprüfen, wozu der Rota-Rod-Test verwendet wurde. Es konnte weder ein Defekt in der Motorik der $GC\alpha_1^{-/-}$ -, noch in der Motorik der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere (Median der Latenzzeiten bei WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tieren: jeweils 120 Sekunden) festgestellt werden.

3.1.4 Nozizeptives Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen

3.1.4.1 Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in Modellen für akute Schmerzen

Um das akute nozizeptive Verhalten der $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse zu bestimmen, wurden verschiedene Modelle mit thermischer und mechanischer Stimulation verwendet. In **Abb. 3.15** sind die Daten der $GC\alpha_1^{-/-}$ - (A) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse (B) im Hot-

Ergebnisse

Plate-Test dargestellt. Für keine der drei untersuchten Temperaturen konnte ein Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren gemessen werden. Auch im Cold-Plate-Test konnte zwischen WT- und KO-Tieren weder in der ersten Kälte-Reaktion, noch in der Summe aller Reaktionen in fünf Minuten ein Unterschied detektiert werden (**Abb. 3.15, C-F**).

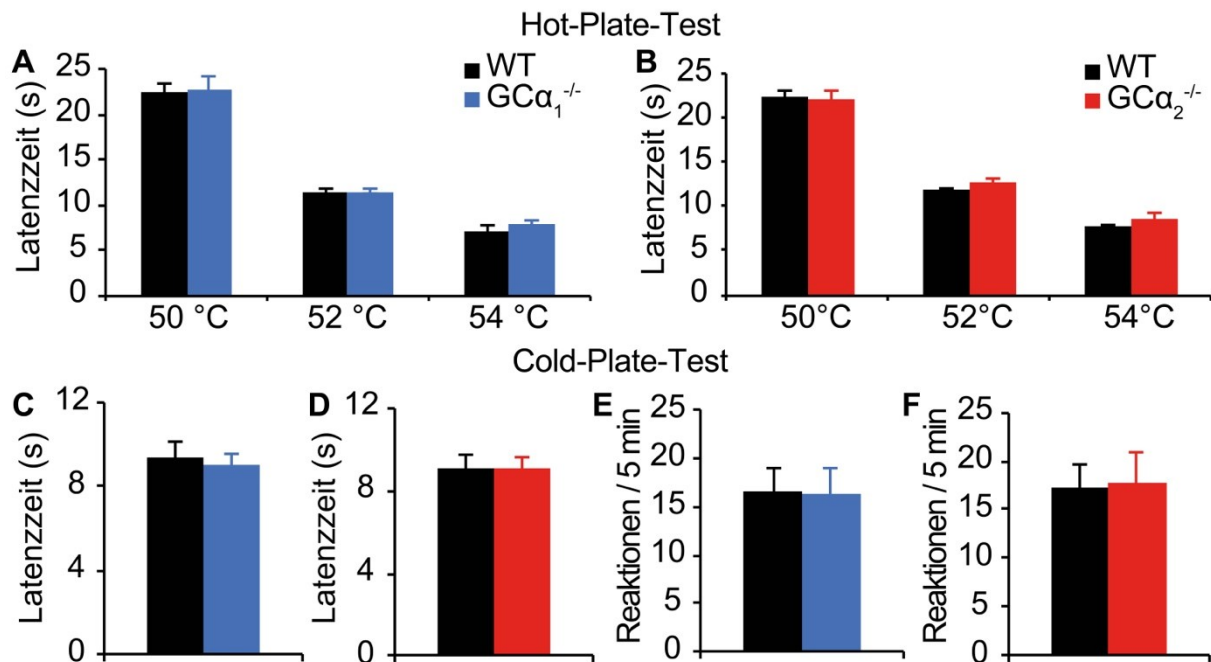


Abb. 3.15: Akutes nozizeptives Verhalten von GC $\alpha_1^{-/-}$ und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Hot-Plate-Test, der zur Untersuchung der akuten Hitze-Nozizeption dient und im Cold-Plate-Test, der zur Untersuchung der akuten Kälte-Nozizeption dient. A, B. Im Hot-Plate-Test wurden drei Temperaturen untersucht: 50°C, 52°C und 54°C. C-F. Im Cold-Plate-Test wurden die Tiere bei einer Temperatur von 2°C untersucht. Es wurde die Latenzzeit bis zur ersten Reaktion bestimmt (A, B, C, D) und die Reaktionen in fünf Minuten wurden notiert (E, F). n = 12. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Abschließend wurde das Verhalten der GC $\alpha_1^{-/-}$ und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Dynamic Plantar-Test nach akuter mechanischer Stimulation untersucht (**Abb. 3.16**). Auch in diesem Test zeigten die GC $\alpha_1^{-/-}$ und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse ein normales nozizeptives Verhalten.

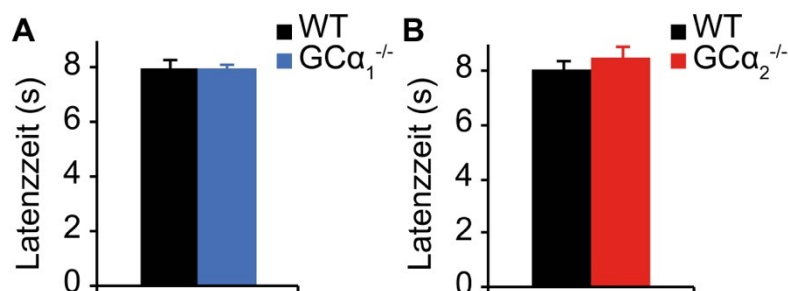


Abb. 3.16: Akutes nozizeptives Verhalten nach mechanischer Stimulation von GC $\alpha_1^{-/-}$ (A) und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (B) im Dynamic Plantar-Test. n = 8; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass der Verlust der NO-GC1 und NO-GC2 keinen Einfluss auf die Verarbeitung akuter thermischer und mechanischer Schmerzen hat.

3.1.4.2 Verhalten von $GC\alpha_1^{-/-}$ - und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in neuropathischen Schmerzmodellen

Um den Einfluss der NO-GC Isoformen auf die Verarbeitung neuropathischer Schmerzen zu untersuchen, wurden die globalen KO-Tiere der NO-GC1 und NO-GC2 in einem neuropathischen Schmerz-Modell, dem "Spared-nerve-injury"-Modell (SNI) charakterisiert. Wie in **Abb. 3.17** dargestellt, zeigten die $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse nach der SNI-Operation zunächst, wie die WT-Tiere, eine abnehmende Latenzzeit bis Tag elf (A). Nach 14 Tagen nahm in den $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäusen die Latenzzeit wieder zu, während sie in WT-Mäusen weitgehend konstant blieb. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant. Somit zeigten die $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen ein reduziertes neuropathisches Schmerzverhalten. Im Gegensatz zu den $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäusen, zeigten die $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den WT-Tieren keinen Unterschied in der Ausbildung der mechanischen Hyperalgesie nach der SNI-Operation (B). Die Latenzzeit beider Gruppen nahm bis Tag 14 nach SNI ab und blieb dann konstant niedrig bis zur Beendigung des Experiments.

Aus den hier gezeigten Daten kann gefolgert werden, dass die NO-GC1, aber nicht die NO-GC2, an der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen beteiligt ist.

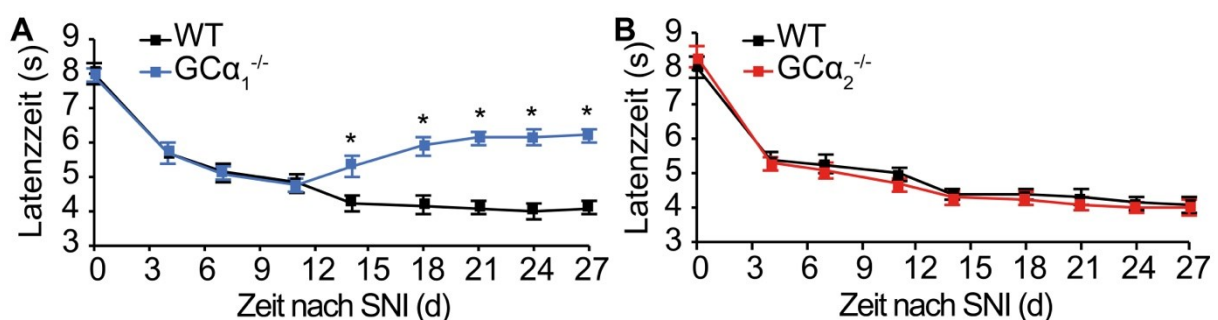


Abb. 3.17: Mechanische Hypersensitivität von $GC\alpha_1^{-/-}$ (A) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (B) im Vergleich zu WT-Tieren nach peripherer Nervenverletzung mittels "Spared nerve injury" (SNI). n = 8; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; d = Tage. * p < 0,05.

Um zu untersuchen, ob die Expression der NO-GC in DRGs oder im Rückenmark im Verlaufe einer Nervenverletzung reguliert wird, wurde die mRNA-Expression der $GC\alpha_1$ -, $GC\alpha_2$ - und $GC\beta_1$ -Untereinheit basal, sieben Tage und 14 Tage nach SNI

Ergebnisse

mittels qPCR untersucht. In **Abb. 3.18** sind die relativen mRNA-Werte der drei NO-GC-Untereinheiten in DRGs (A) und im Rückenmark (B) dargestellt. In den Spinalganglien und im Rückenmark konnte für keine der drei Untereinheiten der NO-GC eine Regulation detektiert werden.

Aus den hier gezeigten Daten kann geschlossen werden, dass die neuropathischen Signalwege im SNI-Modell keine mRNA-Regulation der NO-GC induzieren.

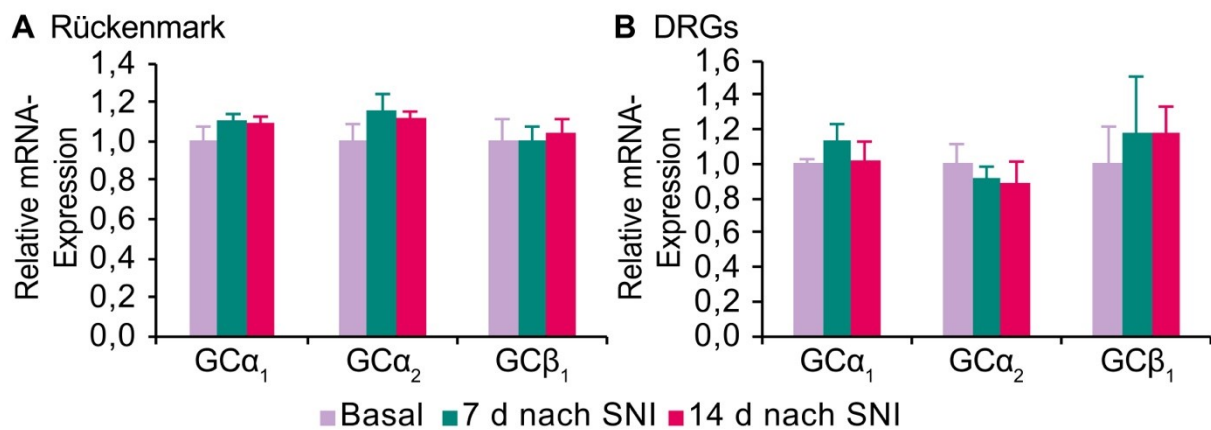


Abb. 3.18: Relative mRNA-Expression der GC α_1 -, GC α_2 - und GC β_1 -Untereinheiten nach Nervenverletzung (SNI) im Rückenmark und in DRGs. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet und es wurde das Gewebe von je drei bis vier Tieren pro Zeitpunkt betrachtet (basal (rosa), 7 Tage (grün) und 14 Tage (rot) nach SNI). n = 3-4; es ist jeweils der Mittelwert \pm SEM dargestellt; d = Tage.

Da die NO-GC1 KO-Tiere eine verringerte Latenzzeit im SNI-Modell gezeigt haben, wurde zur Bestätigung noch ein weiteres neuropathisches Schmerzmodell mit dieser Linie durchgeführt, das "Chronic constriction injury"-Modell (CCI). Im Vergleich zum SNI-Modell bilden die Tiere nach CCI sowohl eine mechanische als auch eine thermische Hyperalgesie aus. In **Abb. 3.19** ist in A die Messung der mechanischen, in B die Messung der thermischen Hyperalgesie dargestellt. In beiden Versuchen bildeten die NO-GC1 KO-Tiere zunächst eine Hyperalgesie aus, die mit den WT-Tieren vergleichbar war. Nach 21 Tagen zeigten die KO-Tiere jedoch eine, im Vergleich zum WT, signifikant längere Latenzzeit nach mechanischer Stimulation und nach 30 Tagen auch eine signifikant längere Latenzzeit nach thermischer Stimulation.

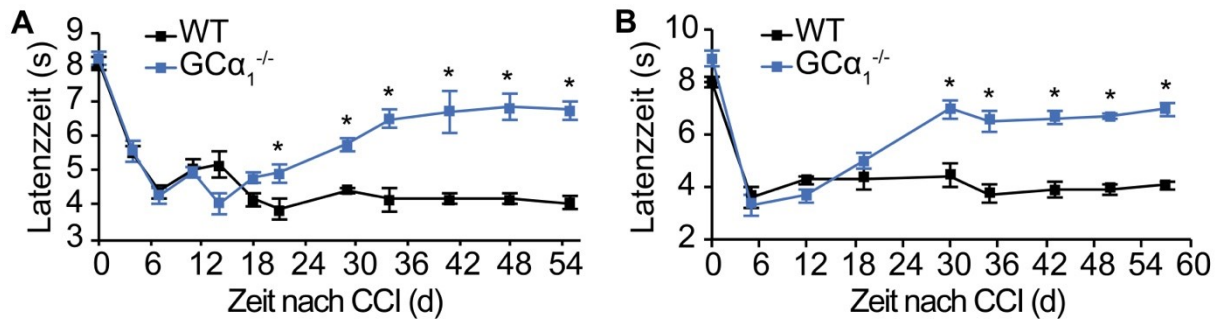


Abb. 3.19: Nozizeptives Verhalten von WT- und GC $\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse nach peripherer Nervenverletzung im "Chronic constriction injury"-Modell (CCI). A. Mechanische Allodynie nach CCI, gemessen mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer. B. Thermische Hyperalgesie nach CCI, gemessen mit der Hargreaves-Apparatur. n = 8; dargestellt sind die Daten als Mittelwerte \pm SEM; d = Tage. * p < 0,05.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnissen darauf hin, dass die GC α_1 an der Langzeitverarbeitung von neuropathischen Schmerzen essentiell beteiligt ist, jedoch keine Regulation der Expression in DRGs oder Rückenmark stattfindet.

3.1.4.3 Verhalten von GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen in Inflammatorischen Schmerzmodellen

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der NO-GC Isoformen bei der Verarbeitung von Entzündungsschmerzen wurde das Verhalten von GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung charakterisiert. In **Abb. 3.20** sind die Latenzzeiten vor und nach Zymosan-Injektion für die GC $\alpha_1^{-/-}$ - (A) und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere (B) dargestellt. Die GC $\alpha_1^{-/-}$ -Tiere zeigten nach Injektion keinen Unterschied im Schmerzverhalten verglichen mit den WT-Tieren: Beide Gruppen bildeten eine Hyperalgesie aus, die zwischen 4 und 7 Stunden ihr Maximum erreichte. Wie in **Abb. 3.20 B** dargestellt ist, entwickelten die WT- und die GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere eine vergleichbare Hyperalgesie in den ersten Stunden nach der Zymosan-Injektion, nach sechs, sieben und acht Stunden zeigten die GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere jedoch eine erhöhte Hypersensitivität im Vergleich zu den WT-Tieren.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die NO-GC2, jedoch nicht die NO-GC1, einen hemmenden Effekt auf die Verarbeitung von Zymosan-induzierten Entzündungsschmerzen hat.

Ergebnisse

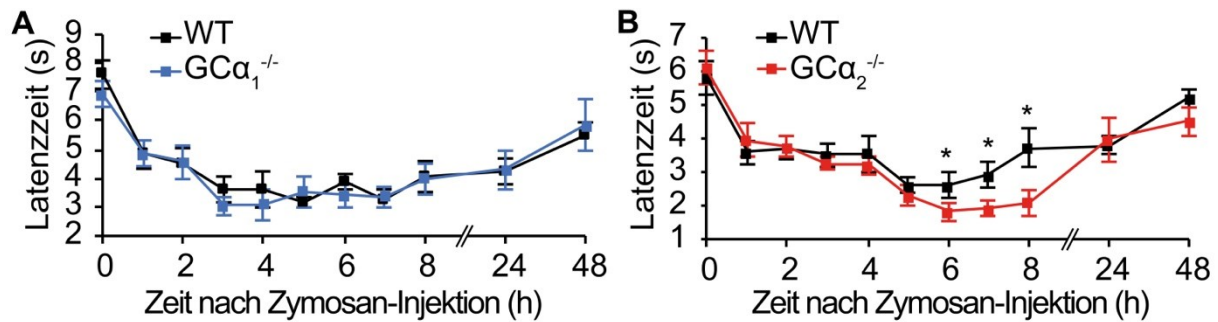


Abb. 3.20: Mechanische Hyperalgesie von WT-, $GC\alpha_1^{-/-}$ (A) und $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen (B) nach Injektion von Zymosan (15 μ l einer 5 mg/ml Suspension) in eine Hinterpfote. n = 8; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; h = Stunden. * p < 0,05.

Um zu untersuchen, ob die Expression der NO-GC-Untereinheiten im Rückenmark und in den Spinalganglien im Verlauf der Entzündungsreaktion reguliert wird, wurde eine qPCR mit basalem Gewebe und mit Gewebe vier und sieben Stunden nach Zymosan-Injektion durchgeführt. In **Abb. 3.21** sind die relativen mRNA-Werte der qPCR aus dem Rückenmark (A) und aus den Spinalganglien (B) dargestellt. In beiden Geweben zeigt nur die $GC\alpha_2$ eine Regulation vier Stunden nach der Zymosan-Injektion. Diese Hochregulation der $GC\alpha_2$ -Untereinheit nach Zymosan-Injektion untermauert die beschriebene erhöhte mechanische Hyperalgesie der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse.

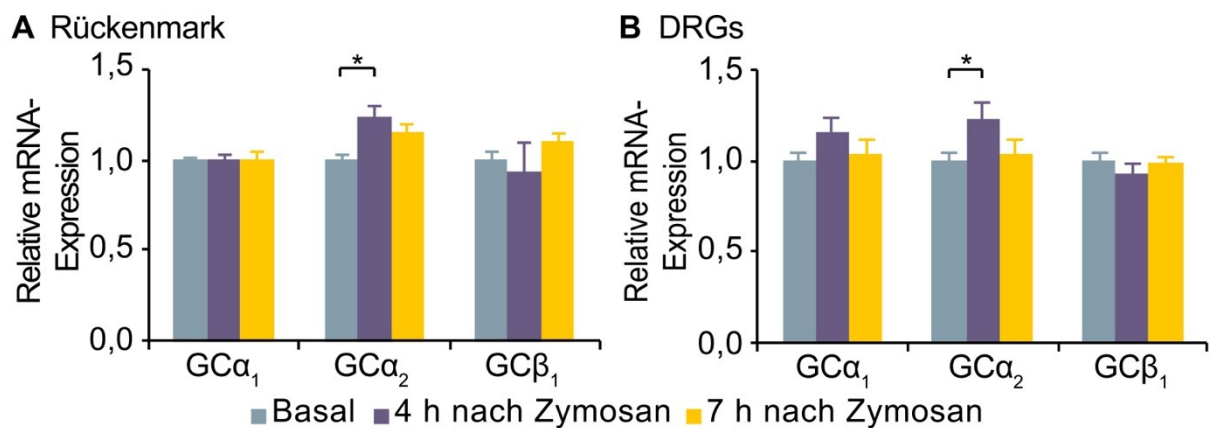


Abb. 3.21: Relative Expression der $GC\alpha_1$ -, $GC\alpha_2$ - und $GC\beta_1$ -mRNA im Rückenmark und in DRGs nach Induktion einer Pfotenentzündung. Nach der Injektion von Zymosan (15 μ l einer 5 mg/ml Suspension) in eine Hinterpfote wurde das Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. n = 4; dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM; h = Stunden. * p < 0,05.

Da die $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere ein verändertes Schmerzverhalten im Vergleich zum WT nach der Zymosan-Injektion gezeigt haben, wurde diese Mauslinie in weiteren Entzündungsmodellen untersucht. Zunächst wurden die Tiere im CFA-Modell

charakterisiert. Wie in **Abb. 3.22** dargestellt, konnte im CFA-Modell auch eine verstärkte Hyperalgesie der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zum WT gemessen werden.

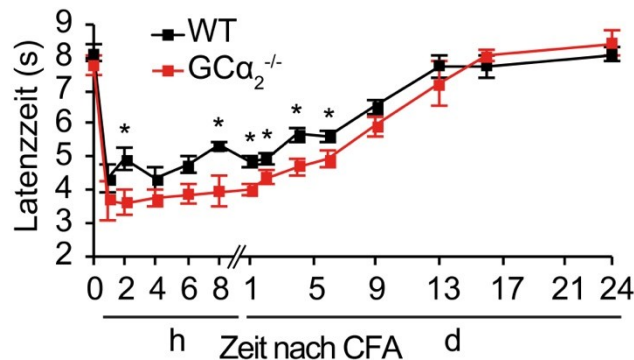


Abb. 3.22: Mechanische Hyperalgesie von $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen nach Injektion einer CFA-Lösung in eine Hinterpfote. $n = 8$; dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM; h = Stunden, d = Tage. * $p < 0,05$.

Diese Daten bestätigen, dass die NO-GC2 einen inhibitorischen Einfluss auf die Verarbeitung persistierender inflammatorischer Schmerzen hat.

3.1.4.4 Verhalten von $GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Formalin-Test

Um den weiteren Einfluss der NO-GC2 auf die Verarbeitung inflammatorischer Reize zu ermitteln, wurden die $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Formalin-Test untersucht. In **Abb. 3.23** ist die Leckzeit der WT- und der $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere nach Formalin-Injektion dargestellt. In *A* sind die Leckzeiten im Zeitverlauf aufgeführt, in *B* die statistische Auswertung der zwei Phasen. Weder die Phase 1 (0-10), die durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle gebildet wird (McNamara et al., 2007), noch die Phase 2 (11-60), in der es zu vermehrten Sensibilisierungsvorgängen im Rückenmark kommt, zeigt signifikante Unterschiede zwischen den $GC\alpha_2^{-/-}$ - und den WT-Tieren (*B*). Demzufolge scheint die NO-GC2 nicht an der schnellen Schmerzsensibilisierung nach Formalin-Injektion beteiligt zu sein.

Ergebnisse

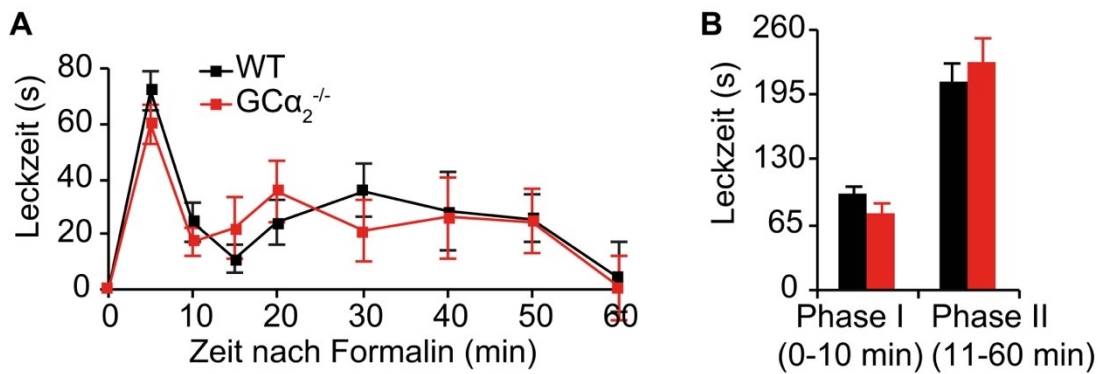


Abb. 3.23: Formalin-Test bei WT- und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. (A) Darstellung des Leckverhaltens im Zeitverlauf nach Formalin-Injektion (15 μ l einer 0,5 %igen Lösung). (B) Darstellung der zwei unterschiedlichen Phasen des Formalin-Tests als Summe des Leckverhaltens. n = 8; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

3.1.4.5 Verhalten von GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen im Capsaicin-Test

Schließlich wurde das Verhalten der GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Capsaicin-Test, einem weiteren Modell der schnellen Schmerzsensibilisierung, untersucht. Wie in **Abb. 3.24** gezeigt, weisen die GC $\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren in fünf Minuten keine signifikant veränderte Summe der Leckzeit auf.

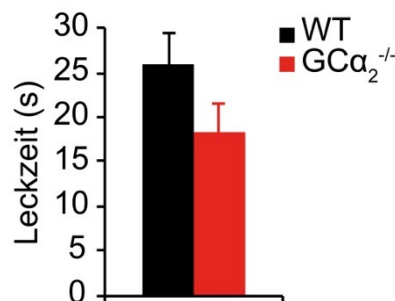


Abb. 3.24: Capsaicin-Test bei WT- und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt ist das Leckverhalten nach Capsaicin-Injektion (5 μ g in 10 μ l) in 5 Minuten. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die NO-GC2 nicht an der Verarbeitung von Formalin- oder Capsaicin-vermittelten Entzündungsschmerzen beteiligt ist.

Die Daten aus den Studien mit den GC $\alpha_1^{-/-}$ - und GC $\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen skizzieren eine sehr spezifische Verteilung der NO-GC Isoformen im schmerzrelevanten Gewebe und teilweise gegensätzliche Funktionen bei der Verarbeitung von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen. Um zu untersuchen, ob die beteiligten Signalkaskaden im Rückenmark lokalisiert sind, wurde eine konditionelle KO-Linie (cKO) gezüchtet, in

der die NO-GC1 oder NO-GC2 nur in Rückenmarksneuronen ausgeschaltet wurde ($Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ und $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$). Die Zucht und Charakterisierung dieser Linien werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

3.2 Charakterisierung von $Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ - und $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäusen

3.2.1 Zucht der $Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ - und $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse

Zur Analyse, ob die veränderte Schmerzwahrnehmung der globalen KO-Tiere auf die Expression der NO-GC1 und NO-GC2 im Dorsalhorn des Rückenmarks zurück zu führen ist, wurden cKO-Mäuse mit spezifischer Deletion in Dorsalhorn-Neuronen generiert. Hierzu wurden geflochte Mäuse ($GC\alpha_1^{fl/fl}$ und $GC\alpha_2^{fl/fl}$) mit Lbx_1 -Cre Mäusen gekreuzt, bei denen die Dorsalhorn-Neurone, aber auch Neurone im dorsalen Teil des Gehirns Cre-positiv sind (Sieber et al., 2007). Zunächst wurde überprüft, ob die Cre-Expression im Rückenmark wirklich nur im Dorsalhorn liegt, indem die $Lbx_1^{Cre/wt}$ -Tiere mit einer rot fluoreszierenden Reporter-Linie verpaart wurden (tdTomato). In **Abb. 3.25** ist das Rückenmark einer Lbx_1 -tdTomato-Maus aus der beschriebenen Zucht zu sehen (A). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Lbx_1 -positiven Zellen das Dorsalhorn betreffen. Zudem ist in B die Genotypisierung der Reporter-Mäuse dargestellt. In der oberen Spur ist die PCR der Cre-Rekombinase dargestellt. Es können zwei Banden detektiert werden, da die PCR ein internes Kontrollgen bei 400 bp amplifiziert (CB1). Das Cre-Amplifikat erscheint bei 250 bp. In der unteren Spur ist die tdTomato-PCR dargestellt. Auch in dieser PCR können zwei Amplifikate detektiert werden, ein WT- (300 bp) und ein tdTomato-Amplifikat (200 bp), da die Tiere in der F1-Generation verwendet werden konnten und somit heterozygot für das Reporter-Gen waren.

Ergebnisse

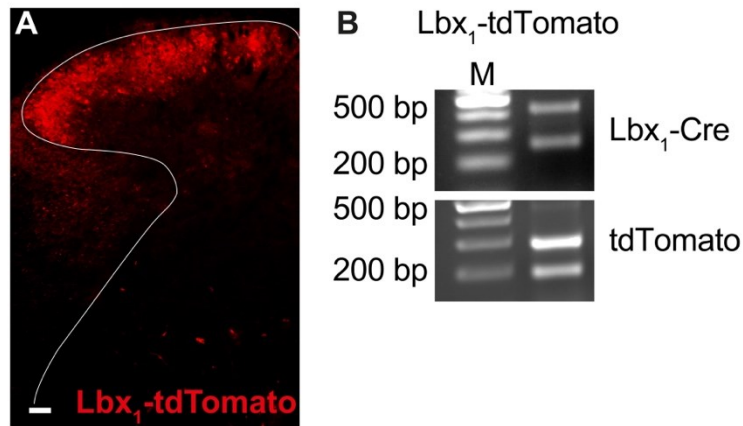


Abb. 3.25: Rückenmarksschnitt eines *Lbx₁-tdTomato* Tieres und die zugehörige Genotypisierung. *A.* In rot erscheint die Fluoreszenz der Tomato-positiven Zellen, also die Cre-produzierenden Zellen. Die graue Substanz ist mit einer weißen Linie umrandet. Maßstabsbalken: 50 μm . *B.* In der oberen Spur ist die *Lbx₁-Cre*-PCR, in der unteren Spur die *tdTomato*-PCR dargestellt. Die Cre-PCR zeigt zwei Banden, zum einen das Kontroll-Gen *CB1* (400 bp), zum anderen die Bande für die Cre (250 bp). Für die *tdTomato*-PCR wurde auch eine doppelte Bande detektiert, da die Tiere heterozygot Tomato-positiv waren (WT-Bande: 300 bp; Tomato-Bande: 200 bp).

In **Abb. 3.26** ist ein Längsschnitt des Gehirns der *Lbx₁-tdTomato*-Mäuse dargestellt. Im Gehirn können Bereiche mit roter Fluoreszenz erkannt werden, besonders im Kleinhirn (*Cb*) und in der Medulla oblongata (*Mo*) liegt eine starke Expression vor. Zwischen dem Thalamus (*Th*) und dem Hippocampus (*Hc*) kann eine fluoreszierende Struktur erkannt werden, dabei handelt es sich um ein Schnittartefakt.

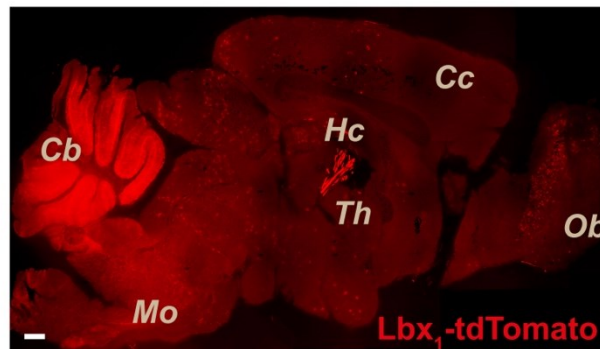


Abb. 3.26: Gehirn- und DRG-Schnitte eines *Lbx₁-Tomato* Tieres. Übersichtsaufnahme der *tdTomato*-Fluoreszenz in einem Sagittal-Schnitt des Gehirns. Die Cre-positiven Zellen sind rot gefärbt. Unterhalb des Hippocampus erscheint ein Schnittartefakt. *Cb*: Cerebellum (Kleinhirn); *Mo*: Medulla oblongata (Verlängertes Mark); *Cc*: Cortex cerebri (Großhirnrinde); *Hc*: Hippocampus; *Th*: Thalamus (Zwischenhirn); *Ob*: Bulbus olfactorius (Riechkolben). Maßstabsbalken: 400 μm .

In **Abb. 3.27** ist die Zuchtstrategie zur Herstellung der konditionellen KO-Mäuse der *GC α ₁* und *GC α ₂* dargestellt. In der F₀ Generation wurde eine Cre-positive Maus, die WT-Allele für die *GC α ₁*/*GC α ₂*-Untereinheit aufwies (*Lbx₁^{Cre/wt}-GC α ₁^{wt/wt}*; *Lbx₁^{Cre/wt}-*

GC α_2 ^{wt/wt}; (Sieber et al., 2007)), mit einer Cre-negativen Maus verpaart, die auf beiden Allelen loxP-Sides (gefloxt) um das Exon 4 des Gens *Gucy1A3* oder *Gucy1A2* aufwies (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}) (Mergia et al., 2006). In der F1 Generation wurden dann Tiere mit und ohne Cre-Rekombinase im Lbx $_1$ -Gen geboren, die immer heterozygot gefloxt waren für die GC α_1 - oder GC α_2 -Untereinheit (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/wt} und Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{fl/wt}). Aus dieser Generation wurde dann ein Cre-positives und ein Cre-negatives Tier verpaart, um in der F2-Generation Cre-positive und Cre-negative Tiere zu generieren, die in beiden Allelen des Gens *Gucy1A3* oder *Gucy1A2* loxP-Sides aufwiesen (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/fl} und Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}). Allerdings entstehen bei der oben beschriebenen Zuchtstrategie viele Genotypen, die für die geplanten Versuche nicht verwendet werden können (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{wt/wt}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{wt/wt}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{fl/wt}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{wt/wt}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{wt/wt}). Daher wurde eine F3-Generation gezüchtet. Hierzu wurden die Tiere aus der F2-Generation ausgewählt, die Cre-positiv und homozygot gefloxt für die GC α_1 -/GC α_2 -Untereinheit waren (Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}) und mit Tieren verpaart, die Cre-negativ und ebenso homozygot gefloxt für die GC α_1 - oder GC α_2 -Untereinheit waren (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}). In dieser Zucht wurden nur Jungtiere geboren, die für die Untersuchungen verwendet werden konnten (Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{wt/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_1 ^{fl/fl}; Lbx $_1$ ^{Cre/wt}-GC α_2 ^{fl/fl}).

Zur Genotypisierung der Tiere wurden zwei PCR-Ansätze durchgeführt, einer zur Identifikation der Cre und eine zur Identifikation der gefloxten GC α_1 - und GC α_2 -Untereinheiten. Die Kontroll-Tiere wiesen keine Bande in der Cre-PCR auf, nur die CB1-Amplifikation (Kontrolle) war positiv (**Abb. 3.27**; B und C untere Spur, linke Seite, CB1: 400 bp). Für die cKO-Tiere wurde eine Bande in der Cre-PCR amplifiziert (B und C obere Spur, rechte Seite, Cre: 250 bp). Die Amplifikation für die loxP-Side in der GC α_1 -/GC α_2 -Untereinheit lieferte eine Bande, was auf eine homozygote loxP-Side hindeutet (B und C obere Spur, linke und rechte Seite, GC α_1 : 920 bp; GC α_2 : 800 bp).

Ergebnisse

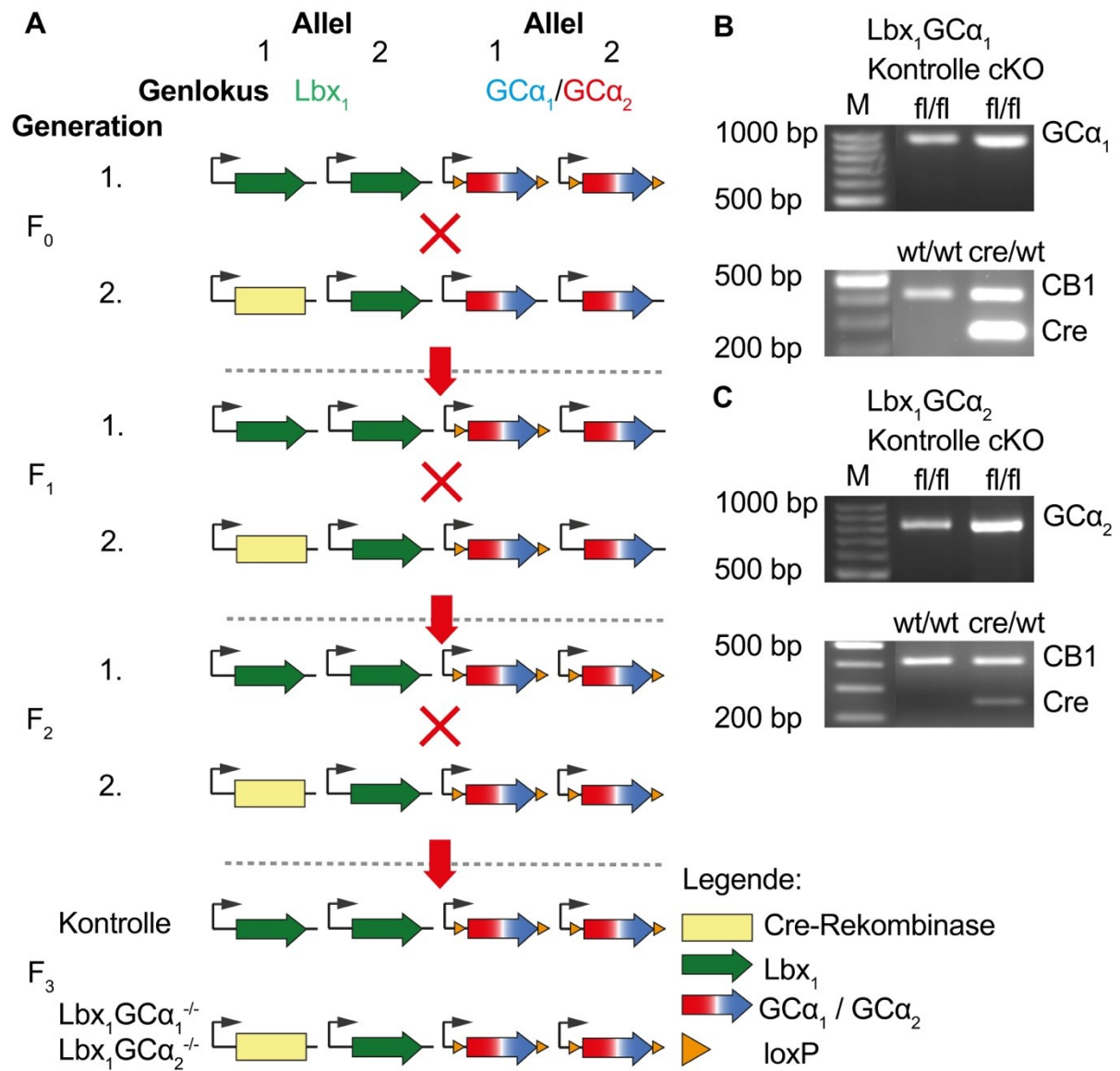


Abb. 3.27: Schematische Zuchtstrategie zur Erzeugung eines konditionellen KO der $GC\alpha_1$ - oder $GC\alpha_2$ -Untereinheit in den Lbx_1 -positiven Zellen und die zugehörigen Genotypisierungen. **A**: F_0 : Erstes Zuchtpaar, bei dem ein Lbx_1 -Cre Tier mit einem $GC\alpha_1^{fl/fl}$ - oder einem $GC\alpha_2^{fl/fl}$ -Tier verpaart wurde. F_1 : Zweite Generation, aus der ein Lbx_1 -Cre Tier und ein Cre-negatives Tier, die jeweils heterozygot gefloxt sind ($GC\alpha_1^{wt/fl}$ oder $GC\alpha_2^{wt/fl}$) verpaart wurden. F_2 : Um eine effizientere Zucht zu erhalten, wurde aus dieser Generation ein Lbx_1 -Cre Tier mit homozygoter loxP-Side ($GC\alpha_1^{fl/fl}$ oder $GC\alpha_2^{fl/fl}$) mit einem $GC\alpha_1^{fl/fl}$ - oder einem $GC\alpha_2^{fl/fl}$ -Tier verpaart. F_3 : In dieser Generation wurden nur Kontroll-Tiere ($Lbx_1^{wt/wt}$ - $GC\alpha_1^{fl/fl}$ und $Lbx_1^{wt/wt}$ - $GC\alpha_2^{fl/fl}$) und konditionelle KO-Tiere ($Lbx_1^{Cre/wt}$ - $GC\alpha_1^{-/-}$ und $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $GC\alpha_2^{-/-}$) geboren. **B**, **C**. In der unteren Spur ist die PCR für den Lbx_1 -Cre Lokus abgebildet, in der unteren Spur die PCR für die α_1 - und α_2 -Untereinheiten der NO-GC. Die PCR der Kontroll-Tiere, $Lbx_1^{wt/wt}$ - $GC\alpha_1^{fl/fl}$ und $Lbx_1^{wt/wt}$ - $GC\alpha_2^{fl/fl}$, zeigt keine Bande für die Cre (**B** und **C**, untere Spur linke Seite), aber eine Bande für die homozygote loxP-Side (**B** und **C**, obere Spur, linke Seite, 920 bp und 800 bp). Für die $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $GC\alpha_1^{-/-}$ -Tiere und $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere ist eine Bande für die Amplifikation der Cre-Rekombinase (**B** und **C**, obere Abbildung, rechte Spur; 250 bp) und eine Bande für die homozygote loxP-Side (**B** und **C**, untere Spur, rechte Seite, 920 bp und 800 bp) abgebildet.

Zur Überprüfung der Geburtenrate wurde die Zucht der Lbx_1 - $GC\alpha_1$ - und Lbx_1 - $GC\alpha_2$ -Mäuse hinsichtlich der Verteilung der Kontroll-Tiere zu den konditionellen KO-Tieren

untersucht. Wie in **Abb. 3.28** dargestellt ist, wurden etwa gleich viele Jungtiere pro Genotyp geboren, was ungefähr der Mendel'schen Verteilung entspricht.

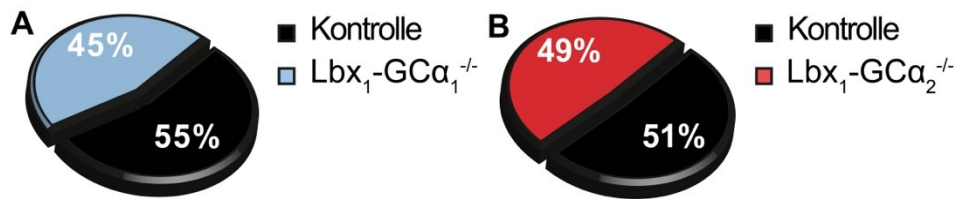


Abb. 3.28: Prozentuale Verteilung der Kontroll- und der konditionellen KO-Tiere in der Zucht der Lbx₁-GCα₁- (A) und Lbx₁-GCα₂-Mäuse (B). n = 49; dargestellt sind die Mittelwerte.

Zur Bestätigung des gewebespezifischen KOs der GCα₁- oder GCα₂-Untereinheit wurden verschiedene Gewebe der Tiere mittels qPCR untersucht. Wie in **Abb. 3.29** dargestellt, wurde für die Lbx₁-GCα₁-Tiere ein signifikanter Knockdown der GCα₁-Untereinheit im Rückenmark detektiert, nicht jedoch in den DRGs oder im Gehirn.

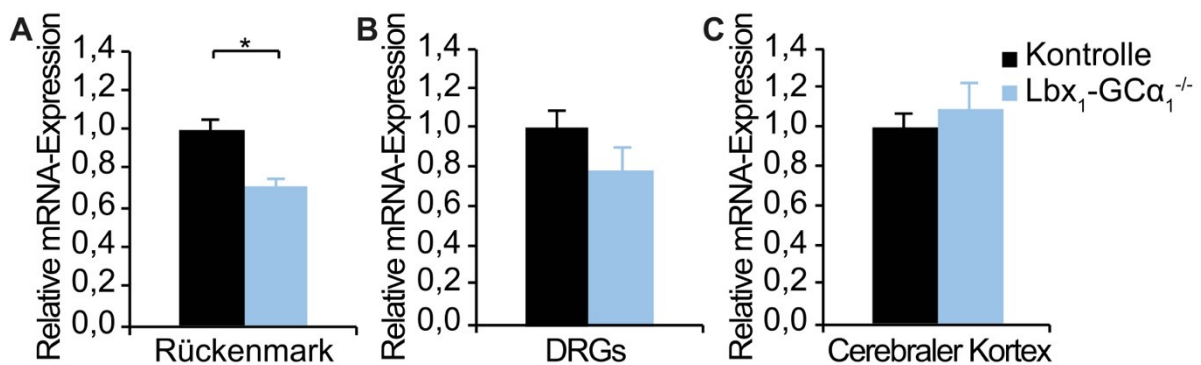


Abb. 3.29: Relative mRNA-Expression der GCα₁ in Lbx₁-Kontroll-Tieren (Lbx₁-GCα₁^{fl/fl}) und in konditionellen KO-Tieren der NO-GC1 (Lbx₁-GCα₁^{-/-}). In Abbildung A ist die Expression im Rückenmark, in B in DRGs und in C im Cerebralen Kortex dargestellt. n = 3; dargestellt ist der Mittelwert ± SEM; * p < 0,05.

In **Abb. 3.30** ist die qPCR der GCα₂-Expression im Rückenmark (A), in DRGs (B) und im Cerebralen Kortex (C) von Lbx₁-GCα₂-Mäusen dargestellt. Auch in dieser Linie konnte gezeigt werden, dass die Expression der GCα₂-mRNA im Rückenmark der konditionellen KO-Mäuse signifikant verringert ist im Vergleich zum Kontroll-Gewebe. In den DRGs oder im Gehirn von Kontroll- und cKO-Tieren konnte kein Unterschied in der Expression detektiert werden. Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, werden die GCα₁- oder GCα₂-Untereinheiten nicht nur in neuronalem Gewebe des Rückenmarks exprimiert, sondern auch im Gefäßendothel. Darüber hinaus werden die GCα₁- oder GCα₂-Untereinheiten im Rückenmark auch in Lbx₁-negativen Neuronen exprimiert.

Ergebnisse

Daher wurde eine geringere Reduktion der mRNA-Expression in der gezüchteten Linie erwartet.

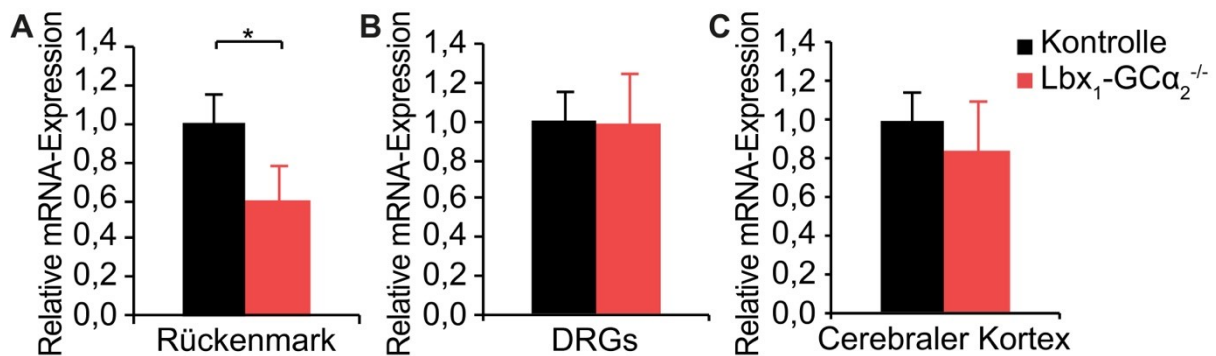


Abb. 3.30: Relative Expression der GCα₂-mRNA in Lbx₁-Kontroll-Tieren (Lbx₁-GCα₂^{fl/m}) und in konditionellen NO-GC2 KO-Tieren (Lbx₁-GCα₂^{-/-}). In Abbildung A ist die NO-GC2-Expression im Rückenmark, in B in DRGs und in C im Cerebralen Kortex dargestellt. n = 6; dargestellt ist der Mittelwert ± SEM; * p < 0,05.

Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass der KO der GCα₁- und GCα₂-Untereinheiten im Bereich der Lbx₁-positiven Rückenmarksneuronen im Dorsalhorn stattgefunden hat, so dass die Tiere für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.2 Motorische Koordination

Wie schon in Kapitel 3.1.3.3 beschrieben, werden die *in-vivo* Untersuchungen des Schmerzverhaltens aufgrund von motorischen Reaktionen der Versuchstiere quantifiziert. Daher wurden auch die Lbx₁-GCα₁^{-/-}- und Lbx₁-GCα₂^{-/-}-Mäuse auf ihre motorische Koordination mittels des Rota-Rod-Tests überprüft. Weder die Motorik der Lbx₁-GCα₁^{-/-}-Tiere, noch die Motorik der Lbx₁-GCα₂^{-/-}-Tiere war verändert im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (Median der Latenzzeiten bei Kontroll-, Lbx₁-GCα₁^{-/-}- und Lbx₁-GCα₂^{-/-}-Tieren: jeweils 120 Sekunden).

3.2.3 Verhalten der Lbx₁-GCα₁^{-/-}-Mäuse in einem neuropathischen Schmerzmodell

Um zu testen, ob das verringerte Schmerzverhalten der globalen GCα₁^{-/-}-Tiere in neuropathischen Modellen auf die Expression der GCα₁-Untereinheit in Dorsalhorn-Neuronen zurückzuführen ist (**Abb. 3.1**), wurden die Lbx₁-GCα₁^{-/-}-Mäuse im SNI-

Modell untersucht. In **Abb. 3.31** ist dargestellt, dass sich nach der Nervenverletzung sowohl in den Kontroll-Tieren als auch in den cKO-Tieren eine zunehmende mechanische Hyperalgesie ausbildet. Ab Tag 14 nach SNI zeigen die $Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse jedoch eine signifikant längere Latenzzeit im Vergleich zu den WT-Tieren.

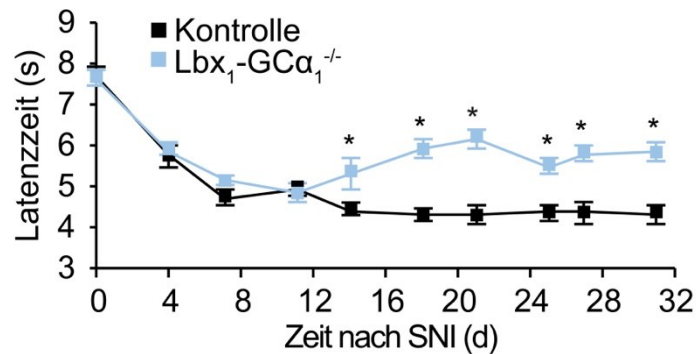


Abb. 3.31: Mechanische Hypersensitivität nach peripherer Nervenverletzung (SNI) von $Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Tieren ($Lbx_1-GC\alpha_1^{fl/fl}$). $n = 8$; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; d = Tage. * $p < 0,05$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das neuropathische Schmerzverhalten der $Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse reduziert ist, was dem Schmerzverhalten der $GC\alpha_1^{-/-}$ -Mäuse entspricht. Somit ist die Expression der NO-GC1 in den Dorsalhorn-Neuronen für die Verarbeitung neuropathischer Schmerzen, wie sie im SNI-Modell entstehen, wichtig.

3.2.4 Verhalten der $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Mäuse in einem inflammatorischen Schmerzmodell

Wie in Kapitel 3.1.4.3 beschrieben wurde, zeigten die $GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu WT-Tieren eine verstärkte mechanische Hyperalgesie nach Induktion einer Pfotenentzündung. Zur Klärung der Frage, ob die Expression der $GC\alpha_2$ -Untereinheit in Dorsalhorn-Neuronen an der Verarbeitung dieser Schmerzreaktion beteiligt ist, wurde das Schmerzverhalten der $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere im Zymosan-Modell untersucht. In **Abb. 3.32** ist dargestellt, dass die Latenzzeiten in den ersten fünf Stunden nach der Zymosan-Injektion bei Kontroll- und $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Tieren abnahmen. Die $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$ -Tiere zeigten jedoch nach sieben, 24 und 48 Stunden eine signifikant stärkere Schmerzreaktion im Vergleich zu den Kontroll-Tieren.

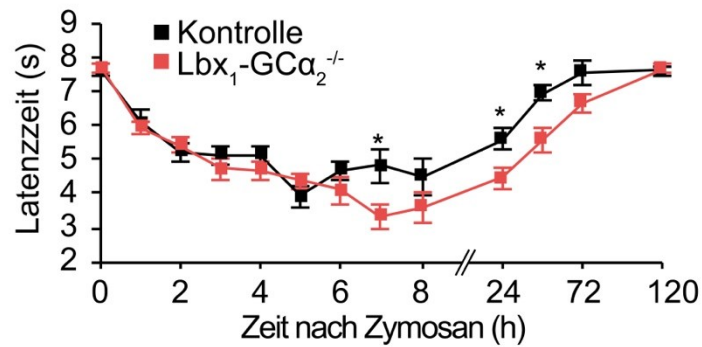


Abb. 3.32: Mechanische Hyperalgesie nach Injektion von Zymosan (15 μ l einer 5 mg/ml Suspension) in eine Hinterpfote der Lbx₁-GCα₂^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Tieren (Lbx₁-GCα₂^{fl/fl}). n = 8; die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; h = Stunden. * p < 0,05.

Die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen das Verhalten der globalen GCα₂^{-/-}-Tiere in Modellen für Entzündungsschmerzen. Somit ist die erhöhte Schmerzreaktion der GCα₂^{-/-}-Tiere nach einer Pfotenentzündung zumindest teilweise auf die fehlende GCα₂-Expression in Dorsalhorn-Neuronen zurückzuführen.

3.3 Expression der NO-Synthasen in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen

3.3.1 mRNA-Regulation der NO-Synthasen im SNI-Modell

Die mRNA-Expression der NOS-1, NOS-2 und NOS-3 wurde basal, sieben und 14 Tage nach SNI im Rückenmark mittels qPCR quantifiziert, um zu untersuchen ob die Verhaltensänderungen der GCα₁^{-/-}- und der Lbx₁-GCα₁^{-/-}-Tiere in neuropathischen Schmerzmodellen mit einer veränderten NOS-Expression einhergeht. In **Abb. 3.33** sind die relativen mRNA-Level der drei NOS-Isoformen in DRGs und im Rückenmark dargestellt. Die mRNA der NOS-2 konnte zu keinem Zeitpunkt und in keinem untersuchten Gewebe detektiert werden. In den Spinalganglien (B) zeigte weder die NOS-1, noch die NOS-3, ein verändertes mRNA-Level nach Nervenverletzung. Im Rückenmark liegt sieben Tage nach SNI eine leicht erhöhte mRNA-Expression der NOS-1 vor, diese ist aber statistisch nicht signifikant. Für die NOS-3 mRNA konnte ein signifikanter Rückgang in der Expression 14 Tage nach SNI detektiert werden (p = 0,011).

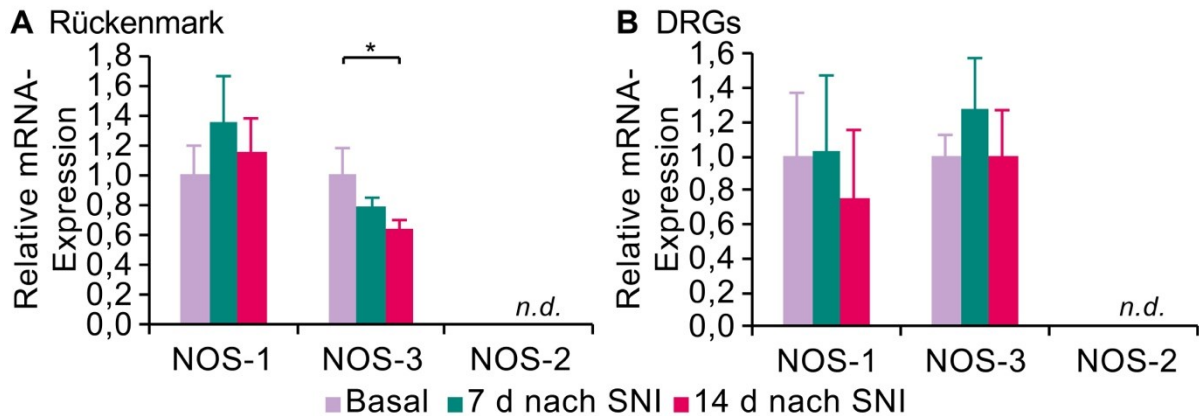


Abb. 3.33: Relative Expression der NOS-1- und NOS-3-mRNA im Rückenmark und in DRGs nach Nervenverletzung (SNI). $n = 3-4$; es ist jeweils der Mittelwert \pm SEM dargestellt; n.d. = nicht detektiert.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass nur die Expression der NOS-3-mRNA im Rückenmark nach Nervenverletzung reguliert wird.

3.3.2 Protein-Regulation der NO-Synthasen im SNI-Modell

Zusätzlich zur Untersuchung der mRNA-Expression wurde die Proteinexpression der NOS-1 und NOS-3 nach Nervenverletzung untersucht. Hier wurde der Zeitpunkt 18 Tage nach SNI gewählt, da in diesem Zeitraum auch der Phänotyp der NO-GC1 KO-Tiere stark ausgeprägt war. Es wurde nur die Expression im Rückenmark betrachtet, da die NO-GC nicht in Neuronen in den DRGs exprimiert wird und die Ergebnisse der Lbx₁-Tiere den Fokus auf die Rückenmarks-Expression lenkten. In **Abb. 3.34 A** sind exemplarische Proteinbanden eines Western Blots der NOS-1-Expression (155 kDa) in unbehandeltem Gewebe und nach SNI dargestellt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet (50 kDa). Für die NOS-1 Expression konnte keine Regulation nach SNI detektiert werden ($p = 0,595$). In **B** ist die Quantifizierung und ein Western Blot der NOS-3 Expression (140 kDa) in unbehandeltem und in SNI-Gewebe dargestellt. Die NOS-3 Proteinexpression ist zwar verringert verglichen mit unbehandeltem Gewebe, allerdings ist die Reduktion nicht statistisch signifikant ($p = 0,141$).

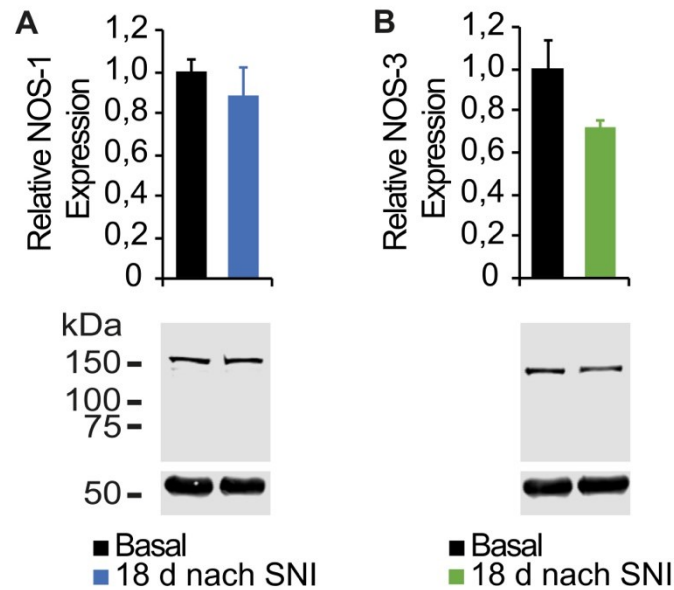


Abb. 3.34: Western Blot Analyse der Proteinexpression der NOS-1 und NOS-3 in Rückenmarksproben basal und 18 Tage nach SNI. *A.* Quantifizierung der Proteinbanden der NOS-1 Expression und exemplarische Western Blots der NOS-1 (150 kDa) und α -Tubulin (50 kDa) als Ladekontrolle. *B.* Quantifizierung der NOS-3 Expression nach SNI und ein exemplarischer Western Blot der NOS-3 (140 kDa) und α -Tubulin (50 kDa) als Ladekontrolle; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die Expression der NOS-1 und NOS-3 im Rückenmark nach SNI untersucht. In **Abb. 3.35 A** und *B* ist die Immunfluoreszenz der NOS-1 mit dem Marker IB4 im Dorsalhorn eines unbehandelten Tieres und im Dorsalhorn nach SNI gezeigt. Die Expression der NOS-1 liegt, wie oben schon beschrieben, im Bereich der Lamina II-III. Im Dorsalhorn nach SNI kann die durchbrochene IB4-Bande erkannt werden, die aus der Degradation der zentralen Endigungen der durchtrennten Äste des *N. ischiadicus* resultiert (*B* und *D*). In *E* ist dargestellt, dass die Intensität der NOS-1 Immunfluoreszenz nach SNI nicht verändert ist im Vergleich zum Kontrollgewebe. In *C* und *D* ist die Immunfluoreszenz der NOS-3 im Dorsalhorn des Rückenmarks vor und nach SNI dargestellt. Es konnte nur eine Expression in Endothel-Zellen detektiert werden. In *F* ist gezeigt, dass auch die Intensität der NOS-3 Expression nach Nervenverletzung nicht verändert ist.

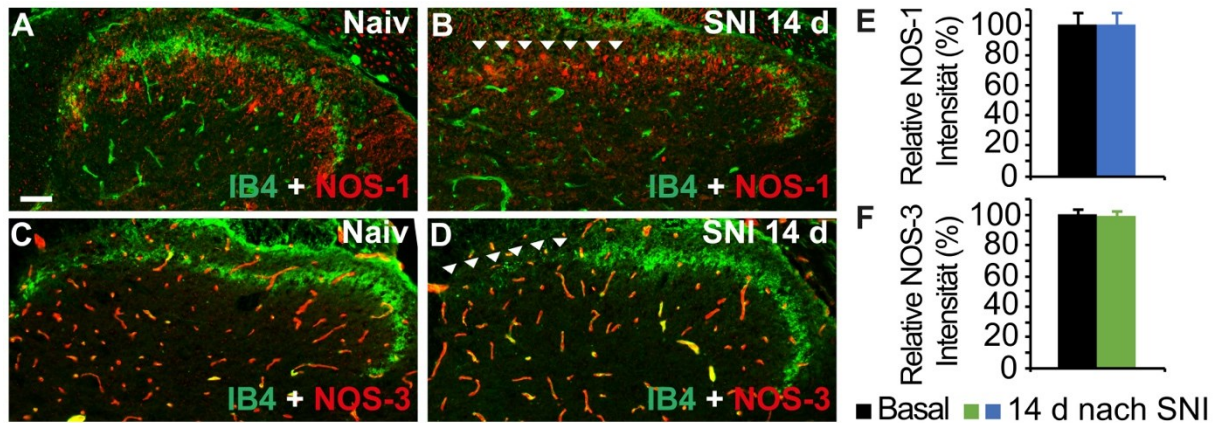


Abb. 3.35: Immunfluoreszenzfärbung der NOS-1 (A und B) und NOS-3 (C und D) mit dem Marker IB4 auf naivem Gewebe und 14 Tage nach SNI. Der Bereich des durchbrochenen IB4-Bandes ist mit Pfeilen gekennzeichnet; d = Tage; Maßstabsbalken: 50 μ m. In E und F sind die zugehörigen Quantifizierungen der Intensitäten der NOS-Proteinfärbungen dargestellt (n = 5-6; 3-4 Schnitte mit ca. 50 μ m Abstand); die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

Die oben beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Proteinmenge der NOS-1 im Rückenmark nach der Nervenverletzung nicht reguliert wird. Im Gegensatz dazu nimmt die mRNA-Expression der NOS-3 ab, was jedoch nicht mit Proteindaten unterstützt werden konnte.

3.3.3 mRNA-Regulation der NO-Synthasen im Zymosan-Modell

Wie oben für die neuropathischen Modelle beschrieben, wurde auch die mRNA Expression der NOS-1, NOS-2 und NOS-3 nach Zymosan-Injektion untersucht (**Abb. 3.36**). Dabei wurden Proben aus DRGs und aus dem Rückenmark basal, vier Stunden und sieben Stunden nach Injektion untersucht. Wie schon nach Nervenverletzung (**Abb. 3.33**), konnte auch im Zymosan-Modell in keinem Gewebe die mRNA der NOS-2 detektiert werden. In DRGs und im Rückenmark konnte für die NOS-1 keine Regulation nach Zymosan-Injektion beobachtet werden. Für die NOS-3 konnte jedoch in DRGs eine signifikante Hochregulation vier Stunden nach Injektion beobachtet werden ($p = 0,011$). Im Rückenmark zeigt die NOS-3 eine signifikante Abnahme der mRNA vier Stunden nach Zymosan-Injektion ($p = 0,000$).

Ergebnisse

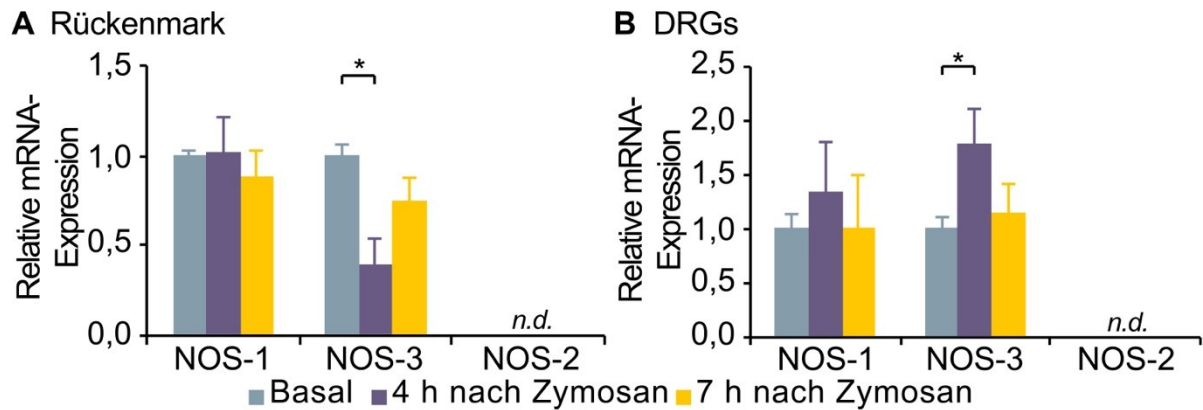


Abb. 3.36: Relative mRNA-Expression der NOS-1 und NOS-3 im Rückenmark und in DRGs nach Induktion einer Pfotenentzündung mit einer Zymosan A-Lösung (15 μ l einer 5 mg/ml Suspension). Nach Injektion in eine Hinterpfote wurde das Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. $n = 4$; dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM; n.d. = nicht detektiert; h = Stunden; * $p < 0,05$.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die mRNA der NOS-1 nicht reguliert wird im Verlaufe der Entzündungsreaktion nach Zymosan-Injektion. Allerdings zeigt die NOS-3-mRNA vier Stunden nach Injektion in DRGs eine erhöhte, im Rückenmark eine verringerte Expression. Es ist jedoch nicht möglich, aus diesen Daten die *in vivo* gebildete Menge des NO abzuschätzen.

3.4 Expression der Proteinkinasen G in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen

3.4.1 mRNA-Regulation der PKG-I und PKG-II im SNI-Modell

In der NO/cGMP-Signalkaskade sind PKG-I (α und β) und PKG-II mögliche Zielproteine des gebildeten cGMP (Feil and Kleppisch, 2008; Francis et al., 2010). Daher wurde die mRNA-Expression der PKG-I und PKG-II nach Nervenverletzung (SNI) in DRGs und im Rückenmark analysiert. In Abb. 3.37 sind die relativen mRNA-Werte basal, sieben und 14 Tage nach Nervenverletzung dargestellt. In DRGs zeigt die PKG-I α keine Regulation. Die PKG-I β zeigt vierzehn Tage nach SNI eine erhöhte mRNA-Expression ($p = 0,044$). Für die PKG-II konnte vierzehn Tage nach Nervenverletzung ein Rückgang in der mRNA-Expression detektiert werden ($p = 0,011$). Im Rückenmark zeigt keine der untersuchten PKGs eine signifikante Regulation nach SNI.

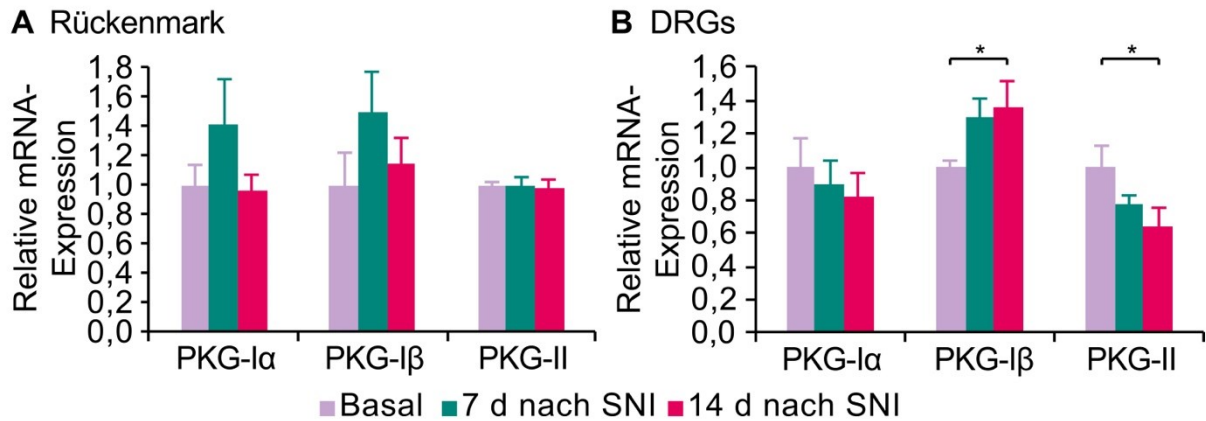


Abb. 3.37: Relative PKG-I α -, PKG-I β - und PKG-II-mRNA-Expression nach Nervenverletzung (SNI) im Rückenmark und in DRGs. Zur Quantifizierung wurde das Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten betrachtet. Es ist jeweils der Mittelwert \pm SEM dargestellt; n = 3-4; d = Tage. * p < 0,05.

3.4.2 mRNA-Regulation der PKG-I und PKG-II im Zymosan-Modell

Schließlich wurde die mRNA-Expression der PKG-I und PKG-II basal, vier und sieben Stunden nach Zymosan-Injektion untersucht. In **Abb. 3.38** sind die relativen mRNA-Werte der PKG-I (α und β) und der PKG-II in DRGs und im Rückenmark dargestellt. Die PKG-I α zeigt in Spinalganglien und im Rückenmark keine Regulation nach Injektion. In den DRGs konnte für die PKG-I β und die PKG-II vier Stunden nach Injektion keine veränderte mRNA-Expression detektiert werden, aber eine abnehmende Expression sieben Stunden nach Zymosan-Injektion ($p(\text{PKG-I}\beta) = 0,046$; $p(\text{PKG-II}) = 0,000$). Im Rückenmark liegt keine veränderte Expression der PKG-I β oder PKG-II vor.

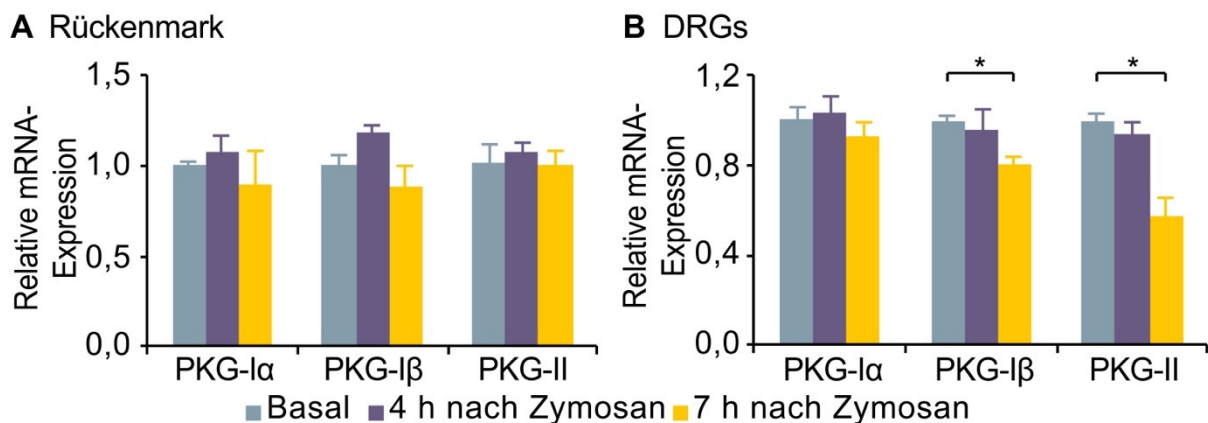


Abb. 3.38: Relative PKG-I α -, PKG-I β - und PKG-II-mRNA-Expression im Rückenmark und in DRGs nach Induktion einer Pfotenentzündung mit einer Zymosan A-Lösung (15 μ l einer 5 mg/ml Suspension). Nach der Injektion in eine Hinterpfote wurde das Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. n = 4; dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM; h = Stunden; * p < 0,05.

Ergebnisse

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass auch potentielle Zielproteine des, von der NO-GC gebildeten, cGMPs im Verlaufe der Schmerzentstehung reguliert werden, was auf eine Beteiligung an der Schmerzverarbeitung hindeutet. Welche Rolle diese putativen Zielproteine in der Schmerzverarbeitung einnehmen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

4 Diskussion

Allein in Deutschland leiden laut der Deutschen Schmerzgesellschaft e.V. schätzungsweise 10 Millionen Menschen an chronischen Schmerzen. Die Behandlung dieser persistierenden Schmerzen stellt immer noch eine große Herausforderung dar, da die pharmakologische Therapie oft sehr ineffektiv ist. Besonders die Therapie neuropathischer Schmerzen ist nur in 50 % der behandelten Patienten zufriedenstellend (Finnerup et al., 2010). Zudem besitzen viele der Substanzen verschiedene Nebenwirkungen, die Therapie-limitierend sind. Um potentielle Ziele neuer analgetischer Substanzen zu finden, ist ein wichtiger Ansatzpunkt die Aufklärung der Mechanismen der Schmerzverarbeitung.

Ein wichtiger Signalweg im schmerzverarbeitenden System ist die Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte cGMP-Produktion. In den Spinalganglien und dem Dorsalhorn des Rückenmarks wird Stickstoffmonoxid durch mindestens zwei Synthesen gebildet, der endothelialen NO-Synthase (NOS-3) und der neuronalen NO-Synthase (NOS-1) (Valtschanoff et al., 1992a; Wu et al., 1998; Maihöfner et al., 2000; Henrich et al., 2002; Keilhoff et al., 2002; Chu et al., 2005; Ruscheweyh et al., 2006; Guan et al., 2007; Tang et al., 2007; Martucci et al., 2008; Sardella et al., 2011b; Todd, 2017). Der primäre Rezeptor für NO im schmerzverarbeitenden System ist die NO-GC (Schmidtke et al., 2008a). Verschiedene Studien haben sich mit der Expression der NO-GC in verschiedenen Geweben beschäftigt, jedoch meist die Gesamtexpression der NO-GC betrachtet, da die Deletion der einzelnen GC α -Untereinheiten keine Auswirkung z.B. auf die Vasorelaxierung oder auf die Schwere der Schallempfindungsschwerhörigkeit der inneren-Haarzellen zeigte (Mergia et al., 2006; Möhrle et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und funktionelle Bedeutung der zwei NO-GC Isoformen im schmerzrelevanten Gewebe daher erstmals charakterisiert.

4.1 Verteilung der NO-GC Isoformen im schmerzrelevanten System

Bei der Untersuchung der Expression der NO-GC Isoformen im schmerzleitenden System zeigte sich, dass die NO-GC2 die dominant exprimierte Isoform im Rückenmark und in den DRGs ist und der Expressionsverteilung im Gehirn entspricht (Mergia et al., 2006). Im Gegensatz hierzu ist z.B. im Aortengewebe die NO-GC1 die dominante Isoform (Mergia et al., 2006). In **Abb. 4.1** und **Abb. 4.2** ist die Expression

der NO-GC Isoformen im schmerzleitenden System schematisch dargestellt. In den Spinalganglien unterscheidet sich die Expression der Isoformen; während beide Isoformen im Endothel lokalisiert sind, wird nur die NO-GC2 auch in Satellitenzellen exprimiert. In DRGs konnte im Gegensatz zum Rückenmark für keine der beiden Isoformen eine neuronale Expression nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Studie in den globalen NO-GC KO-Tieren bestätigt (Schmidtko et al., 2008a). Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper, der gegen die GC β_1 -Untereinheit gerichtet ist, angefertigt. Jedoch konnte die GC β_1 -Untereinheit in den DRG-Neuronen nicht detektiert werden, was im Widerspruch zu Publikationen anderer Arbeitsgruppen steht (Ruscheweyh et al., 2006; Luo et al., 2012). Diese Unterschiede könnten auf Ungenauigkeiten in der Spezifität der Detektionsmethoden oder der Behandlung des Gewebes basieren. In der vorliegenden Arbeit wurde, im Unterschied zu den oben genannten Studien, KO-Gewebe der unterschiedlichen NO-GC-Untereinheiten zur Spezifitätskontrolle verwendet. Interessanterweise wird die fehlende GC β_1 -Expression in DRG-Neuronen durch eine Studie unterstützt, in der das gesamte Transkriptom der DRG-Neuronen analysiert wurde (Usoskin et al., 2015). In dieser Studie wurde allerdings, wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung, eine Expression der GC α_1 - und GC α_2 -Untereinheit in wenigen Subpopulationen von DRG-Neuronen detektiert (Daten nicht gezeigt). Die funktionelle Bedeutung dieser Expression ist nicht bekannt und erschließt sich auch nicht aus der Enzymfunktion, da die GC α -Untereinheiten kein katalytisch aktives Zentrum besitzen und Homodimere der GC α katalytisch inaktiv sind (Allerston et al., 2013). Somit handelt es sich entweder um eine transiente Expression ohne Funktion oder die Untereinheiten haben eine NO-unabhängige Funktion, die nicht der cGMP-Synthese dient.

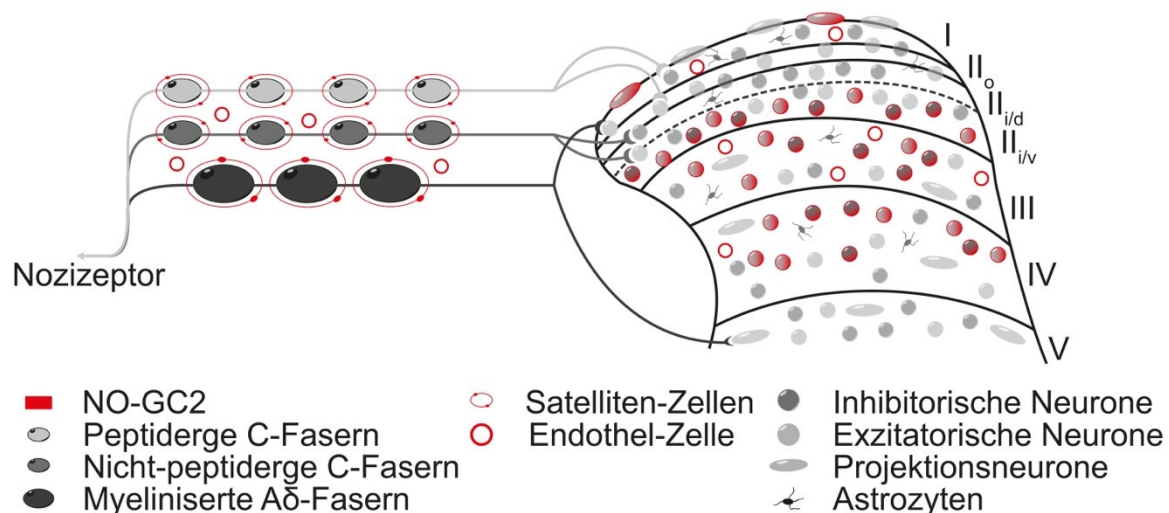


Abb. 4.1: Schematische Expression der NO-GC2 im schmerzrelevanten Gewebe. Auf der linken Seite sind die schmerzrelevanten Populationen der DRG-Neurone dargestellt, auf der rechten Seite das Dorsalhorn bis zur Lamina V. Die Laminae sind mit römischen Ziffern benannt.

In den DRGs wurde die NO-GC2 in Satellitenzellen detektiert. Da die Expression der NO-GC Isoformen in den Spinalganglien mit dem Antikörper gegen die GC β_1 -Untereinheit detektiert wurde, kann von einer katalytischen Aktivität der detektierten Isoform ausgegangen werden. Ein mögliches Zielprotein des von der NO-GC2 gebildeten cGMPs könnten die CNGA3-positiven CNG-Kanäle sein. Wie auch die NO-GC2 wird CNGA3 in Satellitenzellen exprimiert (Heine et al., 2011). CNG-Kanäle werden durch die direkte Bindung von cGMP aktiviert. Nachfolgend kommt es zur Depolarisation der Zellmembran und zum Einstrom von Ca²⁺-Ionen und anderen Kationen. In den optischen und olfaktorischen Signalwegen ist die Rolle der CNG-Kanäle besonders gut untersucht, da die Kanäle hier essentiell sind (Michalakakis et al., 2018). Im schmerzleitenden System wurde gezeigt, dass CNGA3 einen inhibitorischen Effekt auf die Schmerzverarbeitung hat (Heine et al., 2011).

Inwieweit das gebildete cGMP aus den Satellitenzellen mit den Neuronen der DRGs kommunizieren kann, ist ein umstrittener Forschungsschwerpunkt. Allerdings gibt es einige Arbeiten, die auf eine wichtige Rolle der Satellitenzellen bei der Entstehung und Verarbeitung von systemischem Entzündungsschmerz, Diabetes-induzierter Neuropathie, gastrointestinalem Schmerz, multipler Sklerose und Chemotherapie-induzierter Neuropathie hinweisen (Hanani et al., 2002, 2014; Warwick and Hanani, 2013; Blum et al., 2014; Warwick et al., 2014; Hanani, 2015). Zudem wurde beobachtet, dass Satellitenzellen über sogenannte *Gap junctions* miteinander und auch mit den Neuronen der DRGs kommunizieren und nach Nervenverletzung die

simultane Aktivierung benachbarter DRG-Neurone unterstützen (Kim et al., 2016; Spray and Hanani, 2017).

Im Dorsalhorn des Rückenmarks werden beide NO-GC Isoformen im Endothel und auch neuronal exprimiert (**Abb. 4.1** und **Abb. 4.2**). Dies bestätigt Daten aus früheren Studien (Ding and Weinberg, 2006; Ruscheweyh et al., 2006; Schmidtko et al., 2008a). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Expression der NO-GC in den terminalen Endigungen im Dorsalhorn detektiert werden, die einige ältere Studien mit schlecht validierten Antikörpern aufgezeigt hatten (Maihöfner et al., 2000; Luo et al., 2012). Für die Schmerzverarbeitung besitzt die endotheliale Lokalisation der NO-GC Isoformen wahrscheinlich keine Bedeutung, da das cGMP aus dem Endothel mit den neuronalen Zellen der Schmerzverarbeitung kommunizieren müsste, entweder direkt oder über nachgeschaltete Signalkaskaden, was unwahrscheinlich erscheint.

Die neuronale Lokalisation der NO-GC Isoformen wurde in der vorliegenden Arbeit detaillierter charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Expression der Isoformen im Dorsalhorn unterschiedlich verteilt ist. Wie in **Abb. 4.1** schematisch dargestellt ist, wird die NO-GC2 überwiegend in einem Bereich des Dorsalhornes exprimiert, der sich von Lamina II_{IV} bis in Lamina IV erstreckt. Zudem wird die NO-GC2 zu gleichem Anteil in inhibitorischen und in exzitatorischen Populationen exprimiert. Im Gegensatz dazu scheint die NO-GC1 größtenteils von inhibitorischen Interneuronen exprimiert zu werden (**Abb. 4.2**). Anhand von Doppelfärbungen konnte die Expression der NO-GC1 in einem sehr diskreten Bereich in Lamina II_{IV} lokalisiert werden. Eine sehr aktuelle Studie bestätigte die hier gezeigte interneuronale Verteilung der NO-GC1 und NO-GC2 mit Transkriptom-Daten (Häring et al., 2018). Des Weiteren werden beide Isoformen in Projektionsneuronen in Lamina I exprimiert.

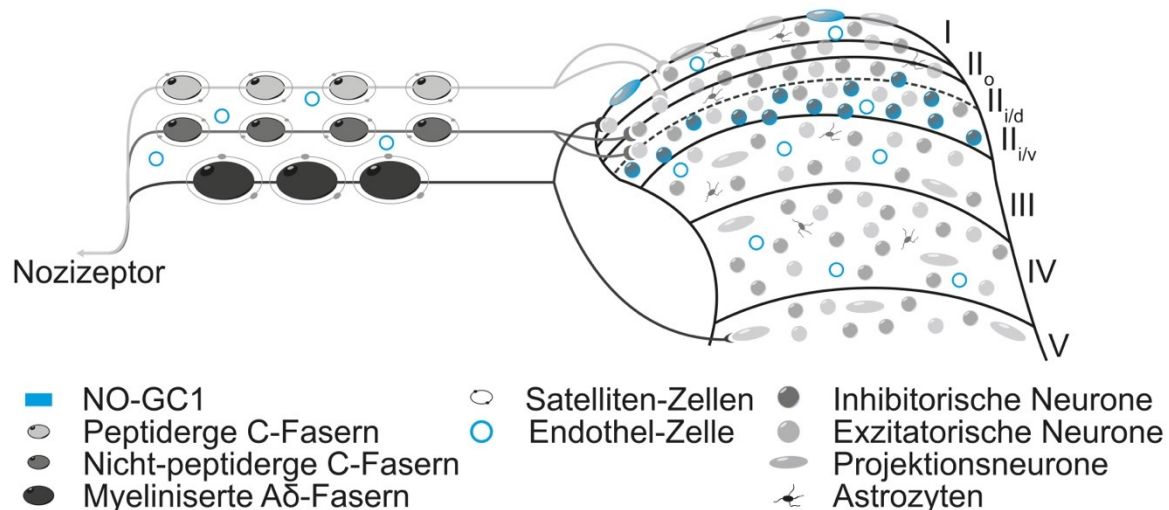


Abb. 4.2: Schematische Expression der NO-GC1 im schmerzrelevanten Gewebe. Auf der linken Seite sind die drei schmerzrelevanten Populationen der DRG-Neurone abgebildet, auf der rechten Seite das Dorsalhorn bis zur Lamina V. Die Laminae sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet.

In den letzten Jahren wurden im Dorsalhorn des Rückenmarks immer enger abgegrenzte inhibitorische und exzitatorische neuronale Subpopulationen beschrieben. So konnte eine aktuelle Studie in Lamina I und II aufgrund von neurochemischen Eigenschaften fünf nicht-überlappende Gruppen inhibitorischer Interneurone identifizieren die NPY, Galanin, Parvalbumin, Calretinin und NOS-1 exprimieren (Boyle et al., 2017). In diesen Laminae bilden Neurone, die Substanz P, GRP, Neurotensin und Neurokinin-B exprimieren, die nicht-überlappenden Gruppen der exzitatorischen Neurone und stellen mehr als die Hälfte der glutamatergen Interneurone in dieser Region dar (Gutierrez-Mecinas et al., 2017; Todd, 2017). Zusammengefasst werden diese Daten in Zukunft dazu beitragen, die genaue interneuronale Lokalisation der NO-GC Isoformen zu ermöglichen. Besonders die Verteilung der NO-GC-Expression in den funktionellen Populationen der Interneurone ist essentiell für eine finale Interpretation der beobachteten Phänotypen.

4.2 Einfluss des spinalen NO-GC Signalweges auf die Verarbeitung chronischer Schmerzen

Für die NO-GC wurde bereits eine wichtige Beteiligung bei der Verarbeitung chronischer Schmerzen beschrieben (Schmidtke et al., 2008a). Die Isoform-spezifische Beteiligung bei der Pathologie in den verschiedenen chronischen Schmerzmodellen wurde bisher nicht untersucht. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich nun die Rolle der NO-GC Isoformen in der Entstehung und im Verlauf von

chronischen entzündlichen und neuropathischen Schmerzen genauer interpretieren. Zunächst wurde untersucht, ob eine der Isoform-spezifischen KO-Mauslinien eine veränderte akute Schmerzwahrnehmung zeigte. Dies war, wie auch bei der Studie mit dem KO beider Isoformen, nicht der Fall, so dass davon auszugehen ist, dass ein NO-/cGMP-Signaling nicht an der Verarbeitung von akuten nozizeptiven Schmerzen beteiligt ist. Wie schon in der Erstpublikation dargestellt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass der KO einer NO-GC Isoform nicht mit einer Regulation der jeweils noch existierenden Isoform kompensiert wird (Mergia et al., 2006). Da der komplette Verlust der NO-GC zur Schmerzreduktion in inflammatorischen Modellen führt (Schmidtko et al., 2008a), wurden auch die Isoform-spezifischen KO-Tiere nach Induktion von Entzündungsschmerz betrachtet. Entgegen der Erwartung aus dem Verhalten der globalen KO-Tiere der NO-GC zeigten die Tiere mit der NO-GC1-Deletion keinerlei verändertes Schmerzverhalten im Entzündungsmodell nach Zymosan-Injektion. Auch die Expression der $GC\alpha_1$ -mRNA zeigte kein verändertes Muster nach der Induktion der Inflammation. Genauso unerwartet war im Modell für Entzündungsschmerzen das Verhalten der NO-GC2 KO-Tiere, die nach der Injektion zweier unterschiedlicher entzündungsauslösender Substanzen ein verstärktes Schmerzverhalten zeigten. Die NO-GC2 KO-Tiere zeigten also ein entgegengesetztes Verhalten im Vergleich zu den globalen KO-Tieren der NO-GC, die ein reduziertes Schmerzverhalten im Zymosan-Modell aufzeigten. Eine Regulation der NO-GC2 im Zymosan-Modell ist nicht die Erklärung der Beobachtungen, da zwar eine Hochregulation der $GC\alpha_2$ -mRNA in DRGs und auch im Rückenmark beobachtet wurde, allerdings keine Regulation der $GC\beta_1$ -Untereinheit detektiert werden konnte, die für die katalytische Aktivität essentiell ist (Koesling et al., 2016). Letztendlich kann auch nicht gesagt werden, ob die erhöhte mRNA-Expression der $GC\alpha_2$ -Untereinheit in DRGs in den Satellitenzellen oder im Endothel und im Rückenmark in den Neuronen oder im Endothel vorliegt, da keine Zellsortierung vorgenommen wurde. Somit könnten die unterschiedlichen Verhaltensweisen bei Entzündungsschmerz an dem Isoform-spezifischen KO liegen, dessen Effekt im globalen KO fehlt.

Im globalen KO der NO-GC wurde nach Nerven-Läsion eine Schmerzentstehung in den ersten 11 Tagen beobachtet, die im weiteren Verlauf komplett rückgängig war (Schmidtko et al., 2008a). Dieser Phänotyp konnte für die NO-GC1 KO-Mäuse bestätigt werden: Nachdem die NO-GC1 KO-Tiere und deren Wildtyp Wurfgeschwister

in den ersten 11 Tagen nach SNI-OP eine Abnahme der Latenzzeiten nach mechanischer Stimulation zeigten, war ein Anstieg der Latenzzeiten (also eine Reduktion des neuropathischen Schmerzverhaltens) ab Tag 13 nach peripherer Nervenverletzung zu beobachten. Die beobachtete Reduktion im Schmerzverhalten der NO-GC1 KO-Tiere ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in den globalen NO-GC KO-Tieren. Im Gegensatz hierzu konnte für die KO-Tiere der NO-GC2 kein verändertes Verhalten im Vergleich zu den WT-Tieren im SNI-Modell beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob die beschriebene Veränderung im Verhalten mit einer Veränderung der NO-GC Isoformen im Gewebe assoziiert ist, wurde eine Analyse der mRNA-Expression nach peripherer Nervenverletzung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es nach einer SNI-Operation zu keiner Zunahme der NO-GC Expression kommt. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu einer Studie, die die NO-GC Expression nach peripherer Nervenverletzung in Ratten untersucht hat (Xu et al., 2016). Auch diese unterschiedlichen Ergebnisse können auf Spezies-Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten basieren. Aber auch Unterschiede in den Detektionsmethoden und den Antikörpern könnten die Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse geben. Im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler wurde im Verlaufe eines anderen Projektes eine Analyse des gesamten Transkriptoms in DRGs und im Dorsalhorn des Rückenmarks nach SNI durchgeführt (bisher nicht publiziert). Dabei wurde für das Rückenmark mittels Mikrodissektion nur das Dorsalhorn ausgeschnitten und analysiert. In diesem Datensatz zeigt die $GC\alpha_2$ -Untereinheit, wie auch in dieser Arbeit im gesamten Rückenmark, keinerlei Regulation nach Nervenverletzung. In DRGs zeigt auch die $GC\alpha_1$ -Untereinheit keine Regulation in dieser Analyse, allerdings konnte im Rückenmark eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression detektiert werden. Wie schon oben für den Verlauf der Entzündungsentstehung beschrieben, ist die Bedeutung dieser Regulation vermutlich gering, da die Häm-bindende $GC\beta_1$ -Untereinheit in der Transkriptom-Analyse nicht reguliert ist.

Aufgrund der beobachteten Schmerzreduktion in den NO-GC1 KO-Tieren wurden weitere neuropathische Schmerzmodelle eingesetzt, so ein weiteres irreversibles Modell, bei dem die Nerven ligiert werden (CCI). In diesem Modell bilden die Tiere nicht nur eine mechanische, sondern auch eine thermische Hyperalgesie aus (Bennett and Xie, 1988). Wie schon im SNI-Modell beobachtet, zeigten die NO-GC1 KO-Tiere

im Vergleich zu den WT-Tieren auch im CCI-Modell eine normal verlaufende Schmerzsensibilisierung zu Beginn der Messung. Im weiteren Verlauf wurde dann eine Reduktion des Schmerzverhaltens sowohl nach mechanischer als auch nach thermischer Stimulation im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet. Somit konnte gezeigt werden, dass die NO-GC1 Isoform für die Verarbeitung neuropathischer Signalwege essentiell ist.

Die beschriebenen Ergebnisse führten im weiteren Verlauf dieser Arbeit zu der Hypothese, dass im Rückenmark das primär schmerzrelevanten Signaling der NO-GC1 oder NO-GC2 stattfindet. Um diese These zu prüfen, wurden konditionelle KO-Tiere gezüchtet, bei denen die jeweilige Isoform der NO-GC im Dorsalhorn des Rückenmarks ausgeschaltet wurde ($Lbx_1-GC\alpha_1^{-/-}$ und $Lbx_1-GC\alpha_2^{-/-}$). Lbx_1 ist ein Protein der *HOX*-Gen Klasse und ein Transkriptionsfaktor, der zur Klassifizierung frühembryonaler neuronaler Subtypen genutzt werden kann. Frühembryonal lassen sich acht molekular unterschiedliche neuronale Zelltypen, $dI1-dI6$, $dILA$ und $dILB$, differenzieren (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Die neuronalen Zellen, die eine Lbx_1 -Expression aufweisen, enthalten dabei alle inhibitorischen Interneurone (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002) und alle exzitatorischen Neurone die nötig sind, um Juckreiz und Schmerzen zu detektieren (Xu et al., 2013; Duan et al., 2014). Hier konnte mit Hilfe einer Reporter-Maus (Lbx_1 -tdTomato) gezeigt werden, dass die Lbx_1 -Expression im Dorsalhorn sehr distinkt in Lamina I-III lokalisiert ist. Dieses Ergebnis bestätigt veröffentlichte Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Duan et al., 2014; Peirs et al., 2015). Auch die Projektionsneurone in Lamina I sind Abkömmlinge der Lbx_1 -positiven Neurone (Nishida and Ito, 2017). Die in dieser Arbeit gezüchteten Lbx_1 -tdTomato-Tiere zeigten darüber hinaus auch eine starke Fluoreszenz im Muskelgewebe (Daten nicht gezeigt), was auf die Rolle von Lbx_1 bei der Migration von hypaxialen Muskel-Vorläuferzellen zurück zu führen ist (Brohmann et al., 2000). Da weder die NO-GC1 noch die NO-GC2 im Muskelgewebe exprimiert werden (Mergia et al., 2003), ist diese Expression irrelevant für die Interpretation der gezeigten Ergebnisse. Wie dargestellt wurde, liegt jedoch im Hinterhirn eine Lbx_1 -Expression vor (Sieber et al., 2007; Chen et al., 2012). In diesem Bereich werden auch die NO-GC Isoformen exprimiert, die in Neuronen des Hippocampus wichtig für synaptische Übertragungen und LTPs sind (Koesling et al., 2016). Viele Studien zeigen, dass auch das Cerebellum einen Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung hat (Moulton et al., 2010; Baumann et al., 2015; Coombes and

Misra, 2015; Rusanescu and Mao, 2017). Welche Rolle die NO-GC im Cerebellum innehat, ist allerdings unbekannt, sowie unbekannt ist, ob die NO-GC-positiven Neuronen auch Lbx₁-positiv sind.

In der Analyse der mRNA-Expression in Geweben der Lbx₁-GCα₁^{-/-}-Tiere wurde wie erwartet ein signifikanter Knockdown der GCα₁-Untereinheit im Rückenmark detektiert. Hierbei war kein vollständiger Knockout entstanden, da die NO-GC1 im Endothel und eventuell auch vereinzelt in Neuronen der tieferen Laminae lokalisiert ist (Schmidtko et al., 2008a; Hamilton et al., 2010; Bettaga et al., 2015; Häring et al., 2018). Die mRNA-Expression in den Lbx₁-GCα₂^{-/-}-Tieren war im Rückenmark ebenfalls herunterreguliert. Auch hier war kein vollständiger Knockout zu erwarten, da die NO-GC2 im Endothel und, wie in dieser Arbeit gezeigt, in tieferen Laminae (IV) exprimiert wird. Zudem gibt es drei neuronale Vorläuferzellen, die nicht Lbx₁-positiv sind, die aber den exzitatorischen Transporter VGLUT2-exprimieren und somit eventuell NO-GC2 enthalten (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Xu et al., 2013; Duan et al., 2014), aber nicht schmerzrelevant sind (Xu et al., 2013; Duan et al., 2014).

Die cKO Tiere der NO-GC1 (Lbx₁-GCα₁^{-/-}) zeigten im SNI-Modell, wie die globalen KO-Tiere, eine deutliche Reduktion des neuropathischen Schmerzverhaltens. Des Weiteren konnte in den cKO-Tieren der NO-GC2 (Lbx₁-GCα₂^{-/-}), wie im globalen KO, ein verstärktes Schmerzverhalten im Zymosan-Modell detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass die NO-/cGMP-vermittelte Schmerzwahrnehmung wahrscheinlich durch die Dorsalhorn-Expression der Isoformen verarbeitet wird, was auch durch den Verlust der NO-vermittelten Hyperalgesie in den globalen KO-Tieren gestützt wird (Schmidtko et al., 2008a). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die durch NO-GC2 (A) und NO-GC1 (B) vermittelten schematischen Signalabläufe erarbeitet (**Abb. 4.3**).

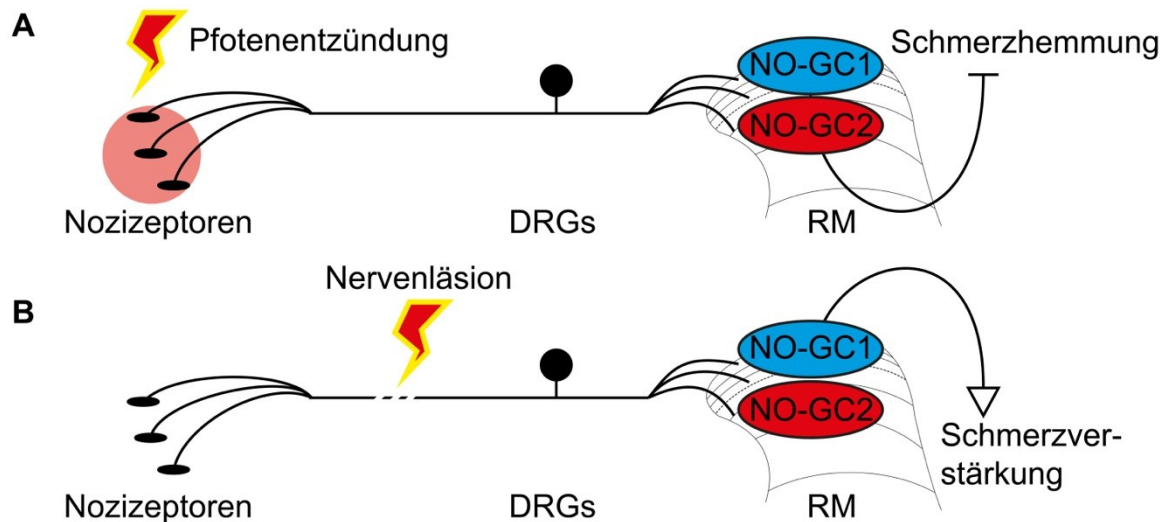


Abb. 4.3: Schematische Übersicht der pro- und antinozizeptiven Rolle der beiden NO-GC Isoformen. Dargestellt ist, dass die NO-GC2 nach peripherer Entzündung eine hemmende und die NO-GC1 im Verlaufe der Entstehung neuropathischer Schmerzen eine verstärkende Rolle in der spinalen Schmerzverarbeitung spielt.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die interneuronale Lokalisation der NO-GC Isoformen und die distinkte Aktivierung dieser Subpopulationen wichtig ist für die Schmerzverarbeitung, wie auch in anderen Signalkaskaden gezeigt werden konnte (McCoy et al., 2013; Wang et al., 2013; Duan et al., 2014; Kardon et al., 2014; Lee et al., 2014; Peirs et al., 2015). Wie oben schon beschrieben, muss in weiteren Studien die genaue interneuronale Verteilung der NO-GC Isoformen analysiert werden, um den Mechanismus der Schmerzphänotypen zu charakterisieren. Wahrscheinlich sind auch die nachgeschalteten Signalkaskaden der NO-GC1 und NO-GC2 unterschiedlich und werden in unterschiedlichem Maße in inflammatorischen oder neuropathischen Signalwegen aktiviert.

4.3 Rolle der NO-/cGMP-Signalkaskade in der Schmerzverarbeitung

Um die beobachteten Schmerzphänotypen besser interpretieren zu können, wurden die NO-Synthasen und putative Zielproteine des von der NO-GC gebildeten cGMPs untersucht. Wie in den Ergebnissen dargestellt wurde, konnte in den Schmerzmodellen nur eine Verringerung in der Expression der NOS-3-mRNA beobachtet werden, was im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen steht, die keine Veränderung der Expression aufgezeigt haben (Keilhoff et al., 2002; Chu et al., 2005; Guan et al., 2007). In dieser Arbeit konnte allerdings keine veränderte Proteinmenge der NOS-3 nach SNI nachgewiesen werden, so dass diese Daten im Widerspruch

stehen oder die verringerte mRNA der NOS-3 physiologisch nicht relevant ist. So könnten z.B. post-translationale Prozesse die mRNA-Expression wieder deregulieren, so dass keine erhöhte Protein-Synthese stattfindet. Für NOS-1 wurde gezeigt, dass die Expression im Schmerzmodell hochreguliert wird (Herdegen et al., 1994; Yonehara et al., 1997; Maihöfner et al., 2000; Chu et al., 2005), was in dieser Arbeit jedoch weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene bestätigt werden konnte.

Aus den Spinalganglien ist bekannt, dass die CNGA3-Untereinheit in Satellitenzellen exprimiert wird (Heine et al., 2011). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass im Schmerzmodell die CNGA3-Untereinheit im Rückenmark hochreguliert und in inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird. Somit könnte theoretisch eine Kollokalisierung mit den NO-GC Isoformen vorliegen. Jedoch bedarf es weiterer Experimente, um den Einfluss der CNG Kanäle auf den NO-/cGMP-Signalweg im Rückenmark aufzuklären, da der Phänotyp in den *Lbx1* cKO-Tieren gegen den Einfluss der CNGA3 vermittelten cGMP-Kaskade in den Satellitenzellen der Spinalganglien spricht.

Ein weiteres mögliches Zielprotein des NO-GC Signalings im Rückenmark ist PKG-I oder PKG-II (Feil and Kleppisch, 2008; Francis et al., 2010). Im Rückenmark konnte im Zymosan-Modell eine erhöhte mRNA-Expression der PKG-I β detektiert werden, aber nicht im SNI-Modell. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die PKG-I an der Bildung von LTPs im Rückenmark beteiligt ist (Luo et al., 2012). Bisher ist jedoch noch nicht geklärt, ob eine NO-/cGMP-/PKG-I-Signalkaskade im Rückenmark an der Schmerzverarbeitung funktionell beteiligt ist.

In der Therapie neuropathischer Schmerzen werden trizyklische Antidepressiva, SNRIs, Antikonvulsiva, Tramadol und starke Opioide verwendet (Schäfers and Tölle, 2013; Finnerup et al., 2015; Finnerup and Attal, 2016). Neben ihrer teilweise geringen Wirksamkeit in unterschiedlichen Neuropathien weisen diese Substanzen eine Fülle von Nebenwirkungen auf, wie Schlaflosigkeit, Schwindel, Übelkeit, Müdigkeit, Obstipation und Mundtrockenheit. Besonders die Langzeitanwendung der genannten Substanzen stellt dabei ein großes Problem dar. Hier könnte die Manipulation der NO-GC zur Behandlung neuropathischer Schmerzen einen Vorteil aufweisen. Diese müsste jedoch selektiv im schmerzrelevanten System angewendet werden, da bei systemischer NO-GC-Inhibition Nebenwirkungen aufgrund der wichtigen Rolle der NO-GC im kardiovaskulären System wahrscheinlich sind (Kemp-Harper and Schmidt, 2009). Schon in der Einleitung wurde dargestellt, dass der verfügbare Inhibitor ODQ

im Tiermodell Glutamat- und NMDA-induzierte Hyperalgesien inhibieren konnte (Ferreira et al., 1999; Kawamata et al., 1999; Tao and Johns, 2002; Song, 2005; Komatsu et al., 2009; Tanabe et al., 2009; Ding et al., 2010). Dieser ist zwar selektiv für die NO-GC, aber nicht selektiv für eine der Isoformen, da ODQ über die Oxidation des Häm in der katalytischen GC β_1 -Untereinheit wirkt (Zhao et al., 2000). Zudem weist ODQ eine sehr geringe Löslichkeit auf. Zur Reduktion der neuropathischen Schmerzen müsste ein selektiver Inhibitor der NO-GC1 verfügbar sein.

Alternativ könnte man versuchen, über die Stimulation der NO-GC2 einen antinozizeptiven Effekt zu erreichen, auch wenn in dieser Arbeit im Tiermodell nur der inflammatorische Schmerz durch die Deletion der NO-GC2 verändert wurde. Es sind sowohl Hämoglobin-abhängige Aktivatoren wie YC-1, BAY-41-2272 oder A-350619 als auch Häm-unabhängige Aktivatoren wie BAY 58-26667 oder HMR 1766 bekannt (Schmidt et al., 2009; Stasch and Hobbs, 2009). Aber auch diese Stimulatoren der NO-GC sind nicht spezifisch für eine der zwei Isoformen, so dass auch hier kein gezielter Effekt erreicht werden könnte. Eventuell kann in Zukunft der Mechanismus der Häm-unabhängigen Stimulatoren zur selektiven Aktivierung oder Inhibierung einer der zwei NO-GC Isoformen genutzt werden, jedoch werden hierzu weitere Studien benötigt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass NO-GC1 und NO-GC2 unterschiedliche Funktionen bei der Verarbeitung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen ausüben. Weitere Studien müssen aufzeigen, welche nachgeschalteten Signalwege die schmerzrelevanten Effekte der beiden Isoformen vermitteln.

5 Zusammenfassung

Viele Studien konnten in den letzten Jahren aufzeigen, dass Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP-Signaling eine wichtige Rolle in der Verarbeitung chronischer Schmerzprozesse einnimmt. Bei Verletzung peripherer Nerven oder Entzündung im Gewebe wird NO gebildet, das durch Stimulation der NO-sensitiven Guanylatzyklase (NO-GC) die cGMP-Bildung katalysiert. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass zwei Isoformen dieses Enzyms existieren, NO-GC1 und NO-GC2. Das Expressionsmuster der beiden Isoformen im nozizeptiven System und der jeweilige Einfluss auf die Schmerzverarbeitung ist jedoch bisher völlig unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Expression der NO-GC1 und NO-GC2 in den Spinalganglien (DRGs) und im Rückenmark von Mäusen charakterisiert und das Verhalten von NO-GC1 und NO-GC2 Knockout (KO)-Mäusen in verschiedenen Schmerzmodellen untersucht. Mit Immunfluoreszenzfärbungen und In-situ-Hybridisierungen wurde in dieser Arbeit dargestellt, dass die zwei Isoformen in Interneuronen des Rückenmarks lokalisiert sind, wobei die NO-GC1 vorwiegend in inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird. In den DRGs konnte die Expression in nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden, wobei nur die NO-GC2 in Satellitenzellen detektiert werden konnte. Die NO-GC1 KO-Mäuse zeigten eine verringerte mechanische Hypersensitivität in neuropathischen Schmerzmodellen, aber ein normales Verhalten in Modellen inflammatorischer Schmerzen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten die NO-GC2 KO-Mäuse ein erhöhtes Schmerzverhalten in Entzündungsmodellen, aber kein verändertes Verhalten in Modellen neuropathischer Schmerzen. Die gezielte Deletion der NO-GC1 und NO-GC2 in Interneuronen des Rückenmarks führte in den entsprechenden Tieren zu Verhaltensänderungen in der Schmerzwahrnehmung, die den Phänotypen der globalen NO-GC KO-Tieren in Schmerzmodellen ähnelte. Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die NO-GC1- oder NO-GC2-vermittelte cGMP-Produktion in Interneuronen des Rückenmarks sehr wichtige, und teilweise gegensätzliche Funktionen bei der Verarbeitung chronischer Schmerzsignale einnimmt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
A		
	A. dest.	Aqua destillata
	Abb.	Abbildung
	ADP	Adenosindiphosphat
	AF(-488 usw.)	Alexa Fluor
	AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
	ANOVA	<i>Engl.: Analysis of variance</i>
	ANP	Atriales natriuretisches Peptid
	APS	Ammoniumpersulfat
	ATP	Adenosin-Triphosphat
B		
	BDNF	<i>Engl.: Brain-derived neurotrophic factor</i>
	BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
	Bp	<i>Engl.: Basepair</i>
	BSA	<i>Engl.: Bovines Serumalbumin</i>
	Bzw.	Beziehungsweise
C		
	Ca.	circa; ungefähr
	Ca ²⁺	Calcium-Ion
	cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
	cDNA	komplementäre DNA
	CCI	<i>Engl.: Chronic constriction injury</i>
	CFA	Complete Freund's Adjuvants
	cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
	CGRP	<i>Englisch: Calcitonin gene related peptides</i>
	Cl ⁻	Chlorid-Ion
	CNG	cGMP-gesteuerten Ionenkanäle
	CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
C		
	CO ₂	Kohlenstoff-Dioxid
	Cox-2	Cyclooxygenase-2
	Cre	<i>Engl.: Cyclization recombination</i>
	CRP4	Cystein-reiches LIM-Protein 4
	C _T	<i>Engl.: Cycle threshold</i>
	C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
	Cy3	Cyanin 3
	Cy5	Cyanin 5
D		
	d	Tag/e
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
	DRGs	<i>Engl.: Dorsal root ganglia</i> (Spinalganglien)
E		
	eNOS	Endotheliale NO-Synthase
	EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
	<i>ERK</i>	<i>Engl.: Extracellular-signal regulated Kinase</i>
	<i>et al.</i>	<i>Lat.: und andere</i>
G		
	g	Gramm
	GABA	γ-Aminobuttersäure
	GAD	Glutamat-Dekarboxylase
	GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
	GC	Guanylatzyklase
	GDNF	<i>Engl.: glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
	GFAP	<i>Engl.: Glial fibrillary acidic protein</i>
	GlyT2	Glycin-Transporter Typ2
	GRP	<i>Engl.: Gastrin Releasing Peptide</i>
	GTP	Guanosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
H		
	h	Stunde/n
	H ₂ O	<i>Aqua purificata</i>
	HCl	Salzsäure
	HRP	<i>Engl.: Horseradish peroxidase</i>
I		
	IB4	Isolektin B4
	IL	Interleukin
	iNOS	Induzierbare NO-Synthase
	i.t.	intrathekal
J		
	JNK	<i>Engl.: C-Jun N-Terminal Kinase</i>
K		
	kb	Kilo-Basen
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KO	Knockout
L		
	l	Liter
	L4	Lumbalsegment 4
	Lbx ₁	<i>Engl.: Ladybird Homeobox 1</i>
	Lmx1b	<i>Engl.: LIM homeobox transcription factor 1 beta</i>
	loxP	<i>Engl.: locus of crossing over of bacteriophage PI</i>
	LTP	<i>Long-term-potentiation</i>
M		
	M	Mol
	Min	Minute/n
	mg	Milligramm
	Mg ²⁺	Magnesium-Ion
	ml	Milliliter

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
M		
	mM	Millimolar
	mRNA	<i>Engl.: messenger RNA</i>
N		
	N	Stickstoff
	n	Anzahl
	Na _v	Spannungsabhängiger Natrium-Kanal
	NaCl	Natriumchlorid
	NaOH	Natriumhydroxid
	n.d.	Nicht detektiert
	NeuN	Neuronal Nuclei
	NF200	Neurofilament 200
	NGF	<i>Engl.: nerve growth factor</i>
	NGS	<i>Engl.: normal goat serum</i>
	NK1	Tachykininrezeptor
	NKB	Neurokinin B
	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
	nNOS	Neuronale NO-Synthase (NOS-1)
	NO	Stickstoffmonoxid
	NO-GC	Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylatzyklase
	NOS	NO-Synthase
	NOS-1	Neuronale NO-Synthase
	NOS-2	Induzierbare NO-Synthase
	NOS-3	Endotheliale NO-Synthase
	NPY	Neuropeptid Y
	N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
O		
	OD	Optische Dichte
	O ₂	Sauerstoff
P		
	PAG	Periaquäduktales Grau
	Pax2	Paired box gene 2

Abkürzungsverzeichnis

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
P		
	PBS	<i>Engl.: Phosphat buffered saline</i>
	PCR	<i>Engl.: Polymerase Chain Reaction</i>
	PDE	Phosphodiesterasen
	PFA	Paraformaldehyd
	pGC	partikuläre Guanylatzyklase
	pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
	PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
	PKC	Protein Kinase C
	PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
	PSD-95	<i>Engl.: postsynaptic density protein 95</i>
R		
	R	Rezeptor
	RM	Rückenmark
	RNA	<i>Engl.: Ribonucleic acid</i>
	Rpm	rounds per minute
	RT	Raumtemperatur
	RT	Reverse Transkription
S		
	S	Sekunden
	SDS-PAGE	<i>Engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
	SEM	<i>Engl.: Standard error of the mean</i>
	SNI	<i>Engl.: spared nerve injury</i>
	SNRIs	Serotonin-/ Noradrenalin-Reuptake Inhibitoren
	SPSS	<i>Engl.: Statistical Product and Service Solution</i>
	Sst _{2A}	Somatostatin-Rezeptor 2a
	SubP	Substanz P

Anfangsbuchstabe	Abkürzung	Erläuterung
T		
	t	Zeit
	TrkA	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A
	TrkB	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B
	TRP	<i>Engl.: Transient receptor potential</i>
U		
	ÜN	Über Nacht
	UV	Ultraviolett
V		
	VGAT	Vesikulärer GABA-Transporter
	VGLUT	Vesikulärer Glutamat-Transporter
	VGS	<i>Engl. Voltage-gated sodium</i>
W		
	WT	Wildtyp
Z		
	z.B.	zum Beispiel
	ZNS	Zentrales Nervensystem
Symbole		
	α	Alpha
	β	Beta
	γ	Gamma
	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
	μl	Mikroliter
	μm	Mikrometer
	%	Prozent

7 Literaturverzeichnis

- Abe K, Kato G, Katafuchi T, Tamae A, Furue H, Yoshimura M (2009) Responses to 5-HT in morphologically identified neurons in the rat substantia gelatinosa in vitro. *Neuroscience* 159:316–324.
- Abraira VE, Ginty DD (2013) The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* 79:618–639.
- Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Springel MW, Toliver AA, Zimmerman AL, Orefice LL, Boyle KA, Bai L, Song BJ, Bashista KA, O'Neill TG, Zhuo J, Tsan C, Hoynoski J, Rutlin M, Kus L, Niederkofler V, Watanabe M, Dymecki SM, Nelson SB, Heintz N, Hughes DI, Ginty DD (2017) The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168:295–310.e19.
- Aimi Y, Fujimura M, Vincent SR, Kimura H (1991) Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 306:382–392.
- Al-Khater KM, Todd AJ (2009) Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area. *J Comp Neurol* 515:629–646.
- Alexandre C, Latremoliere A, Ferreira A, Miracca G, Yamamoto M, Scammell TE, Woolf CJ (2017) Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. *Nat Med* 23:768–774.
- Allerston CK, von Delft F, Gileadi O (2013) Crystal Structures of the Catalytic Domain of Human Soluble Guanylate Cyclase. *PLoS One* 8.
- Antal M, Freund TF, Polgár E (1990) Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 295:467–484.
- Antal M, Polgár E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 314:114–124.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CCH, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008) Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557–568.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD (1963) Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11:330–334.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139:267–284.
- Basbaum AI, Bráz JM (2016) Cell transplants to treat the “disease” of neuropathic pain and itch. *Pain* 157:S42–S47.

- Baumann O, Borra RJ, Bower JM, Cullen KE, Habas C, Ivry RB, Leggio M, Mattingley JB, Molinari M, Moulton EA, Paulin MG, Pavlova MA, Schmähmann JD, Sokolov AA (2015) Consensus Paper: The Role of the Cerebellum in Perceptual Processes. *Cerebellum* 14:197–220.
- Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley J V (1998) A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 18:3059–3072.
- Bennett GJ, Xie Y-K (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87–107.
- Bernardi PS, Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Schmidt HH, Rustioni A (1995) Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J Neurosci* 15:1363–1371.
- Berrazueta JR, Losada A, Poveda J, Ochoteco A, Riestra A, Salas E, Amado JA (1996) Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. *Pain* 66:63–67.
- Bettaga N, Jäger R, Dünnes S, Groneberg D, Friebe A (2015) Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. *Angiogenesis* 18:245–254.
- Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, Murad F (2006) Proteomic Modification by Nitric Oxide. *J Pharmacol Sci* 101:271–279.
- Bice TN, Beal JA (1997) Quantitative and neurogenic analysis of neurons with supraspinal projections in the superficial dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 388:565–574.
- Blum E, Procacci P, Conte V, Hanani M (2014) Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. *Neuroscience* 274:209–217.
- Boettger MK, Üceyler N, Zelenka M, Schmitt A, Reif A, Chen Y, Sommer C (2007) Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain* 11:810–818.
- Bourquin AF, Süveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I (2006) Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122:14.e1-14.e14.
- Boyle KA, Gutierrez-Mecinas M, Polgár E, Mooney N, O'Connor E, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2017) A quantitative study of neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord. *Neuroscience* 363:120–133.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum A (2014) Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. *Neuron* 82:522–536.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006) Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287–333.

Literaturverzeichnis

- Bröhl D, Strehle M, Wende H, Hori K, Bormuth I, Nave KA, Müller T, Birchmeier C (2008) A transcriptional network coordinately determines transmitter and peptidergic fate in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 322:381–393.
- Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C (2000) The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* 127:437–445.
- Brumovsky P, Hofstetter C, Olson L, Ohning G, Villar M, Hökfelt T (2006) The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord. *Neuroscience* 138:1361–1376.
- Bryan PM, Smirnov D, Smolenski A, Feil S, Feil R, Hofmann F, Lohmann S, Potter LR (2006) A sensitive method for determining the phosphorylation status of natriuretic peptide receptors: cGK- α does not regulate NPR-A. *Biochemistry* 45:1295–1303.
- Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ESJ, Ballard A, McMahon SB, McNaughton PA (2007) Modulation of Acid-Sensing Ion Channel Activity by Nitric Oxide. *J Neurosci* 27:13251–13260.
- Cameron D, Polgar E, Gutierrez-Mecinas M, Gomez-Lima M, Watanabe M, Todd AJ (2015) The organisation of spinoparabrachial neurons in the mouse. *Pain* 156:2061–2071.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- Chao Y-C, Cheng C-J, Hsieh H-T, Lin C-C, Chen C-C, Yang RB (2010) Guanylate cyclase-G, expressed in the Grueneberg ganglion olfactory subsystem, is activated by bicarbonate. *Biochem J* 432:267–273.
- Chen S-R, Jin X-G, Pan H-L (2017) Endogenous nitric oxide inhibits spinal NMDA receptor activity and pain hypersensitivity induced by nerve injury. *Neuropharmacology* 125:156–165.
- Chen Y, Takano-Maruyama M, Fritsch B, Gaufo GO (2012) Hoxb1 controls anteroposterior identity of vestibular projection neurons. *PLoS One* 7.
- Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, Shirasawa S, Goulding M, Ma Q (2005) Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci* 8:1510–1515.
- Chiang MC, Hachisuka J, Todd AJ, Ross SE (2015) Insight into B5-I spinal interneurons and their role in the inhibition of itch and pain. *Pain* 157:544–545.
- Chiu IM, Pinho-Ribeiro FA, Woolf CJ (2016) Pain and infection: Pathogen detection by nociceptors. *Pain* 157:1192–1193.
- Choi S-R, Kwon S-G, Choi H-S, Han H-J, Beitz AJ, Lee J-H (2016) Neuronal NOS Activates Spinal NADPH Oxidase 2 Contributing to Central Sigma-1 Receptor-Induced Pain Hypersensitivity in Mice. *Biol Pharm Bull* 39:1922–1931.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532–537.
- Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL (1993) Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *J Biol Chem* 268:3698–3703.

- Chu Y-C, Guan Y, Skinner J, Raja SN, Johns RA, Tao Y-X (2005) Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain* 119:113–123.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R (1990) Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535:155–158.
- Coombes SA, Misra G (2015) Pain and motor processing in the human cerebellum. *Pain* 157:117–127.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1–32.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894–898.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101:8–16.
- Dableh LJ, Henry JL (2011) The selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole has acute analgesic but not cumulative effects in a rat model of peripheral neuropathy. *J Pain Res* 4:85–90.
- Dallel R, Descheemaeker A, Luccarini P (2018) Recurrent administration of the nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a persistent cephalic cutaneous hypersensitivity: A model for migraine progression. *Cephalalgia* 38:776–785.
- De Alba J, Clayton NM, Collins SD, Colthup P, Chessell I, Knowles RG (2006) GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 120:170–181.
- de Vente J, Markerink-van Ittersum M, Vles JSH (2006) The role of phosphodiesterase isoforms 2, 5, and 9 in the regulation of NO-dependent and NO-independent cGMP production in the rat cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat* 31:275–303.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149–158.
- Derbyshire ER, Marletta MA (2012) Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu Rev Biochem* 81:533–559.
- Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR (2007) Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: Natriuretic peptide receptor (NPR)-B, not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* 148:3518–3522.
- Ding JD, Weinberg RJ (2006) Localization of soluble guanylyl cyclase in the superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 495:668–678.
- Ding XL, Wang YH, Ning LP, Zhang Y, Ge HY, Jiang H, Wang R, Yue SW (2010) Involvement of TRPV4-NO-cGMP-PKG pathways in the development of thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. *Behav Brain Res* 208:194–201.

- Duan B, Cheng L, Bourane S, Britz O, Padilla C, Garcia-Campmany L, Krashes M, Knowlton W, Velasquez T, Ren X, Ross SE, Lowell BB, Wang Y, Goulding M, Ma Q (2014) Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159:1417–1432.
- Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Förstermann U, Schmidt HHHW, Tseng LF (1993) Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience* 54:845–857.
- Eddy NB, Leimbach D (1953) Synthetic analgesics. II. dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107:385 LP-393.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3396–3401.
- Feil R, Kleppisch T (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol* 184:529–560.
- Fernandes EC, Luz LL, Mytakhir O, Lukoyanov N V, Szucs P, Safronov B V (2016) Diverse firing properties and A β -, A δ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I. *Pain* 157.
- Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB (2001) Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41:1006–1012.
- Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB (1999) The role of systemic, spinal and supraspinal l-arginine–nitric oxide–cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38:835–842.
- Finnerup NB, Attal N (2016) Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? *Pain Manag* 6:1–3.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 14:162–173.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150:573–581.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD (2010) cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol Rev* 62:525–563.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D (2007) Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7699–7704.
- Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3571–3575.
- Gangadharan V, Kuner R (2015) Unravelling Spinal Circuits of Pain and Mechanical Allodynia. *Neuron* 87:673–675.

- Gassner M, Leitner J, Gruber-Schoffnegger D, Forsthuber L, Sandkühler J (2013) Properties of spinal lamina III GABAergic neurons in naive and in neuropathic mice. *Eur J Pain (United Kingdom)* 17:1168–1179.
- Gerzer R, Hofman F, Schultz G (1981) Purification of a Soluble, Sodium-Nitroprusside-Stimulated Guanylate Cyclase from Bovine Lung. *Eur J Biochem* 116:479–486.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386–401.
- Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 180:375–393.
- Gosselin R-D, Suter MR, Ji R-R, Decosterd I (2010) Glial Cells and Chronic Pain. *Neurosci* 16:519–531.
- Gross MK, Dottori M, Goulding M (2002) Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34:535–549.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189–207.
- Guan Y, Yaster M, Raja SN, Tao YX (2007) Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain* 3:1–10.
- Gühring H, Görig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, Rehse K, Brune K (2000) Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci* 20:6714–6720.
- Guo D, Zhang JJ, Huang X-Y (2009) Stimulation of Guanylyl Cyclase-D by Bicarbonate. *Biochemistry* 48:4417–4422.
- Gutierrez-Mecinas M, Bell AM, Marin A, Taylor R, Boyle KA, Furuta T, Watanabe M, Polgár E, Todd AJ (2017) Preprotachykinin A is expressed by a distinct population of excitatory neurons in the mouse superficial spinal dorsal horn including cells that respond to noxious and pruritic stimuli. *Pain* 158:440–456.
- Gutierrez-Mecinas M, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2016) A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I–III of the mouse spinal cord. *Mol Pain* 12:174480691662906.
- Gutierrez-Mecinas M, Watanabe M, Todd AJ (2014) Expression of Gastrin-Releasing Peptide by Excitatory Interneurons in the Mouse Superficial Dorsal Horn. *Mol Pain* 10:1744-8069-10–79.
- Haley J, Dickenson A, Schachter M (1992) Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 31:251–258.
- Hamilton NB, Attwell D, Hall CN (2010) Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2:1–14.
- Hanani M (2015) Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Front Cell Neurosci* 9:1–10.

- Hanani M, Blum E, Liu S, Peng L, Liang S (2014) Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. *J Cell Mol Med* 18:2367–2371.
- Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, Ledda M, Pannese E (2002) Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience* 114:279–283.
- Hantman AW, van den Pol AN, Perl ER (2004) Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci* 24:836–842.
- Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244:6363–6370.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88.
- Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 21:869–880.
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G (1991) Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292:217–222.
- Heine S, Michalakakis S, Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Lim H-Y, Weiland J, Del Turco D, Deller T, Tegeder I, Biel M, Geisslinger G, Schmidtke A (2011) CNGA3: A Target of Spinal Nitric Oxide/cGMP Signaling and Modulator of Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J Neurosci* 31:11184–11192.
- Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkühler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560:249–266.
- Henrich M, Hoffmann K, König P, Groß M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W (2002) Sensory Neurons Respond to Hypoxia with NO Production Associated with Mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 20:307–322.
- Herdegen T, Rüdiger S, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M (1994) Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Mol Brain Res* 22:245–258.
- Hervera A, Leáñez S, Negrete R, Motterlini R, Pol O (2012) Carbon monoxide reduces neuropathic pain and spinal microglial activation by inhibiting nitric oxide synthesis in mice. *PLoS One* 7:1–10.
- Hervera A, Negrete R, Leáñez S, Martín-Campos JM, Pol O (2010) The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice. *PLoS One* 5.
- Huang M, Huang T, Xiang Y, Xie Z, Chen Y, Yan R, Xu J, Cheng L (2008) Ptf1a, Lbx1 and Pax2 coordinate glycinergic and peptidergic transmitter phenotypes in dorsal spinal inhibitory neurons. *Dev Biol* 322:394–405.

- Hughes DJ, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS (2003) Lack of evidence for sprouting of Abeta afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23:9491–9499.
- Hunskar S, Fasmer OB, Hole K (1985) Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 14:69–76.
- Iwagaki N, Garzillo F, Polgár E, Riddell JS, Todd AJ (2013) Neurochemical characterisation of lamina II inhibitory interneurons that express GFP in the PrP-GFP mouse. *Mol Pain* 9:56.
- Jensen TS, Finnerup NB (2014) Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol* 13:924–935.
- Ji RR, Gereau IV RW, Malcangio M, Strichartz GR (2009) MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 60:135–148.
- Juilfs DM, Fulle H-J, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA (1997) A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci* 94:3388–3395.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203–210.
- Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Bothe A, Thomas D, Schlaudraff J, Lorenz JE, Lippold N, Real CI, Ferreirós N, Geisslinger G, Del Turco D, Schmidtko A (2014) Phosphodiesterase 2A localized in the spinal cord contributes to inflammatory pain processing. *Anesthesiology* 121:372–382.
- Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri J a, Kuno T, Chang BY, Waldman S a, Murad F (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 261:7236–7241.
- Kardon AP, Polgár E, Hachisuka J, Snyder LM, Cameron D, Savage S, Cai X, Karnup S, Fan CR, Hemenway GM, Bernard CS, Schwartz ES, Nagase H, Schwarzer C, Watanabe M, Furuta T, Kaneko T, Koerber HR, Todd AJ, Ross SE (2014) Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuron* 82:573–586.
- Kawamata T, Omote K, D M (1999) Activation of Spinal N-methyl-D-aspartate Receptors Stimulates a Nitric Oxide/Cyclic Guanosine 3',5'-monophosphate/Glutamate Release Cascade in Nociceptive Signaling. *Anesthesiology* 91:1415–1424.
- Keilhoff G, Fansa H, Wolf G (2002) Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy. *J Chem Neuroanat* 24:181–187.
- Keilhoff G, Schröder H, Peters B, Becker A (2013) Time-course of neuropathic pain in mice deficient in neuronal or inducible nitric oxide synthase. *Neurosci Res* 77:215–221.
- Kemp-Harper B, Schmidt HHHW (2009) cGMP in the Vasculature. In: *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, pp 447–467. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kim YH, Back SK, Davies AJ, Jeong H, Jo HJ, Chung G, Na HS, Bae YC, Kim SJ, Kim JS, Jung SJ, Oh SB (2012) TRPV1 in GABAergic Interneurons Mediates Neuropathic Mechanical Allodynia and Disinhibition of the Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord. *Neuron* 74:640–647.

Literaturverzeichnis

- Kim YS, Anderson M, Park K, Zheng Q, Agarwal A, Gong C, Saijilafu, Young LA, He S, LaVinka PC, Zhou F, Bergles D, Hanani M, Guan Y, Spray DC, Dong X (2016) Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain. *Neuron* 91:1085–1096.
- Kina VA V., Villarreal CF, Prado WA (2005) The effects of intraspinal L-NOARG or SIN-1 on the control by descending pathways of incisional pain in rats. *Life Sci* 76:1939–1951.
- Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Soeki T, Chusho H, Nakao K, Kangawa K (2008) C-type natriuretic peptide is a Schwann cell-derived factor for development and function of sensory neurones. *J Neuroendocrinol* 20:1213–1223.
- Kitto KF, Haley JE, Wilcox GL (1992) Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett* 148:1–5.
- Koesling D, Friebe A (2000) Structure-function-relationship of soluble guanylyl cyclase. In: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro L, ed), pp 369–381. Academic Press: Orlando.
- Koesling D, Mergia E, Russwurm M (2016) Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Curr Med Chem* 23:2653–2665.
- Komatsu T, Sakurada S, Kohno K, Shiohira H, Katsuyama S, Sakurada C, Tsuzuki M, Sakurada T (2009) Spinal ERK activation via NO-cGMP pathway contributes to nociceptive behavior induced by morphine-3-glucuronide. *Biochem Pharmacol* 78:1026–1034.
- Kruse LS, Sandholdt NTH, Gammeltoft S, Olesen J, Kruuse C (2006) Phosphodiesterase 3 and 5 and cyclic nucleotide-gated ion channel expression in rat trigeminovascular system. *Neurosci Lett* 404:202–207.
- Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, Yanagihara N, Inoue K (2011) Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain* 7:50.
- Kuhn M, Ng CKD, Su Y-H, Kilic A, Mitko D, BIEN-LY N, Kömüves LG, Yang R-B (2004) Identification of an orphan guanylate cyclase receptor selectively expressed in mouse testis. *Biochem J* 379:385–393.
- Kuner R (2015) Spinal excitatory mechanisms of pathological pain. *Pain* 156:S11–S17.
- Kuner R, Flor H (2016) Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 18:20–30.
- Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HHHW (1994) Subpopulations of gabaergic neurons in laminae i–iii of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61:123–132.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain* 10:895–926.
- Lauretti GR, De Oliveira R, Reis MP, Mattos AL, Pereira NL (1999a) Transdermal nitroglycerine enhances spinal sufentanil postoperative analgesia following orthopedic surgery. *Anesthesiology* 90:734–739.
- Lauretti GR, Lima ICPR, Reis MP, Prado WA, Pereira NL (1999b) Oral ketamine and transdermal nitroglycerin as analgesic adjuvants to oral morphine therapy for cancer pain management. *Anesthesiology* 90:1528–1533.

- Lee JH, Park CK, Chen G, Han Q, Xie RG, Liu T, Ji RR, Lee SY (2014) A monoclonal antibody that targets a Nav1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief. *Cell* 157:1393–1404.
- Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 104:14507–14512.
- Lin Q, Wu J, Peng YB, Cui M, Willis WD (1999) Nitric oxide-mediated spinal disinhibition contributes to the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 81:1086–1094.
- Lindia JA, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C (2005) Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain* 6:434–438.
- Loo L, Shepherd AJ, Mickle AD, Lorca RA, Shutov LP, Usachev YM, Mohapatra DP (2012) The C-Type Natriuretic Peptide Induces Thermal Hyperalgesia through a Noncanonical G β -dependent Modulation of TRPV1 Channel. *J Neurosci* 32:11942–11955.
- Lorenz JE, Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Syhr KMJ, Eaton P, Geisslinger G, Schmidtko A (2014) Oxidant-Induced Activation of cGMP-Dependent Protein Kinase α Mediates Neuropathic Pain After Peripheral Nerve Injury. *Antioxid Redox Signal* 21:1504–1515.
- Lowe DG, Dizhoor a M, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, Lu L, Hurley JB (1995) Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5535–5539.
- Lu R, Lukowski R, Sausbier M, Zhang DD, Sisignano M, Schuh CD, Kuner R, Ruth P, Geisslinger G, Schmidtko A (2014) BKCa channels expressed in sensory neurons modulate inflammatory pain in mice. *Pain* 155:556–565.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun Y-Y, Ji R-R, Xiong L (2013) A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050–4062.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752–8758.
- Lu Y, Perl ER (2005) Modular Organization of Excitatory Circuits between Neurons of the Spinal Superficial Dorsal Horn (Laminae I and II). *J Neurosci* 25:3900–3907.
- Luo C, Gangadharan V, Bali KK, Xie R-G, Agarwal N, Kurejova M, Tappe-Theodor A, Tegeder I, Feil S, Lewin G, Polgar E, Todd AJ, Schlossmann J, Hofmann F, Liu D-L, Hu S-J, Feil R, Kuner T, Kuner R (2012) Presynaptically Localized Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase 1 Is a Key Determinant of Spinal Synaptic Potentiation and Pain Hypersensitivity Nestler E, ed. *PLoS Biol* 10:e1001283.
- Luo ZD, Chaplan SR, Scott BP, Cizkova D, Calcutt NA, Yaksh TL (1999) Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J Neurosci* 19:9201–9208.
- Luo ZD, Cizkova D (2000) The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain* 4:459–466.
- Machelska H, Przewłocki R, Radomski MW, Przewłocka B (1998) Differential effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation. *Pol J Pharmacol* 50:407–415.

- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt B, Corey DP, Patapoutian A (2007) An Ion Channel Essential for Sensing Chemical Damage. *J Neurosci* 27:11412–11415.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133–140.
- Maihöfner C, Euchenhofer C, Tegeder I, Beck K., Pfeilschifter J, Geisslinger G (2000) Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci Lett* 290:71–75.
- Makuch W, Mika J, Rojewska E, Zychowska M, Przewlocka B (2013) Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology* 75:445–457.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science* 278:279–283.
- Mansfield KE, Sim J, Jordan JL, Jordan KP (2016) A systematic review and meta-analysis of the prevalence of chronic widespread pain in the general population. *Pain* 157:55–64.
- Martucci C, Trovato AE, Costa B, Borsani E, Franchi S, Magnaghi V, Panerai AE, Rodella LF, Valsecchi AE, Sacerdote P, Colleoni M (2008) The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 β , interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain* 137:81–95.
- Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R (2007) Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol* 584:521–533.
- McCoy ES, Taylor-Blake B, Street SE, Pribisko AL, Zheng J, Zylka MJ (2013) Peptidergic CGRP α Primary Sensory Neurons Encode Heat and Itch and Tonically Suppress Sensitivity to Cold. *Neuron* 78:138–151.
- McMahon SB, Wall PD (1985) Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat. *Brain Res* 333:19–26.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci* 104:13525–13530.
- Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF (1992) Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol* 214:93–96.
- Meller ST, Gebhart GF (1993) Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52:127–136.
- Meller ST, Gebhart GF (1997) Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J pain* 1:43–52.

- Melnick I (2008) Morphophysiological properties of islet cells in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 446:65–69.
- Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D (2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 116:1731–1737.
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D (2003) Major occurrence of the new $\alpha 2\beta 1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 15:189–195.
- Michalakis S, Becirovic E, Biel M (2018) Retinal cyclic nucleotide-gated channels: From pathophysiology to therapy. *Int J Mol Sci* 19:1–15.
- Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013) Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 716:106–119.
- Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA, Verge GM, Chapman G, Green P, Foster AC, Naeve GS, Maier SF, Watkins LR (2004) Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci* 20:2294–2302.
- Minett MS, Nassar MA, Clark AK, Passmore G, Dickenson AH, Wang F, Malcangio M, Wood JN (2012) Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons. *Nat Commun* 3:791.
- Minett MS, Pereira V, Sikandar S, Matsuyama A, Lolignier S, Kanellopoulos AH, Mancini F, Iannetti GD, Bogdanov YD, Santana-Varela S, Millet Q, Baskozos G, MacAllister R, Cox JJ, Zhao J, Wood JN (2015) Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. *Nat Commun* 6:8967.
- Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKC γ Interneurons McCabe B, ed. *PLoS One* 2:e1116.
- Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL (2009) Glycine Inhibitory Dysfunction Induces a Selectively Dynamic, Morphine-Resistant, and Neurokinin 1 Receptor-Independent Mechanical Allodynia. *J Neurosci* 29:2519–2527.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M (1999) Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80:67–82.
- Möhrle D, Reimann K, Wolter S, Wolters M, Varakina K, Mergia E, Eichert N, Geisler H-S, Sandner P, Ruth P, Friebe A, Feil R, Zimmermann U, Koesling D, Knipper M, Rüttiger L (2017) NO-Sensitive Guanylate Cyclase Isoforms NO-GC1 and NO-GC2 Contribute to Noise-Induced Inner Hair Cell Synaptopathy. *Mol Pharmacol* 92:375–388.
- Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C (1990) Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: Light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 299:167–177.
- Moulton EA, Schmähmann JD, Becerra L, Borsook D (2010) The cerebellum and pain: Passive integrator or active participator? *Brain Res Rev* 65:14–27.
- Müller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM, Birchmeier C (2002) The homeodomain factor Lbx1 distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34:551–562.

Literaturverzeichnis

- Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T (1997) Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 15:1235–1243.
- Nishida K, Ito S (2017) Developmental origin of long-range neurons in the superficial dorsal spinal cord. *Eur J Neurosci* 46:2608–2619.
- O’Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH (2012) Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacol Rev* 64:939–971.
- Pan J, Zhong F, Tan X (2013) Soluble guanylate cyclase in NO signaling transduction. *Rev Inorg Chem* 33:193–206.
- Paoloni JA, Appleyard RC, Nelson J, Murrell GAC (2003) Topical nitric oxide application in the treatment of chronic extensor tendinosis at the elbow: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Am J Sports Med* 31:915–920.
- Peirs C, Seal RP (2016) Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* (80-) 354:578–584.
- Peirs C, Williams SPG, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, Hioki H, Liu Z, Marell PS, Seal RP (2015) Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87:797–812.
- Polgár E, Al Ghamdi KS, Todd AJ (2010a) Two populations of neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that differ in AMPA receptor subunit composition and density of excitatory synaptic input. *Neuroscience* 167:1192–1204.
- Polgár E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ (2013a) A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *PLoS One* 8.
- Polgár E, Fowler J., McGill M., Todd A. (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71–80.
- Polgár E, Furuta T, Kaneko T, Todd A (2006) Characterization of neurons that express preprotachykinin B in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 139:687–697.
- Polgár E, Sardella TCP, Tiong SYX, Locke S, Watanabe M, Todd AJ (2013b) Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 154:2606–2615.
- Polgár E, Wright LL, Todd AJ (2010b) A quantitative study of brainstem projections from lamina I neurons in the cervical and lumbar enlargement of the rat. *Brain Res* 1308:58–67.
- Pollock J, Crawford JH, Wootton JF, Corrie JET, Scott RH (2003) A comparison between the distinct inward currents activated in rat cultured dorsal root ganglion neurones by intracellular flash photolysis of two forms of caged cyclic guanosine monophosphate. *Neurosci Lett* 338:143–146.
- Potter LR (2011) Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 23:1921–1926.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47–72.

- Prescott SA, De Koninck Y (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 539:817–836.
- Proudlock F, Spike RC, Todd AJ (1993) Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 327:289–297.
- Punnakkal P, von Schoultz C, Haenraets K, Wildner H, Zeilhofer HU (2014) Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol* 592:759–776.
- Puskár Z, Polgár E, Todd A. (2001) A population of large lamina I projection neurons with selective inhibitory input in rat spinal cord. *Neuroscience* 102:167–176.
- Qian Y, Chao DS, Santillano DR, Cornwell TL, Nairn AC, Greengard P, Lincoln TM, Bredt DS (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci* 16:3130–3138.
- Reichling DB, Green PG, Levine JD (2013) The fundamental unit of pain is the cell. *Pain* 154:S2–S9.
- Ren K, Ruda MA, Jacobowitz DM (1993) Immunohistochemical localization of calretinin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Res Bull* 31:13–22.
- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:415–495.
- Rowan S, Todd AJ, Spike RC (1993) Evidence that neuropeptide Y is present in gabaergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 53:537–545.
- Rusanescu G, Mao J (2017) Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling. *J Cell Mol Med* 21:299–314.
- Ruscheweyh R, Goralczyk A, Wunderbaldinger G, Schober A, Sandkühler J (2006) Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons. *Neuroscience* 141:977–988.
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335 (Pt1):125–130.
- Russwurm M, Koesling D (2002) Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem* 230:159–164.
- Russwurm M, Koesling D (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* 23:4443–4450.
- Russwurm M, Wittau N, Koesling D (2001) Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: Targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha 2\beta 1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 276:44647–44652.
- Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF (1994) Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 59:447–456.
- Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K (1992) The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31:1279–1285.

Literaturverzeichnis

- Sardella TCP, Polgár E, Garzillo F, Furuta T, Kaneko T, Watanabe M, Todd AJ (2011a) Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. *Mol Pain* 7:1–14.
- Sardella TCP, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ (2011b) A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 192:708–720.
- Schäfers M, Tölle TR (2013) Aktuelle Therapie neuropathischer Schmerzen. *Nervenarzt* 84:1445–1450.
- Schmidt H, Stonkute A, Jüttner R, Schäffer S, Buttgereit J, Feil R, Hofmann F, Rathjen FG (2007) The receptor guanylyl cyclase Npr2 is essential for sensory axon bifurcation within the spinal cord. *J Cell Biol* 179:331–340.
- Schmidt HHHW, Schmidt PM, Stasch J-P (2009) NO- and Haem-Independent Soluble Guanylate Cyclase Activators. In: *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, pp 309–339. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schmidtko A (2015) Nitric oxide-mediated pain processing in the spinal cord Schaible H-G, ed. *Handb Exp Pharmacol* 227:103–117.
- Schmidtko A, Gao W, König P, Heine S, Motterlini R, Ruth P, Schlossmann J, Koesling D, Niederberger E, Tegeder I, Friebe A, Geisslinger G (2008a) cGMP Produced by NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Essentially Contributes to Inflammatory and Neuropathic Pain by Using Targets Different from cGMP-Dependent Protein Kinase I. *J Neurosci* 28:8568–8576.
- Schmidtko A, Gao W, Sausbier M, Rauhmeier I, Sausbier U, Niederberger E, Scholich K, Huber A, Neuhuber W, Allescher H-D, Hofmann F, Tegeder I, Ruth P, Geisslinger G (2008b) Cysteine-Rich Protein 2, a Novel Downstream Effector of cGMP/cGMP-Dependent Protein Kinase I-Mediated Persistent Inflammatory Pain. *J Neurosci* 28:1320–1330.
- Schmidtko A, Ruth P, Geisslinger G, Tegeder I (2003) Inhibition of cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation. *Nitric Oxide - Biol Chem* 8:89–94.
- Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G (2009) No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci* 32:339–346.
- Schneider SP (1992) Functional properties and axon terminations of interneurons in laminae III-V of the mammalian spinal dorsal horn in vitro. *J Neurophysiol* 68:1746–1759.
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* 47:719–730.
- Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5:1062–1067.
- Schultz G, Böhme E, Munske K (1969) Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 8:1323–1332.
- Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58:1155–1162.
- Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gillett NA, Goeddel D V., Lowe DG (1992) Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron* 9:727–737.

- Sieber MA, Storm R, Martinez-de-la-Torre M, Müller T, Wende H, Reuter K, Vasyutina E, Birchmeier C (2007) Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci* 27:4902–4909.
- Simmons DR, Spike RC, Todd AJ (1995) Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 187:119–122.
- Smith KM, Boyle KA, Madden JF, Dickinson SA, Jobling P, Callister RJ, Hughes DI, Graham BA (2015) Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J Physiol* 593:4319–4339.
- Song X-J (2005) cAMP and cGMP Contribute to Sensory Neuron Hyperexcitability and Hyperalgesia in Rats With Dorsal Root Ganglia Compression. *J Neurophysiol* 95:479–492.
- Sousa AM, Prado WA (2001) The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* 897:9–19.
- Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18:2433–2448.
- Spike RC, Todd AJ, Johnston HM (1993) Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 335:320–333.
- Spray DC, Hanani M (2017) Gap junctions, pannexins and pain. *Neurosci Lett*.
- Stasch J, Hobbs AJ (2009) NO-Independent, Haem-Dependent Soluble Guanylate Cyclase Stimulators. In: *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, pp 277–308. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K (1992) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229–239.
- Sun L, Wang H, Hu J, Han J, Matsunami H, Luo M (2009a) Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO₂ neurons is activated by bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci* 106:2041–2046.
- Sun Y-G, Chen Z-F (2007) A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 448:700–703.
- Sun Y-G, Zhao Z-Q, Meng X-L, Yin J, Liu X-Y, Chen Z-F (2009b) Cellular basis of itch sensation. *Science* 325:1531–1534.
- Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JGG, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG (1998) Exchange of Substrate and Inhibitor Specificities between Adenylyl and Guanylyl Cyclases. *J Biol Chem* 273:16332–16338.
- Sung Y-J, Walters ET, Ambron RT (2004) A neuronal isoform of protein kinase G couples mitogen-activated protein kinase nuclear import to axotomy-induced long-term hyperexcitability in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 24:7583–7595.
- Sung YJ, Chiu DTW, Ambron RT (2006) Activation and retrograde transport of protein kinase G in rat nociceptive neurons after nerve injury and inflammation. *Neuroscience* 141:697–709.

- Szucs P, Luz LL, Lima D, Safronov B V. (2010) Local axon collaterals of lamina I projection neurons in the spinal cord of young rats. *J Comp Neurol* 518:2645–2665.
- Szucs P, Luz LL, Pinho R, Aguiar P, Antal Z, Tiong SYX, Todd AJ, Safronov B V. (2013) Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 521:2719–2741.
- Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, Ono H (2009) Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* 56:702–708.
- Tang Q, Svensson CI, Fitzsimmons B, Webb M, Yaksh TL, Hua XY (2007) Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation. *Eur J Neurosci* 25:2964–2972.
- Tao F, Tao YX, Mao P, Zhao C, Li D, Liaw WJ, Raja SN, Johns RA (2003) Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience* 120:847–854.
- Tao F, Tao YX, Zhao C, Doré S, Liaw WJ, Raja SN, Johns RA (2004) Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience* 128:421–430.
- Tao YX, Hassan A, Haddad E, Johns RA (1999) Expression and action of cyclic GMP-dependent protein kinase α in inflammatory hyperalgesia in rat spinal cord. *Neuroscience* 95:525–533.
- Tao YX, Johns RA (2002) Activation and up-regulation of spinal cord nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience* 112:439–446.
- Tegeder I, Del Turco D, Schmidtke A, Sausbier M, Feil R, Hofmann F, Deller T, Ruth P, Geisslinger G (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* 101:3253–3257.
- Tegeder I, Schmidtke A, Niederberger E, Ruth P, Geisslinger G (2002) Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett* 332:146–150.
- Thippeswamy T, McKay JS, Morris R, Quinn J, Wong LF, Murphy D (2005) Glial-mediated neuroprotection: Evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glia communication in the peripheral nervous system. *Glia* 49:197–210.
- Tiong SYX, Polgár E, van Kralingen JC, Watanabe M, Todd AJ (2011) Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I–III of the rat spinal cord. *Mol Pain* 7:36.
- Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51:5–17.
- Todd A., Spike R., Polgár E (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85:459–473.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823–836.

- Todd AJ (2017) Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Mol Pain* 13:1–19.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13–27.
- Todd AJ, Polgár E, Watt C, Bailey MES, Watanabe M (2009) Neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in laminae III and IV of the rat spinal cord have synaptic AMPA receptors that contain GluR2, GluR3 and GluR4 subunits. *Eur J Neurosci* 29:718–726.
- Todd AJ, Spike RC (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:609–645.
- Todd AJ, Spike RC, Price RF, Neilson M (1994) Immunocytochemical Evidence That Neurotensin Is Present in Glutamatergic Neurons in the Superficial Dorsal Horn of the Rat. *J Neurosci* 14:774–794.
- Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light Microscope Study of the Coexistence of GABA-Like and Glycine-Like Immunoreactivities in the Spinal Cord of the Rat. *Analysis* 505:496–505.
- Tröster P, Haseleu J, Petersen J, Drees O, Schmidtko A, Schwaller F, Lewin GR, Ter-Avetisyan G, Winter Y, Peters S, Feil S, Feil R, Rathjen FG, Schmidt H (2018) The Absence of Sensory Axon Bifurcation Affects Nociception and Termination Fields of Afferents in the Spinal Cord. *Front Mol Neurosci* 11:19.
- Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, Hurley JB (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5993–5997.
- Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggström J, Kharchenko O, Kharchenko P V., Linnarsson S, Ernfors P (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 18:145–153.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A (1992a) NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 321:209–222.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HHHW (1992b) Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 148:6–10.
- Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N (2014) Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* 155:654–662.
- Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC (2004) Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci* 20:1150–1160.
- Wang H, Zylka MJ (2009) Mrgprd-Expressing Polymodal Nociceptive Neurons Innervate Most Known Classes of Substantia Gelatinosa Neurons. *J Neurosci* 29:13202–13209.
- Wang X, Zhang J, Eberhart D, Urban R, Meda K, Solorzano C, Yamanaka H, Rice D, Basbaum A (2013) Excitatory superficial dorsal horn interneurons are functionally heterogeneous and required for the full behavioral expression of Pain and Itch. *Neuron* 78:312–324.

- Warwick RA, Hanani M (2013) The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain (United Kingdom)* 17:571–580.
- Warwick RA, Ledgerwood CJ, Brenner T, Hanani M (2014) Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett* 569:59–62.
- Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001) Glial activation: A driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24:450–455.
- Weiss J, Pyrski M, Jacobi E, Bufe B, Willnecker V, Schick B, Zizzari P, Gossage SJ, Greer CA, Leinders-Zufall T, Woods CG, Wood JN, Zufall F (2011) Loss-of-function mutations in sodium channel Na v 1.7 cause anosmia. *Nature* 472:186–192.
- White AA, Aurbach GD (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *BBA - Enzymol* 191:686–697.
- Willis WD (2009) The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res* 196:5–11.
- Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR (2008) Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* 508:500–509.
- Woolf CJ (2004) Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med* 140:441–451.
- Woolf CJ (2011) Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152:S2–S15.
- Woolf CJ, Costigan M (1999) Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci* 96:7723–7730.
- Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* 55:353–364.
- Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN (1998) Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res* 118:457–65.
- Xu Y, Lopes C, Qian Y, Liu Y, Cheng L, Goulding M, Turner EE, Lima D, Ma Q (2008) Tlx1 and Tlx3 Coordinate Specification of Dorsal Horn Pain-Modulatory Peptidergic Neurons. *J Neurosci* 28:4037–4046.
- Xu Y, Lopes C, Wende H, Guo Z, Cheng L, Birchmeier C, Ma Q (2013) Ontogeny of Excitatory Spinal Neurons Processing Distinct Somatic Sensory Modalities. *J Neurosci* 33:14738–14748.
- Xu Z, Yang B, Zhang J, Zheng J (2016) The regulation of sGC on the rat model of neuropathic pain is mediated by 5-HT1ARs and NO/cGMP pathway. *Am J Transl Res* 8:1027–1036.
- Yamamoto T, Carr PA, Baimbridge KG, Nagy JI (1989) Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the superficial layers of the spinal cord dorsal horn of rat. *Brain Res Bull* 23:493–508.
- Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle HJ (1995) Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Pnas* 92:602–606.

- Yang Y, Zhang J, Liu Y, Zheng Y, Bo J, Zhou X, Wang J, Ma Z (2016) Role of nitric oxide synthase in the development of bone cancer pain and effect of L-NMMA. *Mol Med Rep* 13:1220–1226.
- Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M (2007) Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol* 581:603–618.
- Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475–488.
- Yeomans DC, Proudfit HK (1994) Characterization of the foot withdrawal response to noxious radiant heat in the rat. *Pain* 59:85–94.
- Yonehara N, Takemura M, Yoshimura M, Iwase K, Seo HG, Taniguchi N, Shigenaga Y (1997) Nitric Oxide in the Rat Spinal Cord in Freund's Adjuvant-Induced Hyperalgesia. *Jpn J Pharmacol* 75:327–335.
- Yuen PS, Potter LR, Garbers DL (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29:10872–10878.
- Zeilhofer HU (2005) The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62:2027–2035.
- Zeilhofer HU, Wildner H, Yevenes GE (2012) Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control. *Physiol Rev* 92:193–235.
- Zhang F-X, Liu X-J, Gong L-Q, Yao J-R, Li K-C, Li Z-Y, Lin L-B, Lu Y-J, Xiao H-S, Bao L, Zhang X-H, Zhang X (2010) Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons. *J Neurosci* 30:10927–10938.
- Zhang X, Bao L, Xu ZQ, Kopp J, Arvidsson U, Elde R, Hökfelt T (1994) Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11738–11742.
- Zhang X, Tong YG, Bao L, Hokfelt T (1999) The neuropeptide Y Y1 receptor is a somatic receptor on dorsal root ganglion neurons and a postsynaptic receptor on somatostatin dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 11:2211–2225.
- Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Snyder SH, Hökfelt T (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335:563–575.
- Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JPM, Babcock GT, Marletta MA (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39:10848–10854.
- Zheng J, Lu Y, Perl ER (2010) Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 588:2065–2075.
- Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF (1993) Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 54:71–78.

Literaturverzeichnis

Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi JI, Nau C, Wood JN, Reeh PW (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447:855–858.

Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ (2005) Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* 45:17–25.

8 Wesentliche Kooperationspartner

Soweit nicht anders vermerkt, wurde diese Arbeit von mir und unter Anweisung meines Betreuers während meiner Zeit als Doktorand am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler angefertigt. Jeder Beitrag von Kollegen wurde explizit benannt in der Arbeit. Im nachfolgenden sind die wesentlichen Kooperationspartner und das erhaltene Material aufgelistet:

Tab. 8-1: Aufgelistet sind die wesentlichen Kooperationspartner dieser Doktorarbeit.

Kooperationspartner		Material
Prof. Dr. Doris Koesling	Pharmakologie und Toxikologie,	GC $\alpha_1^{fl/fl}$ -, GC $\alpha_2^{fl/fl}$ -, NO-GC1
Dr. Evanthia Mergia	Ruhr-Universität Bochum	und NO-GC2 KO-Mäuse.
Prof. Dr. Andreas Friebe	Physiologisches Institut, Universität Würzburg	GC β_1 -Antikörper.
DFG FOR 2060		Wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung.