

Charakterisierung potentieller Redoxtargets im nozizeptiven System

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von **Gesine Wack**
aus Kassel

Frankfurt am Main 2020
(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtko

Prof. Dr. Robert Fürst

Datum der Disputation: 25.05.2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Schmerz	1
1.2 Aufbau des nozizeptiven Systems.....	7
1.3 Mechanismen der Schmerzsensibilisierung	10
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im nozizeptiven System	12
1.4.1 Physiologische ROS Funktionen.....	12
1.4.2 ROS-Signaling im schmerzverarbeitenden System	16
1.4.3 Funktionen von NADPH-Oxidasen bei der Schmerzverarbeitung	19
1.4.4 Potentielle Redoxtargets im schmerzverarbeitenden System	21
1.4.4.1 S100A4	23
1.4.4.2 Funktionen von S100A4 bei Nervenverletzung und Schmerz.....	25
1.4.4.3 Lösliche Epoxidhydrolase (Soluble epoxide hydrolase, sEH)	27
1.4.4.4 Funktion der sEH bei Schmerz	29
1.5 Zielsetzung.....	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Versuchstiere	33
2.1.1 Generierung von S100A4-Knockout Mäusen	33
2.1.2 sEH Knockin-Mäuse.....	35
2.2 Verhaltensversuche.....	36
2.2.1 Rota Rod.....	36
2.2.2 Nozizeptive Tiermodelle	36
2.2.2.1 Modelle der akuten Nozizeption.....	37
2.2.2.1.1 Hot-Plate-Test	37
2.2.2.1.2 Cold-Plate-Test.....	37
2.2.2.1.3 Dynamic-Plantar-Test	37
2.2.2.2 Inflammatorische Schmerzmodelle	38
2.2.2.2.1 Formalin-Test	38
2.2.2.2.2 Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie	39
2.2.2.2.3 Zymosan-induzierte Peritonitis	39

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.2.4 Peritoneale Lavage.....	40
2.2.2.3 Neuropathische Schmerzmodelle	41
2.2.2.3.1 Spared nerve injury Modell (SNI-Modell)	41
2.2.2.3.2 Crush injury Modell (CI-Modell)	42
2.2.2.3.3 Methoden der Schmerzquantifizierung in neuropathischen Modellen	42
2.2.2.3.3.1 Dynamic-Plantar-Test.....	42
2.2.2.3.3.2 Wühlverhalten	42
2.2.2.3.3.3 Sciatic Funktional Index	43
2.2.2.3.3.4 Brush Test.....	44
2.2.2.3.3.5 Von Frey Filament-Test.....	45
2.2.2.4 Schmerzverhalten nach Applikation redoxaktiver Substanzen	45
2.2.2.4.1 Intrathekale Applikation von ROS-Donoren.....	45
2.2.2.4.2 Intraplantare Injektion von 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J ₂	46
2.2.3 Gewebeentnahme.....	47
2.3 Molekularbiologische Methoden	47
2.3.1 RNA-Isolierung.....	47
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.3.3 Real-time quantitative RT-PCR	48
2.3.4 Reverse Transkription	48
2.3.4.1 Hintergrund der Real-time quantitativen RT-PCR	48
2.3.4.2 Quantifizierung anhand der 2 ^{-ΔΔCT} -Methode.....	49
2.3.5 Genotypisierungen	51
2.4 Proteinanalytik.....	55
2.4.1 Western Blot.....	55
2.4.1.1 Proteinextraktion	55
2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung	55
2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	55
2.4.1.4 Antikörper-Inkubation.....	56
2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten.....	56
2.5 Statistische Methoden	59
2.6 Chemikalien und Reagenzien.....	60
2.6.1 Substanzen	60

Inhaltsverzeichnis

2.6.2 Verbrauchsmaterialien	63
2.6.3 Geräte	63
2.6.4 Lösungen und Puffer	65
3 Ergebnisse.....	66
3.1 Charakterisierung der Expression und Funktion von S100A4 im schmerzverarbeitenden System	66
3.1.1 Expression von S100A4 in schmerzrelevanten Geweben.....	66
3.1.2. Zelluläre Lokalisation von S100A4 in Spinalganglien, Ischiasnerv und Rückenmark.....	68
3.1.3 Basale Charakterisierung von Adv-S100A4 ^{-/-} Mäusen	74
3.1.4 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von Adv-S100A4 ^{-/-} Mäusen.....	75
3.1.5 Neuropathisches Schmerzverhalten von Adv-S100A4 ^{-/-} Mäusen.....	76
3.1.6 Basale Charakterisierung von S100A4 ^{-/-} Mäusen	76
3.1.7 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von S100A4 ^{-/-} Mäusen	79
3.1.8 Neuropathisches Schmerzverhalten von S100A4 ^{-/-} Mäusen	80
3.1.8.1 Spared nerve Injury Modell	80
3.1.8.2 Crush Injury Modell.....	83
3.1.9 ROS-induziertes Schmerzverhalten	85
3.2 Charakterisierung der redoxabhängigen Inhibierung der sEH Funktion im schmerzverarbeitenden System	86
3.2.1 Basale Charakterisierung von sEH-KI-Mäusen	86
3.2.2 Nozizeptives Verhalten von sEH-KI-Mäusen	87
3.2.2.1 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von sEH-KI-Mäusen	87
3.2.2.2 Schmerzverhalten von sEH-KI Mäusen im Formalin Test.....	88
3.2.2.3 Mechanische Hyperalgesie von sEH-KI Mäusen nach Zymosan- Injektion	89
3.2.2.4 Schmerzverhalten von sEH-KI Mäusen im Modell der Zymosan induzierten Peritonitis	90
3.2.2.5 Mechanische Allodynie von sEH-KI Mäusen im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen	92
3.2.2.6 15d-PGJ ₂ -Pfoteninjektion.....	93
3.2.3 Fazit	95

Inhaltsverzeichnis

4 Diskussion	96
4.1 S100A4 als potentiell Redoxtarget innerhalb des nozizeptiven Systems	97
4.2 Die sEH als mögliches Redoxtarget im nozizeptiven System.....	103
4.3 Weitere Redox-modifizierte Proteine als potentielle Targets in der Schmerztherapie	105
5 Zusammenfassung	111
6 Abkürzungsverzeichnis.....	114
7 Literaturverzeichnis	120

1 Einleitung

1.1 Schmerz

Weltweit leiden schätzungsweise 20 % der Bevölkerung an chronischen Schmerzen. Während akute Nozizeptorschmerzen und Entzündungsschmerzen in den meisten Fällen gut mit klassischen NSAID (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) wie Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen oder mit Opioiden behandelt werden können, wirken die verfügbaren Analgetika bei chronischen Schmerzen nur unzureichend. Bei neuropathischen Schmerzen kommt hinzu, dass die indizierten Medikamente häufig mit therapielimitierenden Nebenwirkungen behaftet sind (Gao and Ji 2010, Johannes et al. 2010). Chronische neuropathische Schmerzen kommen weltweit vor und haben einen stark belastenden Charakter (Rice et al. 2016). Die Prävalenz chronischer neuropathischer Schmerzen wird auf 6,9 – 10 % der Bevölkerung geschätzt (van Hecke et al. 2014, Scholz et al. 2019). In Europa leiden schätzungsweise 19 % der Bevölkerung an chronischen Schmerzen, wobei deren Lebensqualität stark eingeschränkt ist und die Schmerzpatienten prozentual ein erhöhtes Suizidrisiko zeigen (Breivik et al. 2006, Mansfield et al. 2016, Alexandre et al. 2017). Da sich die Pathogenese neuropathischer Schmerzen zum Teil stark von der anderer Schmerzformen unterscheidet, weicht auch die Pharmakotherapie von der Therapie akuter oder entzündlicher Schmerzen ab. Die dem Schmerz zugrundeliegenden Sensibilisierungsprozesse sind komplex und häufig nicht ausreichend verstanden (Patapoutian et al. 2009, Borsook et al. 2014, Price and Gold 2018). Unterschiede in den Schmerzphänotypen ermöglichen allerdings eine klinische Unterscheidbarkeit der Schmerzsyndrome und damit einhergehend eine der Diagnose entsprechenden Therapie (von Hehn et al. 2012, Edwards et al. 2016, Baron et al. 2017). Aktuell wird für die Therapie von neuropathischen Schmerzen eine, chemisch betrachtet, sehr heterogene Gruppe von Medikamenten aus verschiedenen Bereichen eingesetzt, insbesondere Antidepressiva, Antikonvulsiva, Natrium-Kanalblocker oder Opiode (Gosselin et al. 2010, Schlereth 2019). In einer groß angelegten Meta-Studie aus 229 ausgewählten Studien konnte die Wirksamkeit der trizyklischen Antidepressiva, Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, sowie von Pregabalin und Gabapentin nachgewiesen werden, welche daher bei neuropathischen Schmerzen als Therapeutika der ersten Wahl empfohlen werden. Lidocain-Pflaster, hochkonzentrierte Capsaicin-Pflaster und Tramadol sind Schmerzmedikamente der zweiten Wahl. Starke

Einleitung

Opioide und Botulinumtoxin A werden nur als Medikamente der dritten Wahl empfohlen (Schafers and Tolle 2013, Finnerup and Attal 2015, Finnerup and Attal 2016).

Schmerzen werden als „unangenehmes sensorisches und emotionales Gefühlserlebnis“ definiert, welches mit einer „tatsächlichen oder potentiellen Gewebeverletzung einhergeht oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ (International Association for the Study of Pain (IASP), 2019). Die Fähigkeit, schmerzhaft stimuli wahrzunehmen und adäquat auf diese zu reagieren, ist für Lernprozesse und das Überleben essentiell. Wichtige Funktionen von akuten (physiologischen) Schmerzen sind der Schutz des Gewebes durch eine Vermeidungsreaktion vor potentieller Schädigung und die Förderung des Heilungsprozesses (Kuner and Flor 2016, Peirs and Seal 2016). Ein völliger Verlust der Schmerzwahrnehmung korreliert mit einer höheren Verletzungsgefahr und Mortalität (Cox et al. 2006, Weiss et al. 2011, Minett et al. 2012).

Akute Schmerzen entstehen durch eine Erregung von Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) an peripheren Enden sensorischer Neurone, welche das Schmerzsignal zum Hinterhorn des Rückenmarks leiten. Im Rückenmark wird das eintreffende Signal über Inter- und Projektionsneurone in höhere Zentren des zentralen Nervensystems (Thalamus, Limbisches System, Hypothalamus u. a.) weitergeleitet und zentral verarbeitet (Abbildung 1). Normalerweise werden akute Schmerzreize nur durch hochschwellige Reize ausgelöst, welche real oder potentiell eine Gewebeschädigung auslösen können. Akute Nozizeptorschmerzen sind meist auf den Ort der Schädigung begrenzt, bessern sich mit zunehmender Heilung und sprechen gut auf eine Analgetika Therapie an.

Einleitung

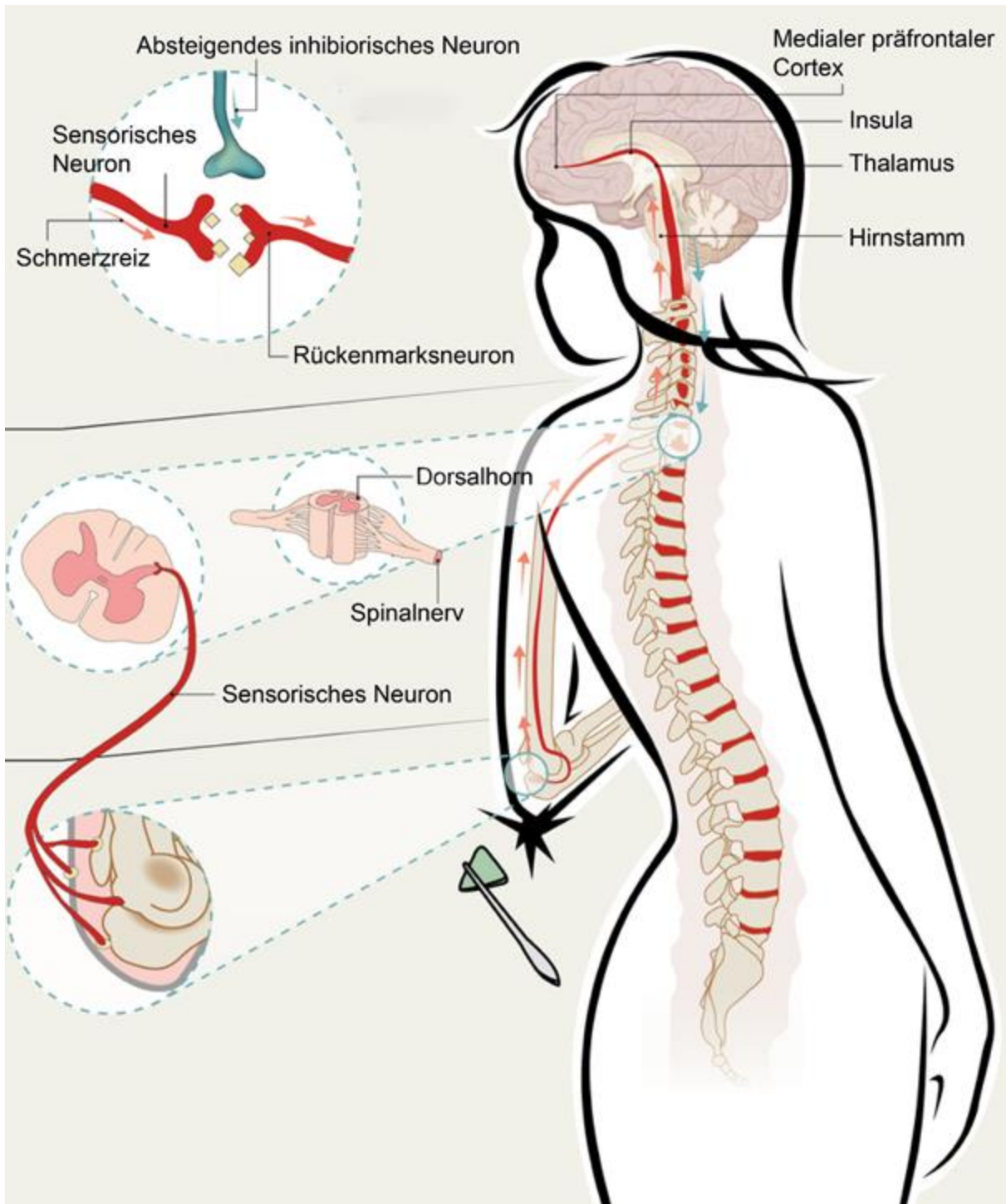


Abbildung 1: Anatomie des schmerzverarbeitenden Systems, modifiziert nach Holmes (2016). Die Detektion von Schmerzreizen erfolgt an den peripheren Enden sensorischer Neurone, anschließend werden die Signale zum Hinterhorn des Rückenmarks weitergeleitet. Im Hinterhorn des Rückenmarks kommt es zur ersten synaptischen Verschaltung mit exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen, sowie Projektionsneuronen und das Schmerzsignal wird in höhere Zentren des zentralen Nervensystems (Hirnstamm, Thalamus, Insula, medialer präfrontaler Cortex u. a.) weitergeleitet. Neben dem aufsteigenden (exzitatorischen) besteht weiterhin ein absteigendes (inhibitorisches) schmerzverarbeitendes System.

Einleitung

Während man bisher zwischen nozizeptiven und neuropathischen Schmerzen unterschied, kommt seit 2019 zu der bisherigen Einteilung der IASP eine neue Schmerzform, noziplastische Schmerzen, hinzu. Noziplastische Schmerzen sind Schmerzen, deren Ursache plastische Veränderungen des (zentralen) Nervensystems umfassen, die keiner anderen Schmerzform eindeutig zugeordnet werden konnten. Bei noziplastischen Schmerzen besteht kein klarer Zusammenhang mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung, die eine Aktivierung von peripheren Nozizeptoren erklären könnte und es gibt keinen Hinweis auf eine Erkrankung oder Schädigung des somatosensorischen Systems, welche den Schmerz bedingen könnte (Kosek et al. 2017). Zudem können auch Kombinationen der beschriebenen Schmerztypen vorliegen (Kosek et al. 2016). Die Bezeichnung „Mischschmerz“ wird für Schmerzzustände verwendet, deren Pathologie eine Überlappung von nozizeptiven, neuropathischen und ggf. noziplastischen Schmerzen darstellt (Freyenhagen et al. 2019) (Abbildung 2). Jene Kategorisierungen der Schmerzen sind besonders wichtig, um einerseits das pathologische Verständnis der jeweiligen Schmerztypen zu verbessern, andererseits eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der klinischen Forschung zu schaffen und neue Wirkstoffe zu generieren.

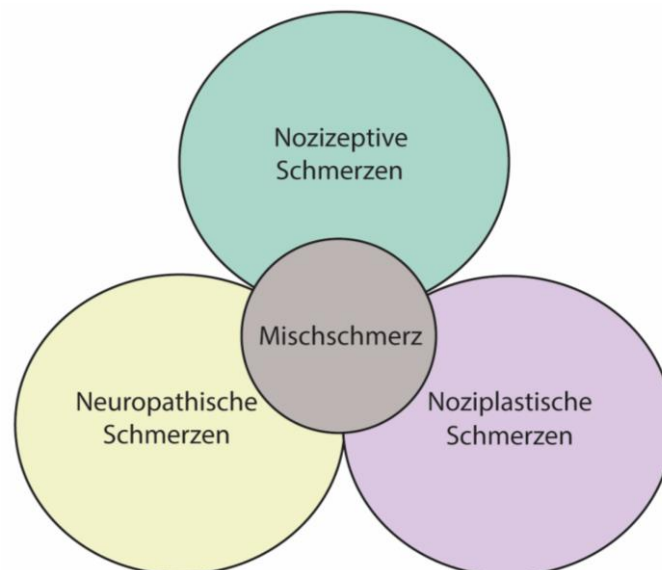


Abbildung 2: Abgebildet sind die drei von der International Association of Pain (IASP, 2019) definierten Schmerzarten: nozizeptive Schmerzen, neuropathische Schmerzen und noziplastische Schmerzen, sowie deren Überschneidungen, welche in der Fachliteratur oft als „Mischschmerz“ bezeichnet werden (Freyenhagen et al. 2019).

Einleitung

Im Gegensatz zu noziplastischen Schmerzen liegen über die Pathogenese von inflammatorischen Schmerzen und neuropathischen Schmerzen schon viele Erkenntnisse vor. Inflammatorische Schmerzen entstehen durch Verletzungen oder Entzündungen peripherer Gewebe, woraufhin proinflammatorische Mediatoren in das Gewebe sezerniert werden und ein entzündliches Geschehen aufrechterhalten. Dabei werden Nozizeptoren selbst aktiviert, aber auch sensibilisiert (Woolf and Costigan 1999, Basbaum et al. 2009). Dies geschieht beispielsweise im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis: Immunzellen wie Makrophagen, Basophile und Neutrophile, infiltrieren in das Gewebe und es kommt lokal zu einer Freisetzung von Mediatoren wie Eicosanoiden und verwandten Lipiden (Prostaglandine, Leukotriene, Endocannabinoide u. a.), Peptiden (Substanz P, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)), Bradykinin, Neutrophinen, Cytokinen, Chemokinen u. a., sowie extrazellulären Proteasen und Protonen. Die Folge ist eine Aktivierung verschiedener intrazellulärer und extrazellulärer Signalwege, die zu einer Sensibilisierung von Nozizeptoren führt (Basbaum et al. 2009, Reichling et al. 2013). Dies äußert sich in einer verstärkten Wahrnehmung von schmerzhaften Reizen (Hyperalgesie), einer schmerzhaften Wahrnehmung von normal nicht schmerzhaften Reizen (Allodynie) und dem Auftreten von Spontanschmerz, einer Schmerzempfindung ohne erkennbare Ursache (Abbildung 3) (Costigan et al. 2009, Jensen and Finnerup 2014, Jensen and Finnerup 2014). Sofern diese Kaskade der Schmerzsensibilisierung nicht rechtzeitig (z. B. durch eine adäquate Medikation) unterbrochen wird, können Entzündungsschmerzen chronifizieren und zu einer eigenständigen Erkrankung werden. Je länger dieses Geschehen aufrechterhalten wird, desto schwieriger gestaltet sich auch die Therapie.

Einleitung

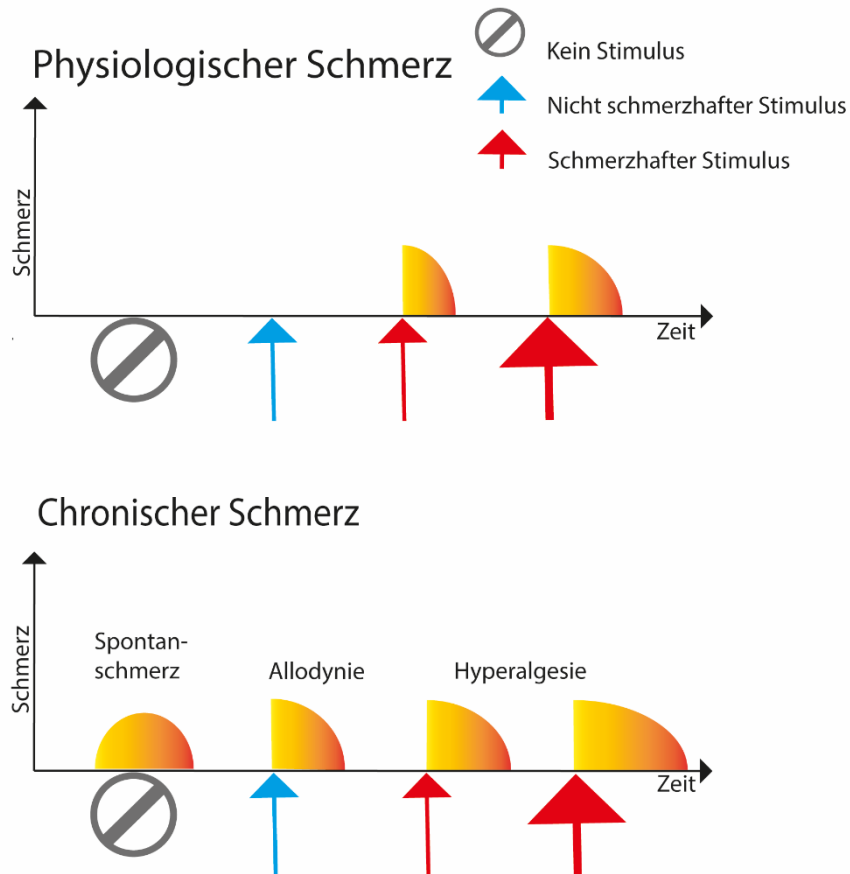


Abbildung 3: Symptomvergleich bei physiologischen und chronischen Schmerzen, modifiziert nach Costigan et al. (2009). Während physiologische Schmerzen (physiologischer Nozizeptorschmerz) zu einem adäquaten Schmerzreiz führen, kann es bei chronischen Schmerzen auch ohne Schmerzreiz zu einer Schmerzreaktion kommen. Zudem können sowohl nicht schmerzhaft stimulierte als auch schmerzhaft stimulierte Reize zu übersteigerten Schmerzreaktionen führen.

Neuropathische Schmerzen entstehen – anders als Entzündungsschmerzen - durch Verletzungen von peripheren oder zentralen Nerven. Sowohl metabolische Erkrankungen, Virusinfektionen, neurotoxische Chemikalien, Schlaganfälle und Tumorerkrankungen als auch Chemotherapiebehandlungen können zur Entstehung neuropathischer Schmerzen beitragen (Costigan et al. 2009, Gosselin et al. 2010, Finnerup and Attal 2016, Colloca et al. 2017). Durch die nervale Schädigung oder Erkrankung kommt es in den Neuronen und ihrer Umgebung zu plastischen Veränderungen, unter anderem der Proliferation von Gliazellen und einem modifizierten Expressionsmuster zahlreicher Gene (Kuner and Flor 2016). Wie bei Entzündungsschmerzen kann es auch bei neuropathischen Schmerzen zu einer Allodynie, einer Hyperalgesie, und dem Auftreten von Spontanschmerzen kommen (Costigan et al. 2009). Diese werden jedoch bei neuropathischen Schmerzen teilweise

über andere Signalwege als bei Entzündungsschmerzen vermittelt und sind zum Teil von Symptomen wie Parästhesien (Missempfindungen der Haut in Form von Kribbeln, Brennen, „Ameisenlaufen“) begleitet. Auch diese Form von Schmerzen kann chronifizieren und zu einer eigenständigen Erkrankung werden. Die detaillierte Aufklärung der molekularen Mechanismen der Sensibilisierungsprozesse im nozizeptiven System ist daher unabdingbar um neuartige spezifische Optionen für eine Therapie chronischer Schmerzen zu erhalten.

1.2 Aufbau des nozizeptiven Systems

Als Nozizeption wird der Prozess der Schmerzdetection und –verarbeitung bezeichnet. Nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip wird ein Schmerzreiz nach dem Überschreiten eines Schwellenwertes durch Nozizeptoren, einer Gruppe primär afferenter Neurone, detektiert. Dieser Reiz wird anschließend als elektrisches Signal über primär afferente nozizeptive Fasern weitergeleitet. Je nach Funktion, Struktur und Leitungsgeschwindigkeit kann man diese schmerzleitenden Fasern in A δ - und C-Fasern unterteilen. A δ -Fasern sind dünn-myelinisiert, haben einen mittleren Durchmesser und vermitteln mittlere bis schnelle Reizantworten (5-30 m/s). C-Fasern sind hingegen nicht myelinisiert, haben einen geringen Durchmesser und vermitteln Signale mit einer deutlich langsameren Reizleitungsgeschwindigkeit. Anhand molekularbiologischer Kriterien kann man die C-Fasern in „peptiderge“ und „nicht-peptiderge“ Populationen unterteilen. Peptiderge Neurone setzen bei Aktivierung Neuropeptide wie zum Beispiel Substanz P und CGRP frei. Außerdem sind die peptidergen Populationen sensitiv für den Wachstumsfaktor NGF (nerve growth factor), da sie den Rezeptor TrkA exprimieren. Nicht-peptiderge Populationen exprimieren den c-Ret Neurotrophin Rezeptor, welcher als Target für GDNF (glial-derived neurotrophic receptor), Neurturin und Artemin fungiert (Basbaum et al. 2009, Braz et al. 2014). Ein großer Prozentsatz dieser Neurone bindet das Isolectin B4 (IB4) aus *Griffonia simplicifolia* und exprimiert G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Mrg-Familie (Dong et al. 2001). Des Weiteren exprimieren nicht-peptiderge Neurone P₂X₃-Rezeptoren (Molliver and Snider 1997, Molliver et al. 1997, Bennett et al. 1998, Dong et al. 2001, Pinto et al. 2019). Eine anatomische Unterscheidung kann auch anhand des Expressionsprofils von Transient receptor potential V1 (TRPV1), Transient receptor potential member 8 (TRPM8), Acid-sensing ion channels (ASICs) und Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) -Nozizeptoren vorgenommen werden (Julius and

Einleitung

Basbaum 2001). Nozizeptoren werden anhand ihres Aufbaus als „pseudo-unipolare“ Zellen bezeichnet, da sie aus einem Perikaryon, einem Axon und einem Axon-ähnlichen Dendriten bestehen. Nozizeptive Fasern münden in bestimmte Abschnitte des Dorsalhorns des Rückenmarks, die in Laminae unterteilt werden, und sind hier mit Projektions- und Interneuronen sowie Gliazellen verschaltet (Abbildung 4) (Rexed 1952, Todd et al. 2009).

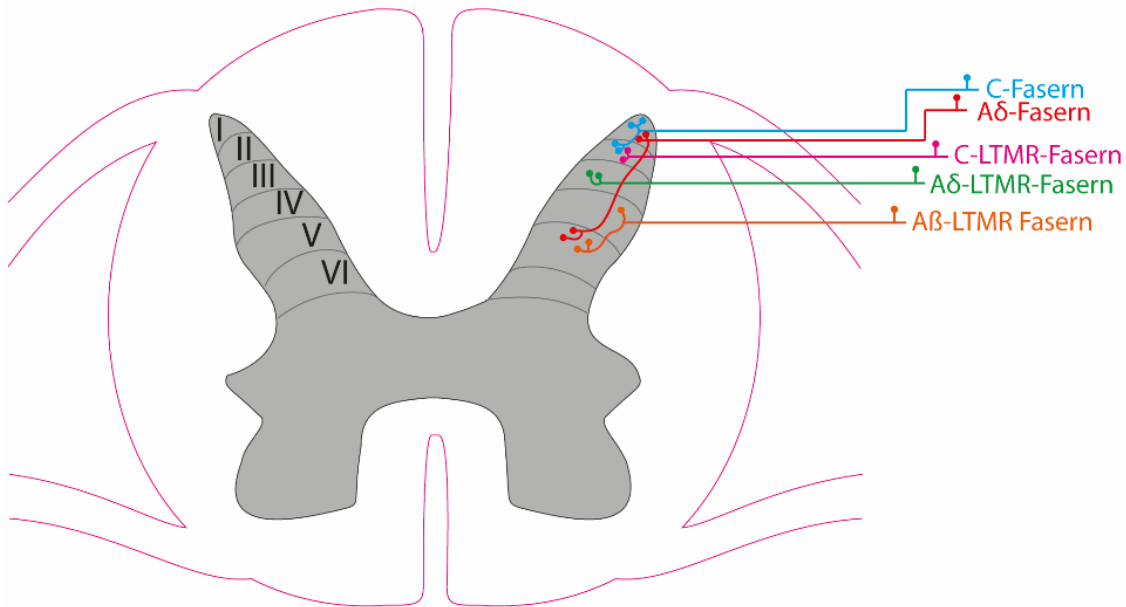


Abbildung 4: Vereinfachter anatomischer Aufbau des Dorsalhorns modifiziert nach Lallemand and Ernfors (2012). Organisation und Verschaltung der primär afferenten Fasern in den Laminae des Rückenmarks. Schmerzrelevante C-Fasern (blau) terminieren in den Laminae I und II des Dorsalhorns, Aδ-Fasern in den Laminae I und V (rot) und Aβ-Fasern (orange) in den Laminae IV und V. Weiterhin sind C-LTMR-Fasern (pink) dargestellt, die in der Lamina II terminieren und Aδ-LTMR-Fasern (grün) die in der Lamina III des Dorsalhorns enden.

Aδ-Nozizeptoren projizieren in die Lamina I und die Lamina V des Dorsalhorns. Aβ-Fasern münden typischerweise in die Laminae IV und V, C-Fasern in die oberen Laminae I und II. Die Afferenzen der C-Fasern kann man anhand ihrer Projektionen noch detaillierter charakterisieren: Die peptidergen C-Fasern terminieren in der Lamina I und in den dorsalen Teilen der Lamina II. Nicht-peptiderge C-Fasern terminieren in einem mittleren Bereich der Lamina II. Der ventrale Part der Lamina II kann anhand der Expression der Proteinkinase C γ (PKC γ), die in einer Gruppe exzitatorischer Interneurone exprimiert wird, charakterisiert werden. Ihnen kommt eine Rolle bei chronischen Schmerzen zu (Malmberg et al. 1997). Elektrophysiologische Studien zeigen, dass Lamina I und II Neurone des Dorsalhorns nach Aδ- und C-Faser-

Einleitung

Stimulation für die Weiterleitung von Schmerzreizen relevant sind und dass über A β -Fasern eintreffende Reize in den Laminae IV und V terminieren und eine weniger wichtige Rolle im Schmerzgeschehen einnehmen. Die Neurone der Lamina V empfangen sowohl nicht-schmerzhaft als auch schmerzhaft Reize durch monosynaptisch eintreffende Signale von A δ - und A β -Fasern und darüber hinaus auch Reize indirekt über polysynaptische C-Fasern. Man bezeichnet jene polysynaptischen C-Fasern auch als WDR-Neurone (wide dynamic range). WDR-Neurone detektieren eine große Bandbreite an Signalen, darunter auch viszerale Reize. Der Reiz wird nach der Verschaltung im Rückenmark über afferente Fasern zum Gehirn weitergeleitet, wo es zu einer Signalweiterleitung in verschiedene Hirnregionen kommt. Projektionsneurone der Laminae I und V tragen diesbezüglich zu einem großen Anteil zur Schmerzweiterleitung bei (Basbaum and Jessel 2000). Diese Neurone bilden den Ursprung für viele aufsteigende Leitungsbahnen (u. a. spinothalamischer und spinoretikulärer Trakt), die die Schmerzreize weiter zu Hirnregionen wie dem Thalamus und dem Hirnstamm leiten. Von thalamischen Regionen und dem Hirnstamm ausgehend werden die Informationen weiter zu kortikalen Strukturen geleitet (Basbaum et al. 2009). Obwohl verschiedene Hirnregionen bekannt sind, die an der Verarbeitung des Schmerzgeschehens beteiligt sind, ist die genaue zentrale Verschaltung noch unvollständig verstanden. Allerdings kann man festhalten, dass es kein spezifisches Areal im Gehirn gibt, das allein für das Schmerzgeschehen relevant ist, sondern dass es sich vielmehr um ein Zusammenspiel verschiedener zentraler molekularbiologischer Prozesse handelt (Apkarian et al. 2005).

1.3 Mechanismen der Schmerzsensibilisierung

Bei chronischen Schmerzen kann es durch komplexe Sensibilisierungsprozesse in peripheren (Schädigung in der Peripherie) oder zentralen Geweben (Schädigung im Gehirn oder Rückenmark) zu pathologisch veränderten Expressionsprofilen von Rezeptoren, Neurotransmittern u. a. kommen. Die jeweiligen Mechanismen werden analog als periphere und zentrale Sensibilisierung bezeichnet (Woolf 2004, Kuner 2015).

Eine periphere Sensibilisierung beinhaltet veränderte Genexpressionen, atypische Proteinexpressionen und pathologisch veränderte Phosphorylierungsmuster bzw. Modellierungen von Ionenkanälen im peripheren Nervensystem, was potentiell zu einer Reduktion der Reizschwelle für einen nozizeptiven Stimulus führen kann. Dies geschieht oft in Folge eines entzündlichen Geschehens, welches mit einer Freisetzung verschiedener Entzündungs- und Schmerzfactoren einhergeht.

Insbesondere die Protein-Kinase C (PKC), die Proteinkinase A (PKA), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die ‚extracellular-signal regulated‘ Kinase (ERK), p38 und die c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) sind bei nozizeptiven Prozessen von besonderer Bedeutung. Eine Induktion von Signalkaskaden (insbesondere bei Dauerstimulation) führt hier insbesondere zu Phosphorylierungsprozessen von TRP-Kanälen (TRPV1-, TRPA1-Kanal) und Natriumkanälen (Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9). Folglich kann es zu einer reduzierten Aktivierungsschwelle, einer Änderung der Kinetik und auch einer gesteigerten Einlagerung von Kanälen in die Zellmembran kommen. Dies resultiert insgesamt in einer gesteigerten Sensitivität gegenüber peripheren Stimuli (Woolf 2004, Woolf and Ma 2007, Reichling et al. 2013).

Die Prozesse, die einer zentralen Sensibilisierung zugrunde liegen, betreffen vor allem Veränderungen der Glutamat-/NMDA-Rezeptor-Signaltransduktion, Disinhibition, Glia-Neuron-Interaktionen und strukturelle Reorganisationen (Basbaum et al. 2009, Latremoliere and Woolf 2009, Kuner and Flor 2016). Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat ist ein wichtiger Mediator der chemischen Signalweiterleitung im Rückenmark. Glutamat bindet postsynaptisch an AMPA- (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) und mGlu-Rezeptoren (metabotrope Glutamatrezeptoren) und führt so zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran. Daraufhin kommt es im Fall von Glutamat postsynaptisch durch eine Bindung an den Rezeptor zu einer Induktion von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP). Durch den darauffolgenden

Einleitung

Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle kann es zu einer Aktivierung von Proteinkinasen kommen, welche wiederum AMPA- und NMDA-Rezeptoren phosphorylieren, was unter anderem die Empfindlichkeit für Glutamat erhöht (Scholz and Woolf 2002, Latremoliere and Woolf 2009). Jene Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen (PKA, PKC, ERK) führt zu einer Veränderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, einer veränderten Genexpression (z.B. c-Fos, Cox-2, NK-1, TrkB) (Latremoliere und Woolf, 2009) und kann zu einer langfristigen Modulation zentraler nozizeptiver Prozesse beitragen.

Die Hemmung inhibitorischer nozizeptiver Signalwege stellt einen weiteren Mechanismus der zentralen Sensibilisierung dar. Diese Disinhibition kann ebenfalls zu einer gesteigerten Reaktivität des nozizeptiven Systems führen. GABAerge und glycinerge Interneurone kommen gehäuft innerhalb des Dorsalhorns vor und dämpfen normalerweise überschießende oder unphysiologische Reize. Eine Hemmung durch Rezeptorantagonisten oder ein Funktionsverlust dieser Interneurone kann demnach in einer gesteigerten Reizweiterleitung resultieren, wobei der genaue Mechanismus noch diskutiert wird (Moore et al. 2002, Kuner and Flor 2016). Während einige Forschergruppen davon ausgehen, dass es sich um eine Kaspase-abhängige Apoptose der Zellen an der Seite der Verletzung handelt (Moore et al. 2002, Scholz et al. 2005), halten andere Gruppen eine Apoptose von Mikroglia (im Gegensatz zu Neuronen) als Ursache für wahrscheinlicher (Polgar et al. 2004).

Insgesamt sind die möglichen Veränderungen und Sensibilisierungsprozesse innerhalb des nozizeptiven Systems vielfältig und stellen daher eine Herausforderung in der Therapie chronischer Schmerzpatienten dar.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im nozizeptiven System

1.4.1 Physiologische ROS Funktionen

Aus dem biologischen Kontext heraus betrachtet sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wichtige Signalmoleküle und entstehen zum Teil als Nebenprodukte physiologischer metabolischer Prozesse (Afonso et al. 2007). Einerseits sind hier Radikalderivate des molekularen Sauerstoffs (O_2) gemeint, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen tragen wie Superoxid (O_2^-), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Peroxylradikale ($ROO\cdot$), und Alkoxyradikale ($RO\cdot$), andererseits dessen nicht radikalische Derivate Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorige Säure ($HOCl$) und Peroxynitrit Anionen ($ONOO^-$) (Hurd and Murphy 2009). Die Einwirkung von Hitze (thermolytische Bindungsspaltung), UV-Licht (Photolyse), Röntgen- bzw. ionisierender Strahlung und elektrochemische Redoxprozesse können zu der Bildung von ROS führen. Viele Radikale reagieren exergonisch, sind sehr reaktiv und haben eine kurze Lebenszeit von unter einer Sekunde. Obwohl man weiß, dass erhöhte ROS Spiegel (oxidativer Stress) schädliche Auswirkungen auf den Körper haben können, zeigen aktuelle Forschungsarbeiten, dass die Produktion von ROS in physiologischen Konzentrationen reversible Signalprozesse steuern kann. In hohen, pathologischen Konzentrationen können ROS jedoch an der Entstehung von Krankheiten (u. a. neuropathischer Schmerz, Krebs, Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen) beteiligt sein.

Eine der wichtigsten ROS-Quellen stellen die Mitochondrien dar, in welchen ROS als Nebenprodukt der Zellatmung entstehen. Im Rahmen der ATP-Produktion in der Atmungskette kommt es in der inneren Membran der Mitochondrien zu einer Reihe von katalysierten Redoxreaktionen. Dabei passieren Elektronen die in den integralen Membrankomplexen organisierten Redoxsysteme, wobei im letzten Schritt molekularer Sauerstoff reduziert wird. Im Rahmen der Atmungskette entstehen ROS, wie O_2^- , durch eine inkomplette bzw. eine ein- oder zwei-Elektronen-Reduktion. Dies geschieht hauptsächlich an den Komplexen I und III mittels „NADH-Ubichinon Oxidoreduktase“ sowie an dem Komplex III auch mittels „Ubiquinol-Cytochrom C Oxidoreduktase“. Bei dem Komplex III handelt es sich um die mitochondriale ROS-Hauptquelle (Bratic and Larsson 2013). Eine weitere ROS-Quelle sind Xanthinoxidasen. Dabei kommt es außerhalb der Mitochondrien durch eine katalysierte Hypoxanthin-Oxidation zu einer O_2^- Generierung (Kinuta 1989, Kinuta et al. 1989). Auch durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen kann O_2^- generiert werden (Cho et al. 2011).

Einleitung

Weiterhin können ROS durch NADPH-Oxidasen freigesetzt werden (Lambeth 2004), deren Hauptfunktion offenbar in der Generierung von ROS besteht. Die einzelnen NADPH-Oxidasen unterscheiden sich in ihrem Aufbau, ihrem Expressionsmuster und in ihrer physiologischen Funktion. Sie katalysieren die Umwandlung von molekularem Sauerstoff zu Superoxid, wobei NADPH als Elektronendonator fungiert (Griendling et al. 2000, Touyz 2004). Im Rahmen von Abwehrmechanismen (z.B. Bakterien- und Virenabtötung) werden ROS-Moleküle von Abwehrzellen wie Makrophagen, Granulozyten und Microglia zur Abwehr verwendet (Abbildung 5).

Zellen schützen sich gegen eine potentielle oxidative Schädigung, indem sie verschiedene zelleigene Antioxidantien nutzen, um ROS in untoxische Nebenprodukte umzuwandeln (Bachi et al. 2013). Man unterscheidet zum einen zwischen dem nicht-enzymatischen Abbau und dem enzymatischen Abbau von ROS. Der nicht-enzymatische Abbau gelingt über eine direkte Reaktion mit Antioxidantien wie beispielsweise Glutathion, Vitamin C, Vitamin E, Carotinoiden und Harnsäure. Bei enzymatischen Vorgängen entgiften körpereigene Enzyme wie Superoxid-Dismutasen, Glutathion-Peroxidasen, Katalasen u. a. die Zellen von übermäßigen ROS-Konzentrationen und tragen so zu einer Aufrechterhaltung eines physiologischen Redoxstatus bei (Abbildung 5) (Maher and Schubert 2000, Apel and Hirt 2004, Afonso et al. 2007).

Einleitung

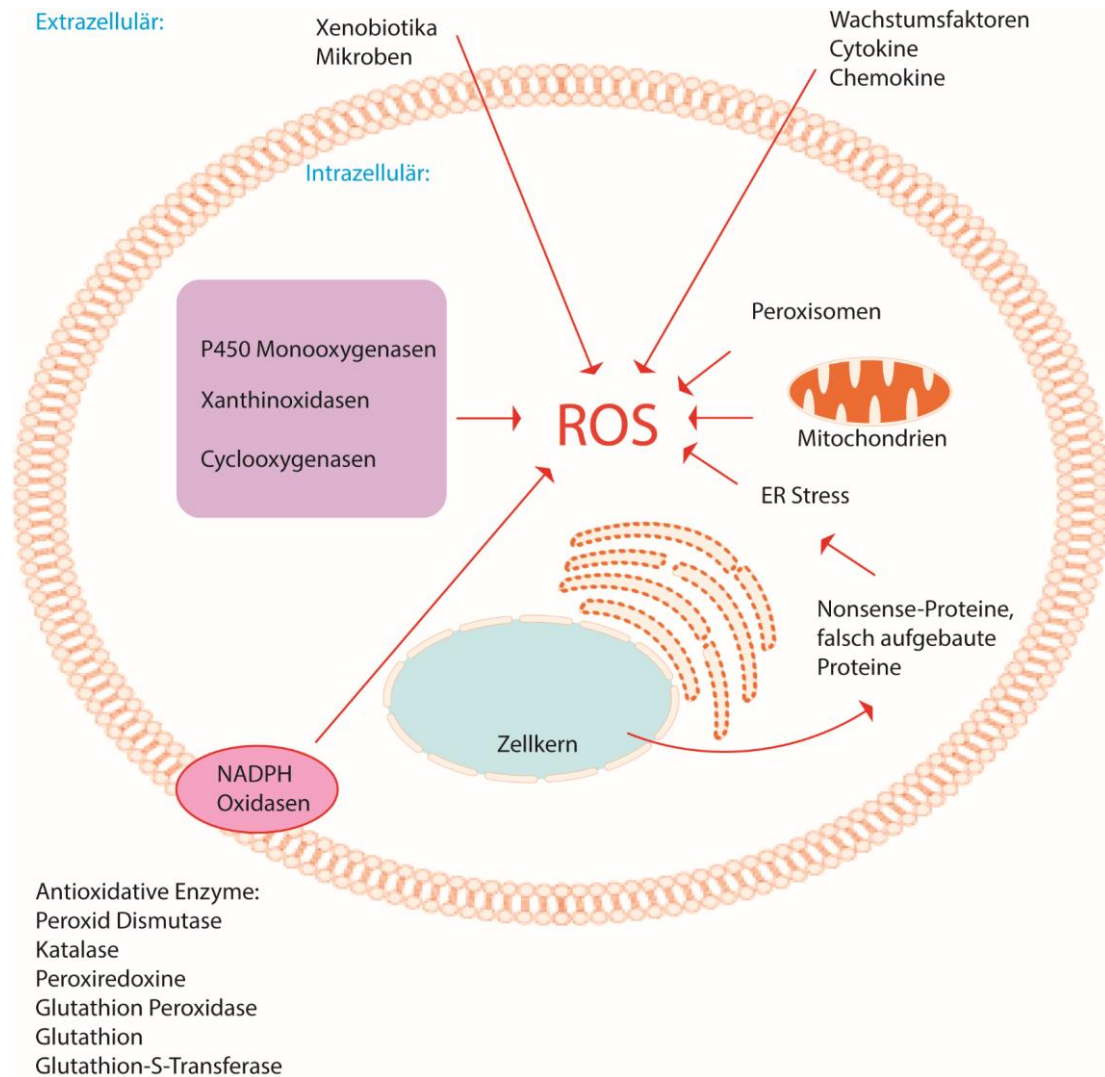


Abbildung 5: Intrazelluläre und extrazelluläre ROS-Quellen. Die Mitochondrien stellen primäre intrazelluläre ROS-Quellen dar. ROS können zudem durch verschiedene Enzyme (u. a. NADPH-Oxidasen), über Genexpressionen, Peroxisomen und die Entstehung von falsch gefalteten/funktionsuntüchtigen Proteinen generiert werden, die zu zellulärem Stress führen; modifiziert nach Carrasco et al. (2018).

Die physiologischen Wirkmechanismen von ROS sind von deren jeweiligen Eigenschaften abhängig. Superoxid kann beispielweise als polares Molekül Membranen nicht passieren, was den direkten Einflussbereich von Superoxid auf seinen Entstehungsort begrenzt. Es besitzt eine lokal proinflammatorische Wirkung und vermag Zellen sowie die extrazelluläre Matrix zu schädigen. In wässriger Lösung ist O_2^- weniger stabil und es kommt zu einer schnellen Umwandlung zu H_2O_2 . Bei pH 7,0 weist es eine Dismutationsrate von $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf. Dieser Prozess kann durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) um das 10^4 -fache beschleunigt werden. Folglich ist eine O_2^- Produktion in der Regel mit einem Anstieg der H_2O_2 -Konzentration

Einleitung

assoziiert. H_2O_2 kann durch Aquaporine in das Zytoplasma von Zellen diffundieren und Zellmembranen passieren (Bienert et al. 2006, Hooijmaijers et al. 2012, Laforenza et al. 2016, Watanabe et al. 2016). Es weist somit Eigenschaften eines sekundären Messengers auf und kann als Kommunikationsmittel zwischen Zellen fungieren (Afonso et al. 2007). Das H_2O_2 -Molekül kann jedoch auch durch Monoaminoxidasen (Monoaminoxidase 1 und 2) synthetisiert werden (Sandri et al. 1990). Bei Menschen sind bisher drei Isoformen der Superoxid-Dismutase für die Neutralisation von O_2^- bekannt (SOD 1-3). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die SOD-Isoformen eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus besitzen. Ihnen wird weiterhin eine schützende Rolle vor neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben (Afonso et al. 2007).

Selektive Wirkmechanismen von ROS beinhalten unter anderem Redoxmodifikationen an Thiolresten von Proteinen (insbesondere der Thiolgruppe von Cystein-Resten bzw. an der Schwefelgruppe der Aminosäure Methionin), welche die primären Targets für Redoxreaktionen sind (Stadtman and Levine 2003, Stadtman et al. 2003, Boronat et al. 2015). Dabei findet eine Oxidation der Thiolgruppe zum Sulfensäurerest oder weiter zum Sulfinsäurerest bzw. Sulfonsäurerest statt (Abbildung 6). Durch diese Modifikationen können dreidimensionale Faltungen und Aktivitätszustände von Proteinen verändert und Signalkaskaden beeinflusst werden. Auch oxidative Veränderungen der Peptidbindungen (Kohlenstoff-Stickstoff-Rückgrat) von Proteinen verändern deren Funktion. Zudem können auch empfindliche Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Threonin von oxidativen Veränderungen betroffen sein. Hier kann es durch eine direkte Oxidation der Seitenkette zu einer Carbonylformation kommen (Stadtman and Levine 2003, Stadtman et al. 2003, Bern et al. 2010, Kim et al. 2014). Oxidativen Modifikationen an Proteinen kommt daher eine duale Funktion zu – einerseits bieten sie einen oxidativen Schutz vor irreversiblen Reaktionen und andererseits ermöglichen sie eine Funktionsänderung durch Veränderungen in der Proteininformation (Redox Regulation) (Boronat et al. 2015).

Einleitung

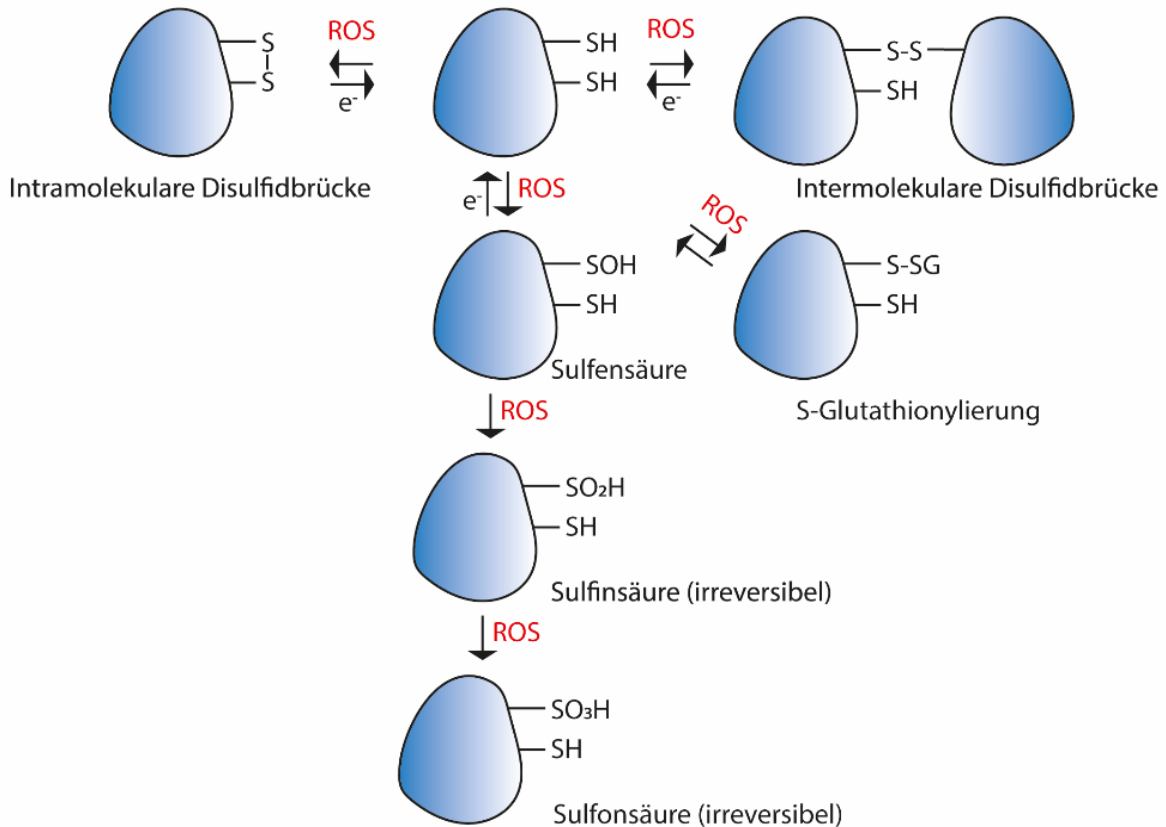


Abbildung 6: Schematische Darstellung der oxidationsabhängigen Modifikationen reaktiver Cysteinthiole (R-SH). Die Deprotonierung von Thiolen geschieht abhängig von dem jeweiligen Zellmilieu. Ein Thiolat (R-SH) kann mit Oxidantien (ROS) wie beispielsweise Wasserstoffperoxid reagieren, wobei es zu der Bildung von Sulfensäure kommt. Sulfensäure kann weiter zu Sulfinsäure und Sulfonsäure oxidiert werden. Weiterhin kann es innerhalb des Proteins zur Bildung von Disulfidbrücken kommen (intramolekulare Disulfidbrücke) und/oder zu Disulfidbildungen mit anderen Proteinen (intermolekulare Disulfidbrücken). Auch eine S-Glutathionylierung ist möglich (modifizierte Abbildung nach Cuello and Eaton (2019)).

1.4.2 ROS-Signaling im schmerzverarbeitenden System

Anhand von Proteom-Daten konnte gezeigt werden, dass Redoxmodifikationen von Proteinen mit einigen Krankheiten assoziiert bzw. an deren Pathogenese beteiligt sind (Poon et al. 2005, Butterfield and Dalle-Donne 2014). Hier sind insbesondere Diabetes, Nierenerkrankungen, respiratorische Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen und verschiedene Krebsformen zu nennen (Haut-, Brustkrebs, sowie Krebserkrankungen des zentralen Nervensystems u. a.) (Turchan et al. 2003, Tabner et al. 2005, Tabner et al. 2005, Thongboonkerd and Malasit 2005, Reuter et al. 2010, Sanchez-Gomez et al. 2013, Butterfield and Dalle-Donne 2014). Interessanterweise werden ROS auch im nozizeptiven System generiert und spielen bei Sensibilisierungsprozessen eine Rolle (Salvemini et al. 2011, Kallenborn-Gerhardt et al. 2013). Insbesondere die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Produktion ist hier von

Einleitung

besonderem Interesse, da Knockout-Mäuse der NADPH-Oxidasen Nox1, Nox2 und Nox4 ein nachweislich reduziertes Schmerzverhalten in inflammatorischen und/oder neuropathischen Schmerzmodellen zeigten (Ibi et al. 2008, Kettenhofen and Wood 2010, Im et al. 2012, Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Lim et al. 2013, Kallenborn-Gerhardt et al. 2014) (siehe Kapitel 1.4.3). Eine Gabe von Antioxidantien und ROS-Scavengern führte zudem in verschiedenen Tiermodellen zu einer Reduktion des Schmerzverhaltens (Schwartz et al. 2008, Lu et al. 2011, Ko et al. 2012, Riffel et al. 2016).

Auf Proteinebene kann es durch oxidative Prozesse zu strukturellen und funktionellen Änderungen der Proteine kommen. Beispielsweise zeigen TRP Ionenkanäle, NMDA-Rezeptoren, T-Typ-Calciumionenkanäle und verschiedene K⁺-Kanal-Subtypen (z. B. KCNQ, K⁺_{ATP}, BK und A-Typ-K⁺-Kanäle) ROS-abhängige strukturelle bzw. funktionelle Änderungen (Kozai et al. 2014, Evans and Todorovic 2015). Bei spannungsabhängigen K⁺-Kanälen kommt KCNQ (auch Kv7 oder M-Kanal genannt) eine Rolle bei der Reiz- bzw. Schmerzübertragung zu. Eine Oxidation führt zu einer beachtlichen Verstärkung der KCNQ-Aktivität (Li et al. 2004). Die Ca²⁺ aktivierten Kaliumkanäle (Slo1, BK und Maxi K) werden in Subpopulationen sensorischer Neurone exprimiert. Eine Aktivierung führt insbesondere zu einer Verkürzung von Aktionspotentialen, der Beschleunigung einer Hyperpolarisation und einer schnelleren Repolarisation (Scholz et al. 1998, Li et al. 2007). BK Kanalproteine enthalten viele Cysteinreste, die oxidativ moduliert werden können. Daher können diese Proteine durch Redoxprozesse in ihrer Funktion beeinflusst werden (Kemp and Peers 2007, Sahoo et al. 2014). ATP-sensitive K⁺ Kanäle enthalten unter anderen die regulatorischen Sulfonylharnstoff-Untereinheiten SUR1 und SUR2 (Hibino et al. 2010). Studien an diesen Kanälen konnten zeigen, dass K⁺_{ATP} Induktoren (Diazoxid und Pinacidil) zu einer Hyperpolarisation von nozizeptiven Neuronen führen, was Bradykinin induzierte Schmerzen reduziert (Du et al. 2011). Auch Ca²⁺-Kanäle, insbesondere T-Typ Calcium-Kanäle, können durch oxidative Modifikationen in ihrer Funktion beeinflusst werden (Jevtovic-Todorovic and Todorovic 2006, Coste et al. 2007, Rose et al. 2013).

Heute sind neun Isoformen von TRP-Kanälen bekannt (TRPA1, TRPC5, TRPM2, TRPM4, TRPM7, TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4), die durch oxidativen Stress aktiviert werden (Mori et al. 2016, Ogawa et al. 2016). Vier dieser Kanäle (TRPA1, TRPM2, TRPV1 und TRPV4) werden stark in nozizeptiven Neuronen exprimiert.

Einleitung

TRPA1 Kanäle werden durch verschiedene Stimuli (z.B. Senföl, Zimtaldehyd und Temperaturen ≤ 17 °C) aktiviert. Zudem handelt es sich bei TRPA1 um einen für oxidativen Stress sensitiven Ca^{2+} -Kanal. Bei dem TRPM2-Rezeptor handelt es sich um einen Rezeptor mit Enzymfunktion, der C-terminal eine Pyrophosphatase (ADP Ribose) enthält, welche sensitiv auf ROS und RNS (reactive nitrogen species) reagiert (Naziroglu 2007). TRPM2-Rezeptoren werden in den sensorischen Neuronen exprimiert (Naziroglu 2011), wobei hier insbesondere die ROS-Produktion von NADPH-Oxidasen zu einer Sensibilisierung der Kanäle führt und ein chronisches Schmerzgeschehen induzieren kann (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012).

Eine Unterfamilie der TRP Superfamilie ist die Vanilliod Familie. TRPV1 ist ein Mitglied dieser Unterfamilie, das durch hohe Temperaturen und Capsaicin (einer Komponente des Chili) aktiviert werden kann (Caterina et al. 1997). Der Kanal kann zusätzlich durch einen niedrigen pH ($< 5,9$), eine Temperatur > 43 °C und ROS aktiviert werden und Schmerzen induzieren (Yoshida et al. 2006). Bei dem TRPV1-Kanal handelt es sich ebenfalls um einen Kationenkanal, dessen Struktur über mehrere Cystein-Reste verfügt, welche durch oxidative Prozesse aktiviert und modifiziert werden können (Yoshida et al. 2006, Chuang and Lin 2009), sowie Disulfidbrücken ausbilden können (Wang and Chuang 2011). In Versuchen mit Ratten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Gabe von Antioxidantien wie GSH (Glutathion), Selen und NAC (N-Acetylcystein) eine über TRPV1 vermittelte Hyperalgesie reduzieren kann (Khodorova et al. 2013, Naziroglu et al. 2013, Kahya et al. 2017).

TRPV4 gehören ebenfalls zu den TRP-Kanälen. Diese Kanäle werden aktiviert durch die Ester des Phorbols (Alkohol, Naturstoff aus Pflanzen wie Wolfsmilchgewächsen und Seidelbastgewächsen), einen niedrigen pH-Wert, Citrat, Arachidonsäure, exogenen Chemikalien wie Bisandrographolid A und hohe Temperaturen (≥ 24 °C) (Guler et al. 2002, Yoshida et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der TRPV4-Kanal ebenfalls auf oxidativen Stress in Form von H_2O_2 reagiert (Bai and Lipski 2010, Materazzi et al. 2012), wobei jene Aktivierung durch die Gabe von GSH gehemmt werden konnte (Materazzi et al. 2012).

Viele der genannten Kanäle sind in die Lipiddoppelschicht von Membranen eingelagert und haben eine komplexe Beziehung zu den molekularbiologischen Funktionen dieser Schicht. Daher können unphysiologische ROS-Konzentrationen schädigend auf die Membran und die in ihr verankerten Proteine wirken. Hohe ROS-Konzentrationen zerstören Lipide insofern, dass diese selbst zu Radikalen werden. Diese

Lipidperoxidation entsteht durch eine ROS-vermittelte Bisallyl-Reaktion, wobei hoch reaktive elektrophile Aldehyde entstehen können (Wagner et al. 1994). Durch die hohe Reaktivität der Lipidradikale und von ROS kommt es zu Lipid-Lipid und Lipid-Protein Cross-Linking, was sowohl die Funktionalität der Membran als auch die in ihr verankerten Kanalproteine in ihrer Funktion beeinträchtigen kann (Yang et al. 1996, Anzai et al. 1999, Sultana et al. 2006).

1.4.3 Funktionen von NADPH-Oxidasen bei der Schmerzverarbeitung

Insbesondere bei einer chronischen Entzündung oder bei neuropathischen Schmerzen kann es zu einer erhöhten Bildung von ROS kommen. Als wichtige ROS-Quellen sind in diesem Zusammenhang die NADPH-Oxidasen zu nennen. Im Gegensatz zu anderen ROS-Quellen, deren ROS-Produktion eher einen Nebeneffekt anderer Stoffwechselprozesse darstellt, ist die ROS-Generierung bei NADPH-Oxidasen eine primäre Funktion dieser Enzyme. NADPH-Oxidasen sind Transmembranproteine, die Elektronen von zytosolischem NADPH über die Membran auf molekularen Sauerstoff übertragen und dabei extrazelluläre oder luminale Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid generieren (Holmstrom and Finkel 2014, Casas et al. 2015). Insgesamt gibt es sieben Mitglieder der Familie der NADPH-Oxidasen, Nox1-5 sowie Duox 1-2. Die Nox NADPH-Oxidasen (Nox1-5) weisen bezüglich ihrer Struktur eine hohe Homologie auf, zeigen jedoch Unterschiede bezüglich ihrer Expressionsmuster in Geweben und haben unterschiedliche Aktivierungsmechanismen (Bedard and Krause 2007). Von besonderem Interesse im schmerzverarbeitenden System sind die NADPH-Oxidasen Nox1, 2 und 4, welche eine Rolle bei chronischen Schmerzen spielen. Während Nox1 insbesondere eine Funktion bei entzündlichen Schmerzen, Endometriose und Depressionen spielt (Ibi et al. 2008, Nassif et al. 2016, Ibi et al. 2017), wird das neuropathische Schmerzverhalten insbesondere durch die Enzyme Nox2 und Nox4 beeinflusst (Kim et al. 2010, Im et al. 2012, Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Kallenborn-Gerhardt et al. 2014, Geisz et al. 2017).

Für Nox1 ist eine sehr hohe Expression innerhalb des Dickdarms beschrieben, darüber hinaus auch in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, im Uterus, in der Placenta, in der Prostata, in Osteoclasten und in Pericyten (Bedard and Krause 2007). Die Aktivierung von Nox1 bedarf mehrerer Untereinheiten, wobei die membranständige Untereinheit p22phox von essenzieller Bedeutung ist (Banfi et al. 2003, Geiszt et al. 2003, Geiszt

Einleitung

et al. 2003). Hinzu kommen andere zytosolische Untereinheiten, die an der Aktivierung von Nox1 beteiligt sind: Nox Organizer 1 (NOXO1) und Nox Activator 1 (NOXA1) (Banfi et al. 2003, Geiszt et al. 2003, Geiszt et al. 2003). Die Nox1 Expression kann in Mikroglia, Neuronen, Astrozyten und Makrophagen der Spinalganglien und im zentralen Nervensystem induziert werden (Ibi et al. 2008, Kim et al. 2010, Nayernia et al. 2014). Nox1 Knockout-Mäuse zeigten im Formalin- und Carrageenan-Modell eine reduzierte nozizeptive Hypersensitivität (Ibi et al. 2008). Aus Nox1 generierte ROS induzieren eine Translokation der PKC ϵ in die Membran und verstärken auf diese Weise die TRPV1-Aktivität in Spinalganglien, was zu einer verstärkten Schmerzreaktion führt (Ibi et al. 2008). Andere Versuche zeigten jedoch, dass die Nox1 mRNA-Expression im neuropathischen Schmerzmodell nicht wesentlich hochreguliert wurde, was vermuten lässt, dass Nox1 primär bei inflammatorischen Schmerzen eine Rolle spielt (Kallenborn-Gerhardt et al. 2014).

Die NADPH-Oxidase Nox2 wurde zuerst in Phagozyten beschrieben und gilt als der Prototyp der Nox-Familie (Segal and Jones 1978, Segal et al. 1978, Royer-Pokora et al. 1986, Teahan et al. 1987). Mittlerweile hat man Nox2 auch in anderen Geweben, wie B-Lymphozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Skelettmuskelzellen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Hepatozyten und im Endothel detektiert (Bedard and Krause 2007). Für die Funktion im schmerzverarbeitenden System ist insbesondere die Expression im Gehirn, Rückenmark und den Spinalganglien interessant (Sorice and Krause 2009). Die Aktivität von Nox2 ist von verschiedenen Untereinheiten abhängig: p22phox, p40phox, p47phox und Rac, wobei Nox2 über p47phox aktiviert wird. Bei einer Phosphorylierung dieser Untereinheit kommt es zu einer Konformationsänderung und einer darauffolgenden Interaktion mit dem p22phox-Nox2-Komplex (Groemping et al. 2003). Daraufhin können die anderen zytosolischen Untereinheiten rekrutiert werden und zusammen den funktionellen Nox2-Komplex bilden (Han et al. 1998, Diebold and Bokoch 2001). In neuropathischen Schmerzmodellen konnte gezeigt werden, dass es im Zuge einer Nervenverletzung zu einer Hochregulation von Nox2 mRNA in den Spinalganglien und in den spinalen Mikroglia kommt, was mit einer erhöhten Konzentration von Superoxid korreliert. Es konnte zudem *in vivo* gezeigt werden, dass ein Nox2-Knockout das neuropathische Schmerzverhalten von Mäusen nach einer peripheren Nervenverletzung reduziert (Kim et al. 2010, Kallenborn-Gerhardt et al. 2014).

Einleitung

Nox4 wird in der Niere, Osteoclasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, hämatopoetischen Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Myelomzellen und Neuronen exprimiert (Geiszt et al. 2000, Shiose et al. 2001, Bedard and Krause 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass es innerhalb des schmerzverarbeitenden Systems auch in myelinisierten A-Fasern und in nicht-myelinisierten C-Fasern vorkommt, sowie in Mikroglia, Astrozyten und Makrophagen (Lee et al. 2010, Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Casas et al. 2015). Anders als bei den anderen Familienmitgliedern scheint die Aktivität von Nox4 nur von der membranständigen Untereinheit p22phox abhängig zu sein (Kawahara et al. 2005, Martyn et al. 2006). Es wurden bisher verschiedene Proteine identifiziert, wie beispielsweise Poldip2 (Lyle et al. 2009), Tks4/5 (Diaz et al. 2009) und PDI (Janiszewski et al. 2005), die regulatorisch auf die Nox4 Funktion wirken können. Studien in Endothelzellen lassen vermuten, dass Nox4 auch an Zellalterungs- und Zellzyklusfunktionen, sowie bei Zellmigration eine Rolle spielen könnte (Montezano et al. 2011). Sowohl eine pharmakologische Hemmung von Nox4 (durch einen NADPH-Oxidase-Inhibitor) als auch ein Nox4-Knockout wirkten sich günstig auf oxidativen Stress, Störungen der Blut-Hirn-Schranke und neuronale Apoptose aus (Kleinschnitz et al. 2010). In nozizeptiven Versuchen mit Mäusen zeigte sich, dass Nox4-Knockout Mäuse ein reduziertes Schmerzverhalten in neuropathischen Schmerzmodellen haben (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Geis et al. 2017). Neben dieser Funktion im Schmerzgeschehen wirkt Nox4 protektiv im kardiovaskulären System, indem es vasodilatierende und proangiogenetische Eigenschaften hat (Zhang et al. 2010, Schroder et al. 2012).

1.4.4 Potentielle Redoxtargets im schmerzverarbeitenden System

Wie bereits beschrieben sind verschiedene Redoxtargets innerhalb des nozizeptiven Systems bekannt. Einerseits kann es durch ROS zu einer Beeinflussung von enzymatischen Vorgängen kommen, andererseits können auch Kanalproteine und Membranen in ihrer Funktion beeinflusst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei potentiellen Redoxtargets S100A4 und sEH näher auf ihre Funktionen innerhalb des nozizeptiven Systems untersucht.

Einleitung

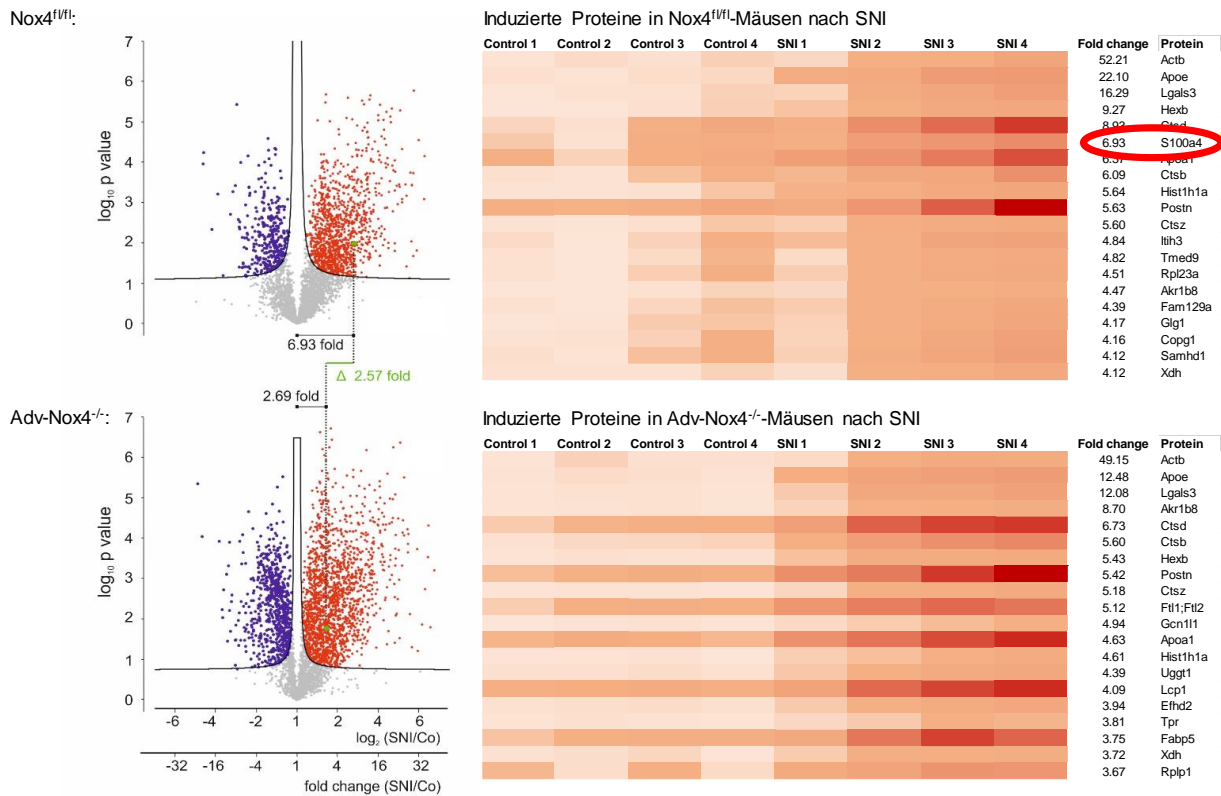


Abbildung 7: Proteomscreen der SNI-regulierten Proteine im Ischiasnerv von Adv-Nox4^{-/-} und Nox4^{flox/flox}-Mäusen. Das Protein S100A4 wird Nox4-abhängig nach peripherer Nervenverletzung hochreguliert. Links dargestellt ist die unterschiedliche Regulation in Nox4^{flox/flox}-Mäusen und Adv-Nox4^{-/-}-Mäusen im Ischiasnerv nach peripherer Nervenverletzung (SNI). Die Regulation von S100A4 in den Nox4^{flox/flox}-Mäusen ist im Gegensatz zu den gewebespezifischen Adv-Nox4^{-/-}-Mäusen SNI-abhängig stark erhöht (Δ 2,57). Rechts dargestellt ist eine Heat-Map der Proteine, die Nox4-abhängig nach SNI reguliert werden. S100A4 wird 6,93-fach (angegeben als „fold change“) Nox4-abhängig nach SNI in den Ischiasnerven der Nox4^{flox/flox}-Mäuse reguliert und ist somit eines der am stärksten regulierten Proteine nach peripherer Nervenverletzung. In Adv-Nox4^{-/-}-Proteinen wird S100A4 wesentlich geringer exprimiert und ist nicht mehr unter den am stärksten regulierten Proteinen. Der Proteomscreen wurde von Dr. Ilka Wittig und Dr. Juliana Heidler an der medizinischen Fakultät (Functional Proteomics) der Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

Es ist bereits durch vorherige Forschungsarbeiten bekannt, dass die NADPH-Oxidase Nox4 eine Funktion bei neuropathischen Schmerzen besitzt (siehe Kapitel 1.4.3). Allerdings ist weniger gut verstanden, welche weiteren Proteine innerhalb des Schmerzgeschehens Nox4 abhängig reguliert werden. Anhand von Vorversuchen mit gewebespezifischen Nox4-Knockout (Adv-Nox4^{-/-}) Mäusen, in denen Nox4 selektiv in sensorischen Neuronen ausgeknockt ist, konnte eine Nox4-abhängige Hochregulation von S100A4 im Ischiasnerv nach Nervenverletzung ermittelt werden. Bei diesem Versuch wurde eine periphere Nervenverletzung, Spared nerve Injury (SNI), durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ischiasnerven der Mäuse 14 Tage nach SNI

entnommen und mittels eines Proteomscreens gemessen. Im Folgenden wurde die SNI-abhängige Proteinregulation in den Adv-Nox4^{-/-} und den Nox4^{flox/flox}-Mäusen bestimmt. Als eines der am stärksten Nox4-abhängig regulierten Proteine nach SNI konnte das Protein S100A4 identifiziert werden (Abbildung 7). Bei den Nox4^{flox/flox}-Mäusen zeigte sich eine starke SNI-abhängige Hochregulation von S100A4, die bei den gewebespezifischen Knockout-Mäusen nicht messbar war. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Regulation von S100A4 direkt oder indirekt durch Nox4 beeinflusst wird.

1.4.4.1 S100A4

Die Namensgebung der S100-Proteine basiert auf deren Löslichkeit in einer 100 % gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Es handelt sich um kleine (Molekulargewicht zwischen 10-12 kDa) saure Proteine, die strukturell in der Regel als symmetrische Homodimere vorliegen und die durch nicht-kovalente intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden (Moore 1965). S100 Familienmitglieder oder Homologe konnten nicht in Pflanzen, Hefen, Würmern oder Fliegengenomen gefunden werden (Zimmer et al. 2003) und wurden zuerst in Fischen - *Salvelinus fontinalis* - (Bobe and Goetz 2000), und Zebrafischen (Hsiao et al. 2003) nachgewiesen, was impliziert, dass es sich bei Proteinen der S100 Familie um phylogenetisch neue Proteine handelt. Aktuell sind über 20 verschiedene S100 Familienmitglieder bekannt, die sich in ihrem Expressionsmuster und ihrer Funktion unterscheiden (Zimmer et al. 1995, Heizmann et al. 2002). S100 Monomere bestehen aus zwei Calcium-bindenden EF-Hand-Domänen (Helix-Loop-Helix Motif) (Heizmann and Cox 1998). EF-Hand Calcium bindende Proteine sind mit Calmodulin, Troponin C und Parvalbumin strukturverwandt (Persechini et al. 1989). Die meisten der S100 Proteine können auf Grund dieser Struktur Calcium binden, wobei Familienmitglieder mit veränderter EF-Hand-Struktur (wie S100A10) nicht über diese Bindungsaffinität verfügen (Gerke and Weber 1985). Eine Calciumbindung führt zu einer Konformationsänderung der Proteine, wobei eine hydrophobe Bindetasche freigelegt wird, die intra- und extrazelluläre Proteinbindungen möglich macht (Abbildung 8) (Drohat et al. 1998, Otterbein et al. 2002, Wright et al. 2005). Manche Familienmitglieder binden auch Kupfer- oder Zinkionen, wodurch ebenfalls die biologische Aktivität reguliert wird (Nishikawa et al. 1997, Heizmann and Cox 1998, Schafer et al. 2000, Marenholz et al. 2004). Die Fähigkeit der Proteine, nicht-kovalente Homo- und Hetero-Dimere zu bilden erlaubt einen dynamischen

Einleitung

Austausch der S100 Untereinheiten (Sedaghat and Notopoulos 2008). Unter anderem konnte für S100 Proteine eine Funktion in der Zelldifferenzierung, beim Zellwachstum, innerhalb der Zellzyklusregulation und eine Interaktion mit zytoskeletalen Proteinen nachgewiesen werden (Donato 2001, Donato 2003). Einige S100 Proteine, wie S100A4, S100A6, S100A7 und S100B, werden bei verschiedenen Krebsstadien und –formen stark hochreguliert (Emberley et al. 2004).

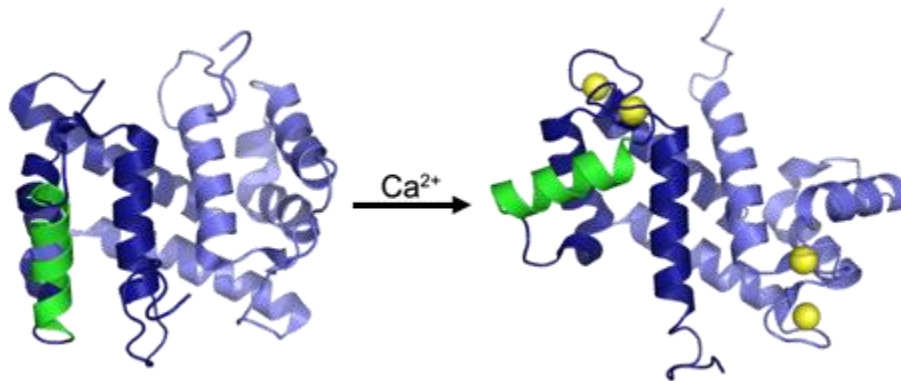


Abbildung 8: Calcium-abhängige Konformationsänderung von S100A4, die zu einer Freilegung der für die Targetbindung notwendigen hydrophoben Tasche führt. Abbildung nach Anne Bresnick u. a. (2005), veröffentlicht von Gajanan u. a., (2013).

Humanes S100A4 (auch Metastasin genannt) ist, bezüglich seiner Rolle beim Krebsgeschehen und in der Angiogenese, das am besten charakterisierte Mitglied der S100 Proteinfamilie (Barracough and Rudland 1994, Semov et al. 2005). Wie bei anderen S100 Proteinen führen hohe intrazelluläre Calciumspiegel zu einer nicht-kovalenten Dimerisierung von S100A4 (Tarabykina et al. 2001). S100A4 kommt sowohl innerhalb der Zelle als auch extrazellulär vor. Intrazellulär bindet es in Abhängigkeit des Calciumspiegels seine Targets und reguliert so verschiedene Zellfunktionen. Die extrazelluläre biologische Aktivität ist mit verschiedenen Multimeren von S100A4 assoziiert. Eine Überexpression von S100A4 wurde bereits in Verbindung mit Tumor-assoziiertem Angiogenese beobachtet (Barracough and Rudland 1994, Semov et al. 2005). Neben anderen Krebsformen wird S100A4 insbesondere bei metastasierendem Brustkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostata-, Gallenblasen- und Lungenkrebs stark überexprimiert (Kimura et al. 2000, Nakamura et al. 2002, Pedersen et al. 2002, Rosty et al. 2002, Gupta et al. 2003). Im aktiven Zustand kann S100A4 mit vielen Zielproteinen, wie Proteinen der p53 Familie, HDM2, Annexin II, F-Actin, Tropomyosin oder Myosin IIA interagieren

(Grigorian u. a., 2001; Kriajevska u. a., 1994; Kriajevska u. a., 2002; Semov u. a., 2005). Neben seiner Hochregulation fördert es zudem die Metastasierung (Barraclough and Rudland 1994, Semov et al. 2005). Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Hochregulation von S100A4 und der Ausbreitung des Tumors auf die Lymphknoten, sowie einer schlechten Prognose des Krebsgeschehens. Daher wird S100A4 auch als prognostischer Marker bei bestimmten humanen Krebsformen eingesetzt (Ambartsumian et al. 2001, Garrett et al. 2006).

1.4.4.2 Funktionen von S100A4 bei Nervenverletzung und Schmerz

Mindestens 12 der über 20 S100 Proteine sind im Nervensystem an Neurodegeneration und neuronaler Plastizität beteiligt (Zimmer et al. 2005, Shepherd et al. 2006, Lisachev et al. 2010). S100A4 ist eines dieser Familienmitglieder, die nach einer Nervenschädigung nachweislich induziert werden. Während S100B und S100A12 ihre neurotrophische Wirkung zum Teil über den RAGE (receptor of advanced glycation) Signalweg vermitteln (Hofmann et al. 1999), ist die neurotrophe Wirkung von S100A4 offenbar RAGE-unabhängig (Kiryushko et al. 2006). Forschungsarbeiten zeigen, dass S100A4 im verletzten Gehirn in Astrozyten in dem Bereich der Verletzung (Kozlova and Lukanidin 2002) und im Hippocampus im Rahmen einer exzitatorischen Vergiftung hochreguliert wird (Dmytriyeva et al. 2012). *In vitro* Versuche zeigten weiterhin, dass S100A4 von verschiedenen Zelltypen (u. a. Astrozyten) in den Extrazellulärraum sezerniert werden kann (Stary et al. 2006, Yammani et al. 2009, Dmytriyeva et al. 2012) und eine Rolle bei Neuritenwachstum und bei dem Überleben von primären hippocampalen und zerebralen Neuronen spielt (Novitskaya et al. 2000, Pedersen et al. 2004, Kiryushko et al. 2006, Dmytriyeva et al. 2012). Darüber hinaus kann S100A4 neuroprotektiv wirken. Extrazelluläres S100A4 schützt Neuronen durch Interaktion mit dem IL-10-Rezeptor, einem Interleukin-10-Rezeptor, indem es intrazellulär die JAK/STAT3 Signalkaskade aktiviert. Dies führt zur Hochregulation vieler antioxidativer Enzyme und neuroprotektiver Gene, die wiederum neuronale Zellen vor oxidativen Schädigungen schützen (Dziennis and Alkayed 2008, Zhou et al. 2009, Sarafian et al. 2010, Sharma et al. 2011).

Einleitung

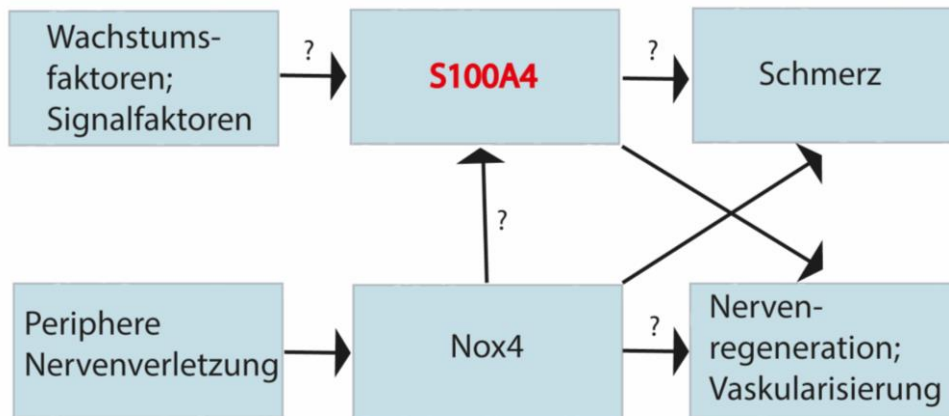


Abbildung 9: Postulierte Wirkung von S100A4. Die Expression von S100A4 wird durch verschiedene Wachstums- und Signalfaktoren beeinflusst. Bisherige Forschungsarbeiten zeigen eine Beteiligung von Nox4 an der Entwicklung neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenverletzung. In Abhängigkeit davon wird S100A4 innerhalb des peripheren nozizeptiven Systems hochreguliert und könnte dort eine Rolle innerhalb des Schmerzgeschehens, bei Nervenregeneration oder innerhalb von Vaskularisierungsprozessen spielen.

Ein weiteres Target könnte der Erb-Rezeptor darstellen (Klingelhofer et al. 2009), welcher von extrazellulärem S100A4 indirekt aktiviert wird und seine Wirkung intrazellulär über JAK/STAT (Sibilia et al. 2007), ERK und Akt (Fuller et al. 2008) vermittelt. Neben den genannten Rezeptoren vermittelt S100A4 seine neurotrophische und neuroprotektive Funktion sehr wahrscheinlich auch über andere Rezeptoren und Plasmamembrantargets. In Astrozyten überexprimiertes S100A4 wirkt durch eine Hochregulation von Glia-Faktoren (MT I + II) neuroprotektiv (Dmytriyeva et al. 2012). Einerseits können MT I + II intrazellulär als ROS Scavenger fungieren und andererseits können sie nach Sekretion - durch eine Interaktion mit Oberflächenrezeptoren - eine schützende Funktion für Zellen zeigen (Chung et al. 2008, West et al. 2008). Weiterhin wurde herausgefunden, dass MT I und II neuronale Schädigungen und posttraumatische Entzündungen reduzieren können und eine Gewebereparatur fördern (West et al. 2008). Einige Studien konnten bereits zeigen, dass S100A4 auch peripher eine Bedeutung nach Verletzungen in den Schwanzzellen besitzt und/oder in den unmyelinisierten Nervenbündeln an der Seite der Verletzung hochreguliert wird (Kozlova and Lukanidin 1999, Sandelin et al. 2004). Expressionsuntersuchungen konnten eine Hochregulation von S100A4 in sensorischen und autonomen Neuronen verifizieren (Sandelin et al. 2004). Aktuelle Proteomdaten untermauern die genannte Hochregulation von S100A4 im Ischiasserv und in den Spinalganglien nach SNI, was

zeigt, dass S100A4 eine Rolle im peripheren Schmerzgeschehen oder innerhalb regenerativer Prozesse zukommen könnte (Barry et al. 2018) (Abbildung 9).

1.4.4.3 Lösliche Epoxidhydrolase (Soluble epoxide hydrolase, sEH)

Als ein weiteres potentiell Redox-Target im nozizeptiven System wurde in der vorliegenden Arbeit die lösliche Epoxidhydrolase (sEH; soluble epoxide hydrolase) untersucht. Die sEH stellt ein wichtiges regulatorisches Enzym innerhalb des Lipid-Signalling dar. Sie wird in mehreren verschiedenen Geweben, wie dem kardiovaskulären System, der Niere, der Leber und der Lunge, aber auch im schmerzverarbeitenden System exprimiert (Harris and Hammock 2013). Intrazellulär liegt sie als antiparalleles Homodimer mit zwei regulatorischen Domänen vor, wobei das C-terminale Ende über eine Epoxidhydrolasefunktion verfügt und das N-terminale Ende eine Phosphataseaktivität besitzt (Argiriadi et al. 1999, Cronin et al. 2003, Newman et al. 2003). Durch den strukturellen Aufbau ihrer C-terminalen Domäne mit α/β -Hydrolase-Struktur vermag die sEH Epoxide in ihre korrespondierenden Diole umzuwandeln, indem sie katalytisch die Addition von Wasser ermöglicht. Über diesen Mechanismus wird die Aktivität der Verbindungen reduziert und die Wasserlöslichkeit der Metabolite stark erhöht, was die Elimination über die Niere verbessert (Morisseau and Hammock 2013). Das N-terminale Ende vermag Phosphate zu hydrolysieren, ist in seiner Funktion jedoch weniger gut verstanden.

Durch die C-terminale Hydrolasefunktion des Enzyms kann die sEH Lipidmediatoren, wie die Epoxide der Arachidonsäure oder Epoxyfettsäuren (EETs), hydrolysieren und somit wichtige biologische Funktionen der EETs terminieren. Diese natürlichen Epoxide haben unter physiologischen Bedingungen regulatorische Funktionen innerhalb des kardiovaskulären Systems und anti-inflammatorische Eigenschaften. Innerhalb des kardiovaskulären Systems können EETs u. a. die Regulation des Blutdrucks beeinflussen, was in verschiedenen Versuchen mit Nagetieren gezeigt werden konnte (Yu et al. 2000, Imig et al. 2002, Fornage et al. 2005, Imig 2005, Imig et al. 2005). Sie wirken zudem durch eine Verminderung der Leukozytenadhäsion an vaskulärem Gewebe und einer damit verbundenen Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF κ B antientzündlich (Node et al. 1999) und haben als Epoxide der Arachidonsäure antipyretische Eigenschaften (Kozak et al. 2000). Hinzu kommt, dass sie im Tiermodell effektiv einer diabetischen Neuropathie entgegenwirken können (Wagner et al. 2017).

Einleitung

Interessanterweise können bestimmte Elektrophile die sEH inhibieren, indem sie an die redoxaktive Aminosäure Cystein 521 (Cys512) binden (redoxaktives Thiol der sEH). Im kardiovaskulären System konnte gezeigt werden, dass die Cys521-vermittelte Inhibition von sEH durch das Prostaglandin 15d-PGJ₂ zu einer Dilatation der Koronargefäße führt (Imig and Hammock 2009, Charles et al. 2011). Bei sEH-Knockin-Mäusen, deren redox-sensitives Cystein 521 durch ein Serin ersetzt wurde („redox-dead mice“) besitzen Elektrophile wie 15d-PGJ₂ oder 9-/10-Nitrooleonsäure (NO₂-OA) keine blutdrucksenkende Wirkung (Charles et al. 2011, Charles et al. 2014). Die C-terminale Funktion der sEH ist demnach durch Redoxmodifikationen an Cys521 modulierbar (Abbildung 10).

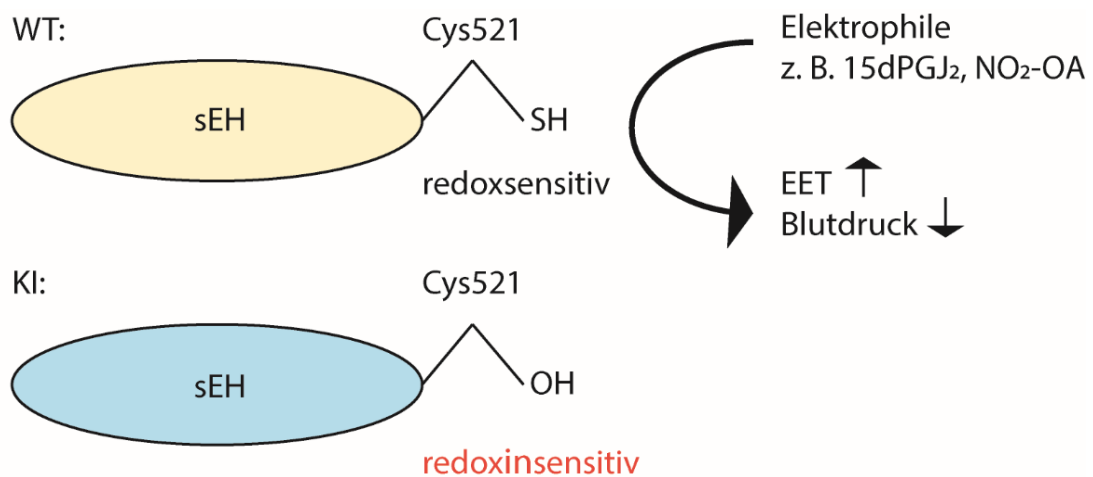


Abbildung 10: Schematische Darstellung des sEH-Proteins mit dem redoxsensitiven Thiolrest an der Position 521 (R-SH). Elektrophile Lipide, wie 15-deoxy- Δ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) und 9-/10-Nitrooleonsäure (NO₂-OA) können an diesem redoxsensitiven Thiolest die Aktivität der sEH modulieren. Additionsreaktionen von elektrophilen Lipiden an diesen Rest führen zu einer Hemmung der sEH, wodurch es zu einer Akkumulation von Epoxyfettsäuren (EETs) kommt, was in Nagermodellen zu einer Reduktion des Blutdrucks führte (Charles et al. 2014). Der Austausch der Aminosäure Cystein an der Position 521 gegen die Aminosäure Serin führt dazu, dass das sEH-Enzym redoxinsensitiv gegenüber elektrophilen Lipiden ist.

1.4.4.4 Funktion der sEH bei Schmerz

Innerhalb des Schmerzgeschehens besteht die Funktion von sEH unter anderem darin, die Epoxyfettsäuren (EETs) 8,9-, 11,12- und 14,15-EETs per Hydrolyse in ihre weniger aktiven Dehydrometabolite (DHET) umzuwandeln (Chiamvimonvat et al. 2007). Anhand von LC-MS Untersuchungen konnte man feststellen, wie die Konzentrationen von sEH Enzymen und EETs miteinander in Verbindung stehen. Hohe sEH-Level führen zu verminderten EET-Spiegeln, wobei gleichzeitig die Konzentrationen von DHETs ansteigen. Analog führt eine Hemmung von sEH zu erhöhten EET-Werten.

EETs sind, wie bereits erwähnt, Moleküle des Lipid-Signaling, die autokrin und parakrin freigesetzt werden (Imig et al. 2009, Imig and Hammock 2009) und innerhalb der Arachidonsäurekaskade produziert werden. EETs können schmerzrelevante Ionenkanäle modulieren und haben sowohl vasoaktive und anti-entzündliche als auch analgetische Eigenschaften (Abbildung 11). Sie binden an intrazelluläre Targets oder fungieren als auto- oder parakrine Mediatoren und aktivieren den PPARgamma oder cAMP/PKA Signalweg (Spector 2009). Ein spezifischer Rezeptor für EETs konnte bisher nicht identifiziert werden, allerdings existieren sowohl intrazelluläre als auch membrangebundene Bindungsstellen, an die EETs hochaffin binden (Spector et al. 2004). Bindungsstudien an 47 verschiedenen Rezeptortypen konnten zeigen, dass EETs unter anderem an periphere Benzodiazepinrezeptoren (PBR), Cannabinoid CB₂ Rezeptoren, Neurokinin NK₂ Rezeptoren und Dopamin D₃ Rezeptoren binden (Inceoglu et al. 2007). Hervorzuheben ist hier die Interaktion mit dem peripheren CB₂ Rezeptor, der (unabhängig von dem CB₁ Rezeptor) unter anderem auf Immunzellen exprimiert wird, die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren moduliert und dadurch eine Wirkung auf die Sensibilisierung von Nozizeptoren besitzt (Malan et al. 2001).

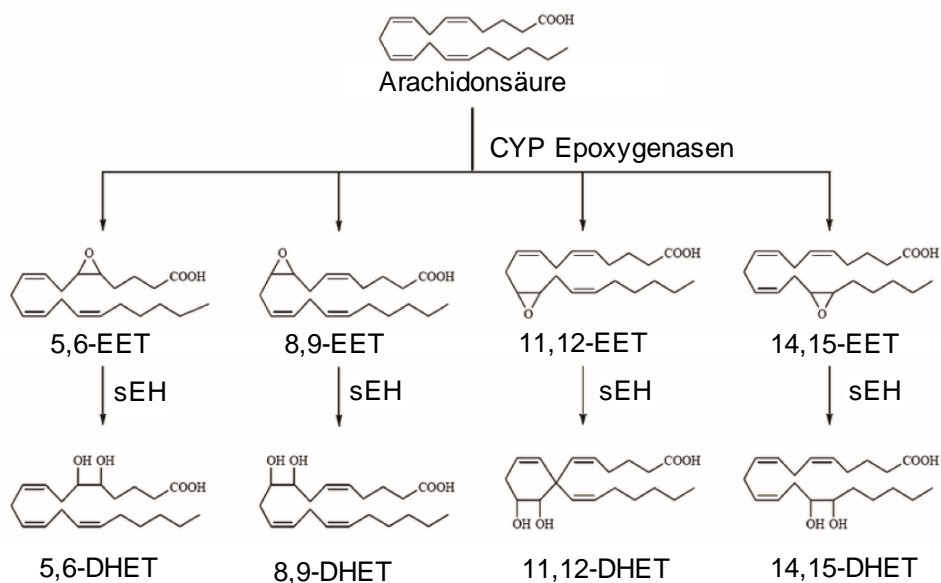
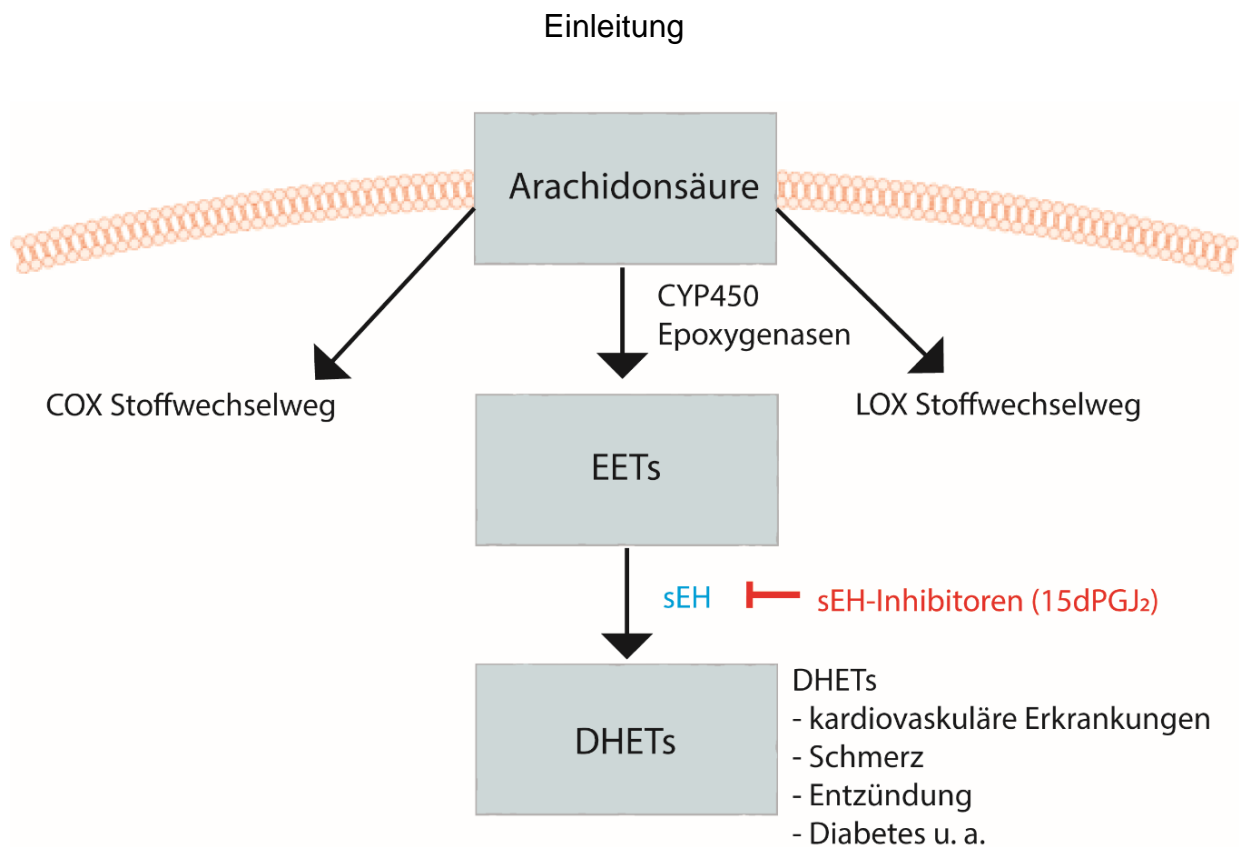


Abbildung 11: Die Arachidonsäure-Kaskade. Arachidonsäure wird über CYP450 Epoxygenasen in aktive EETs umgewandelt, welche wiederum über die sEH zu DHETs umgewandelt werden. Cyclooxygenasen (COX) wirken ebenfalls innerhalb des Arachidonsäurestoffwechsels und katalysieren u. a. die Bildung von Prostaglandinen (COX-Stoffwechselweg). Weiterhin ist auch der Lipoxygenase (LOX) Stoffwechselweg angedeutet, wo es u. a. zu einer Bildung von Leukotrienen kommt. Abbildung modifiziert nach Sudhahar et al. (2010) und Wagner et al. (2011).

Einleitung

In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass CB₂-Rezeptor-Agonisten schmerzreduzierend in akuten, inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen wirken (Ibrahim et al. 2003, Nackley et al. 2003, Quartilho et al. 2003, Hohmann et al. 2004). Darüber hinaus vermögen EETs verschiedene Ionenkanäle (Isoformen von TRP-Kanälen, Ca²⁺ aktivierte Kaliumkanäle (BK(Ca)) und L-Typ Calciumkanäle (CA_v) zu aktivieren/modulieren. Daher spielen sie bei entzündlichen Prozessen und chronischen Schmerzen eine relevante Rolle (Spector and Norris 2007). Beispielsweise können EETs direkt TRPV₄ Kanäle aktivieren und die Membraninsertion von TRPV₄- und TRPV₆ Kanälen erhöhen, was als pronozizeptiv angesehen werden kann. Um die Funktion der sEH bei der Schmerzverarbeitung anhand von *in vivo* Modellen zu untersuchen und an möglichen Targets für neue Therapieansätze zu forschen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt: sEH-Inhibitoren, EET-Mimetika und genetische sEH-Modelle. Versuche an Mäusen konnten bereits zeigen, dass eine sEH-Hemmung antinozizeptive Effekte im Modell der LPS-induzierten Hyperalgesie und der Streptozotocin-induzierten diabetischen Neuropathie hat (Inceoglu et al. 2006, Inceoglu et al. 2008). Die Relevanz redoxabhängiger Modifikationen der sEH innerhalb des nozizeptiven Systems ist bisher jedoch nicht geklärt und soll daher im Rahmen dieser Dissertation näher untersucht werden (siehe Abschnitt 3.2).

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung von neuen Redoxtargets im nozizeptiven System. Vorausgehende Forschungsarbeiten konnten bereits zeigen, dass verschiedene Proteine innerhalb des nozizeptiven Systems redoxabhängig reguliert werden. Diese redoxabhängigen Modulationen können zu einer strukturellen und funktionellen Änderung von Proteinen führen und das Schmerzempfinden möglicherweise modulieren. Anhand von Nox4-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass Nox4 eine wesentliche Rolle innerhalb des nozizeptiven Systems zukommt. Fraglich ist jedoch, über welche Mechanismen eine Nox4-vermittelte ROS-Produktion in die Schmerzverarbeitung eingreift. Anhand eines Proteomscreens konnte das Ca^{2+} -bindende Protein S100A4 identifiziert werden, welches Nox4-abhängig nach peripherer Nervenverletzung hochreguliert wird und in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wird.

Ein weiteres Redoxtarget ist die lösliche Epoxidhydrolase (sEH). Bisherige Forschungsarbeiten konnten bereits zeigen, dass über eine sEH-Hemmung analgetische Effekte erzielt werden können. Inwiefern die Aktivität der sEH im nozizeptiven System redoxabhängig reguliert wird, ist jedoch nicht vollständig geklärt. Die Arbeit fokussiert daher auf die redoxabhängige Modulation von S100A4 und sEH sowie ihre jeweiligen Funktionen innerhalb des nozizeptiven Systems.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Versuchstiere (Mäuse) wurden in einem 12/12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter gehalten. Alle durchgeführten Experimente wurden von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt und entsprachen den Vorgaben des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung, den Prinzipien der 3Rs (replacement, refinement, reduction), sowie den aktuellen Richtlinien der International Association for the Study of Pain. Die Experimente wurden von einem Beobachter durchgeführt, der für die Genotypen der Mäuse verblindet war.

Um verschiedene potentielle Redoxtargets im schmerzverarbeitenden System zu untersuchen, wurden gewebespezifische und globale S100A4-Knockout-Mäuse sowie sEH-Knockin-Mäuse verwendet.

2.1.1 Generierung von S100A4-Knockout Mäusen

Die Generierung der geflochten S100A4-Mäuse wurde zuvor von Li et al. (2010) (Abbildung 13) beschrieben (Li et al. 2010). Für die Verpaarungen wurden die geflochten S100A4-Mäuse von dem Department of Biochemistry, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA, von Dr. Anne Bresnick zur Verfügung gestellt. Der Targetvektor enthielt eine loxP Seite bei dem Basenpaar 305 upstream mit Methionin als Startcodon, welches in dem zweiten Exon von S100A4 liegt. Die Phosphoglycerinkinase (PGK) Neo Kasette, welche von loxP-Seiten flankiert war, wurde bei dem Basenpaar 426 downstream bei dem Stoppcodon des Exons 3 eingebaut (Abbildung 13A).

Gewebsspezifische S100A4-Knockout-Mäuse wurden generiert, indem Mäuse die die Cre-Rekombinase unter dem Promoter des spezifisch in sensorischen Neuronen lokalisierten Proteins Advillin exprimieren (Adv-Cre Mäuse) in der F0-Generation mit homozygot geflochten S100A4-Mäusen verpaart wurden. Durch weitere Verpaarungen der heterozygoten Tiere gelang es schließlich in der F2-Generation, einen gewebsspezifischen Knockout (Adv-S100A4^{-/-}) zu generieren (Abbildung 13B).

Material und Methoden

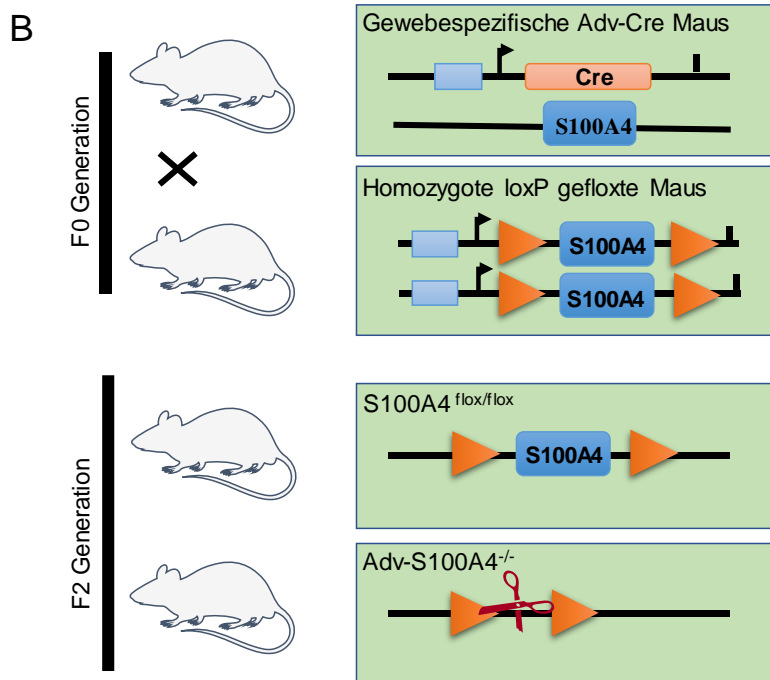
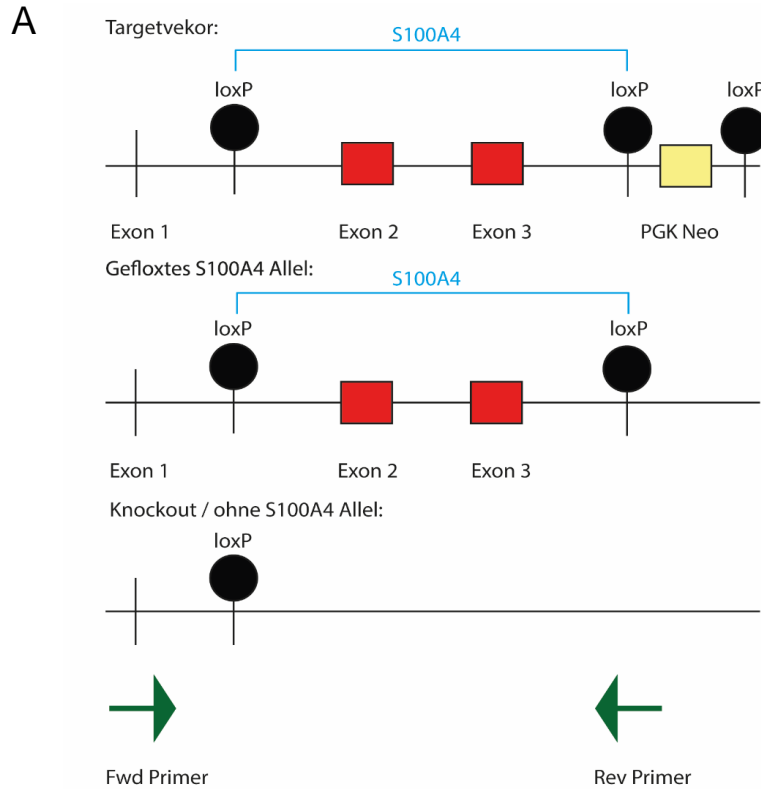


Abbildung 12: A. Vereinfachte Darstellung der Generierung von geflochten S100A4-Mäusen und S100A4-Knockout Mäusen nach Li et al., (2010) (Li et al. 2010). Dargestellt sind die genomischen S100A4 Loci, wobei die kodierenden Exone (Exon 2, Exon 3) in rot dargestellt sind. Der Targetvektor führt die loxP-Seiten ein (schwarz dargestellt), welche das S100A4 Gen flankieren. Für die ES Zellselektion wurde eine PGK Neo Kasette (gelb) verwendet. B. Vereinfachte Darstellung der Generierung von Adv-S100A4^{-/-}-Mäusen.

Material und Methoden

Zur Generierung von globalen S100A4-Knockout (S100A4^{-/-}) Mäusen wurden die geflochten S100A4-Mäuse mit CMV-Cre (Cre Rekombinase unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus Promotors) Mäusen (Jackson Laboratories) verpaart. Die Mäuse wurden dann bis zur Homozygotität verpaart. Die Cre Rekombinase wurde ausgekreuzt.

```
AAACCTCTCT ATTCAGCACT TCCTCTCTCT TGGTCTGGTG AGTTGTGTTG GTCTGATAGC ACTGCTAGCG
GCATTAGAGG CTGAGGCTAG GGTAGAAGAA AGGGGGGCTG CTGGGGGAAC AGATGTCTTT AATAAATCCA
GATGAGAGAT TCTGATGTGG AGGTTCATGT ATGTGTGTGT GTGTGTGTGT TTTTCACGAG AATGAAAACC
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAGTGTA TAAATGGCTA CATCTGAGCT CCCGGAGGTT TTGAGATACT
GAGGCTGGCT TGCATGTTGC TATAGTGTAT ATTGGTGGTG CTGGGGAGTC ACTGTCATGC ATAGGATGCT
GACTCGTGTT GCTGGGTAAT ACAAGACAGT GTGTGGACAC TCGGGTACAG GAAGCAAAAGC GAAGGCATCA
GTAGGCCTTT TTGTTTTACA GTATTTAAAT TACAATTTTT ATTTGTGTGT ATGAGCGTAT GGGTTGGGCT
GGAGCAAATG CCAAGGGCAC ATTTGTGGAG CCAAGGACAA ATTTGTGTGG GAGTCAATCT GTTCCTTCTA
GCATGTGGGC TGTGGGGATC AAACCTCAGGC CCTGGAGCTT GGTGGCAAGC ACCTCTACCC ACTGAGCTAT
CTCTCCAGCA CCCTCCTGCA GGCATTCGTG TTTGTAGTGT GTCTTATTTT TAATAGCCCT ATGAACATAT
AGCACCTAGG CCAAGAAAAGC CTGGCTTCCC CACCCTCTCC TCTTGCAATCC CTACCTCTGC CACTTCATCT
TACTCCTATT AGGCAGCTGG GGTTTTCCA CTTTTTTTG TCTGCCTCTG GGCAGGCAGC CAGCAGCCGC
GCCAACGCT GGGAGGGAGA AGAATGGGCC AGGGCCTGCT GCTTGTGGTT GAGCTGTGG AGTGAGTAAG
CTGATGGAAA ACTGCTGTGG TTGAGGCCAG GACTGAGAGG CACAGAAAGG TGCTGGCATG GATCTCCAGA
GTTTGAAGGG TAGGCTTTGC AGGTTTCAGA GCCCAGAGCA CATGTGACCT TCTTGCCATC AATGGGTCCC
ATTCCTCTGA TCTCCCCAGG GGGTGAGGTC CATCTCTTAG AGAGTTGGCT GGGATAGAGC ACTTAAATG
GGGACAGAAAT GAGTGTGATT TGGGTCTATC TCAGCAACAC ATATCCAGTT CTCACACAC TGTGGCGTG
GGTTGGAGAA TGTACTTTT GTGTCTCCTG CCCTTAGGTC TCAACGGTTA CCATGGCAAG ACCCTTGGAG
GAGGCCCTGG ATGTAATTGT GTCCACCTTC CACAATACT CAGGCAAGA GGGTGACAAG TTCAGCTGA
ACAGACAGA GCTCAAGGAG CTACTGACCA GGGAGCTGCC TAGCTTCTG GGGTAAAGT GGTCCCTGCT
GTGTAATGCA CAGTGATGC ATCTGCAGGA GGAGGTGGG GCTGGTAGGC ACTAGTCTTG ATGCACTACT
TAGCTATAGC TGGCATATAT CCCTGCTCTG GGTGCTTGG AGGGAACAC AATGAACCA CTACTTCACA
CTAGCCCCCA GCTGAGACAG CTTTAGATG AAGATAACTG AAGNGGCAGA GGAAAACCAA AACACCCACA
TTAGGCAGTC AGTGTCTGAA ACCACAGCCT AGATCAGGCC TGTCTTCCG GAGATGGGCA CTGAAATCTG
AGTTTTTATT TGTGAAGACA TGATCGTGGG GGCAACACAA TGCTGCAGA TTATCCTCTC AATAACCTCT
TATATTGATT AACGGATCAC TATTATGACA GTTTCCTATT AAGATRAATA AACCAAGCAC GGGGAAGATG
TGCTCACATC CTTTCCAGC TATCCCATGT GTTCATCCCA TAGTTTAGCC CCGAGGCTAG CAAGGAGTGC
CTCAACCTT TCCTGAGCTC CTGACTGGAG GCAATATCT GGTTTGATT GGTCTTAAT TGCTCTCTT
TACTGCCAG AAAAGGACAG ATGAAGCTGC ATTCAGAAAG CTGATGAGCA ACTTGGACAG CAACAGGAC
AATGAAGTTG ACTTCCAGGA GTACTGTGTC TTCTGTCTCT GCATTGCCAT GATGTGCAAT GAATCTTTG
AGGGCTGCC AGATANGAG CCCCGGAAGA AGTGAAGACT CCTCAGATGA AGTGTGGGG TGTATTTGC
CAGTGGGGGA TCTTCCCTGT TGGCTGTGAG CATAGTGCTT TACTCTGGCT TCTTCGCACA TGTGCACAGT
GCTGAGCAAA TTCAATAAAA GGTTTTGAAA CTATTA
```

Abbildung 13: Dargestellt ist die S100A4 Sequenz (NCBI Reference Sequenz: NC_000069.6). Die Exons sind in roter Schrift dargestellt. Markiert sind zudem die verwendeten S100A4-flox Primer (grün) und die CMV-S100A4 Primer (gelb).

2.1.2 sEH Knockin-Mäuse

Die Generierung von Cys521Ser sEH Knockin-Mäusen (sEH-KI) wurde bereits von Charles et al. (2011) beschrieben. Bei diesen Knockin-Mäusen wurde das Cystein in Position 521 konstitutiv durch ein Serin ersetzt, was eine oxidative Modifikation dieses hochkonservierten Thiols verhindert. Die sEH-Knockin Mäuse wurden von Prof. Philip Eaton, The William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, Vereinigtes Königreich, zur Verfügung gestellt.

2.2 Verhaltensversuche

2.2.1 Rota Rod

Die motorische Koordination der Tiere wurde mit Hilfe eines Rota-Rod-Tests durchgeführt. Die motorische Koordination wurde untersucht, da motorische Reaktionen zur Beurteilung der Nozizeption verwendet werden und eine intakte Motorik die Voraussetzung für die Interpretation nozizeptiver Tests ist. Bei jedem Test wurden die Versuchstiere auf eine mit 16 rpm rotierende Stange gesetzt (Rotarod Treadmill für Mäuse, Ugo Basile) und deren Laufverhalten beobachtet. Es wurde die Zeit bestimmt, in der sich die Tiere ohne herunter zu fallen auf der Stange halten konnten. Sofern diese Zeit länger als 120 Sekunden betrug (zuvor festgelegte Cutoff Zeit), wurde das Experiment beendet (Kallenborn-Gerhardt et al. 2017, Lu et al. 2017). Vor den Messungen wurden die Mäuse an die Apparatur gewöhnt und hatten je zwei Trainingseinheiten unter den gleichen Bedingungen wie im nachfolgenden Experiment.

2.2.2 Nozizeptive Tiermodelle

In der Erforschung von Schmerzen werden häufig Nagetiere verwendet, um die pathophysiologischen Ursachen von Schmerzen zu untersuchen, da Humanstudien zum Teil schwierig durchführbar und ethisch begrenzt machbar sind. Da Schmerzen einer subjektiven Wahrnehmung unterliegen und sehr unterschiedlich bewertet werden können, sind die Schmerzen im Tiermodell nur indirekt erfassbar.

In den betreffenden Versuchen werden zuvor definierte Verhaltensänderungen von Tieren als Schmerzreaktionen gewertet (z. B. der Rückzug einer Hinterpfote bei der Verwendung eines Dynamic Plantar Aesthesimeters oder das Lecken der Pfote im Formalin-Test). Das Ausmaß der Schmerzreaktion wird entweder durch die Zeit bis zum Auftreten einer Reaktion oder die Intensivität der Reaktion bestimmt. Die Verhaltensänderungen können dabei in „stimulierte“ oder „nicht stimulierte“ (spontane) Methoden unterteilt werden. Zu den Stimulus-induzierten Methoden, bei denen eine Reaktion durch einen Reiz ausgelöst wird, zählen zum Beispiel die manuelle von Frey Filament-Messung oder Messungen mit einem Dynamic Plantar Aesthesimeter. Bedenken über die klinische Repräsentationsfähigkeit der durch Reize hervorgerufenen Verhaltensänderung haben in den letzten Jahren jedoch zur Entwicklung von nicht durch Reize hervorgerufenen Methoden, wie zum Beispiel dem

Wühlverhalten, der Untersuchung des Sciatic Funktional Index oder Untersuchungen an einer DWB Apparatur geführt.

2.2.2.1 Modelle der akuten Nozizeption

2.2.2.1.1 Hot-Plate-Test

Zur Untersuchung von akuten Schmerzen nach thermischer Reaktion wurde der Hot-Plate-Test nach Eddy und Leimbach (1953) verwendet (Eddy and Leimbach 1953). Die Mäuse wurden in einen Acrylglaszylinder auf eine auf 50, 52 oder 54 °C erhitzte Platte gesetzt. In sofortigem Anschluss wurde die Latenzzeit bis zur ersten definierten nozizeptiven Reaktion (Lecken der Hinterpfoten, Schütteln der Hinterpfoten oder Sprünge auf den Rand des Plexiglaskäfigs) gemessen und notiert. Um Gewebeschäden zu vermeiden wurden Cutoff-Zeiten von 60 Sekunden (50°C), 40 Sekunden (52°C) und 20 Sekunden (54°C) gewählt (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Lorenz et al. 2014). Zur Vermeidung von Gewöhnungseffekten wurde jedes Tier nur einmal pro Temperatur gemessen (Mogil et al. 1999). Es wurden nicht mehr als maximal zwei verschiedene Temperaturen pro Tag untersucht, wobei ein Mindestabstand von zwei Stunden eingehalten wurde.

2.2.2.1.2 Cold-Plate-Test

Bei dem Cold-Plate-Test wurden die Mäuse auf eine gekühlte (2° C) Platte gesetzt und die Anzahl der Reaktionen innerhalb von fünf Minuten gezählt. Als Reaktionen wurden das Lecken der Hinterpfote, das Hochhalten einer Hinterpfote, sowie das Hochspringen des Tieres an den Rand des Acrylglaskäfigs gewertet. Der Versuch wurde nach fünf Minuten beendet. Das Tier wurde anschließend von der Platte gehoben und zurück in den Käfig gesetzt (Petersen et al. 2019).

2.2.2.1.3 Dynamic-Plantar-Test

Das basale Schmerzverhalten von Mäusen kann mittels akuter mechanischer Stimulation anhand eines Dynamic Plantar Aesthesimeters (Ugo Basile, Comerico, Italien) bestimmt werden. Das Dynamic Plantar Aesthesimeter enthält eine Edelstahlsonde (0,5 mm Durchmesser), welche mit zunehmender Kraft gegen die plantare Oberfläche der Pfote gedrückt wird. Die Mäuse werden für diesen Versuch auf einen Drahtgitterboden platziert. Ein Pfotenrückzug wird als eine eindeutige Reaktion auf die ansteigende Kraft und damit als Reaktion gewertet. Die auf die Pfote

wirkende Kraft wird über einen Zeitraum von 10 s (0,5 g/s Rampe) von 0 auf 5 g erhöht und bleibt dann für weitere 10 s (Cutoff-Zeit, 20 s) konstant bei 5 g. Die Latenzzeit wurde als Mittelwert von vier aufeinanderfolgenden Expositionen im Abstand von mindestens 20 s berechnet (Schmidtko et al. 2008, Kallenborn-Gerhardt et al. 2012).

2.2.2.2 Inflammatorische Schmerzmodelle

2.2.2.2.1 Formalin-Test

Der Formalin-Test ist ein inflammatorisches Schmerzmodell für die Untersuchung anhaltend tonischer Schmerzen und wurde zum ersten Mal 1977 bei Ratten und 1985 bei Mäusen verwendet (Dubuisson and Dennis 1977, Hunskaar et al. 1985). Mindestens 30 Minuten vor dem Test wurden die Mäuse in einen Acrylglaszylinder gesetzt und an die Testumgebung gewöhnt. Nach der Eingewöhnung wurde den Mäusen Formalin (15 µl einer 0,5%igen Formaldehyd-Lösung, Applichem) mittels einer 50 µl Hamilton-Spritze und einer 27 Gauge Nadel subkutan in die Rückseite einer Hinterpfote injiziert (Hunskaar et al. 1985, McNamara et al. 2007) und die Leckzeit der Mäuse an der mit Formalin behandelten Pfote gemessen. Die Reaktionen wurden mit einer Stoppuhr gemessen und alle fünf Minuten notiert, wobei über einen Gesamtzeitraum von 60 Minuten gemessen wurde.

Nach der Formalininjektion kommt es typischerweise zu zwei Phasen starker nozizeptiver Reaktionen, welche vor allem auf eine Stimulation von TRPA1-Kanälen im Nozizeptor zurückzuführen sind (Macpherson et al. 2007). Die erste Leckphase beginnt direkt nach der Injektion des Formaldehyds in die Pfote und dauert bis zu 15 Minuten an. Diese Reaktion ist auf die direkte Stimulation von Nozizeptoren, insbesondere der A δ , zurückzuführen. Es schließt sich dann eine Ruhephase von circa 15 Minuten an, in der es zu keinen oder nur vereinzelt Reaktionen kommt. Auf diese Ruhephase folgt eine zweite Phase intensiven Pfotenleckens über weitere 10-15 Minuten. Ursächlich verantwortlich für diese verzögerten Reaktionen sind - anders als in der ersten Phase - lokale entzündliche Veränderungen in dem Gewebe der Pfote und zentrale Veränderungen, die zu einer anhaltenden Aktivierung von C-Fasern führen (Coderre et al. 1990, Tjolsen et al. 1992).

2.2.2.2.2 Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie

Bei diesem Modell für persistierende Entzündungsschmerzen wurde den Mäusen 20 µl einer Zymosan-A-Suspension (5 mg/ml in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung [PBS], pH 7,4; Sigma-Aldrich) subkutan in die Plantarseite einer Hinterpfote injiziert (Meller and Gebhart 1997). Durch die Injektion dieser Lösung kommt es lokal zu einem entzündlichen Geschehen innerhalb der Pfote, was sich in einer Überempfindlichkeit gegenüber mechanischen Stimuli (Hyperalgesie) äußert. Im Rahmen der Untersuchung dieser Schmerzen kann die Hyperalgesie quantitativ unter Verwendung eines Dynamic Plantar Aesthesiometers (Ugo Basile, Comerico, Italien) bestimmt werden. Das Dynamic Plantar Aesthesiometer enthält eine Edelstahlsonde (0,5 mm Durchmesser), welche mit zunehmender Kraft gegen die plantare Oberfläche der Pfote (Sural-Nervenbereich) gedrückt wird. Die Mäuse werden hierzu auf einen Drahtgitterboden platziert. Ein Pfotenrückzug wird als eine eindeutige Reaktion auf die ansteigende Kraft und damit als Reaktion gewertet. Die auf die Pfote wirkende Kraft wird über einen Zeitraum von 10 s (0,5 g/s Rampe) von 0 auf 5 g erhöht und bleibt dann für weitere 10 s (Cutoff-Zeit, 20 s) konstant bei 5 g. Die Latenzzeit wurde als Mittelwert von vier aufeinanderfolgenden Expositionen im Abstand von mindestens 20 s berechnet (Schmidtke et al. 2008, Kallenborn-Gerhardt et al. 2012). Nach der Injektion wurde die Latenzzeit beider Hinterpfoten der Mäuse über acht Stunden stündlich, sowie nach 24 und 48 Stunden gemessen. Es wurden bei jedem Versuch mindestens zwei Baseline Messungen durchgeführt. Die Mäuse wurden an jedem Versuchstag mindestens eine Stunde vor dem Versuch in die Apparatur gesetzt.

2.2.2.2.3 Zymosan-induzierte Peritonitis

Das Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis kann genutzt werden, um entzündliche viszerale Schmerzen zu untersuchen. Dabei wird durch eine intraperitoneale (i. p.) Injektion (0,5 ml) einer Zymosan-A-Suspension (1 mg Zymosan A in 500 µl Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Gibco, Darmstadt) eine reversible Entzündung im Peritoneum provoziert, welches anschließend mittels einer peritonealen Lavage hinsichtlich einwandernder Immunzellen quantifiziert werden kann (Doherty et al. 1985, Laux-Biehlmann et al. 2016). Das Schmerzverhalten wurde mit Hilfe einer automatisierten Dynamic Weight Bearing Apparatur (DWB) beurteilt. Dabei wurde untersucht, inwiefern sich die Gewichtsverlagerung der Vorderpfoten zu den Hinterpfoten (Verhältnis Vorderpfoten/Hinterpfoten) nach der Auslösung von

viszeralen Schmerzen verändert (Stark et al. 2019). Das DWB Gerät (Bioseb, Boulogne, Frankreich) besteht aus einem Acrylglaskäfig (11 cm breit x 11 cm lang x 20 cm hoch) und einem mit Sensoren ausgestatteten Boden zur Messung der individuellen Belastung der vier Mauspfoten. Zudem ist eine Kamera oberhalb des Käfigs installiert, um die Tierpositionen zu validieren. Sowohl während der Gewöhnungsphase von fünf Minuten als auch in der fünfminütigen Aufnahmephase konnten sich die Mäuse frei im Käfig bewegen. Nach einer Trainingseinheit einen Tag vor dem Experiment (mit den gleichen Bedingungen wie am Versuchstag) wurde die DWB-Aufzeichnung bei den unbehandelten Mäusen (Baseline) und fünf Stunden nach der Zymosan-Injektion durchgeführt. Die aufgezeichnete Gewichtsverteilung wurde mit der DWB-Software analysiert (Cobos et al. 2012, Laux-Biehlmann et al. 2016). Eine Bodenbelastung galt als gültig, wenn folgende Parameter erkannt wurden: $\geq 0,8$ g auf einer Aufnahme mit mindestens zwei benachbarten Pixelflächen, die $\geq 1,0$ g aufzeichneten. Ein Zeitabschnitt der Gewichtsbelastung wurde als gültig betrachtet, wenn ≥ 3 stabile Bilder erkannt wurden (Laux-Biehlmann et al. 2016, Stark et al. 2019). In allen Videosequenzen wurden die Positionen der Pfoten von einem verblindeten Beobachter manuell überprüft.

2.2.2.2.4 Peritoneale Lavage

Nach der Induktion einer sterilen Peritonitis durch die s.c. Injektion einer 0,5 ml Zymosan A Lösung (Z4250, Sigma-Aldrich, Steinheim; 2 mg/ml in Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Gibco, Darmstadt) in das Peritoneum, wurden die Mäuse nach einer Wartezeit von fünf Stunden mit Ketamin/Xylazin tief narkotisiert. Die äußere Haut des Abdomens wurde mit einer kleinen Schere leicht angeschnitten und geöffnet, um die innere Haut des Abdomens freizulegen. Dann wurde 2 ml eiskaltes PBS mit einer 27G Nadel in das Peritoneum injiziert. Um die Flüssigkeit gut und gleichmäßig in der Peritonealhöhle zu verteilen, wurde das Abdomen der Maus für zwei Minuten leicht und mit regelmäßig kreisenden Bewegungen massiert. Unter der Verwendung einer 25G Nadel wurde die Flüssigkeit danach wieder entnommen (Laux-Biehlmann et al. 2016), in zwei 1,5 ml Eppis verteilt und auf Trockeneis (-80°C) gelegt. Die Zellen wurden anschließend umgehend für die weitere Messung der Prostaglandine vorbereitet.

2.2.2.3 Neuropathische Schmerzmodelle

Zur Untersuchung von neuropathischen Schmerzen wurden das „Spared nerve injury“ Modell (Decosterd and Woolf 2000) und das „Crush injury“ Modell verwendet. Beiden Modellen liegt eine operativ induzierte Schädigung des *Nervus ischiadicus* zugrunde, wobei die Unterschiede der Modelle im Folgenden genauer erläutert werden.

2.2.2.3.1 Spared nerve injury Modell (SNI-Modell)

Bei dem SNI-Modell werden zwei Äste des *N. ischiadicus* ligiert und durchtrennt, wobei der dritte Ast (*Nervus suralis*) intakt bleibt. Dieser operative Eingriff führt zu einer Hypersensivität im lateralen Bereich der Hinterpfote, welche durch den *Nervus suralis* innerviert wird. Das Ausmaß der Hypersensivität kann anhand verschiedener Methoden, z. B. des Dynamic Plantar Aesthesimeters, des Wühlverhaltens oder mittels Dynamic Weight Bearing bestimmt werden. Bereits vor der Operation werden mindestens zwei Baseline Messungen an den unbehandelten Tieren durchgeführt, um deren basale Reaktion zu bestimmen. Die SNI-Operation wurde nach einer Prämedikation mit Caprofen (5 mg/kg s. c., 30 min vor der Operation), unter Isoflurananästhesie (Isofluran und Carbogen, 0,2 - 2,5 Vol% Isofluran) durchgeführt. Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde mittels des Rückziehreflexes der rechten Hinterpfote überprüft. Für die Operation wurde das Bein der Maus rasiert und die Muskulatur im Bereich des Kniegelenks durchtrennt. In diesem Bereich liegt der *Nervus ischiadicus* bereits teilweise verzweigt vor - der *Nervus suralis* ist bereits abgezweigt, während der *Nervus peroneus communis* und der *Nervus tibialis* noch gemeinsam verlaufen, jedoch auch als separate Nervenstränge erkennbar sind. Diese beiden Nervenstränge wurden einzeln mit einem 0,08 mm Faden (FST 18020-60) abgebunden. Distal zu dieser Ligationstelle wurde ein Stück des Nervs entfernt, um eine Re-Ligation des distalen und proximalen Nervenbereichs zu unterbinden. Anschließend wurden die darüberliegende Muskulatur und Haut genäht und die Narkose beendet.

Das neuropathische Schmerzverhalten wurde nach der Operation mit dem Dynamic Plantar Aesthesimeter, Dynamic Weight Bearing oder Wühlverhalten quantifiziert (siehe Abschnitt 3.2.2.3.3).

2.2.2.3.2 Crush injury Modell (CI-Modell)

In dem Crush injury Modell wird der Ischiasnerv (hier alle drei Nervenäste) stumpf verletzt. Dafür wird das Tier narkotisiert (Prämedikation Caprofen 5 mg/kg s. c. (Rimadyl Injektionslösung, Zoetris Deutschland GmbH) 30 min vor der Operation, Isoflurananästhesie mit Isofluran und Carbogen, 0,2 - 2,5 Vol% Isofluran) und mit einem Skalpell ein circa ein Zentimeter großer Hautschnitt über dem *Nervus ischiadicus* gesetzt. Anschließend werden die Muskeln stumpf auseinandergeschoben, der Nerv freigelegt und für 25 Sekunden mit einem Nadelhalter gequetscht. Die Nervenscheiden bleiben in diesem Modell intakt, was eine partielle Regeneration des Axons ermöglicht. Demnach normalisieren sich die motorischen und sensiblen Funktionen. Im Vergleich mit dem SNI-Modell manifestieren sich die pathologischen Veränderungen in dem geschädigten Nerv schneller, sind reversibel und im Hinblick auf Apoptose und Autophagie qualitativ unterschiedlich. Nach der Operation wurde mit Hilfe des Dynamic Plantar Aesthesimeters die mechanische Schmerzschwelle bestimmt. Des Weiteren wurde die Regenerativonskapazität nach der Degeneration mit Hilfe des Brush Tests (Berührungsempfindlichkeit) und des SFI (funktionale Regeneration) über einen Zeitraum von 4-6 Wochen bestimmt.

2.2.2.3.3 Methoden der Schmerzquantifizierung in neuropathischen Modellen

2.2.2.3.3.1 Dynamic-Plantar-Test

Die mechanische Hyperalgesie von Mäusen kann mittels mechanischer Stimulation anhand eines Dynamic Plantar Aesthesimeters (Ugo Basile, Comerico, Italien) bestimmt werden (siehe Kapitel 2.2.2.1.3).

2.2.2.3.3.2 Wühlverhalten

Das Wühlverhalten oder auch das Entfernen von Material (in Form von Futter oder Einstreu) aus einem verschlossenen Rohr zählt zu dem normalen Verhalten von Nagetieren. Dieses freiwillige Verhalten der Tiere kann sich nach einer peripheren Nervenverletzung ändern und als Maß für die Schmerzreaktion ausgewertet werden (Shepherd et al. 2018). Die Tiere wurden einen Tag vor der Versuchsdurchführung an den Testkäfig und die Testbedingungen gewöhnt. Dabei wurden die Mäuse für eine Stunde in den Käfig mit einem einseitig verschlossenen Rohr (Länge 12 cm, Durchmesser 5 cm) gesetzt. Die Testkäfige und Rohre wurden nummeriert, sodass

jede Maus immer dem gleichen Käfig und dem gleichen Rohr ausgesetzt war. Zudem wurde das gleiche Einstreu verwendet, welches auch in den Käfigen der Mäuse verwendet wird und etwas bereits benutztes Einstreu des gewohnten Käfigs verwendet, um Störungen durch Geruchsreize so gering wie möglich zu halten. Vor der Messung wurde das Rohr für 30 Minuten in den Käfig gelegt, damit sich die Mäuse an den Gegenstand gewöhnen konnten. Für den Versuch wurden anschließend 25 g Einstreu in Rohr gefüllt und dieses 15 Minuten in den Käfig gelegt. Danach wurde das Rohr entfernt und der Verlust des Einstreus durch das spontane Wühlverhalten der Maus gemessen. Nach der Gewöhnung wurde an den Mäusen eine SNI-Operation (Spared nerve injury) durchgeführt. An den Tagen 3, 10, 18 und 24 nach SNI wurde das Wühlverhalten der Mäuse untersucht. Das aus dem Rohr entfernte Gewicht wurde anschließend prozentual berechnet.

2.2.2.3.3 Sciatic Funktional Index

Der Sciatic Functional Index (SFI) wurde 1982 von de Medinaceli et al. (1982) entwickelt, um die Auswirkungen von peripheren Nervenschäden bei Versuchstieren zu quantifizieren. Dabei wurden Veränderungen des Fußabdrucks nach einer Verletzung anhand des Trittmusters analysiert. Die Auswertung wurde von Carlton und Goldberg (1986) sowie Bain et al. (1989) anhand von statistischen Auswertungen zu der angegebenen Formel weiterentwickelt.

Anhand des SFI kann man die funktionelle Regeneration des Ischiasnerven, nach einer Crush Injury Operation (siehe „Crush Injury Modell“) untersuchen. Hierzu wurden die Hinterpfoten der Mäuse mit Lebensmittelfarbe eingefärbt (Rottöne für die operierte Seite, Blautöne für die unoperierte Seite) und die Tiere wurden anschließend frei über ein DIN A3-Blatt laufen gelassen. Nach dem Trocknen der Farbe konnten die Pfotenabdrücke mittels Lineal vermessen werden. Dabei wurden die Werte zwischen dem ersten und fünften Zeh, die Werte zwischen dem zweiten und vierten Zeh, sowie die Distanz von der Spitze des dritten Zehs und der Ferse notiert. Aus diesen Werten lässt sich anhand einer Formel (Abbildung 15) der SFI kalkulieren (Subbanna et al. 2007). Dieser gibt einen Aufschluss über die funktionale Regeneration nach peripherer Nervenverletzung (Baptista et al. 2007).

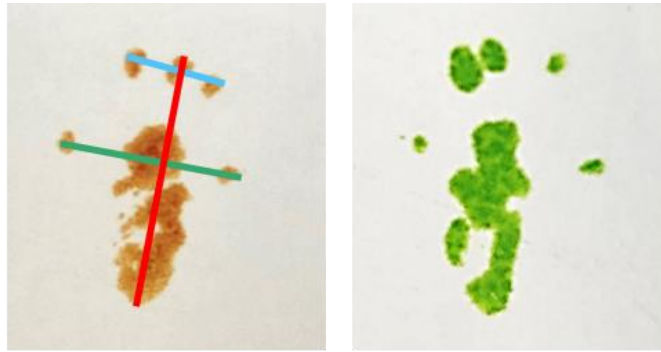


Abbildung 14: Pfotenabdrücke nach Crush Injury Operation. Dargestellt ist die Vermessung der linken Hinterpfote. Die erhaltenen Werte werden in die Formel zur Errechnung des Sciatic Functional Index eingetragen und ermöglichen eine Aussage über die funktionale Regeneration nach Nervenverletzung.

Formel SFI:

$$SFI = -38,5 \left[\frac{(EPL - NPL)}{NPL} \right] + 109,5 \left[\frac{(ETS - NTS)}{NTS} \right] + 13,3 \left[\frac{(EIT - NIT)}{NIT} \right] - 8,8$$

PL: „print length“; Distanz von dem dritten Zeh bis zur Ferse

TS: „toe spread“; Distanz von dem ersten bis zum fünften Zeh

IST: „intermediate toe spread“; Distanz von dem zweiten bis zum vierten Zeh

E: „experimental“; nach Crush injury

N: „normal“; unbehandelt

2.2.2.3.3.4 Brush Test

Die (dynamische) mechanische Hyperalgesie nach einer SNI-Operation wurde weiterhin mit dem Brush Test untersucht. In diesem Modell wurde die Plantarseite der Mauspfote sowohl an der operierten Seite (*ipsilateral*), als auch an der Kontrollseite (*contralateral*) von der Sohle in Richtung der Zehen mit einem dünnen präparierten (abgestumpften) Pinsel (Durchmesser 1-2 mm) in einer Geschwindigkeit von circa 2 cm/s bestrichen. Zu den typischen Reaktionen von unbehandelten Mäusen zählt eine sehr schnelle Bewegung bzw. ein Abheben der betreffenden Pfote (keine Punktevergabe, Punktzahl Null). Nach einer Nervenverletzung oder –entzündung können weitere und intensivere Reaktionen beobachtet werden. Diese werden je nach Reaktion unterschiedlich bewertet: ein anhaltendes Anheben der Pfote oder ein leichtes Zucken wird mit einem Punkt bewertet, ein starkes seitliches Anheben der Pfote über das Körperniveau oder ein aufschreckendes Springen wird mit zwei Punkten und eine mehrfache Reaktion sowie ein Lecken der Pfote mit drei Punkten

bewertet. Die Stimulationen wurden dreimal im Abstand von mindestens drei Minuten wiederholt (Scores nach der Methode von Cheng et al. (2017)). Im Anschluss an die Messungen wurden die Mittelwerte der jeweiligen Reaktionen berechnet und der Versuch ausgewertet.

2.2.2.3.3.5 Von Frey Filament-Test

Die Messung einer mechanischen Sensitivität anhand von Frey-Filamenten basiert auf dem physikalischen Prinzip, dass eine elastische Säule - hier Nylonfilamente - unter Druck bei einer bestimmten auf sie ausgeübten Kraft sich elastisch verbiegen, was abhängig von der Länge, dem Durchmesser und der Beschaffenheit des Materials ist. Sofern ein Nylonfilament gebogen wurde, ist die ausgeübte Kraft konstant und unabhängig vom Grad der Biegung. Verschiedene kalibrierte Filamente können daher verwendet werden, um die Kraft zu ermitteln, auf die die Maus eine nozizeptive Reaktion zeigt (Pfotenrückzug, Lecken der Pfote oder Schütteln der Pfote). Die Kraft ist proportional zum Durchmesser des Filaments. Das verwendete Filamentset (Bioseb Von Frey Filaments) besteht aus 20 verschiedenen Stiften, welche mit Nylonhaaren unterschiedlicher Dicke verbunden sind. Sie können für einen Kraftbereich von typischerweise 0,008 g bis 300 g genutzt werden. Für die Messung der mechanischen Sensitivität wurden acht verschiedene Von Frey Filamente verwendet (0,008 g - 2 g) und diese je fünfmal in einem rechten Winkel gegen die Plantarseite der Pfote gedrückt (Cowie et al. 2018, Albisetti et al. 2019). Es wurde notiert, ob die Maus auf diesen Reiz reagiert oder nicht. Die Messung wurde pro Pfote viermal wiederholt.

2.2.2.4 Schmerzverhalten nach Applikation redoxaktiver Substanzen

2.2.2.4.1 Intrathekale Applikation von ROS-Donoren

Zur intrathekalen (i. t.) Injektion wurden die Mäuse unter kurzer Isofluran-Narkose zunächst rasiert, um die Wirbelstrukturen der Mäuse besser erkennen zu können und die Punktion zu erleichtern. Danach wurden die Mäuse in Bauchlage auf eine gut beleuchtete Operationsarbeitsfläche gelegt, der Oberkörper der Maus in einem halbierten Nitrilhandschuh fixiert und der Rücken mit Hautantiseptikum desinfiziert. Im Anschluss wurde mit den Fingern die Haut über den Lendenwirbeln gespannt und durch Abtasten des *Dorsums* die Injektionsstelle ausfindig gemacht. Die Injektionsstelle befindet sich genau zwischen den Lendenwirbeln L5 und L6. Diese Stelle korreliert mit der Position der *Cauda equina*, einem Nervenbündel, welches

distal zum Ende des Rückenmarks gelegen ist. Nachdem die Einstichstelle genau lokalisiert wurde, konnte mit einer 10 μl Hamiltonspritze und einer 30 Gauge Kanüle vertikal zwischen L5 und L6 eingedrungen werden, der Injektionswinkel auf etwa 30° abgeflacht werden und die Spritze vorsichtig nach vorn in den Zwischenwirbelraum gedrückt werden. Die Punktion der *Dura Mater* verursacht eine ruckartige Schwanzbewegung der Maus oder die Bildung einer „S“-förmigen Schwanzanordnung. Sobald ein Hinweis auf eine Dura-Punktion auftrat, wurde der ROS-Donor tert-Butylhydroperoxid (TBHP), in einer Konzentration von 1,1 μmol TBHP in 5 μl NaCl_{steril}, langsam (innerhalb von circa zwei Sekunden) injiziert (Lu and Schmidtko 2013). Fünf Sekunden nach der Injektion wurde die Injektionsnadel unter einer leichten Drehung entfernt.

Die Mäuse wurden in direktem Anschluss auf das Gitter für die Messung mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer gesetzt und im Abstand von 15 Minuten über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Vor der i. t. Injektion wurden je zwei Baseline-Messungen durchgeführt.

2.2.2.4.2 Intraplantare Injektion von 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J₂

Zur Untersuchung des durch 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) ausgelösten Schmerzverhaltens wurden 30 nmol 15d-PGJ₂ in 20 μl Olivenöl oder Vehicle subkutan in die Plantaroberfläche einer der Hinterpfoten mit einer 25 μl Hamilton Spritze und einer 27 Gauge Kanüle injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Mäuse in eine Acrylglaskammer gesetzt. Die Dauer des nozizeptiven Verhaltens (definiert als Lecken, Beißen, Zucken und Schütteln der injizierten Pfote) wurde mit einer Stoppuhr in Intervallen von 1 Minute über 5 Minuten aufgezeichnet. (Andersson et al. 2008, Zhang et al. 2014, Beckel and de Groat 2018). Unmittelbar nach Beendigung der 5-minütigen Messungen wurden die Tiere in einen Plexiglaskäfig mit Gitterboden gesetzt und es wurde die mechanische Schmerzschwelle der injizierten Hinterpfote mittels Dynamischem Plantartest alle 15 Minuten über einen Zeitraum von 3 Stunden bestimmt.

2.2.3 Gewebeentnahme

Um die Expressionsmuster von ausgewählten Proteinen im Mausgewebe untersuchen zu können, wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und unmittelbar darauf mittels kardialer Punktion entblutet. Dann wurde der Rücken mittels eines Skalpells geöffnet und die Wirbelsäule frei präpariert. In Höhe des Zervikalmarks wurde diese durchtrennt, sodass im Anschluss die kaudalen Wirbelbögen seitlich mit einer Knochenschere geöffnet werden konnten. Nun wurde der lumbale Bereich des Rückenmarks sowie die dazugehörigen Spinalganglien (L4-L6), Ischiasnerv-Gewebe und Rückenmarksgewebe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei -80 °C schockgefroren.

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Mäuse vor der Gewebeentnahme mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) perfundiert. Dabei wurde direkt nach der Tötung der Brustraum geöffnet, eine Kanüle in den linken Herzventrikel gelegt und das Herz am rechten Ventrikel mit einer Schere eröffnet. Nun wurde mit isotonischer Kochsalzlösung gespült und in direktem Anschluss mit 4% PFA fixiert. Die Gewebeentnahme erfolgte analog zu der direkten Gewebeentnahme ohne Perfusion. Das entnommene Gewebe wurde dann zur Entwässerung über eine Nacht in 30 %iger D-Saccharose-Lösung bei -4 °C gelagert und in Gefriermedium (Tissue-Tek O.C.T.) eingebettet. Von den eingebetteten Proben der Spinalganglien, des Ischiasnervs und des Rückenmarks wurden im Anschluss mit Hilfe eines Kryostaten (CryoStar NX50, Thermo Scientific) 14 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, welche nach einer zweistündigen Trocknung bei Raumtemperatur bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Spinalganglien- und Ischias-Nervengewebe erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit von Qiagen. Die Gewebeprobe wird zunächst mit der vorgefertigten Lyse-Lösung lysiert und anschließend homogenisiert. Danach wird dem Lysat Ethanol zugesetzt und die Spin-Säule beladen. Die RNA bindet an die Silicat-Membran. Im Anschluss erfolgt eine Zugabe von RNase-freier DNase, welche einen effizienten Verdau der genomischen DNA ermöglicht. Dann werden die DNase, sowie alle weiteren Verunreinigungen effizient abgewaschen und die reine, konzentrierte RNA in 10 µl Wasser eluiert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der Nukleinsäuren wurden anhand eines NanoDrop-Spektrometers (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) bestimmt. Für die Messung wurde 1 µl Nukleinsäurelösung auf die dafür vorgesehene Scheibe des Spektrometers gegeben und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ bestimmt. Dabei entspricht der Wert $A_{260} = 1$ in der Umrechnung einer Konzentration von 50 µl/ml doppelsträngiger DNA und 40 µl/ml einzelsträngiger RNA. Durch Bildung des Verhältnisses von A_{260}/A_{280} kann zudem die Reinheit der Probe untersucht werden. Dieser Wert sollte bei DNA-Probenmaterial bei 1,8 liegen und bei RNA Probenmaterial 2,0 betragen. Werte, die über diesen idealen Werten liegen sind meist Hinweise auf Protein- oder Phenolverunreinigungen.

2.3.3 Real-time quantitative RT-PCR

Um die RNA-Expression verschiedene Gene quantitativ erfassen zu können, wurden Real-time quantitative RT-PCR Messungen durchgeführt. Dabei wurde für die reverse Transkription das Kit Innuprep Micro Kit von Analytik Jena verwendet.

2.3.4 Reverse Transkription

2.3.4.1 Hintergrund der Real-time quantitativen RT-PCR

Durch die Real-time quantitative RT-PCR kann man synthetisierte PCR-Produkte quantitativ erfassen. Die Quantifizierung findet dabei mittels Fluoreszenzmessung in jedem Zyklus der PCR statt. Das Signal der Messung steigt dabei exponentiell zu der Menge der PCR-Produkte an und die Mengenbestimmung der PCR-Produkte lässt sich mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (siehe Abschnitt 2.3.4.2) bestimmen.

Die Untersuchung der relativen RNA-Expression bezieht sich auf ausgewählte Gene. Dazu wurde eine gebrauchsfertige qPCR Mischung mit ROX- und passiven Fluoreszenzfarbstoffen verwendet (iTaQ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad). Die Amplifikation kann in zwei Phasen unterteilt werden – eine exponentielle und eine nicht exponentielle Phase (Plateau-Phase). Während der exponentiellen Phase kommt es bei jedem Zyklus theoretisch zu einer Verdopplung des PCR Produkts. Allerdings ist diese Phase durch eine limitierte Menge an Reaktionskomponenten begrenzt und geht im Anschluss in die nicht exponentielle Plateau-Phase über. An diesem Punkt kommt es zu einer Verlangsamung der Reaktion. Die jeweiligen Phasen

sind anhand eines Real-time PCR Detektionsgeräts (CFX96™ Touch Real-time Detection System, Bio-Rad) messbar. In der ersten Phase bleibt das Fluoreszenzsignal zwar trotz exponentiellem Anstieg der Produkte vorerst auf Hintergrundniveau, zeigt jedoch ab einer bestimmten Konzentration des Amplifizierungsproduktes ein messbares Signal. Die Zyklusnummer, bei der es zu einem messbaren Fluoreszenzsignal kommt, wird als Quantifizierungszyklus bezeichnet.

Verwendete Primerpaare und Materialien:

Primer S100A4 fwd 5'-agg caa aga ggg tga caa gt-3'

Primer S100A4 rev 5'-atg cag gac agg aag aca ca-3'

iTaq Universal SYBR® Green Supermix
(Bio-Rad)

Reaktionsansatz:

Primer fwd	1 µl
Primer rev	1 µl
RNAse freies Wasser	2 µl
cDNA Probe	1 µl
SYBR Green	5 µl
<hr/>	
Gesamtes Volumen	10 µl

Annealingtemperatur: 60°C

Zyklenanzahl: 40 Zyklen

2.3.4.2 Quantifizierung anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Um die relative Genexpression von DNA-Amplifikaten bestimmen zu können, wurden die C_T -Werte der jeweiligen Proben analysiert, in denen sich die DNA-Amplifikation in der exponentiellen Phase befand. Die C_T -Werte beschreiben den Zeitpunkt (T), bei dem die Fluoreszenz signifikant über dem Hintergrund liegt. Für die Berechnungen wurden dabei die Mittelwerte aus drei Messungen verwendet und wie folgt berechnet:

Im ersten Schritt wurde der Wert des zu untersuchenden Gens (C_T Zielgen) auf den C_T -Wert der endogenen Kontrolle (C_T endogene Kontrolle) normalisiert:

Material und Methoden

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

Darauffolgend wurde die Differenz der ermittelten ΔC_T Werte aus den Lysaten der behandelten Tiere und der Kontrolltiere gebildet:

$$\Delta C_T \text{ behandelte Tiere} - \Delta C_T \text{ Kontrolltiere} = \Delta \Delta C_T$$

Anders ausgedrückt:

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

Die Expressionsstärke lässt sich dann mit der folgenden Formel berechnen:

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

Unter Miteinbezug der folgenden allgemeinen Gleichungen lässt sich schließlich durch Einsetzen der Gleichungen folgende Formel herleiten:

$$X_n = X_0 * E^n$$

X_n : DNA-Gehalt im Zyklus n

X_0 : DNA-Ausgangsmenge

E : Effizienz der PCR

n : Zykluszahl

Z : Zielgen

R : Referenzgen

$$X_n (1) = X_n (2)$$

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

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

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

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

Material und Methoden

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

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

Durch das Einsetzen der C_T -Werte in die Formel erhält man:

$$\frac{Z}{R} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Man erhält durch Berechnung die n-fache Expression des zu untersuchenden Zielgens nach einer Behandlung in Bezug auf das Referenzgen.

2.3.5 Genotypisierungen

Um die genannten Mauslinien zu genotypisieren, wurden Ohrbiopsien der Mäuse entnommen. Diese wurden, sofern sie nicht direkt weiterbearbeitet wurden, bei -20°C bis zur Aufbereitung gelagert. Zur alkalischen Lyse (Protein K in Lysepuffer, M3037 Genaxxon Bioscience) wurde das Gewebe über mindestens vier Stunden unter Schütteln bei 55°C in Lysepuffer gelegt. Nach der Auflösung des Gewebes wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet

Für die Amplifikation wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines RedTaq Mastermix (M3029, Genaxxon bioscience) durchgeführt. Hierbei wurde der Doppelstrang der DNA durch zyklisches Denaturieren getrennt, die Primer hybridisiert und durch eine DNA-Polymerase elongiert. Die Schmelztemperaturen der jeweiligen Primer bestimmen die Hybridisierungstemperatur und die Polymerisationszeit wird durch die Länge der erwarteten PCR-Produkte definiert.

Material und Methoden

Verwendete Primer:

Name der Primer	Sequenz
Gobal S100A4 fwd	5'-agc tgg ggt ttt tcc act tt-3'
Global S100A4 rev	5'-atc caa ccc ttca tgg aca g-3'
sEH fwd	5'-cct cag agg cca gaa tag gg-3'
sEh rev	5'-tag aag ggt ggg agg agc t-3'
S100A4 flox fwd	5'-gtg ctt gtg gtt gag ctg tg-3'
S100A4 flox rev	5'-tgg ttc att gtg gtt ccg ta-3'
Primer CB1 fwd	5'-gct gtc tct ggt cct ctt aaa-3'
Primer CB1 rev	5'-ggg gtc acc tct gaa aac aga-3'
Primer Cre fwd	5'-gaa agc cat gtc caa ttt act gac cgt a-3'
Primer Cre rev	5'-gcg cgc ctg aag ata tag aag-3'

Genotypisierungsansätze

PCR Ansatz Cre:

Primer CB1 fwd	1,5 µl
Primer CB1 rev	1,5 µl
Primer Cre fwd	1,5 µl
Primer Cre rev	1,5 µl
REExtract	10 µl
Tissue Extract	4 µl

Die Primer wurden je 1:100 verdünnt.

PCR Ansatz S100A4 flox:

Primer S100A4-flox fwd	1,5 µl
Primer S100A4-flox rev	1,5 µl
REExtract	10 µl
Tissue Extract	4 µl
Wasser	3 µl

Die Primer wurden je 1:100 verdünnt.

Material und Methoden

PCR-Ansatz sEH:

Primer sEH fwd	1,5 µl
Primer sEH rev	1,5 µl
REDEExtract	10 µl
Tissue Extract	4 µl
Wasser	3 µl

Die Primer wurden je 1:100 verdünnt.

PCR-Ansatz CMV-S100A4:

Primer global S100A4 fwd	1,5 µl
Primer global S100A4 rev	1,5 µl
REDEExtract	10 µl
Tissue Extract	4 µl
Wasser	3 µl

Die Primer wurden je 1:100 verdünnt.

Genotypisierungsprogramme:

Genotypisierungsprogramm CMV-S100A4:

94°C	5 Minuten	} 40x
94°C	30 Sekunden	
55°C	1 Minute	
72°C	2,5 Minuten	
72°C	10 Minuten	
Hold @ 12 °C		

Genotypisierungsprogramm Cre:

94°C	5 Minuten	} 40x
94°C	1 Minute	
55°C	2 Minuten	
72°C	2 Minuten	
Hold @ 4 °C		

Material und Methoden

Genotypisierungsprogramm S100A4 flox

94°C	5 Minuten	}	40x
94°C	30 Sekunden		
60°C	30 Sekunden		
72°C	2 Minuten		
72°C	10 Minuten		
Hold @ 12 °C			

Genotypisierungsprogramm sEH:

94°C	5 Minuten	}	40x
94°C	30 Sekunden		
56°C	30 Sekunden		
72°C	30 Sekunden		
72°C	10 Minuten		
Hold @ 4 °C			

Zur Analyse der amplifizierten PCR Produkte wurden die Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Western Blot

2.4.1.1 Proteinextraktion

Die Extraktion der Proteine erfolgte aus Gewebe der Spinalganglien, des Ischiasnervs und des Rückenmarks. Dabei wurden die Proben mit einer Mischung aus Phosphosafe (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) und einem 1:10 verdünnten Protease Inhibitormix (complete Tablets, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) im Verhältnis 6:1 versetzt und bis zur Homogenität für mindestens fünf Minuten auf Eis unter gleichmäßigen stoßhaften Bewegungen mit Hilfe eines Potters mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand der Proben entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Unter Verwendung eines Photometers kann hier eine Protein-Farbstoff-Komplexbildung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 quantifiziert werden. Die Komplexbildung mit den Probenproteinen führt dabei zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm. Für die Erstellung einer Eichgeraden wird eine Verdünnungsreihe von Albumin-Lösungen (Rinderserumalbumin, BSA, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) verwendet, anhand derer man die Proteinkonzentrationen bestimmen kann. Vor der Messung wurden die Proben je 1:50 mit Wasser verdünnt und 50 µl der verdünnten Proben, sowie je 50 µl der verdünnten BSA-Proben auf eine 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Jede der Proben wurde anschließend mit 200 µl Bradford-Reagenz (Roti® Quant 5x Konzentrat (Charge 314217652), Firma Roth) versetzt und nach einer fünfminütigen Reaktionszeit des Farbstoffs am Photometer (Viktor™X3, 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer) gemessen.

2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer Natriumdodecylsulfat- (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page). In Gegenwart von SDS denaturieren die Proteine und werden dann mit einer negativen Ladung versetzt, die sich proportional zu ihrer Molekülgröße verhält. Die Auftrennung erfolgte in einem

vertikalen Elektrophoresesystem (Mini-Protean® Tetra System, Biorad). Als Gel wurde das Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Proteingel 4-20 % (Biorad) verwendet, da das Protein S100A4 mit einer Größe von 12 kD verhältnismäßig klein ist. Je 20-30 µg der Proteinproben wurden mit 4 x ROTI Load 1 (Carl Roth) und Phosphosafe (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) versetzt und fünf Minuten in einem Thermomixer (ThermoMixer F1.5, Eppendorf) bei 95 °C denaturiert. Zur Zuordnung der Proteingrößen wurde der Molekulargewichtsstandard Precision Plus Protein Dual Color (Biorad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 60-70 Minuten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße) transferiert. Dafür wurde ein „Blotsandwich“ gebildet, in das die Membran und das Gel gelegt wurden (Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, Nitrocellulose). Negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Anode und können so auf eine Membran transferiert werden. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte einem Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) in einer Zeit von drei Minuten.

2.4.1.4 Antikörper-Inkubation

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran für eine Stunde mit Blockierungspuffer (Odyssey® Blocking Buffer (PBS), LI-COR mit PBS im Verhältnis 1:1) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht in einem lichtundurchlässigen 50 ml Reaktionsgefäß rotierend inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei zehnminütige Waschschriffe mit PBS und die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (IRDye® (Infrared Fluorescent Dyes) 680RD, Donkey anti Goat, #C60817-01, LI-COR) zur Visualisierung der Proteine für zwei Stunden. Dieser IRDye Fluoreszenzfarbstoff (Antikörper gelabelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff) hat Absorptions- und Emissionswellenlängen im NIR-Spektrum bei 680 nm. Die Membran wurde schließlich mit einem Odyssey Scanner (Licor) gescannt.

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten

Nach dem Auftauen der bei -80 °C aufbewahrten Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 2.2.4) wurden die Schnitte vor Färbebeginn mit Roti®-Liquid Barrier Marker (Roth) umrandet, um die Gewebeschnitte zu separieren und verschiedene Färbungen auf einem Objektträger zu gewährleisten. Nach der Trocknung des Lackes wurde drei mal

Material und Methoden

fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Permeabilisierung des Gewebes mit 0,1% PBS-TritonX-100 (Sigma-Aldrich) über weitere fünf Minuten. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Schnitte dann für 60 Minuten in einem Blockierungspuffer (10% Normal Goat Serum, NGS + 3% BSA) für eine Stunde geblockt. Direkt danach wurde auf die Schnitte die Primärantikörperlösung gegeben, welche über Nacht bei 4 °C in einen Kühlraum zur Inkubation aufbewahrt wurde. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde drei Mal für fünf Minuten mit einer PBS-Lösung gewaschen und mit 0,06% Sudanschwarz (Sigma-Aldrich) in 70% Ethanol inkubiert. Die Sudanschwarzfärbung wird verwendet, um die Signale in der Fluoreszenzfärbung besser erkennen zu können, da man mit ihr die Lipofuszin-Eigenfluoreszenz des Gewebes reduziert. Sudanschwarzreste konnten mit erneutem dreimaligem Waschen in PBS für fünf Minuten entfernt werden. Letztlich wurde auf die Gewebeschnitte ein Tropfen Fluoromount-G gegeben, sodass das Gewebe mit einem Deckgläschen eingedeckelt werden konnte.

Primärantikörper	Verdünnung
S100A4 (Kaninchen), 16105-AP, Proteintech	1:500
CD31 (Ratte), 557355, BD Pharmington	1:1000
Glutaminsynthetase (Maus), GTX630654, GeneTex	1:1000
Peripherin (Maus), MAB1527, Chemicon	1:200
NF200, N0142 (Maus), Sigma-Aldrich	1:2000
CGRP (Kaninchen), PC205L, Calbiochem	1:1000
F4/80 (Ratte), MCA497RT, Serotec	1:500

Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Ratte AF555, A21434	1:800
Anti-Maus AF555, A21127	1:800
Anti-Ziege AF555, A21432	1:1000
Anti-Kaninchen AF488, A11008	1:1000
Anti-Kanninchen AF555, A31572	1:1000

Material und Methoden

Alle aufgeführten Antikörper wurden in 3 % BSA in PBS inkubiert.

Die Visualisierung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem Nikon Eclipse Ni Mikroskop, welches mit einem monochromen CMOS Sensor und einer Quecksilberlichtquelle für die Fluoreszenzmessungen (Nikon Intenslight C-HGFI) ausgestattet war, sowie der NIS-Elements BR Software. Doppelt gefärbte Gefrierschnitte wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop CS-Software übereinander gelagert. Die Bildbearbeitung (Helligkeit und Kontrast) erfolgte ebenfalls mittels der Adobe Photoshop CS-Software. Die weiteren Auswertungen und Zellzählungen erfolgten mit der Software ImageJ (MacBiophotonics).

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS oder der GraphPad Prism 5 Software durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt. Zuerst wurde die Normalverteilung innerhalb der Gruppen mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test betrachtet. Im Anschluss erfolgte eine Auswertung der statistischen Signifikanz mit dem Student's t-Test. Bei einer größeren Gruppenanzahl (>2) wurde die Signifikanz mit der einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc Test errechnet. Versuchsdaten mit Messwiederholungen wurden anhand der Repeated-Measurement-ANOVA auf statistische Signifikanz geprüft. Die Anzahl der Replikate wird in jeder Abbildungslegende angegeben. Für alle Tests wurde ein Wahrscheinlichkeitswert $P < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

2.6 Chemikalien und Reagenzien

2.6.1 Substanzen

Substanz	Hersteller, Ort
Acrylamid (Rotiphorese® 30 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Albumin	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
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
DTT	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
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
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isofluran (Iso-Vet 1000 mg/g)	Dechra
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kohlendioxid	Praxair, Biebesheim am Rhein

Material und Methoden

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
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
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, EDTAfree	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Proteinase K	Genaxxon
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
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS-Pellets (Natrium-dodecyl-sulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sudanschwarz B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Material und Methoden

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
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.6.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
Cryomold Einbettschalen	Sakura biopsy Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Deckgläser 24x60 mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Kanülen (Sterican®; G 30 ½; G 27 ½; G 25 ½)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroplatte 96-well	U-Boden greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Nitrozellulose Membran	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Objektträger	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 2 ml	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

2.6.3 Geräte

Gerät	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)

Material und Methoden

Elektrophorese-Kammer	OwlScientific, B1 Electrophoresis Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Plantar Test	37370, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Hot-/Cold-Plate	35100, Ugo Basile, Gemonio (Italien)
Kleintier-Induktionskammer	Groppler, Deggendorf
Kryotom	Cryostar NX50 Cryostat, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
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
Rota-Rod (für Mäuse)	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 advancedâ,

Material und Methoden

	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)

2.6.4 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Rezeptur
PBST	Triton X-100 in PBS (1x); 0,1 %
PFA-Lösung	Paraformaldehyd in PBS (1x); pH 7,4; 1 - 4 %
Proteinase K-Puffer	Proteinase K (10 mg/ml); 1 M TRIS-HCl (pH 8) 5 ml; CaCl ₂ 0,15 g; Glycerol 25 ml
Lyse-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 %
TBE-Puffer (10x)	TRIS-Base 108 g; Borsaure 55 g; EDTA (0,5 M, pH 8,0) 40 ml; H ₂ O ad 1 Liter

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Expression und Funktion von S100A4 im schmerzverarbeitenden System

In Vorarbeiten dieser Studie wurde in einem Proteom-Screen beobachtet, dass das Protein S100A4 nach einer peripheren Nervenschädigung (SNI) im verletzten Nerv Nox4-abhängig induziert wird (siehe Kapitel 1.4.4). Während bereits viel über die Funktionen von S100A4 innerhalb des Zellzyklus und bei der Angiogenese bekannt ist, sind die Funktionen innerhalb des nozizeptiven Systems bisher wenig verstanden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde S100A4 hinsichtlich der Rolle bei der Schmerzverarbeitung charakterisiert.

3.1.1 Expression von S100A4 in schmerzrelevanten Geweben

Zur Bestätigung der Hochregulation von S100A4 nach peripherer Nervenverletzung wurde eine qRT-PCR mit Spinalganglien-Gewebe basal (Kontrolle) und 14 Tage nach SNI durchgeführt. Hierbei wurde eine signifikante Zunahme der Expression von S100A4 mRNA 14 Tage nach SNI detektiert (Abbildung 15). Dies bestätigt die Vorversuche, die im Rahmen des Proteom-Screens gemacht wurden.

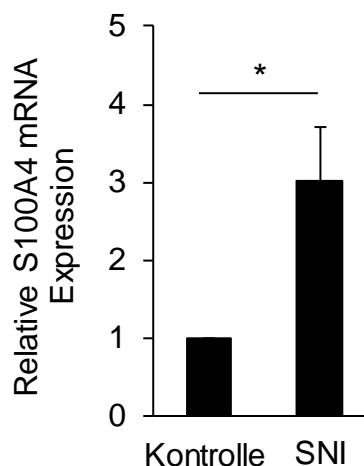


Abbildung 15: S100A4 mRNA Expression in Spinalganglien 14 Tage nach spared nerve injury (SNI). Die Expression von S100A4 wird nach peripherer Nervenverletzung signifikant verstärkt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 4$; $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob auch die Proteinexpression von S100A4 (12 kDa) SNI-abhängig reguliert wird, wurde ein Western Blot mit Ischiassnerv-Gewebe drei Tage, 14

Ergebnisse

Tage und 21 Tage nach SNI durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin (37 kDa) verwendet. Der zur S100A4-Detektion verwendete Primärantikörper zeigt eine typische S100A4 Bande des Monomers bei 12 kDa in Geweben von WT, nicht jedoch von S100A4^{-/-} Mäusen (Abbildung 16A). Eine Quantifizierung der Proteinexpression ergab, dass S100A4 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ab Tag drei nach SNI signifikant stärker exprimiert wurde und dessen Expressionslevel an Tag 14 und 21 nach SNI weiter anstiegen (Abbildung 16B).

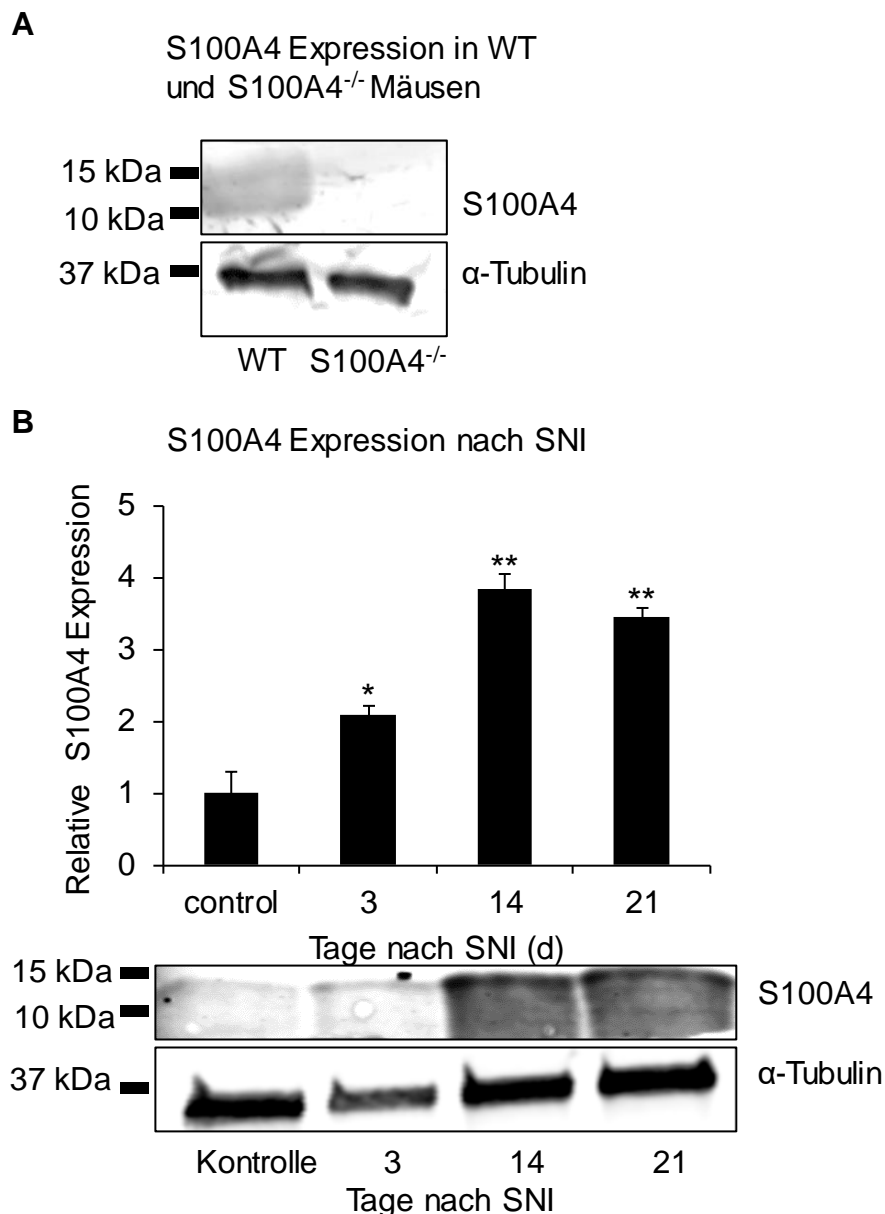
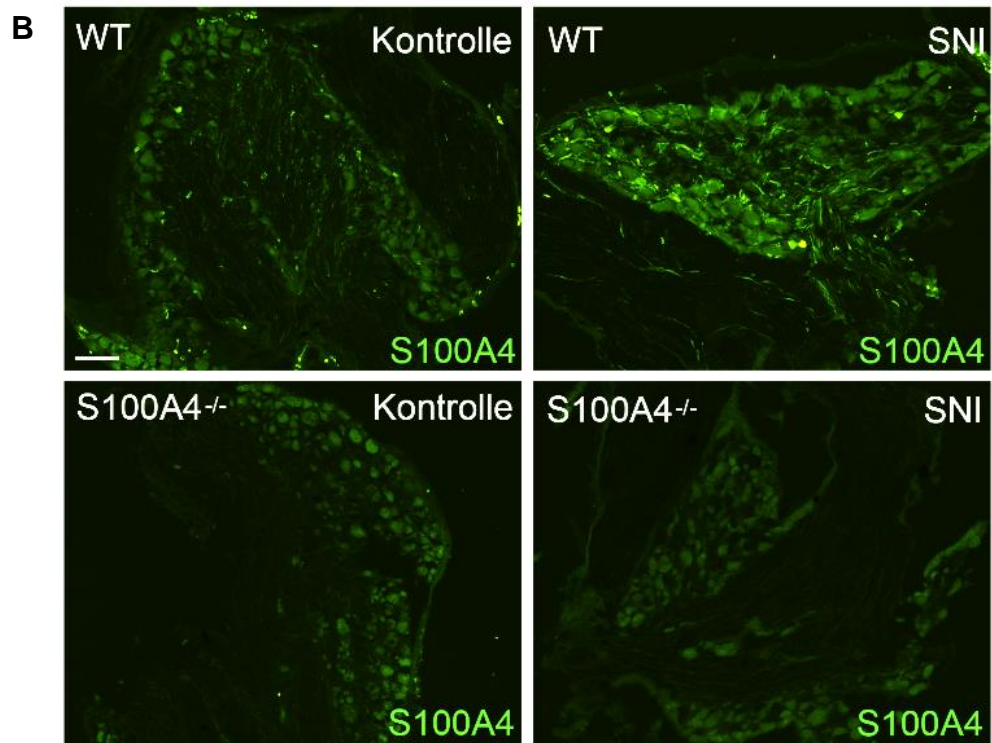
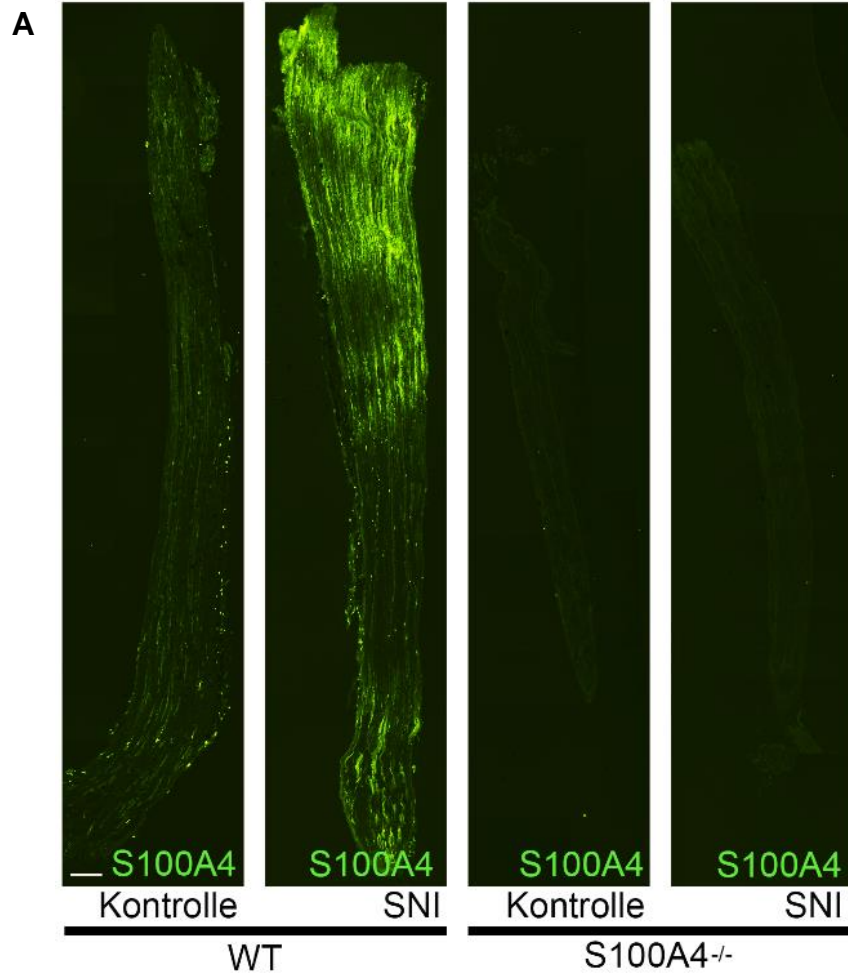


Abbildung 16: SNI-abhängige Hochregulation der Expression von S100A4 (12 kDa) im Ischiasnerv. A. Western Blot zur Kontrolle des globalen S100A4 Knockouts. B. Western Blot an den Tagen 3, 14 und 21 nach SNI, sowie die quantitative Auswertung der Regulation bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.1.2. Zelluläre Lokalisation von S100A4 in Spinalganglien, Ischiasnerv und Rückenmark

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von S100A4 im nozizeptiven System wurden Immunfluoreszenzfärbungen in Geweben naiver Mäuse sowie nach peripherer Nervenverletzung (SNI-Modell) durchgeführt. Es zeigt sich, dass S100A4 basal insbesondere im Ischiasnerv (Abbildung 17A) und in den Spinalganglien (Abbildung 17B) exprimiert wird. Immunfluoreszenzfärbungen des Rückenmarks zeigen, dass S100A4 hier nur zu einem sehr geringen Teil exprimiert wird (Abbildung 17C). Nach peripherer Nervenverletzung wird eine deutliche Expressionssteigerung von S100A4 in dem Bereich der Verletzung (Abbildung 17A, WT SNI) erkennbar. Analog dazu kommt es auch in den Spinalganglien zu einer verstärkten Expression von S100A4 nach SNI (Abbildung 17B, WT SNI). In Geweben von S100A4^{-/-}-Knockout Mäusen wurde – wie erwartet – keine S100A4-Immunreaktivität detektiert, was die Spezifität des verwendeten S100A4-Primärantikörpers belegt (Abbildung 17A, S100A4^{-/-}, Kontrolle und SNI). Auf Rückenmarksebene zeigt sich – anders als in dem Ischiasnerv- und Spinalgangliengewebe – keine Expressionsverstärkung nach SNI. Da S100A4 nicht im Rückenmark (bzw. dem Dorsalhorn des Rückenmarks) exprimiert bzw. nach peripherer Nervenverletzung reguliert wird, wurde insbesondere das Expressionsmuster von S100A4 im Ischiasnerv und in den Spinalganglien weiter untersucht.

Ergebnisse



Ergebnisse

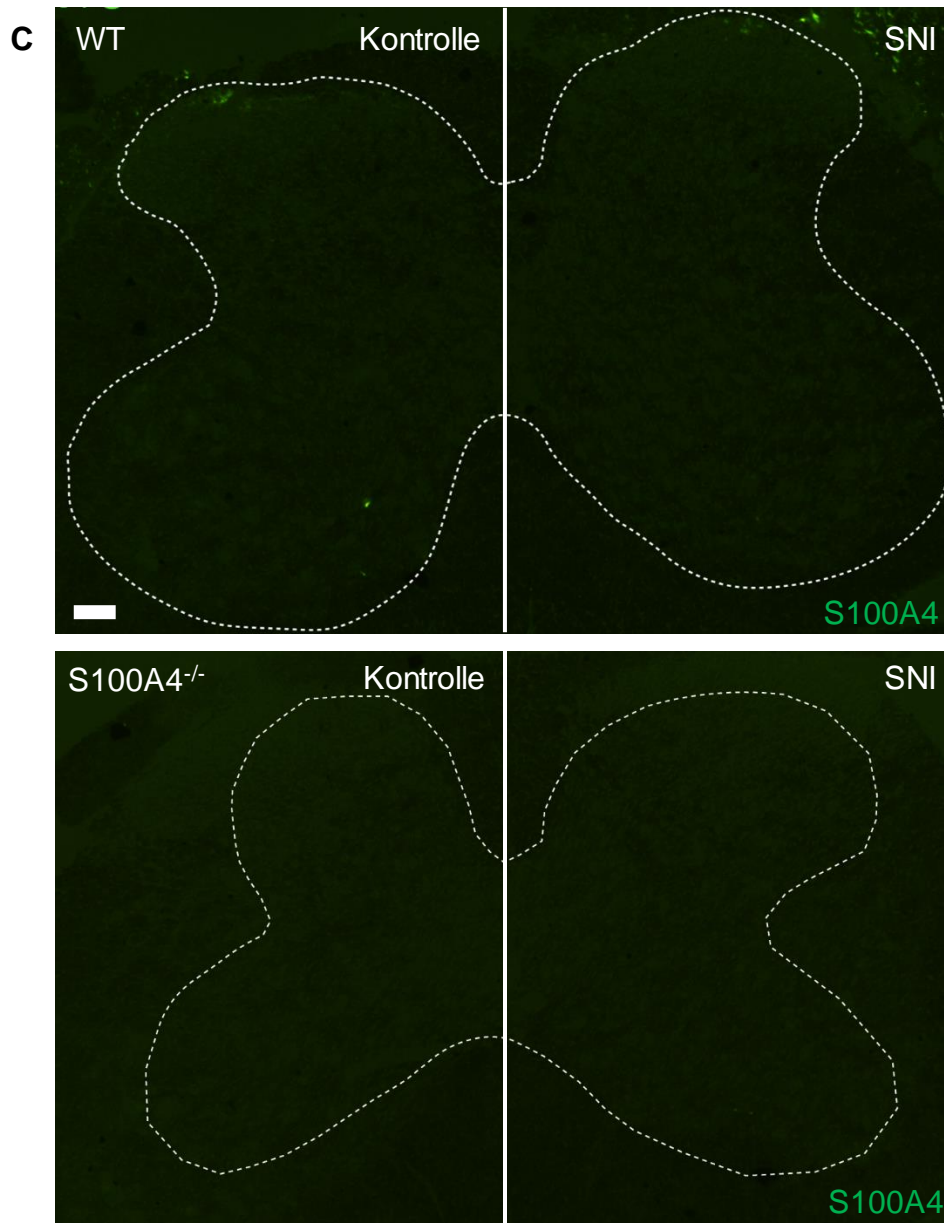


Abbildung 17: S100A4-Immunfluoreszenzfärbung (grün) im Ischiasnerv (A), in den Spinalganglien (B) und im Rückenmark (C) basal und 30 Tage nach SNI. Dargestellt sind Gewebeschnitte von Wildtyp (WT) und S100A4^{-/-} Mäusen. A. S100A4 wird basal in Ischiasnervgewebe exprimiert und 30 Tage nach SNI deutlich hochreguliert. Auf den S100A4^{-/-}-Gewebeschnitten ist weder basal, noch nach SNI ein Signal detektierbar. B. In den Spinalganglien zeigt sich ebenfalls eine basale Expression von S100A4 und eine verstärkte Expression von S100A4 nach SNI. Auf den S100A4^{-/-}-Gewebeschnitten der Spinalganglien ist weder basal, noch nach SNI ein Signal detektierbar. Es ist jedoch eine Fluoreszenz auf den S100A4^{-/-} Gewebeschnitten erkennbar, die durch Autofluoreszenz des Gewebes zustande kommt. C. Im Rückenmark ist auf den wildtypischen Gewebeschnitten weder basal, noch nach SNI ein Signal erkennbar. Auch auf dem S100A4^{-/-}-Gewebe ist keine Fluoreszenz sichtbar. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Ergebnisse

Anhand von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit zellspezifischen Primärantikörpern wurde die zelluläre Lokalisation von S100A4 näher untersucht. Unter Basalbedingungen zeigt S100A4 im Ischiasnerv fast keine Koexpression mit NF200, einem Marker für A β -Fasern (Abbildung 18A). Jedoch ist S100A4 in Peripherin-positiven Fasern lokalisiert (Abbildung 18B). Peripherin ist ein Marker für C-Fasern, welche bei der Reizweiterleitung von Schmerzsignalen eine wichtige Rolle spielen. Auch eine deutliche Kolokalisation von S100A4 mit dem Endothelzellmarker CD31 konnte beobachtet werden (Abbildung 18C).

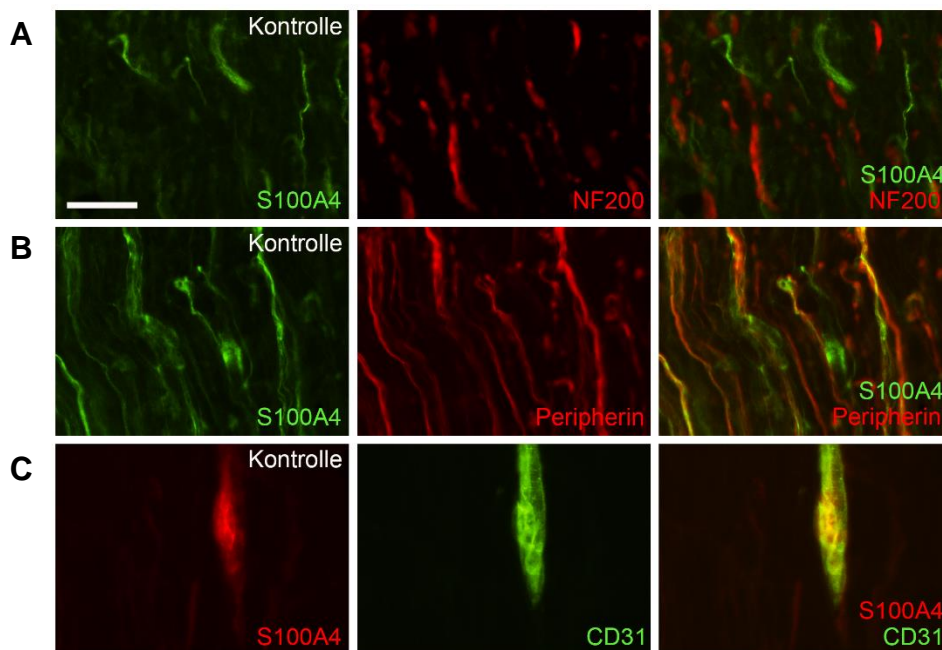


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbungen von S100A4 (in den Abbildungen A und B grün und in Abbildung C rot dargestellt) sowie zellspezifischen Primärantikörpern gegen NF200, Peripherin und CD31 auf Gefrierschnitten von Ischiasnerven (basal). Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung der übereinandergelegten Bilder erkennbar. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Um zu untersuchen, inwieweit sich das Expressionsmuster von S100A4 im Ischiasnerv nach peripherer Nervenverletzung ändert, wurde die S100A4 Expression 30-31 Tage nach SNI untersucht. Interessanterweise zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster von S100A4: S100A4 war nun nicht mehr in NF200-positiven und Peripherin-positiven Zelltypen detektierbar (Abbildung 19A-B). Es bestand jedoch weiterhin eine Kolokalisation mit CD31, was für eine bestehenbleibende Expression von S100A4 in Endothelzellen spricht (Abbildung 19C).

Ergebnisse

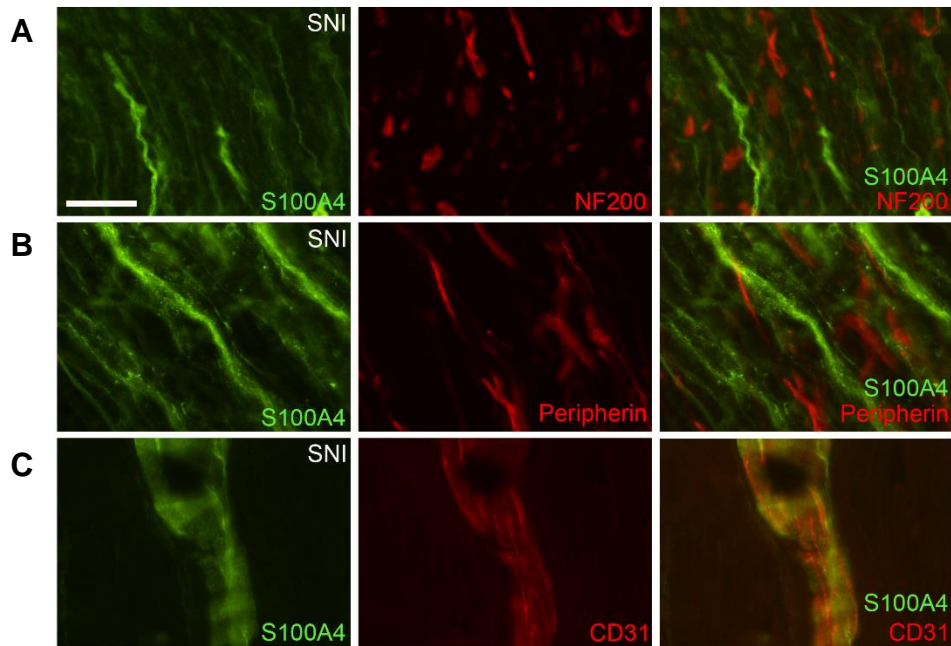


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen von S100A4 (grün dargestellt) sowie zellspezifischen Primärantikörpern gegen NF200, Peripherin und CD31 (rot dargestellt) auf Gefrierschnitten von Ischiasnerven (nach SNI). Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung der übereinandergelegten Bilder dargestellt. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von S100A4 in Spinalganglien wurden immunhistochemische Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen NF200, Peripherin, Tyrosinhydrolase (TH), Glutaminsynthetase (GS) und CD31 durchgeführt. Die Doppelfärbungen auf Kontrollebene von naiven Mäusen zeigen, dass S100A4 in einem Teil der NF200-positiven Neuronen exprimiert wird (Abbildung 20A). Wie bereits im Ischiasnerv beobachtet, zeigt sich auch in den Spinalganglien eine ausgeprägte Expression in Peripherin-positiven Zellen (Abbildung 20B). Weiterhin konnte eine Kolokalisation mit Tyrosinhydroxylase gezeigt werden (Abbildung 20C). Das Enzym Tyrosinhydroxylase spielt eine Rolle bei der Katecholamin-Biosynthese und stellt in Neuronen einen Marker für noradrenerge und dopaminerge Neurone dar. S100A4 zeigt dagegen keine Kolokalisation mit dem Satellitenzellmarker Glutaminsynthetase (GS) (Abbildung 20D). Basal liegt S100A4 auch nicht in CD31-positiven Zellen vor (Abbildung 20E).

Ergebnisse

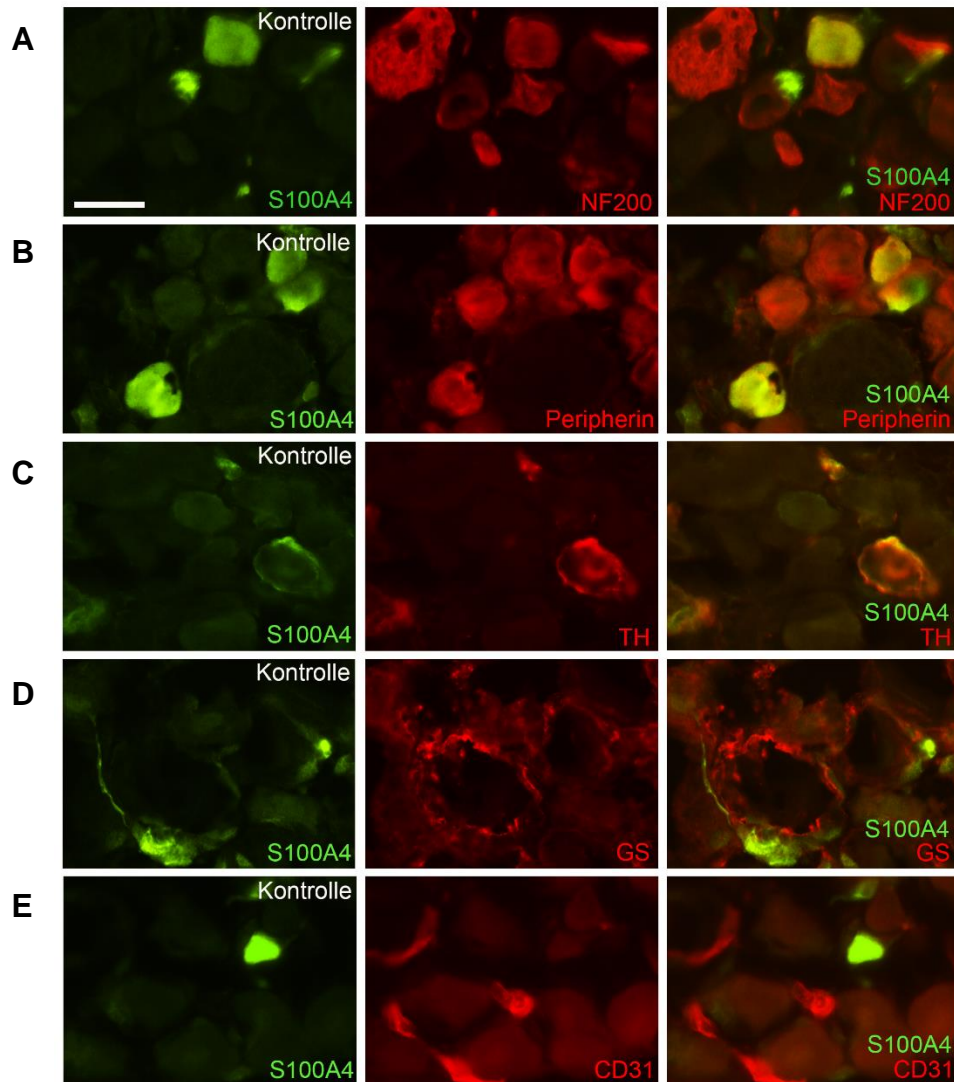


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbungen von S100A4 (grün dargestellt) sowie zellspezifische Primärantikörper von NF200, Peripherin, Tyrosinhydroxylase (TH), Glutaminsynthetase (GS) und CD31 (rot dargestellt) auf Gefrierschnitten von Spinalganglien (basal). Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung der übereinandergelegten Bilder dargestellt. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Immunfluoreszenzfärbungen von S100A4 und zellspezifischen Antikörpern in Spinalganglien nach peripherer Nervenverletzung (SNI) zeigen - analog zu den Doppelfärbungen von Ischiasnerven nach peripherer Nervenverletzung - ein verändertes Expressionsmuster. S100A4 liegt nach SNI scheinbar reduziert in NF200-positiven Neuronen vor, wobei sich die stärkeren S100A4-Fluoreszenzsignale außerhalb der Zellkörper befinden (Abbildung 21A). Doppelfärbungen mit Peripherin zeigen keine Kolokalisation mit Peripherin-positiven Neuronen. Das S100A4 Signal umgibt die Peripherin-positiven Zellen, ist jedoch weniger stark in dem Zellkörper selbst vorzufinden (Abbildung 21B). Es liegt zudem keine Kolokalisation von S100A4

Ergebnisse

nach peripherer Nervenverletzung mit Glutaminsynthetase oder CD31 vor (Abbildung 21C-D).

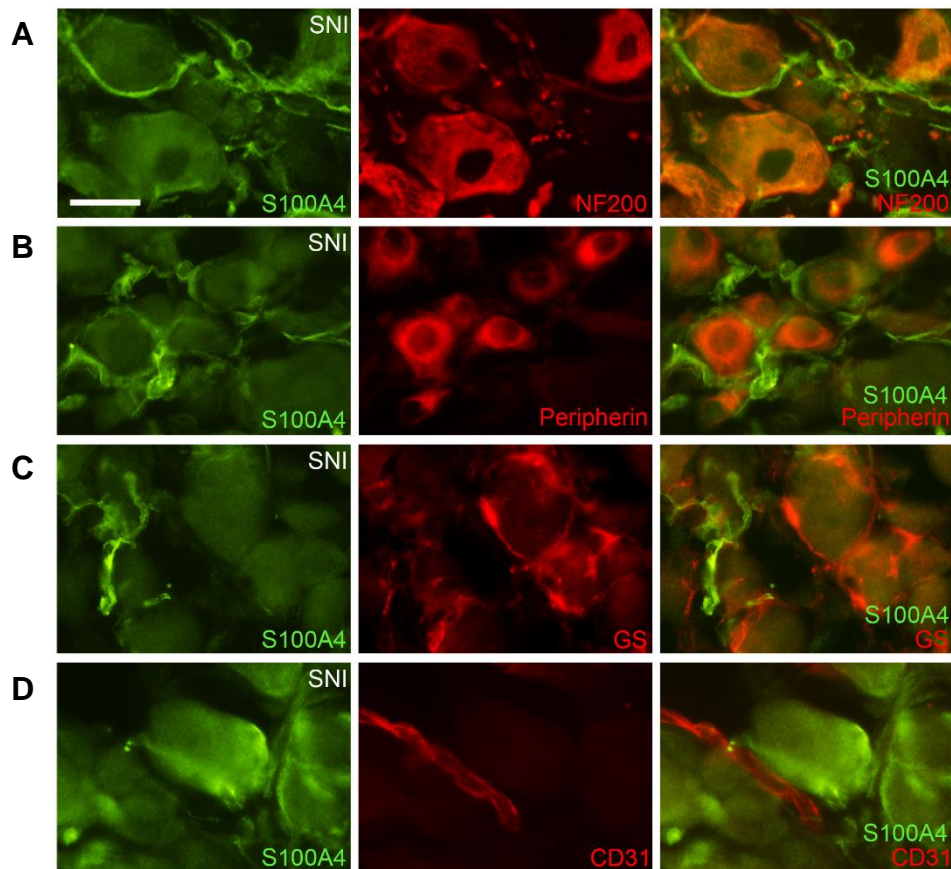


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbungen von S100A4 (grün dargestellt) sowie zellspezifischen Primärantikörpern gegen NF200, Peripherin, Glutaminsynthetase (GS) und CD31 (rot dargestellt) auf Gefrierschnitten von Spinalganglien (nach SNI). Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung der übereinandergelegten Bilder dargestellt. Maßstabsbalken: 25 μ m.

3.1.3 Basale Charakterisierung von Adv-S100A4^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von S100A4 für die Schmerzverarbeitung wurde das Verhalten von gewebespezifischen und globalen S100A4-Knockout-Mäusen in Modellen für akute nozizeptive und neuropathische Schmerzen charakterisiert. Zunächst erfolgte die Charakterisierung von Adv-S100A4^{-/-} Mäusen, bei denen S100A4 gewebespezifisch in sensorischen Neuronen deletiert ist.

Ergebnisse

Da für die Aussagekraft der verwendeten Tiermodelle eine intakte motorische Koordination nötig ist, wurde diese mit Hilfe des Rota-Rod-Tests überprüft. Bei den Adv-S100A4^{-/-}-Mäusen konnte kein motorischer Defekt festgestellt werden. Der Median der Latenzzeiten bei S100A4^{flox/flox} und Adv-S100A4^{-/-}-Mäusen lag jeweils bei 120 Sekunden, was der Cutoff-Zeit in diesem Modell entspricht.

3.1.4 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von Adv-S100A4^{-/-} Mäusen

Um zu untersuchen, ob das akute nozizeptive Schmerzverhalten von Adv-S100A4^{-/-} Mäusen durch den gewebsspezifischen Knockout von S100A4 verändert ist, wurde zunächst der Hot Plate Test bei verschiedenen Temperaturen (50 °C, 52 °C und 54 °C), sowie der Cold Plate Test (2 °C) durchgeführt. Bei diesem Test war die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion bzw. die Anzahl der Reaktionen in 5 min bei den Adv-S100A4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen nicht verändert (Abbildung 22A und B). Es zeigte sich somit kein Unterschied in dem thermischen Schmerzverhalten der Adv-S100A4^{-/-} und Kontroll-Mäuse.

Zur Untersuchung der mechanischen Schmerzschwelle wurde der Dynamic Plantar Aesthesiometer bei unbehandelten Mäusen beider Genotypen verwendet. Die gemessenen Latenzzeiten bis zum Pfotenrückzug waren bei den Adv-S100A4^{-/-} und den Kontroll-Mäusen vergleichbar (Abbildung 22C).

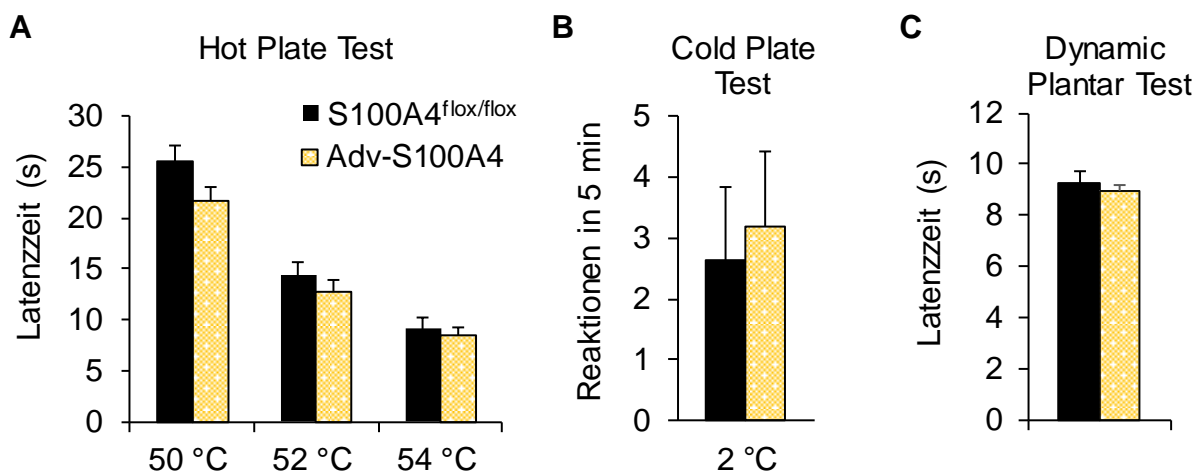


Abbildung 22: Akutes nozizeptives Verhalten von Adv-S100A4^{-/-}-Mäusen. A. Hot-Plate-Test (50 °C, 52 °C und 54 °C) zur Untersuchung der thermischen Nozizeption. n = 7. B. Cold-Plate-Test (2 °C) zur Untersuchung thermischer Nozizeption; n = 7. C. Basale mechanische Schmerzschwelle; n = 7. Es zeigt sich kein Unterschied in dem akuten nozizeptiven Verhalten von Adv-S100A4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den S100A4^{flox/flox} Kontrollmäusen.

Ergebnisse

3.1.5 Neuropathisches Schmerzverhalten von Adv-S100A4^{-/-} Mäusen

In einem Zeitverlauf von 29 Tagen nach SNI zeigte sich bei der Messung der mechanischen Hyperalgesie kein Unterschied zwischen den Adv-S100A4^{-/-} Mäusen und den S100A4^{flox/flox} Mäusen. Bei beiden Gruppen kam es wie erwartet zu einer Abnahme der Latenzzeit nach der SNI-Operation (Abbildung 23).

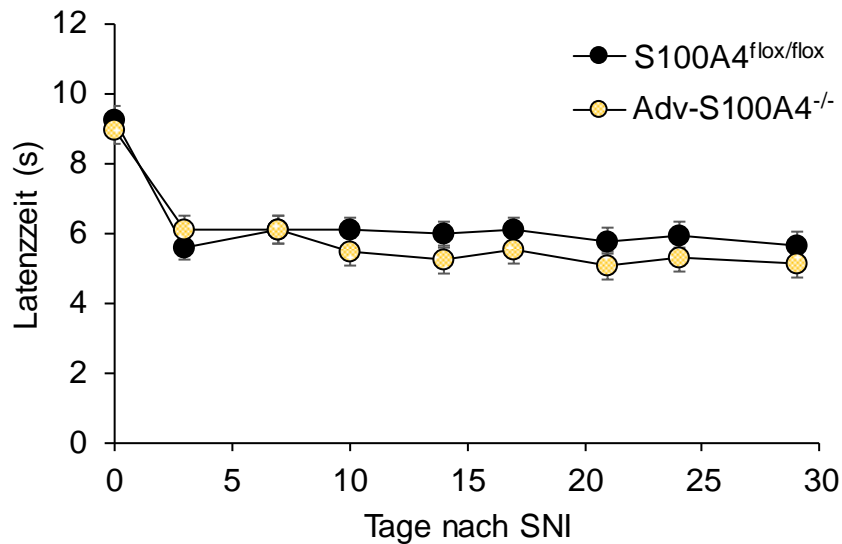


Abbildung 23: Mechanische Hyperalgesie von Adv-S100A4^{-/-} und S100A4^{flox/flox} Kontrollmäusen. Die mechanische Hyperalgesie nach peripherer Nervenverletzung mittels „Spared nerve injury“ (SNI) war in beiden Gruppen vergleichbar. n = 8. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

3.1.6 Basale Charakterisierung von S100A4^{-/-} Mäusen

Da die Adv-S100A4^{-/-} Mäuse im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen einen normalen Phänotyp zeigten (siehe vorheriges Kapitel) und die Expressionsanalysen S100A4 auch außerhalb sensorischer Neurone detektiert hatten (siehe Kapitel 3.1.2), wurden im weiteren Verlauf der Studie globale S100A4^{-/-} Mäuse und wildtypische Wurfgeschwister (WT) verwendet.

Die S100A4^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, vermehrungsfähig und phänotypisch (Aussehen, Gewicht und Körpergröße) unauffällig. Die aus der heterozygoten Zucht resultierenden Mäuse wurden zudem auf die prozentuale Verteilung der Genotypen untersucht. Die Verteilung entspricht bei einem Anteil von 26,87% wildtypischen, 26,87% S100A4^{-/-} Mäusen und 46,27% heterozygoten Mäusen in etwa der Mendel'schen Verteilung (Abbildung 24A). Weiterhin wurde die Häufigkeit der

Ergebnisse

Geschlechter untersucht, wobei es ebenfalls keine Auffälligkeiten gab. Prozentual wurden vergleichbar viele Männchen und Weibchen geboren (Abbildung 24B).

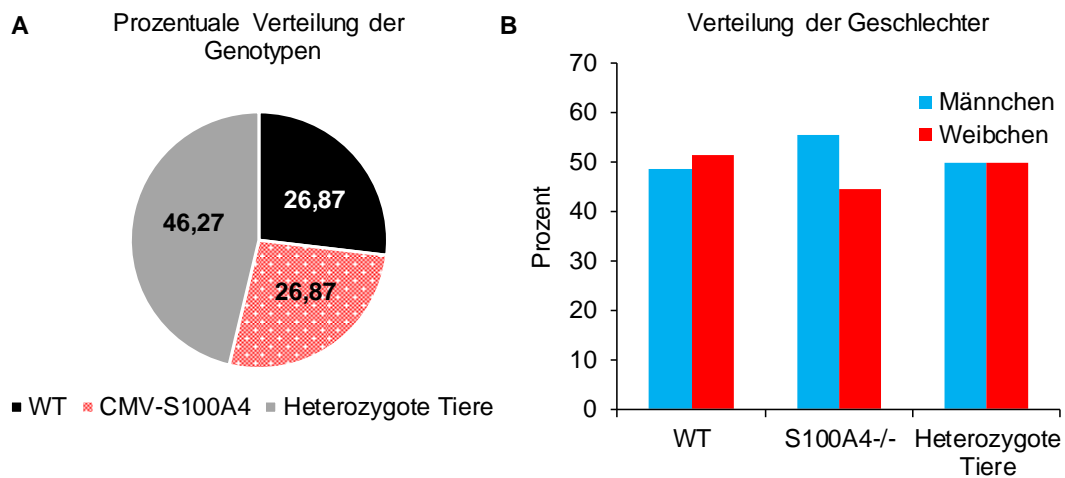


Abbildung 24: Verteilung der Genotypen und Geschlechter in der S100A4^{-/-}-Zucht. A. Es wurden 46,27% heterozygote Mäuse, 26,87% S100A4^{-/-}-Mäuse und 26,87% Wildtypen geboren. B. Innerhalb der drei Genotypen wurden jeweils vergleichsweise viele Männchen und Weibchen geboren; n = 134.

Wie bereits erwähnt ist für die Aussagekraft der verwendeten Tiermodelle eine intakte motorische Koordination nötig. Diese wurde mit Hilfe des Rota-Rod-Tests überprüft. Bei den S100A4^{-/-} Mäusen konnte kein motorischer Defekt festgestellt werden. Der Median der Latenzzeiten der WT und S100A4^{-/-}-Mäuse lag jeweils bei 120 Sekunden, entsprechend der zuvor gesetzten Cutoff-Zeit.

Zur weiteren basalen Charakterisierung von S100A4^{-/-} Mäusen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Markern für Populationen sensorischer Neurone im Rückenmark und Spinalganglien durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits sensorische Neurone durch eine IB4-Bindung (Marker für nicht peptiderge C-Faser Neurone) untersucht, andererseits die morphologische Verteilung von NF200 (Marker für myelinisierte primär afferente Neurone) und Substanz P (Marker für peptiderge primär afferente Neurone) –positiven Neuronen untersucht. Alle Proteine zeigen typische Expressionsmuster (Abbildung 25) im Rückenmark von S100A4^{-/-} und WT Mäusen und sowohl die Größe des Rückenmarks sowie die Struktur der schmerzrelevanten Laminae des Dorsalhorns waren regelhaft. Weiterhin wurde der Anteil NF200-, CGRP- und Substance P-positiver sensorischer Neurone in

Ergebnisse

Spinalganglien untersucht. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen S100A4^{-/-} und WT Gewebe festgestellt werden (Abbildung 26).

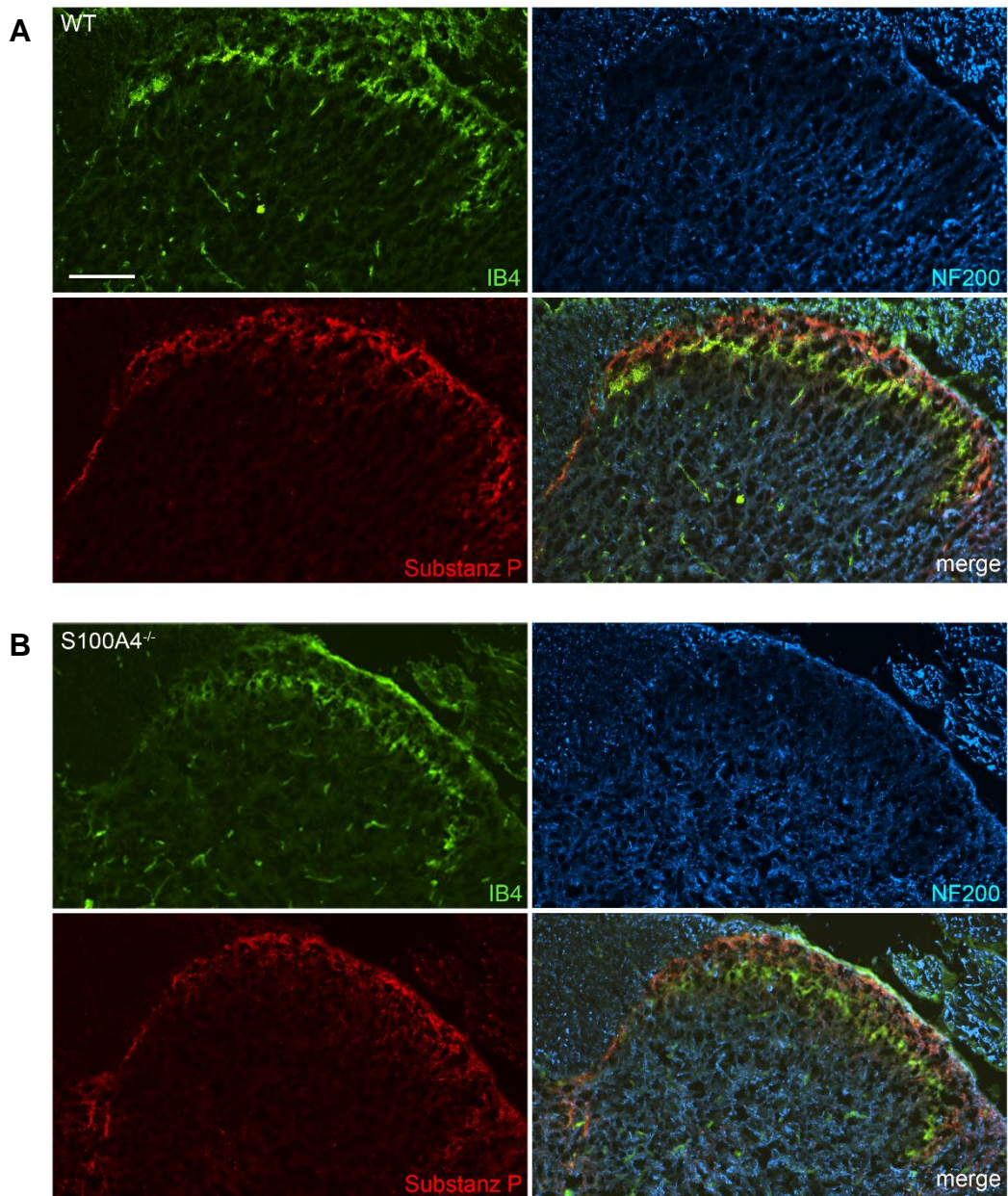


Abbildung 25: Histologische Charakterisierung der Morphologie des Rückenmarks in WT und S100A4^{-/-} Mäusen. A. Immunfluoreszenzmessungen mit den Markern Isolectin B4 (IB4), Neurofilament 200 (NF200) und Substanz P auf wildtypischem Rückenmarksgewebe. B. Immunfluoreszenzfärbungen mit den Markern Isolectin B4 (IB4), Neurofilament 200 (NF200) und Substanz P auf S100A4^{-/-}-Gewebe. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Ergebnisse

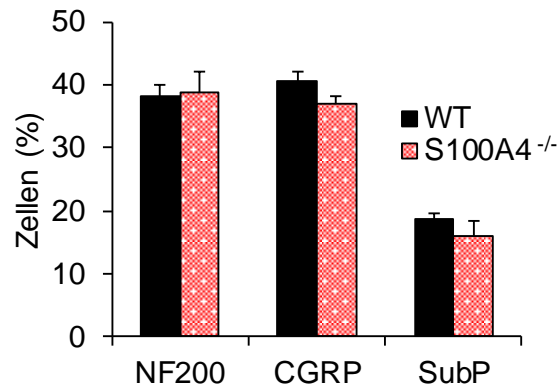


Abbildung 26: Charakterisierung der DRG-Neuronen-Population von WT und S100A4^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Marker-positiver sensorischer Neurone bezogen auf die Gesamtpopulation; Mittelwerte \pm SEM; n = 4.

3.1.7 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung des akuten nozizeptiven Schmerzverhaltens von S100A4^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern (WT) wurden verschiedene Modelle mit thermischer und mechanischer Stimulation verwendet. S100A4^{-/-}-Mäuse zeigten ein mit den Wildtypen vergleichbares Schmerzverhalten bei thermischer Stimulation. Sowohl die Reaktionszeiten bei hohen Temperaturen (50 °C, 52 °C, 54 °C) als auch die Summe der Reaktionen bei erniedrigten Temperaturen (2 °C) waren ähnlich (Abbildung 27A, 27B). Zudem wurde das Verhalten der S100A4^{-/-} und WT-Mäuse mittels eines Dynamic Plantar-Tests nach akuter mechanischer Stimulation untersucht. Beide Genotypen zeigten ein normales nozizeptives Verhalten (Abbildung 27C).

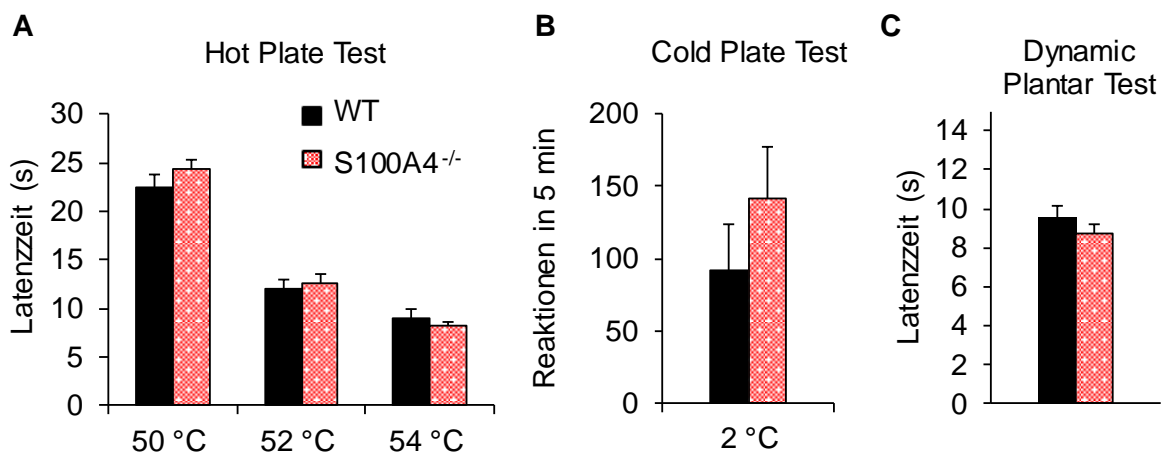


Abbildung 27: Akutes nozizeptives Verhalten von S100A4^{-/-} Mäusen. A. Hot-Plate-Test (50°C, 52°C und 54°C) zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption; n = 11 - 12. B. Cold-Plate-Test (2 °C) zur Untersuchung Kälteschmerzschwelle. C. Dynamic Plantar Test zur Messung der mechanischen Schmerzschwelle; n = 11-12. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Ergebnisse

Insgesamt zeigt sich kein Unterschied zwischen den globalen S100A4^{-/-}-Mäusen und deren wildtypischen Geschwistern in Modellen der akuten Nozizeption. Der Knockout von S100A4 hat demnach keinen Einfluss auf das akute nozizeptive Verhalten von Mäusen.

3.1.8 Neuropathisches Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen

Um das neuropathische Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen zu untersuchen, wurde einerseits das „Spared nerve Injury“ (SNI) Modell und andererseits das „Crush Injury“ (CI) Modell angewendet.

3.1.8.1 Spared nerve Injury Modell

Bei dem SNI-Modell werden zwei der drei Endäste des Ischiasnervs durchtrennt, wodurch im Versorgungsgebiet des intakt gebliebenen Endastes (*Nervus suralis*) eine Überempfindlichkeit induziert wird. Bei der Messung der mechanischen Hyperalgesie mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer über einen Zeitraum von 28 Tagen zeigte sich bei Wildtyp Mäusen eine typische Abnahme der Latenzzeiten (Abbildung 28A). Interessanterweise waren die Latenzzeiten der S100A4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant reduziert, was für eine Funktion von S100A4 bei neuropathischen Schmerzen spricht.

Zusätzlich zur Bestimmung der Latenzzeiten des Pfoten-Zurückziehens wurde auch das spontane Schmerzverhalten mittels einer Dynamic Weight Bearing Apparatur bestimmt. Hierbei wurde die Verlagerung der Hinterpfoten von der SNI-operierten Seite (links, ipsilateral) auf die unbehandelte Seite (rechts, contralateral) in einem Zeitraum von fünf Minuten bestimmt und das Verhältnis contralateral/ipsilateral berechnet. Sowohl die WT-Mäuse als auch die S100A4^{-/-} Mäuse zeigen nach SNI eine verstärkte Belastung der contralateralen Hinterpfote. In einem Zeitverlauf von 24 Tagen zeigten sich hinsichtlich des spontanen neuropathischen Schmerzverhaltens der beiden Genotypen jedoch keine Unterschiede in deren neuropathischen Schmerzverhalten (Abbildung 28B).

Neuropathische Schmerzen können auch das Wühlverhalten von Mäusen beeinflussen (Andrews et al. 2012, Deacon 2012, Rutten et al. 2014, Shepherd et al. 2018), was zur Quantifizierung des spontanen Schmerzverhaltens genutzt werden kann. Um zu untersuchen, ob S100A4^{-/-} Mäuse ein verändertes Wühlverhalten aufweisen, wurde dieses über einen Zeitraum von 24 Tagen nach SNI-Operation

Ergebnisse

untersucht. Gemessen wurde hier das Gewicht an Einstreu (100 % entsprechen 25 g), welches innerhalb von 15 Minuten aus einem im Käfig befindlichen Rohr verdrängt wurde. Anders als erwartet zeigten die Mäuse ein nach SNI verstärktes Wühlverhalten an den Tagen 3, 10, 18 und 24 nach SNI (Abbildung 28C). In der Theorie sollte das Modell dazu verwendet werden, ein reduziertes Wühlverhalten zu quantifizieren, welches durch die verstärkten neuropathischen Schmerzen hervorgerufen wird (Shepherd et al. 2018). Die zunehmende Wühlaktivität der Mäuse ist sehr wahrscheinlich auf ein nicht ausreichend etabliertes Modell zurückzuführen. Eine Untersuchung des Wühlverhaltens von Nagetieren ist vergleichsweise fehleranfällig, da die Mäuse sehr sensibel auf Veränderungen ihrer Umwelt reagieren. Einige bekannte Parameter sind beispielsweise: Änderungen von Gerüchen, die Farbe des Rohrs bzw. dessen Lichtdurchlässigkeit, die Beschaffenheit des verwendeten Materials und auch unterschiedliche Auswirkungen auf das Verhalten der Mäuse bei verschiedenen Schmerzmodellen (Shepherd et al. 2018). Auch eine längere und/oder häufigere Gewöhnung der Tiere könnte zu einer Verbesserung des Modells beitragen (Deacon 2012). Trotz der fragwürdigen Aussagekräftigkeit dieses Modells zeigten die S100A4^{-/-} Mäuse ein mit den Wildtypen vergleichbares Wühlverhalten (Abbildung 28C).

Ergebnisse

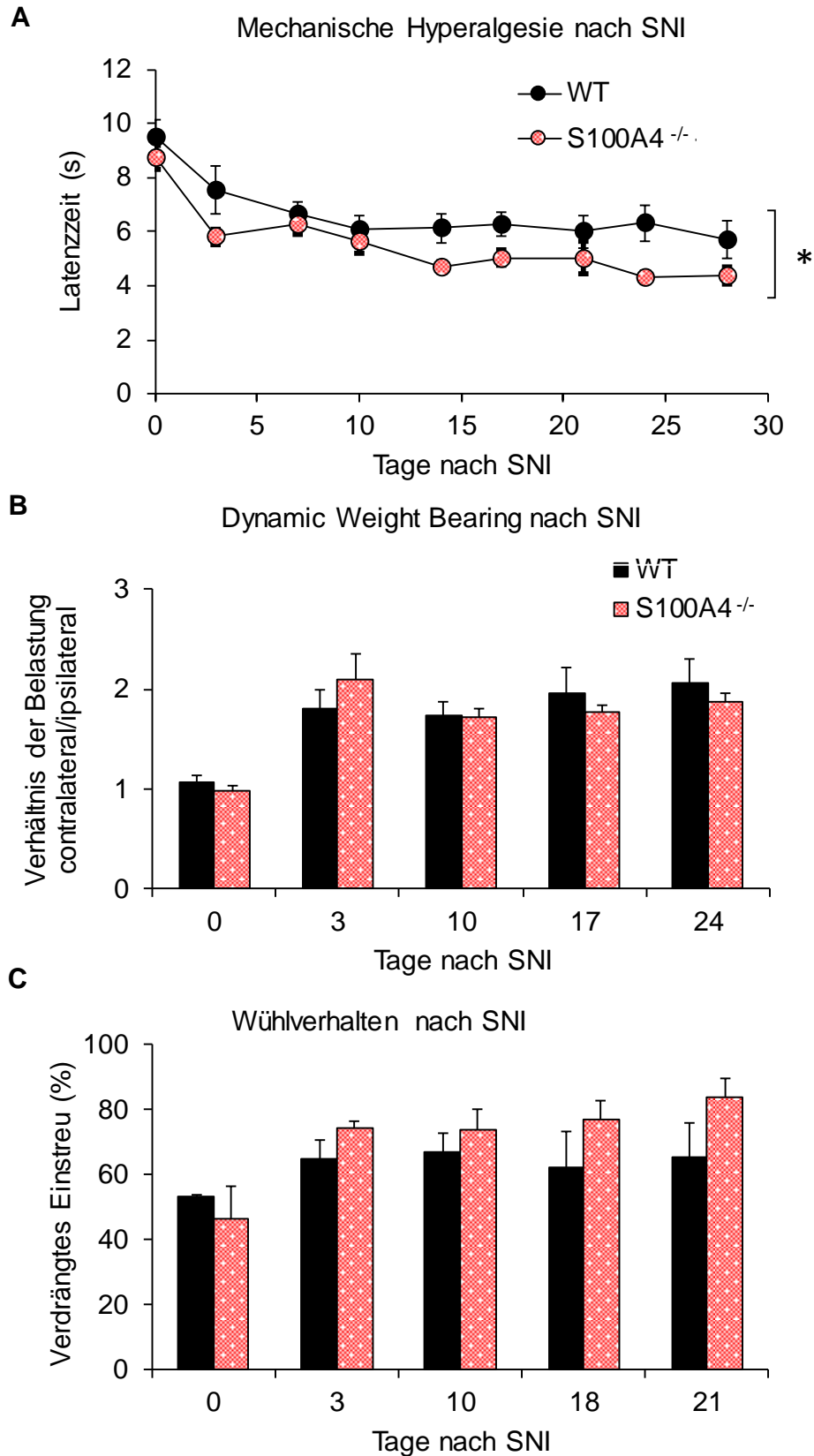


Abbildung 28: Neuropathisches Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen nach peripherer Nervenverletzung mittels „Spared nerve injury“ (SNI). A. Mechanische Hyperalgesie. Die Latenzzeiten des Pfoten-Zurückziehens wurden mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer bestimmt; n = 8. B. Dynamic Weight Bearing nach SNI berechnet als Verhältnis contralaterale/ipsilaterale Hinterpfote; n = 8. C. Wühlverhalten im Zeitverlauf nach SNI; n = 8. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

3.1.8.2 Crush Injury Modell

Bei dem Crush Injury Modell wird der *N. ischiadicus*, im Gegensatz zum SNI-Modell, nicht durchtrennt, wodurch die Nervenscheiden intakt bleiben. Dadurch kommt es, anders als bei dem SNI Modell, nach einer anfänglichen Degeneration zu einer Regeneration des verletzten *N. ischiadicus* und einer Wiedererlangung der Funktionalität der Pfote, was sich in einer Normalisierung des Schmerzverhaltens zeigt. Um zu untersuchen, ob die Regenerationskapazität und das Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen verändert ist, wurde die Latenzzeit bis zum Pfotenrückzug mittels Dynamic Plantar Aesthesiometer bei beiden Genotypen gemessen. Bei einer Messung über 59 Tage zeigte sich, dass die Mäuse sowohl in der Degenerations- als auch in der Regenerationsphase eine vergleichbare mechanische Hyperalgesie aufweisen (Abbildung 29A).

Anhand des Sciatic Functional Index (SFI) kann man die funktionelle Regeneration, des Ischiasnervs, nach einer Crush Injury Operation untersuchen (Prasanna u. a., 2007). Für die Auswertung wurden Pfotenabdrücke nach Crush Injury angefertigt und anhand des Verteilungsmusters konnte der SFI (Sciatic Functional Index) berechnet werden. Über einen Zeitverlauf von 31 Tagen zeigt sich eine zunehmende funktionelle Regeneration der Pfoten bei beiden Gruppen, die keine signifikanten Unterschiede aufwies (Abbildung 29B).

Weitherin wurde das neuropathische Schmerzverhalten nach Crush Injury mit einer Dynamic Weight Bearing Apparatur untersucht. Dabei wurde die Pfotenverlagerung von der verletzten (linke, L) auf die unverletzte (rechte, R) Hinterpfote berechnet. Gerade zu Beginn (3 Tage nach Crush Injury) zeigt sich eine starke Gewichtsverlagerung auf die unverletzte Pfote, was auf ein gesteigertes Schmerzempfinden schließen lässt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen dem neuropathischen Schmerzverhalten von Wildtyp und S100A4^{-/-} Mäusen (Abbildung 29C). Das Protein S100A4 scheint demnach eine untergeordnete Rolle bei der Regeneration von Nervengewebe zu spielen.

Ergebnisse

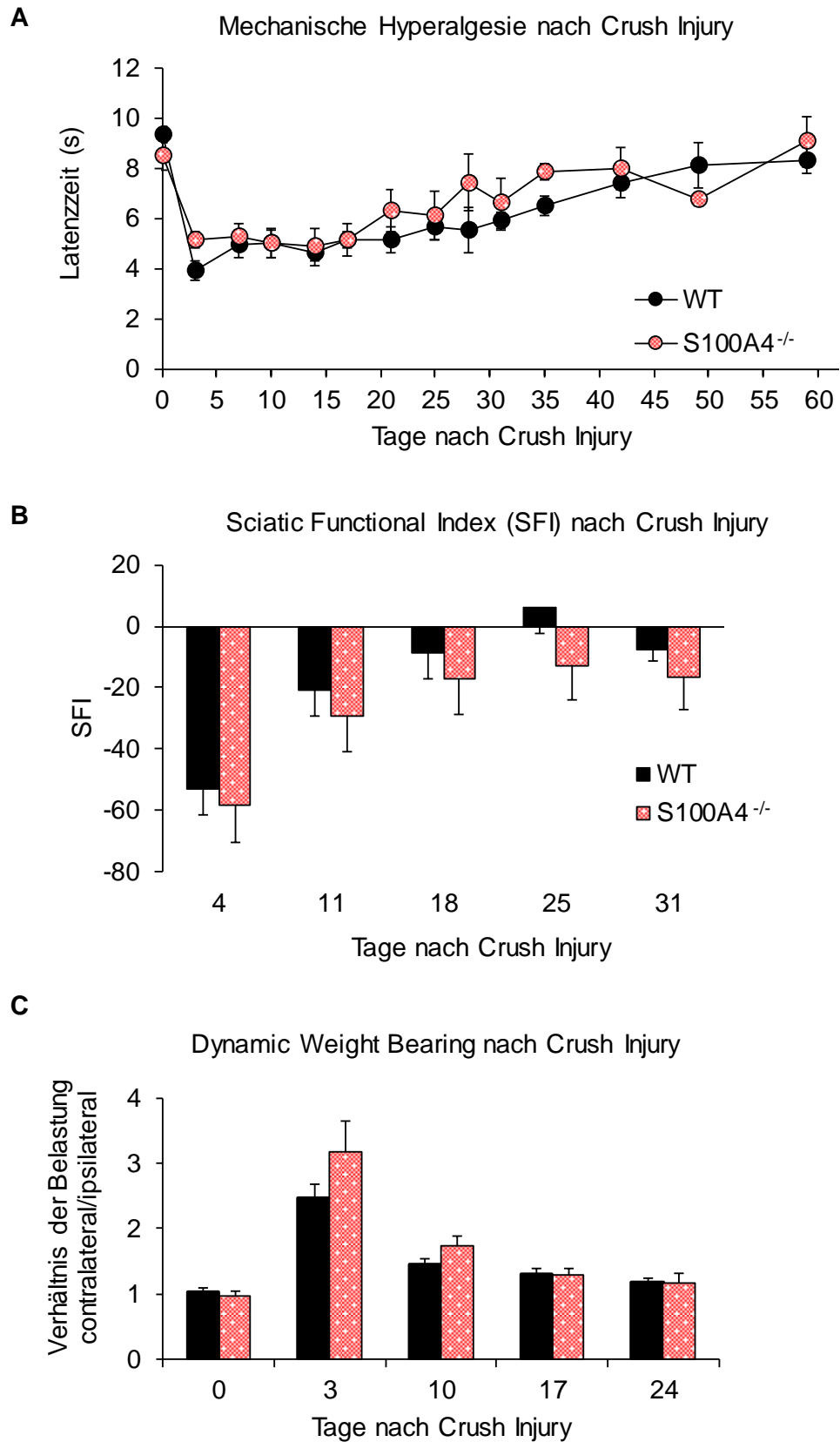


Abbildung 29: Neuropathisches Schmerzverhalten von S100A4^{-/-} Mäusen im Crush Injury-Modell. A Mechanische Hyperalgesie; n = 8. B. Sciatic Funktional Index zur Veranschaulichung der Regenerationskapazität und Funktionalität der Pfote C. Dynamic Weight Bearing nach CI berechnet als Verhältnis contralaterale/ipsilaterale Hinterpfote; n = 8. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.1.9 ROS-induziertes Schmerzverhalten

Um das redoxabhängige Schmerzverhalten von $S100A4^{-/-}$ Mäusen zu untersuchen, wurde der ROS-Donor t-BOOH intrathekal in den Wirbelkanal injiziert und die mechanische Sensitivität der Hinterpfoten über einen Zeitraum von 120 Minuten alle 15 Minuten gemessen. Beide Genotypen zeigten eine typische Abnahme der Latenzzeit nach Injektion des ROS-Donors. $S100A4^{-/-}$ Mäuse zeigten jedoch kein signifikant verändertes Schmerzverhalten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abbildung 30). Die mechanische Hyperalgesie scheint somit $S100A4$ unabhängig zu sein, da kein signifikanter Unterschied in den Reaktionszeiten der Mäuse besteht.

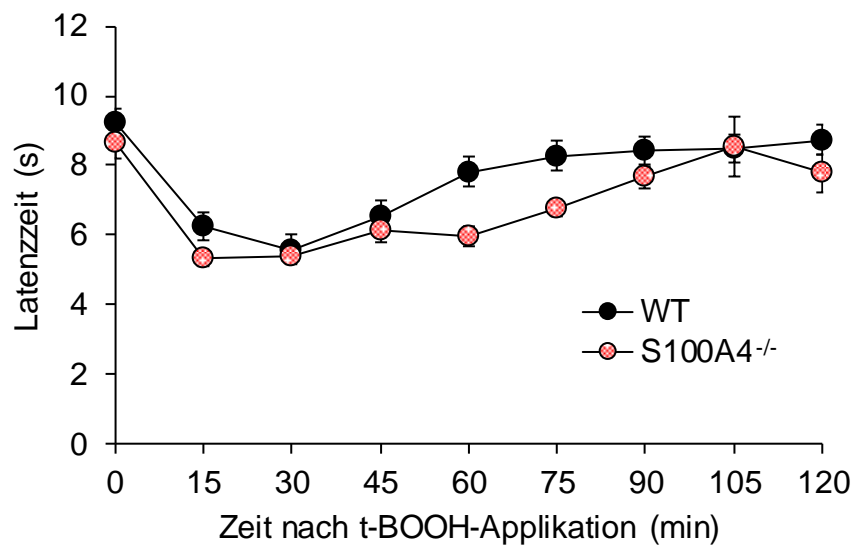


Abbildung 30: Zeitverlauf der mechanischen Hyperalgesie nach i.t. Injektion von t-BOOH bei $S100A4^{-/-}$ Mäusen; n = 6. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.2 Charakterisierung der redoxabhängigen Inhibierung der sEH Funktion im schmerzverarbeitenden System

3.2.1 Basale Charakterisierung von sEH-KI-Mäusen

Bei sEH-Knockin Mäusen wurde an der Position 521 des sEH Enzyms die Aminosäure Cystein gegen die redoxinsensitive Aminosäure Serin ausgetauscht. Um zu untersuchen, ob diese genetische Modifikation einen Einfluss auf die Schmerzverarbeitung hat, wurde das Verhalten von sEH-Knockin Mäusen und deren entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwister (WT) untersucht. Die Knockin Mäuse sind nicht belastet, vermehrungsfähig, weisen eine normale Körpergröße auf und zeigen auch sonst keine Verhaltensauffälligkeiten. Da die Tiere heterozygot gezüchtet wurden, aber nur KI und WT Mäuse untersucht wurden, musste eine Genotypisierung durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.1.3). Es wurden 33,85 % Wildtypen geboren, 21,54 % Knockin Mäuse und 44,62 % heterozygote Tiere (Abbildung 31A). Die Häufigkeitsverteilung der geborenen Geschlechter entspricht in etwa der Mendel'schen Verteilung. Die etwas häufigere Geburt von WT könnte mit einer nicht ausreichend großen Gruppengröße in Zusammenhang stehen. Prozentual werden in allen Genotypen in etwa gleich viele weibliche und männliche Mäuse geboren (Abbildung 31B).

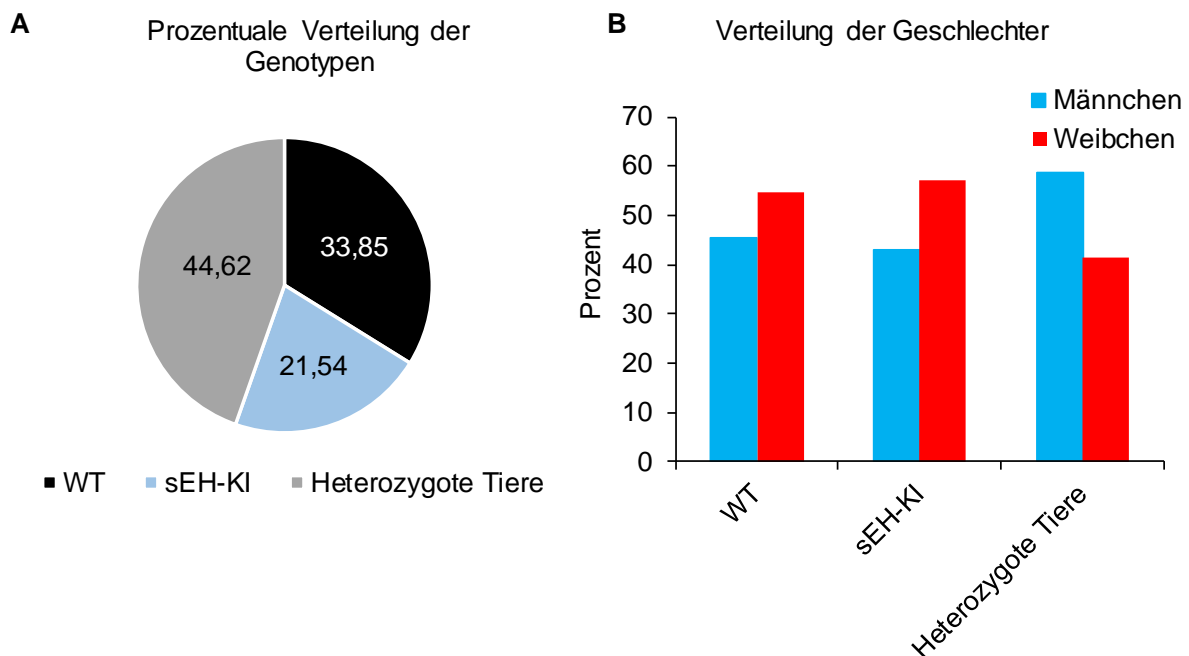


Abbildung 31: Untersuchung der prozentualen Verteilung der Genotypen und der Häufigkeitsverteilung der geborenen Geschlechter. A. Es werden 33,85 % Wildtypen, 21,54 % sEH-KI Mäuse und 44,62 % heterozygote Mäuse geboren. B. Bei sEH-KI Mäusen, deren wildtypischen Geschwistern (WT) und heterozygoten Mäusen zeigt sich kein Unterschied in der prozentualen Geburtenhäufigkeit der Geschlechter; n = 65.

Ergebnisse

Für die Aussagekraft der verwendeten Tiermodelle ist eine intakte motorische Koordination nötig. Diese wurde mit Hilfe des Rota-Rod-Tests überprüft und quantitativ ausgewertet. Bei den sEH-KI Mäusen konnte kein motorischer Defekt festgestellt werden. Der Median der Latenzzeiten der WT und sEH-KI Mäuse lag jeweils bei 120 Sekunden.

3.2.2 Nozizeptives Verhalten von sEH-KI-Mäusen

3.2.2.1 Akutes nozizeptives Schmerzverhalten von sEH-KI-Mäusen

Das akute nozizeptive Verhalten bei Hitze- (Hot-Plate-Test: 50 °C, 52 °C und 54 °C) und Kälte-Stimuli (Cold Plate Test: 2 °C) war bei sEH-KI- und WT-Mäusen vergleichbar (Abbildung 32A und 32B). Darüber hinaus war das nozizeptive Verhalten gegenüber mechanischen Reizen bei sEH-KI- und WT-Mäusen vergleichbar (Abbildung 32C), was darauf hindeutet, dass redoxinsensitive sEH-KI-Mäuse eine intakte physiologische Nozizeption aufweisen.

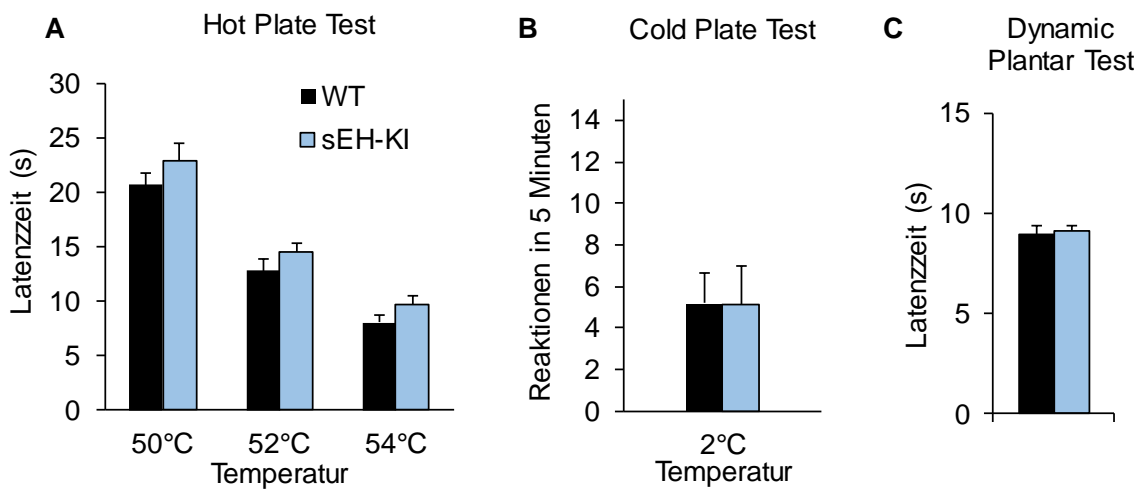


Abbildung 32: Nozizeptives Verhalten von sEH-KI-Mäusen. A. Hot-Plate-Test (50°C, 52°C und 54°C) zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption; n = 11. B. Cold-Plate-Test (2 °C) zur Untersuchung akuter thermischer Nozizeption; n = 11. C. Dynamic Plantar Test; n = 7 - 8.

3.2.2.2 Schmerzverhalten von sEH-KI Mäusen im Formalin Test

Anhand des Formalin-Tests wurde die schnelle Schmerzsensibilisierung bei sEH-KI-Mäusen untersucht. In diesem Modell führt eine intraplantare Injektion einer 0,5%igen Formaldehydlösung in die Hinterpfote der Mäuse führte zu einer typischen biphasischen nozizeptiven Reaktion in Form von Pfotenlecken der behandelten Pfote. Die erste Leckphase beginnt typischerweise unmittelbar nach der Injektion des Formaldehyds in die Hinterpfote und dauert bis zu 15 Minuten. Hier kommt es zu einer direkten Stimulation von Nozizeptoren. Darauf folgt normalerweise eine Ruhephase von circa 15 Minuten. Anschließend kommt es zu einer zweiten Phase des intensiven Pfotenleckens über weitere 10-15 Minuten, was auf lokale entzündliche Veränderungen in der Pfote und zentrale Veränderungen zurückzuführen ist, die zu einer anhaltenden Aktivierung von C-Fasern führen (Coderre et al. 1990, Tjolsen et al. 1992).

Die Summe des Leckverhaltens zwischen sEH-KI- und WT-Mäusen war in beiden Phasen ähnlich (Abbildung 33A), was darauf hindeutet, dass die Redox-Modifikation von sEH an der Aminosäure Cys521 keine Auswirkungen auf schnelle nozizeptive Reaktionen nach Formalin-Stimulation hat. Auch eine Betrachtung des Leckverhaltens über einen Zeitverlauf von 60 Minuten ergab keinen Hinweis auf ein signifikantes verändertes Schmerzverhalten der sEH-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 33B). Allerdings ist hier innerhalb des Zeitverlaufs erkennbar, dass die wildtypischen Mäuse insbesondere in der Zeit von 15-25 Minuten nach Formalininjektion eine tendentiell längere Leckzeit haben als die sEH-KI Mäuse. Bei der Auswertung der einzelnen Zeitpunkte zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Ergebnisse

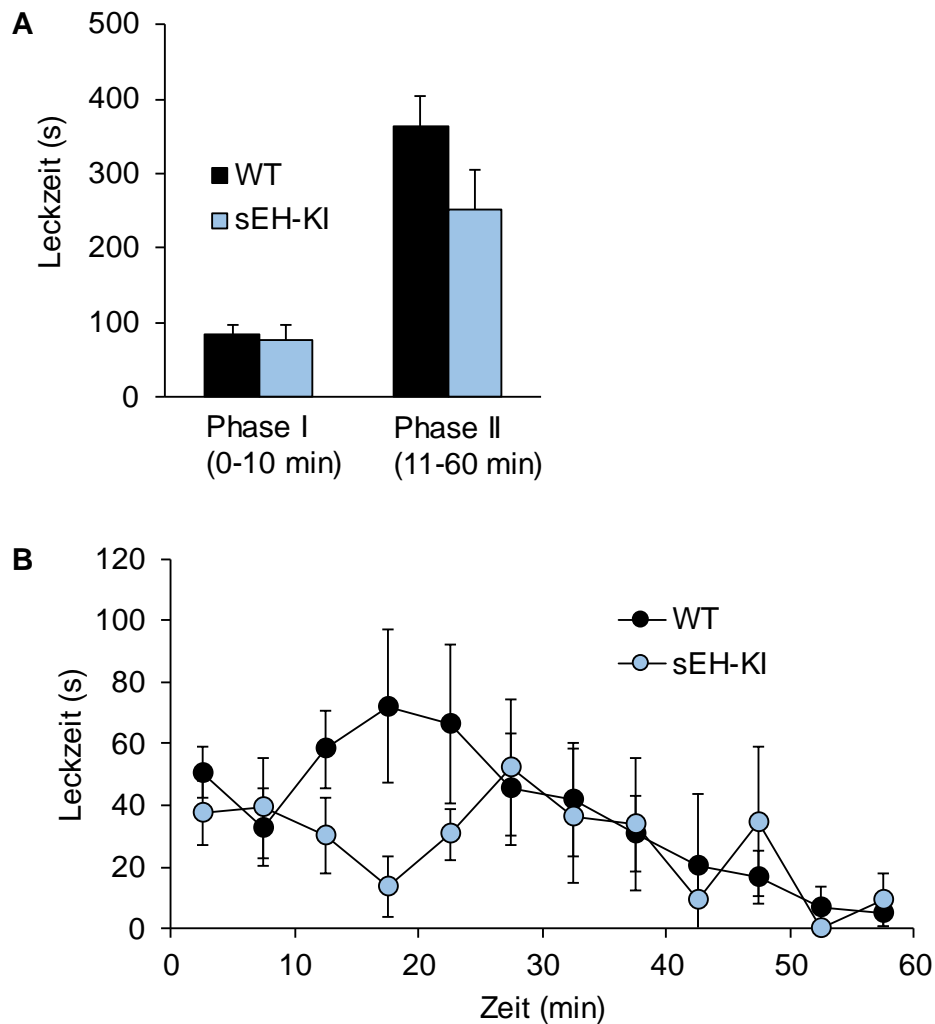


Abbildung 33: Formalin-Test mit sEH-KI-Mäusen. A. Darstellung der zwei charakteristischen Phasen des Formalin-Tests. Die Leckzeit war bei sEH-KI Mäusen in keiner der Phasen signifikant verändert. B. Darstellung des Leckverhaltens über einen Zeitverlauf von 60 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. $n = 9$.

3.2.2.3 Mechanische Hyperalgesie von sEH-KI Mäusen nach Zymosan-Injektion

In einem zweiten Modell zur Untersuchung von entzündlichen Schmerzen wurde die mechanische Hyperalgesie, welche durch die Injektion von Zymosan in eine Hinterpfote hervorgerufen wurde, analysiert. sEH-KI-Mäuse entwickelten, ähnlich wie die WT-Mäuse, eine mechanische Hyperalgesie in der betroffenen Hinterpfote nach der Zymosan-Injektion, wobei die Ausprägung der mechanischen Hyperalgesie in beiden Gruppen ähnlich war (Abbildung 34). Diese Daten deuten daher darauf hin, dass eine redox-induzierte sEH-Modifikation der Aminosäure Cystein 521 das Schmerzverhalten in dem Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung nicht beeinflusst.

Ergebnisse

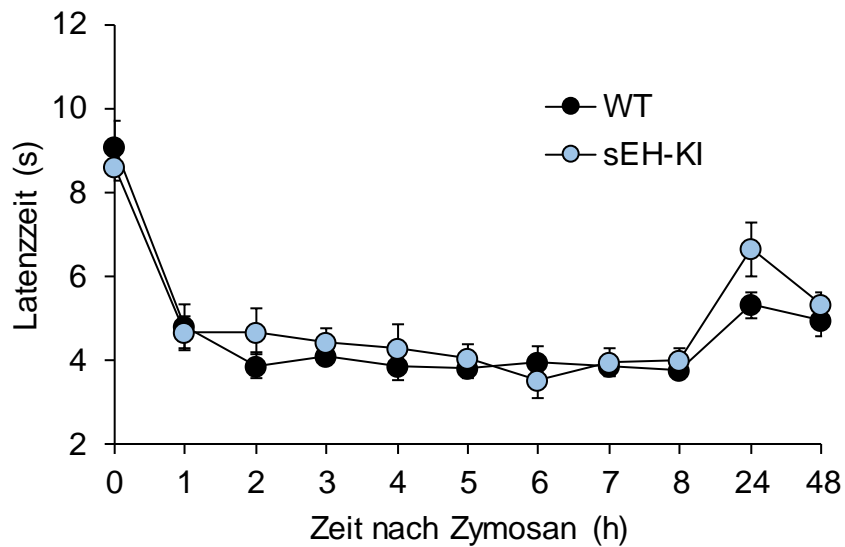


Abbildung 34: Mechanische Hyperalgesie von sEH-KI-Mäusen nach Injektion von Zymosan A (5 mg/ml) in eine Hinterpfote. Gezeigt wird der Zeitverlauf der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach mechanischer Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 8$.

3.2.2.4 Schmerzverhalten von sEH-KI Mäusen im Modell der Zymosan induzierten Peritonitis

Des Weiteren wurde untersucht, ob das viszerale Schmerzverhalten bei sEH-KI-Mäusen verändert ist. Für diese Untersuchung wurde das Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis verwendet. Fünf Stunden nach der intraperitonealen Injektion von Zymosan wurde das viszerale Schmerzverhalten der Mäuse mit einer Dynamic Weight Bearing Apparatur gemessen (Laux-Biehlmann et al. 2016, Stark et al. 2019) und die Gewichtsverlagerung der Vorder- und Hinterpfoten analysiert, wobei das Verhältnis Vorderpfote/Hinterpfote berechnet wurde. In diesem Versuch zeigten die sEH-KI-Mäuse ähnliche Vorderpfoten/Hinterpfoten-Verhältnisse wie ihre WT-Wurfgeschwister (Abbildung 35), was darauf hindeutet, dass eine Redox-Modifikation am Cysteinrest 521 der sEH das viszerale Schmerzverhalten nicht beeinflusst.

Ergebnisse

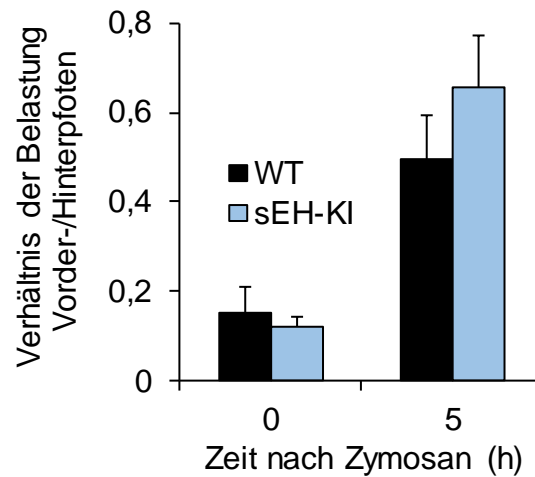


Abbildung 35: Viszerales Schmerzverhalten von sEH-KI-Mäusen im Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis. Die Verlagerung des Gewichts (dargestellt als Vorder-/Hinterpfoten Ratio) ist bei sEH-KI Mäusen 5 Stunden nach einer Injektion von Zymosan A nicht verändert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 7-8.

Es wurde zudem untersucht, inwiefern eine intraperitoneale Injektion von Zymosan bei WT-Mäusen die Konzentration endogener Prostaglandine (inklusive des sEH-Modulators 15d-PGJ₂) durch Zymosan beeinflusst wird. Es zeigt sich, dass Zymosan insbesondere die Spiegel des Prostaglandins E₂ (PGE₂), D₂ (PGD₂) und von Thromboxan B₂ (TXB₂) in der peritonealen Lavage signifikant erhöht, jedoch nicht die von 15d-PGJ₂ (Abbildung 36).

Ergebnisse

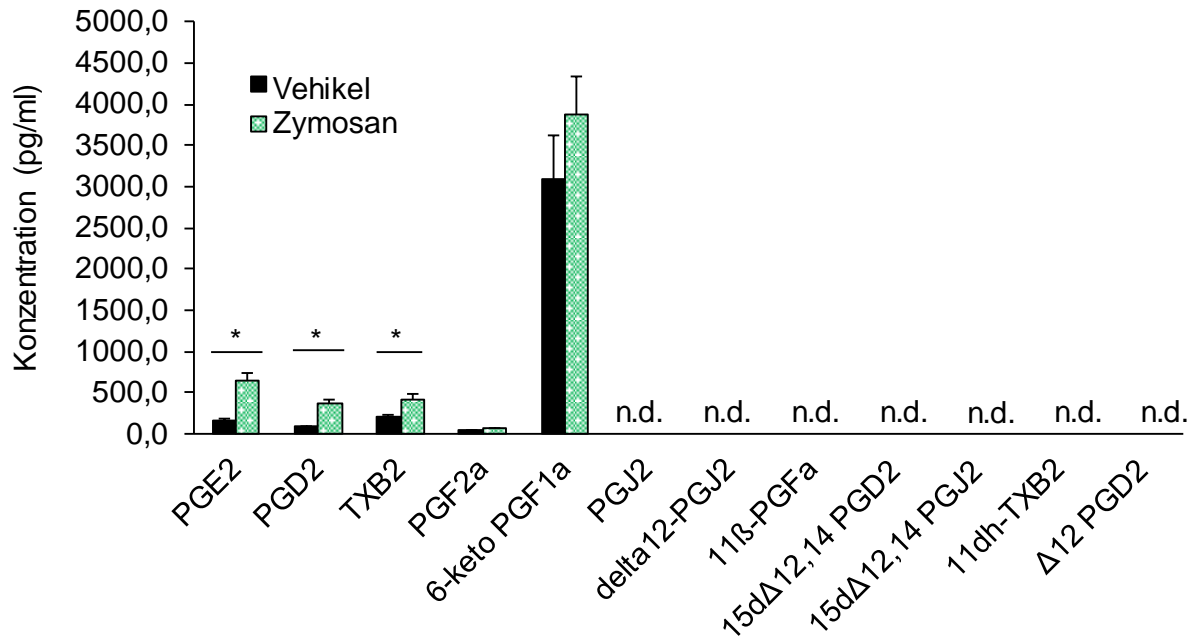


Abbildung 36: Prostaglandinkonzentration in der peritonealen Lavage nach intraperitonealer Applikation von Zymosan oder Vehikel. Es zeigt sich, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂), PGD₂ und TXB₂ in einer signifikant höheren Konzentration nach Zymosanimjektion vorliegt. Die Prostaglandinkonzentrationen wurden mittels LC-MS/MS von Dr. Dominique Thomas, Institut für Klinische Pharmakologie, Klinik der Goethe- Universität Frankfurt am Main gemessen; n. d.: nicht detektiert.

3.2.2.5 Mechanische Allodynie von sEH-KI Mäusen im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen

Eine weitere Untersuchung sollte klären, ob das durch periphere Nervenverletzung induzierte neuropathische Schmerzverhalten bei sEH-KI Mäusen verändert ist. Hierbei wurde wiederum das SNI-Modell verwendet (Decosterd and Woolf 2000). Die Verletzungs-induzierte mechanische Hyperalgesie, die anhand des Dynamic Plantar Aesthesiometer bestimmt wurde, zeigte vergleichbare Latenzzeiten bei sEH-KI- und WT-Mäusen (siehe Abbildung 37A), was darauf hindeutet, dass die redoxabhängige Modifikation von sEH an Cystein 521 das neuropathische Schmerzverhalten durch periphere Nervenverletzungen nicht beeinflusst.

Eine Untersuchung des Schmerzverhaltens von sEH-KI anhand des Brush-Tests zeigte ebenfalls kein verändertes Schmerzverhalten bei sEH-KI Mäusen (siehe Abbildung 37B).

Ergebnisse

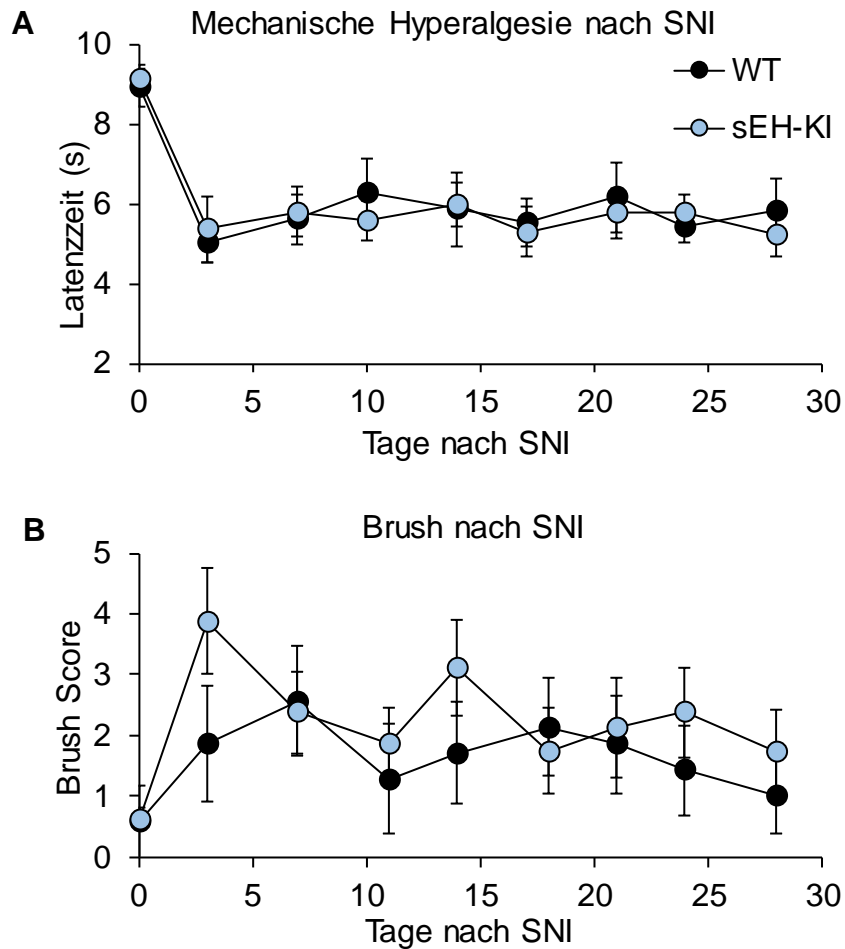


Abbildung 37: Neuropathisches Schmerzverhalten von sEH-KI-Mäusen im SNI-Modell. Zeitverlauf der Latenzzeiten nach mechanischer Pfoten-Stimulation durch einen Dynamic Plantar Asthesiometer (A) oder einen Pinsel (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 8$.

3.2.2.6 15d-PGJ₂-Pfoteninjektion

15d-PGJ₂ ist ein endogener Ligand von Cystein 521 des sEH Enzyms. Es wurde untersucht, inwiefern sich eine Pfoteninjektion von 15d-PGJ₂ auf das Leckverhalten von sEH-KI und deren wildtypischen Wurfgeschwistern auswirkt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine intraplantare Injektion von 15d-PGJ₂ zu einem verstärkten Pfotenlecken von Mäusen führt und eine Quantifizierung des Schmerzverhaltens ermöglicht. Es zeigte sich, dass das Pfotenleckverhalten der sEH-KI und WT Mäuse nach einer Injektion von 15d-PGJ₂ in einem Zeitraum von fünf Minuten vergleichbar war. Eine intraplantare Injektion des Vehikels (Olivenöl) verursachte ebenfalls ein Pfotenlecken, das jedoch geringer ausgeprägt und bei sEH-KI und WT-Mäusen vergleichbar war (Abbildung 38).

Ergebnisse

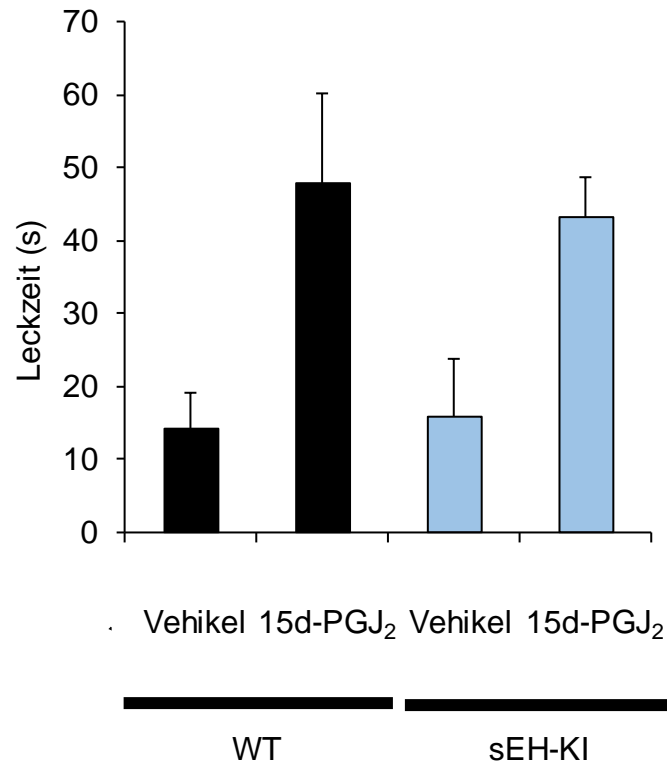


Abbildung 38: Schmerzverhalten von sEH-KI Mäusen nach intraplantarer Injektion von 15d-PGJ₂. Die wildtypischen Mäuse (links) zeigen ein verstärktes Leckverhalten nach einer Injektion von 15d-PGJ₂ in die linke Hinterpfote, verglichen mit einer Injektion des Vehikels Olivenöl. Die Reaktionen der sEH-KI Mäuse (rechts) sind mit den Reaktionen der WT Mäuse vergleichbar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 5-6.

3.2.3 Fazit

Die Untersuchung des Schmerzverhaltens von sEH-KI Mäusen in verschiedenen Schmerzmodellen zeigte keine Unterschiede zu dem Schmerzverhalten von Wildtyp Mäusen. Weder das akute nozizeptive, das inflammatorische, noch neuropathische Schmerzverhalten ist durch eine Modifikation von sEH an Cystein 521 verändert. Somit scheint diese redox-basierte Modulation der sEH-Aktivität im schmerzverarbeitenden System – anders als im kardiovaskulären System – keine Rolle zu spielen.

4 Diskussion

Das Bestreben der Schmerzforschung ist es, periphere und zentrale Sensibilisierungsprozesse innerhalb des nozizeptiven Systems aufzuklären, um mögliche neue Targets zu identifizieren, die eine zuverlässigere Wirkung garantieren und über eine bessere Verträglichkeit als die aktuell verwendeten Therapeutika verfügen. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden das Calcium-bindende Protein S100A4 und das Enzym soluble Epoxidhydrolase (sEH) als potentielle neue Redoxtargets untersucht.

Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise Superoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) innerhalb des nozizeptiven Systems generiert werden und an Sensibilisierungsprozessen beteiligt sind (Salvemini et al. 2011, Little et al. 2012, Kallenborn-Gerhardt et al. 2013). In diesem Zusammenhang stellen insbesondere die NADPH Oxidasen eine wichtige ROS Quelle dar. Bisher wurden allerdings nur wenige Nox-abhängige Targets identifiziert. Anhand von Proteomscreen-Daten wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit das Nox4-abhängig regulierte Protein S100A4 identifiziert, welches stark nach peripherer Nervenverletzung hochreguliert wird. Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene konnten die Proteom Daten untermauern – auch hier zeigte sich eine sehr starke Regulation des Proteins nach peripherer Nervenverletzung. Anhand von *in vivo* Modellen konnte weiterhin eine Funktion von S100A4 bei neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden. In Bezug auf die starke Regulation dieses Proteins ist der Effekt jedoch schwächer als erwartet. S100A4 scheint demnach nur eine untergeordnete Rolle bei neuropathischen Schmerzen zu spielen.

Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) metabolisiert Epoxyfettsäuren (EETs) innerhalb des nozizeptiven Systems. Da jene Epoxyfettsäuren antientzündliche und analgetische Eigenschaften aufweisen, führt eine sEH-Hemmung zu Entzündungs- und Schmerzreduktion in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen. (Inceoglu et al. 2006, Schmelzer et al. 2006, Brenneis et al. 2011, Inceoglu et al. 2011, Inceoglu et al. 2012, Harris and Hammock 2013, Wagner et al. 2014, Wagner et al. 2017, Blocher et al. 2018). Die sEH enthält einen redoxsensitiven Thiolrest an der Position 521, welcher durch elektrophile Lipide moduliert wird. Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass eine Hemmung der Enzymfunktion durch einen Knockin an jener

Position des Enzyms zu einer Reduktion des Blutdrucks bei Mäusen führte (Charles et al. 2011, Charles et al. 2014). Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Relevanz jenes redoxsensitiven Thiolrests der sEH bezüglich einer Funktion innerhalb des nozizeptiven Systems untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Redoxmodulation der Aminosäure Cystein an der Position 521 der sEH – anders als im kariovaskulären System - wahrscheinlich keine Funktion innerhalb des nozizeptiven Systems hat.

4.1 S100A4 als potentiell Redoxtarget innerhalb des nozizeptiven Systems

Ein potentiell ROS-Target, dessen Funktion im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht wurde, ist das EF-Hand Ca^{2+} -bindende Protein S100A4. S100A4 liegt intrazellulär als Homodimer (22 kDa) vor, welches durch nichtkovalente Interaktionen stabilisiert wird (Moore 1965) und oligomerisiert in der Anwesenheit von Calcium und/oder unter nicht reduzierenden Bedingungen (Novitskaya et al. 2000, Boye and Maelandsmo 2010, Boye et al. 2010). Diese durch Calciumbindung ausgelöste Konformationsänderung führt zu der Freilegung einer hydrophoben Bindetasche und einer damit verbundenen gesteigerten Bindungsaffinität zu anderen Proteinen, wie beispielsweise Annexin A2, p53 und Myosin IIa (Pathuri et al. 2008). S100A4 enthält vier strukturell interessante Cysteinreste – einen in der Nähe des N-Terminus (Cys3) und drei in der Helix H4 (Cys76, Cys81 und Cys86). Bei einer Calciumbindung verändern sich die Positionen der Cysteine 76 und 81 nur wenig. Eine dramatische Positionsänderung erfährt hingegen der Cysteinrest Cys86.

Während dieser ohne Calcium nicht zugänglich vorliegt, ist er in der Calciumgebundenen Form zugänglich und kann unter oxidativen Bedingungen an der Bindung zu anderen (S100A4) Dimeren und unter reduzierenden Bedingungen auch an der Bildung zu anderen Proteinpartnern beteiligt sein (Pathuri et al. 2008). Wie S100A4 enthalten die meisten der S100 Proteine ein oder mehrere Cysteinreste, die in der Lage sind unter oxidativen Bedingungen Disulfidbrücken zu bilden (Rety et al. 1999). S100B und S100A10 können durch Disulfidbrückenbildung Dimere bilden (Barger et al. 1992, Rety et al. 1999). Während man bei einigen S100 Proteinen bereits einige Targets identifizieren konnte, sind die Targets von S100A4 wenig gut erforscht. Bei S100B und S100A10 konnte man bereits den RAGE Rezeptor (receptor for advanced glycation end products) identifizieren (Hofmann et al. 1999). Von S100A4 ist bekannt,

Diskussion

dass es intrazellulär an verschiedene Targetproteine bindet, die an dem dynamischen Aufbau des Zytoskeletts und der Zellteilung beteiligt sind (Boye and Maelandsmo 2010, Forst et al. 2010). Zudem kann S100A4 sezerniert werden und extrazellulär weitere regulatorische Funktionen innerhalb der Angiogenese (Ambartsumian et al. 2001), der Zellmigration, sowie der Kardiomyozytendifferenzierung und -hypertrophie vermitteln (Schneider et al. 2007). Die Targets, über die jene genannten Effekte vermittelt werden, sind jedoch nicht näher bekannt. Insgesamt konnten viele Studien bereits zeigen, dass S100A4 eine wichtige Funktion innerhalb des Zellzyklus, der Angiogenese und bei verschiedenen Krebsformen zukommt, die Funktion von S100A4 im nozizeptiven System wurde hingegen kaum untersucht.

Studien von Dmytriyeva et al. (2012) an menschlichen Gehirnbiospien nach Gehirnverletzungen und weitere Studien an Mäusen nach TBI (traumatic brain injury) konnten zeigen, dass S100A4 neuroprotektiv innerhalb des zentralen Nervensystems wirkt (Cabezon et al. 2007). Interessanterweise wurde hier beobachtet, dass S100A4 bereits zwei Stunden nach einer Gabe von H₂O₂ in dem extrazellulären Medium nachweisbar war und innerhalb von 24 Stunden verstärkt induziert wurde, wobei sich zudem auch die Zellzahl erhöhte. Anhand von zwei Modellen für Gehirnverletzungen konnte auch gezeigt werden, dass extrazelluläres S100A4 die Toxizität von H₂O₂ und Kainsäure (kainic acid, KA) reduzieren konnte (Dmytriyeva et al. 2012). Diese protektive Funktion konnte weiterhin in Versuchen an S100A4 Knockout Mäusen bestätigt werden. Innerhalb des TBI Modells (einem Modell, in dem eine kortikale Läsion induziert wird) zeigten S100A4 Knockout Mäuse ein 70% stärkeres Zellsterben (Apoptose) als die Kontrolltiere (Dmytriyeva et al. 2012). Da sich die Funktionen von S100A4 und dessen Homologen zum Teil bezüglich der Targetaffinität unterscheiden, verglich man diejenigen Familienmitglieder (S100B, S100A4 und S100A12) untereinander, die ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzen, sich jedoch hinsichtlich ihrer Bindung zu RAGE (S100B und S100A12 binden RAGE) unterscheiden. Auf diese Weise konnte man einen Teil der Proteinstruktur von S100A4 identifizieren, der wahrscheinlich an der Targetbindung und der neurotrophischen Funktion von S100A4 beteiligt ist.

Auch die Peptidmimetika H3 und H6, die eine ähnliche Funktion wie S100A4 besitzen, bewirkten ein verstärktes Neuritenwachstum. Die Peptidmimetika konnten zudem *in vitro* ein ähnliches Protein Signalling wie S100A4 zeigen - eine Interaktion mit Akt, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1) und CREB (cAMP response element-

Diskussion

bindung). Weiterhin wirkten sie neuroprotektiv bei oxidativem Stress und KA-induzierter Zytotoxizität. Eine Hemmung des ERK1/2 Signalwegs führte zu einer Reduktion des Überlebens-Effekts der S100A4-Analoga und eine Inhibierung von Akt zu einem Verlust dieser Wirkung.

Die Tatsache, dass S100A4 Mimetika zudem in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ermöglichte weitere Untersuchungen von S100A4 bei Gehirnverletzungen von Mäusen. Hier konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Peptidmimetika neben jener beobachteten neuroprotektiven Funktion auch auf der unbehandelten Seite zu einer Hochregulation von S100A4 führen, was auf eine autokrine Regulation von S100A4 hindeutet. Einerseits wird diese neuroprotektive Funktion wahrscheinlich über eine Hochregulation der neuroprotektiven Proteine Metallothionein I und II hervorgerufen und andererseits über den IL-10 Rezeptor, welcher intrazellulär Signale über den JAK/STAT Signalweg vermittelt (Dmytriyeva et al. 2012). In der Folge kommt es zu einer Hochregulierung verschiedener antioxidativer Enzyme und neuroprotektiver Gene in neuronalen Zellen (Dziennis and Alkayed 2008, Sarafian et al. 2010). Mindestens 12 der über 20 verschiedenen S100 Proteine werden innerhalb einer neuronalen Verletzung und im Rahmen neuronaler Plastizität innerhalb des Nervensystems hochreguliert (Zimmer et al. 2005, Shepherd et al. 2006, Lisachev et al. 2010), wobei auch S100B und S100A10 insbesondere mit einer zentralen Verletzung des Gehirns in Zusammenhang stehen (Donato et al. 2009, Alexander et al. 2010). Moldovan u. a. (Moldovan et al. 2013) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass H3 (Helix 3) mimetische Peptide von S100A4 die zeitliche Regeneration nach peripherer Nervenverletzung von myelinisierten Neuronen verkürzte, ohne das finale Outcome zu verändern.

Wie bereits beschrieben ist S100A4, insbesondere innerhalb des Zellzyklusgeschehen, bei Angiogenese und bei verschiedenen Krebserkrankungen, funktionell beteiligt. Da eine S100A4 Überexpression bei Krebs insbesondere mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, wird es hier sogar als prognostischer Marker verwendet (Helfman et al. 2005). Verschiedene Studien sprechen aufgrund der starken Expression nach Verletzungsreaktionen dafür, dass S100A4 eine Funktion innerhalb des nozizeptiven Systems zukommen könnte. In dieser Forschungsarbeit wurde gezeigt, dass S100A4 basal im nozizeptiven System exprimiert wird. Hierbei wurden die Spinalganglien, der Ischiasnerv und das Rückenmark untersucht. In den Spinalganglien wird S100A4 in den Peripherin- und NF200-positiven Neuronen

Diskussion

exprimiert. Peripherin ist ein Marker für nicht-myelinisierte C-Fasern und dünnmyelinisierte A δ -Fasern, NF200 ein Marker für myelinisierte A β -Fasern. Im Ischiasnerv wird S100A4 zusätzlich auch in Makrophagen und Endothelzellen exprimiert. S100A4 ist innerhalb des nozizeptiven Systems demnach in neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen lokalisiert.

Eine nähere Betrachtung der Hochregulation von S100A4 nach SNI lässt vermuten, dass S100A4 von DRG Neuronen und Neuronen des *N. ischiadicus* sezerniert wird, da das Expressionsmuster nach SNI stark verändert ist. Während S100A4 basal mit den genannten Markern kolokalisiert ist, kommt es nach SNI zu einer stark verminderten Kolokalisation. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen ist eine extrazelluläre Lokalisation nach SNI sehr wahrscheinlich, da S100A4 nur sehr schwach in den Zellkörpern exprimiert wird und diese eher zu umgeben scheint. Ob S100A4 jedoch innerhalb des nozizeptiven Systems eine ähnliche neuroprotektive Funktion wie innerhalb anderer Bereiche des Nervensystems zukommt, lässt sich nicht abschließend sagen. Die Hochregulation von S100A4 hält mehrere Wochen nach der SNI Operation an. Dies könnte unter anderem an regulatorischen Funktionen von S100A4 innerhalb des Zellzyklus liegen oder daran, dass es durch die Verletzungen von Blutgefäßen im Rahmen der Angiogenese zu Gefäßneubildungen kommt. Ob S100A4 weitere neuroprotektive und analgetische Funktionen innerhalb des nozizeptiven Systems und bei peripherer Nervenverletzung zukommt ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Wie bereits beschrieben kann die Expression von S100A4 ROS-abhängig gesteigert werden. Möglicherweise kommt es zudem zu ROS vermittelten redoxabhängigen Konformationsänderungen von S100A4, was zu einer Änderung von intra- und intermolekularen Bindungsaffinitäten führt. S100A4 liegt in verschiedenen Bindungsformen vor. Während es intrazellulär insbesondere als Homodimer vorliegt, kann es milieuhabhängig (u. a. extrazellulär) auch in Form von Dimeren, Heterodimeren und Oligomeren vorliegen (Pathuri et al. 2008). Studien konnten hier bereits zeigen, dass S100A4 Zink-abhängig Heterodimere mit S100A9 bilden kann (Bjork et al. 2013). Eine mögliche Interaktion könnte daher auch mit S100A8 und S100A9 bestehen, deren Funktion innerhalb des nozizeptiven Systems schon beschrieben wurde (Chernov et al. 2015). In Form eines Heterodimers aus S100A8/S100A9 (auch als Calprotectin bezeichnet) vermag dieser Komplex eine Chemotaxis auszulösen (Lackmann et al. 1993), an zytoskeletaler Reorganisation mitzuwirken (Vogl u. a., 2004), eine Funktion

Diskussion

innerhalb des Calcium Signalling einzunehmen (Hobbs et al. 2003) und die Zytokinexpression zu beeinflussen (Simard et al. 2013). Die Tatsache, dass S100A8 und S100A9 auch (wie S100A4) an den Tagen 2-14 nach einer Nervenverletzung stark hochreguliert werden, lässt die Vermutung zu, dass es gegebenenfalls auch hier zu Interaktionen mit und Wirkbeeinflussungen von S100A4 kommen könnte (Brockes et al. 1979, Fernandez-Valle et al. 1995, Myers et al. 2006, Thacker et al. 2007). Interessant sind auch die Forschungsarbeiten von Khan et al. (2019) die zeigen, dass S100A4 potentiell auch mit S100A1 Komplexe bilden kann, die wiederum die Wirkung von S100A1 auf die RAGE V Domäne blockieren können, was von therapeutischem Interesse bei Krebs und Entzündungserkrankungen sein könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von S100A4 zuerst in Modellen für akute Schmerzen untersucht. Dafür wurden gewebsspezifische S100A4 Knockout Mäuse (Adv-S100A4^{-/-}) und globale Knockout Mäuse (S100A4^{-/-}) verwendet. Die Untersuchung des akuten Schmerzverhaltens erfolgte mit Hilfe des Hot Plate Tests bei Temperaturen von 50°C, 52°C und 54°C und des Cold Plate Tests bei 2°C. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen. In Bezug auf eine mögliche therapeutische Bedeutung von S100A4 ist dies positiv zu werten, da eine Beeinträchtigung des physiologischen Schmerzverhaltens, dem wichtige protektive Eigenschaften zukommen, nicht vorliegt. Weiterhin wurde das neuropathische Schmerzverhalten von Adv-S100A4^{-/-} untersucht. Die gewebsspezifischen S100A4 Knockout Mäuse zeigten kein verändertes Schmerzverhalten in Modellen für neuropathische Schmerzen. Daraufhin wurde eine globale S100A4 Knockout Linie (S100A4^{-/-}) generiert. Die S100A4^{-/-} Tiere zeigten ein signifikant reduziertes neuropathisches Schmerzverhalten im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen (WT), welche als Kontrolltiere verwendet wurden. Insgesamt kann man daher schlussfolgern, dass S100A4 eine Funktion bei neuropathischen Schmerzen zukommt.

Diskussion

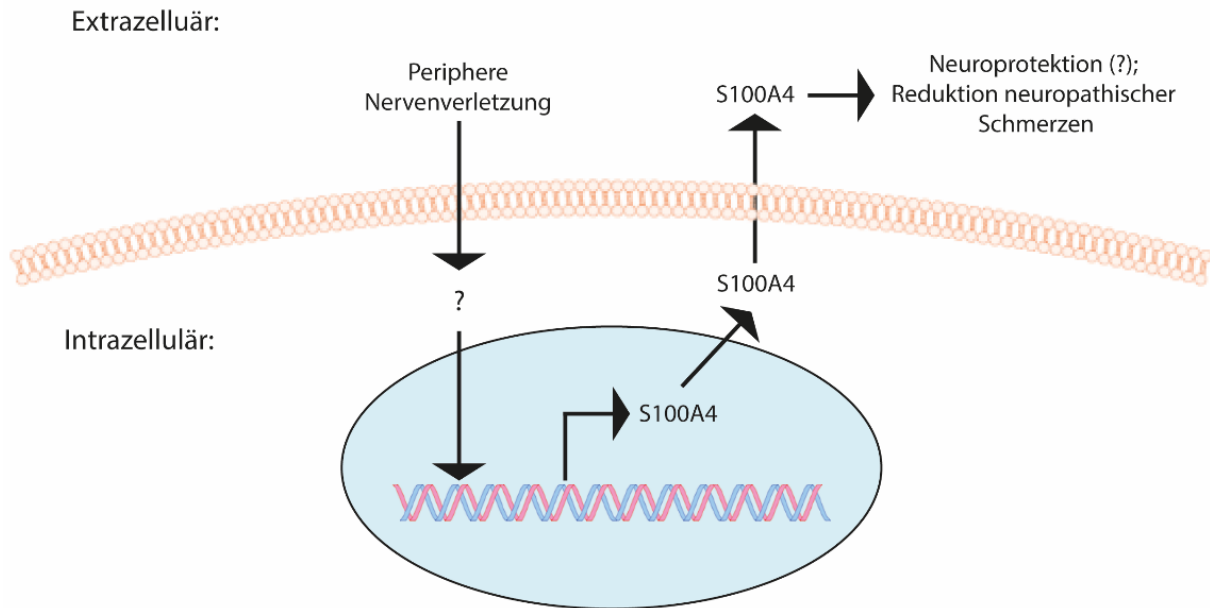


Abbildung 39: Postulierter Mechanismus der S100A4 Hochregulation und Funktion nach peripherer Nervenverletzung. S100A4 wird nach peripherer Nervenverletzung sehr stark exprimiert. Ein bisher unbekannter Stimulus führt zu einer starken Genexpression von S100A4, welches vorerst intrazellulär, jedoch nach der peripheren Nervenverletzung auch verstärkt extrazellulär vorliegt. Durch eine Bindung an bisher unbekannte Targets könnte es zu einer gesteigerten Neuroprotektion und einem verminderten neuropathischen Schmerzverhalten kommen.

Da der Gruppenunterschied allerdings nur gering ausgeprägt war, scheint diese Rolle eher von untergeordneter Bedeutung zu sein. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass es einerseits möglich ist, dass ein S100A4 Knockout eine kompensatorische Regulation eines anderen Proteins induzieren könnte. Etwas unwahrscheinlicher, jedoch nicht auszuschließen, ist die Möglichkeit, dass zudem zirkadiane Rhythmen die Funktion von S100A4 beeinflussen. Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass Bmal1, welches maßgeblich an der Regulation der circadianen Rhythmik beteiligt ist, zusammen mit Smad3, einem zirkadian regulierten Protein, an der Regulation der Expression von p21 und S100A4 in myokardialen stromalen Fibroblasten beteiligt ist (Sato et al. 2017). Zur weiteren Untersuchung des Schmerz-Phänotyps der CMV-S100A4^{-/-}-Mäuse wurde das Crush Injury Modell verwendet. Dieses Modell zählt wie das SNI Modell zu den neuropathischen Schmerzmodellen. Der Nerv wird in diesem Modell zwar ebenfalls verletzt, jedoch nur komprimiert und nicht zertrennt. Daher ist die zelluläre Versorgung nicht unterbrochen und es kommt - im Gegensatz zum SNI-Modell - zu neuronaler und funktionaler (Teil-)Regeneration. Die S100A4^{-/-} Mäuse zeigten jedoch weder in der degenerativen Phase, noch in der regenerativen Phase nach der Operation

Auffälligkeiten in ihrem Schmerzverhalten. Zur Quantifizierung des Schmerzverhaltens wurde das dynamische Plantar Aesthesiometer verwendet, um eine mechanische Hyperalgesie zu untersuchen. Weiterhin wurde das Dynamic Weight Bearing System verwendet, um schmerzbedingte Gewichtsverlagerungen zu messen. Hier wurde sowohl die Verlagerung auf die Kontrollpfote (Vermeidung der operierten Pfote) als auch die Gewichtsverlagerung auf die Vorderpfoten ausgewertet. Auch hier zeigte sich bei den S100A4^{-/-} Tieren keine stärkere oder schwächere Vermeidungsreaktion als bei den Kontrolltieren. Zudem wurde die funktionelle Regenerationskapazität der S100A4^{-/-} Mäuse anhand des Sciatic functional index (SFI) untersucht. Bei diesem Modell zeigte sich insbesondere innerhalb der ersten drei Wochen kein Unterschied in der funktionellen Regeneration von S100A4^{-/-} Mäusen, danach (Tag 25) jedoch eine tendenzielle Verschlechterung der Regeneration, was für eine progenerative Funktion von S100A4 spricht. Auch hier ist der Effekt jedoch ebenfalls nicht sehr stark ausgeprägt und wahrscheinlich eher von untergeordneter Bedeutung. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass bereits progenerative Effekte innerhalb des zentralen Nervensystems beschrieben wurden. Es ist hier fraglich, ob dieser Effekt durch ein schmerzrelevantes neuronales S100A4 Target hervorgerufen wird oder ggf. durch die Funktionen von S100A4 in der Angiogenese hervorgerufen wird. Insgesamt zeigte sich demnach nur eine untergeordnete Funktion von S100A4 im nozizeptiven System bei neuropathischen Schmerzen.

4.2 Die sEH als mögliches Redoxtarget im nozizeptiven System

Ein weiteres potentiell Redoxtarget im nozizeptiven System ist das Enzym sEH (sEH; soluble epoxide hydrolase). Die lösliche Epoxidhydrolase stellt ein wichtiges regulatorisches Enzym der Arachidonsäure-Kaskade dar. Die sEH enthält – wie S100A4 - redox-sensitive Cysteinreste, deren Modifikationen zu Änderungen des Aktivitätszustandes führen können (Brenneis et al. 2011, Harris and Hammock 2013). Es ist daher möglich, die Funktion der sEH redoxabhängig zu modulieren. Insbesondere elektrophile Oxidantien wie 15d-PGJ₂ oder OA-NO₂, die an das redox-sensitive Cystein 521 binden, können die Enzymaktivität hemmen (Charles et al. 2011). In Versuchen mit Mäusen, deren redox-sensitives Cystein 521 durch ein Serin ersetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 15d-PGJ₂ durch Bindung an Cystein 521 *in vivo* zu einer Vasodilatation führt. Daher scheint insbesondere die Aminosäure Cys521 im kardiovaskulären System bezüglich der

Diskussion

Modulation der enzymatischen Funktion von sEH eine Rolle zu spielen. Die regulatorische Funktion dieser Aminosäure wurde bisher nicht innerhalb des nozizeptiven Systems untersucht. Daher lag die Frage nahe, ob es durch eine redoxabhängige Hemmung der sEH Funktion auch innerhalb des nozizeptiven Systems zu einer veränderten Schmerzreaktion in *in-vivo* Versuchen kommt.

Eine Behandlung mit sEH-Inhibitoren führte bei Ratten zu einer reduzierten Hypersensitivität in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen (Inceoglu et al. 2006, Inceoglu et al. 2012, Wagner et al. 2017). Auch bei Pferden konnte eine Schmerzreduktion durch die Gabe eines sEH Inhibitors erreicht werden (Guedes et al. 2013, Guedes et al. 2017). Während die Wirkung von sEH-Inhibitoren im nozizeptiven System bereits untersucht wurde, wurde die redoxabhängige Modulation der sEH im nozizeptiven System in vorherigen Forschungsarbeiten kaum untersucht. Die sEH gehört zur Enzymfamilie der Epoxidhydrolasen und wandelt Epoxide unter Wasserbildung in die korrespondierenden Diole um. Innerhalb des nozizeptiven Systems scheint insbesondere die Verstoffwechselung der Arachidonsäure von Bedeutung zu sein. Arachidonsäure wird durch CYP-Enzyme in EETs umgewandelt. EETs können schmerzrelevante Ionenkanäle modulieren und haben sowohl den Gefäßtonus beeinflussende als auch antientzündliche analgetische Eigenschaften. Sie binden an intrazelluläre Targets oder fungieren als auto- oder parakrine Mediatoren und aktivieren den PPAR γ oder cAMP/PKA Signalweg (Spector 2009). Interessant ist auch die Interaktion mit dem peripheren CB₂ Rezeptor, der auch auf Immunzellen exprimiert wird, welcher die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren herunter zu regulieren vermag und dadurch eine Wirkung auf die Sensibilisierung von Nozizeptoren besitzt (Malan et al. 2001). EETs modulieren verschiedene Ionenkanäle (TRP channel isoforms, Ca²⁺ aktivierte Kaliumkanäle (BK(Ca)) und L-Typ Calciumkanäle (CA_v)), was bei entzündlichen Prozessen und chronischen Schmerzen eine Rolle spielen könnte (Spector and Norris 2007). EETs können zudem TRPV₄ Kanäle aktivieren und eine Membraninsertion von TRPV₄- und TRPV₆ Kanälen induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von *in vivo*-Versuchen mit sEH-KI Mäusen gezeigt werden, dass es durch einen Knockin der Aminosäure Serin an der Position 521 des sEH Enzyms zu keiner Beeinträchtigung in den motorischen Funktionen oder Auffälligkeiten innerhalb des akuten Schmerzverhaltens von Mäusen kommt. In inflammatorischen Schmerzmodellen wie dem Formalin Test und der Zyosan-

induzierten Pfotenentzündung konnte kein Zusammenhang der Redoxmodifikation mit dem Schmerzverhalten der Mäuse gezeigt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die redoxabhängige Modifikation der sEH das viszerale Schmerzgeschehen beeinflusst. Das Schmerzverhalten wurde hier mit der Dynamic Weight Bearing Apparatur aufgenommen und manuell ausgewertet. In diesem Modell zeigten beide Gruppen eine ähnliche Verlagerung des Gewichts auf die Vorderpfoten, was impliziert, dass es keinen Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den sEH-Knockin Mäusen gibt. Auch in neuropathischen Schmerzmodellen, bei denen der Ischiasnerv im Rahmen des SNI Modells durchtrennt und legiert wurde, konnte über einen Zeitverlauf von 28 Tagen kein verändertes Schmerzverhalten der sEH-Knockin-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die Messmethode zu wenig sensitiv ist, wurde das Schmerzverhalten weiterhin anhand des Brush-Modells untersucht. Allerdings zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich der beiden Gruppen (sEH-KI vs. WT). Es liegt daher nahe, dass die Redoxmodulation des Cys521 eine untergeordnete Rolle innerhalb des Schmerzgeschehens spielt. Eine mögliche Erklärung wäre die Lokalisation von sEH in Zellen des nozizeptiven Systems, in denen wenig elektrophile Oxidantien wie 15d-PGJ₂ oder OA-NO₂ gebildet werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Ersatz der Aminosäure Cys521 demnach zwar eine Funktionsveränderung innerhalb des kardiovaskulären Systems zur Folge zu haben scheint, nicht jedoch innerhalb des nozizeptiven Systems.

4.3 Weitere Redox-modifizierte Proteine als potentielle Targets in der Schmerztherapie

ROS (O₂⁻, H₂O₂) werden - wie bereits beschrieben - im nozizeptiven System generiert und spielen bei Sensibilisierungsprozessen eine Rolle (Salvemini et al. 2011, Little et al. 2012, Kallenborn-Gerhardt et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die NADPH-abhängige ROS Produktion thematisiert. Es gibt jedoch viele weitere potentielle Redoxtargets innerhalb des nozizeptiven Systems, wobei auf einige wichtige im Folgenden näher eingegangen wird.

Oxidative Veränderungen können auf Proteinebene zu strukturellen und funktionellen Änderungen führen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die funktionelle Änderung von Rezeptorproteinen, die als Schmerztargets bekannt sind. Hier sind Proteine von TRP Ionenkanälen, NMDA-Rezeptoren und T-Typ-

Diskussion

Calciumionenkanälen zu nennen, die ROS-abhängige strukturelle und/oder funktionelle Änderungen zeigen (Kozai et al. 2014, Evans et al. 2016). Heute sind neun Isoformen von Transient Receptor Potential (TRP)-Kanälen bekannt (TRPA1, TRPC5, TRPM2, TRPM4, TRPM7, TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4), die durch oxidativen Stress aktiviert werden (Mori et al. 2016). Vier dieser Kanäle (TRPA1, TRPM2, TRPV1 und TRPV4) werden insbesondere stark in Neuronen exprimiert, die in nozizeptive Prozesse involviert sind. TRPA1 Kanäle werden durch verschiedene Stimuli (z. B. Senföl, Zimtaldehyd und Körpertemperaturen $\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$) aktiviert. Zudem handelt es sich bei TRPA1 um einen redox-sensitiven Ca^{2+} -Kanal. In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der Kanal durch H_2O_2 aktiviert wird, was zu einem intrazellulären Ca^{2+} Influx führt (Bai and Lipski 2010, Materazzi et al. 2012, Toda et al. 2016). Hohe intrazelluläre ROS- und Ca^{2+} -Spiegel können einen wesentlichen Anteil zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerzprozessen darstellen (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012, Ogawa et al. 2016). Bei dem TRPM2-Rezeptor handelt es sich um einen Rezeptor mit Enzymfunktion, der C-terminal eine Pyrophosphatase (ADP Ribose) enthält, welche sensitiv auf ROS und RNS (reactive nitrogen species) reagiert (Naziroglu 2007). TRPM2-Rezeptoren werden in nozizeptiven sensorischen Neuronen exprimiert (Naziroglu 2011), wobei hier insbesondere die ROS Produktion durch NADPH-Oxidasen zu einer Sensibilisierung der Kanäle führt und ein chronisches Schmerzgeschehen induzieren kann (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012). Eine Unterfamilie der TRP Superfamilie ist die Vanilliod Familie. TRPV1 ist ein Mitglied dieser Unterfamilie und zeichnet sich durch eine Aktivierung bei hohen Temperaturen und durch Capsaicin (einer Komponente des Chili) aus (Caterina et al. 1997). Der Kanal kann zusätzlich durch einen niedrigen pH ($< 5,9$), eine Temperatur $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ und oxidativen Stress aktiviert werden (Yoshida et al. 2006). Bei dem TRPV1-Kanal handelt es sich ebenfalls um einen Kationenkanal, dessen Struktur über mehrere Cystein-Reste verfügt.

ROS-Moleküle können demnach nicht nur als sekundäre Messenger fungieren, sondern nehmen - neben NO und anderen Gasotransmittern - eine potente Rolle als Modulatoren von Ionenkanälen ein (Wang 2012). Neben anderen Ionenkanälen können K^+ -Kanäle (M-Kanäle, K^+_{ATP} Kanäle, BK-Kanäle und A-Typ- K^+ -Kanäle) durch ROS moduliert werden. Insbesondere der Subfamilie KCNQ (auch Kv7 oder M-Kanäle genannt) von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen kommt eine besondere Rolle bei der Reiz- bzw. Schmerzübertragung zu. M-Kanäle werden in schmerzrelevanten Geweben

Diskussion

exprimiert (Devaux et al. 2004, Roza et al. 2004, Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2006, King and Scherer 2012, Passmore et al. 2012, Zheng et al. 2013). Studien konnten zeigen, dass vier der fünf M-Kanal Untereinheiten über reaktive Cysteinreste (S2-S3 Linker) verfügen, welche in physiologisch relevanten Konzentrationen durch H_2O_2 oxidiert werden können (Gamper et al. 2006, Linley et al. 2012). Eine Oxidation führt dabei zu einer nennenswerten Verstärkung der M-Kanal-Aktivität (Li et al. 2004). Die Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanäle (Slo1, BK und Maxi K) werden ebenfalls in sensorischen Neuronen verschiedener Größe exprimiert. Die Hauptfunktionen dieser Kanäle bestehen in einer Verkürzung von Aktionspotentialen, der Beschleunigung einer Hyperpolarisation und einer schnelleren Repolarisation (Scholz et al. 1998, Li et al. 2007). BK Kanalproteine enthalten viele Cysteinreste, welche oxidativen Modulationen unterliegen und dadurch oxidativ in ihrer Funktion beeinflusst werden können (Kemp and Peers 2007, Sahoo et al. 2014). ATP sensitive K^+ Kanäle (K^+_{ATP}) sind heterotrimere Kanäle, welche aus den Untereinheiten KIR6.1 und KIR6.2, sowie den regulatorischen Sulfonylharnstoff Untereinheiten SUR1 und SUR2, bestehen (Hibino et al. 2010). Die Kanäle fungieren insofern als metabolische Sensoren, dass sie durch intrazelluläres ATP gehemmt werden und durch cytosolisches ATP aktiviert werden (Yamada and Inagaki 2005). K^+_{ATP} Kanäle werden in Subpopulationen von sensorischen Neuronen unterschiedlicher Größe exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass K^+_{ATP} Induktoren (Diazoxid und Pinacidil) zu einer Hyperpolarisation von nozizeptiven Neuronen führen, was zu einer Hemmung von Bradykinin-induziertem Schmerz führt (Du et al. 2011). Die genauen Mechanismen der ROS-induzierten Sensitivierung von K^+_{ATP} Kanälen ist bisher nicht geklärt, jedoch konnte eine Schmerzreduktion mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber von ATP in Verbindung gebracht werden (Ichinari et al. 1996).

Auch Ca^{2+} -Kanäle können durch oxidative Modifikationen in ihrer Funktion beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang sind im Schmerzgeschehen insbesondere T-Typ Calcium-Kanäle zu nennen. Sie werden in verschiedenen Subpopulationen von Neuronen exprimiert (Jevtovic-Todorovic and Todorovic 2006, Coste et al. 2007, Rose et al. 2013). In sensorischen Neuronen wird insbesondere der Subtyp Cav3.2 exprimiert (Talley et al. 2001, Shin et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in nozizeptiven Neuronen durch reduzierende Agentien wie DTT oder L-Cystein die Aktionspotentiale verstärkt werden konnten, wohingegen es zu einer Hemmung durch oxidierende Agentien wie 5-5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) kommt. In

Diskussion

Tierversuchen induzierte eine plantare Injektion von Dithiothreitol (DTT) oder L-Cystein in die Hinterpfote von Ratten eine thermale und mechanische Hyperalgesie (Todorovic et al. 2001). Dieser Effekt konnte durch die Gabe des T-Typ Inhibitors Mibefradil aufgehoben werden und es konnte gezeigt werden, dass eine periphere DTNB-Injektion anti-nozizeptiv wirkt (Todorovic et al. 2001).

Eine weitere interessante Therapieoption ist ein Eingriff in das Redoxsystem durch die Gabe von Antioxidantien. Versuche mit Antioxidantien (z. B. α -Phenyl-Nt-Butylnitron, Vitamin E oder kombiniertes Vitamin C und E) konnten zeigen, dass es durch eine Normalisierung des Redoxhaushaltes und ein Abfangen von ROS zu einem weniger ausgeprägten Schmerzverhalten in neuropathischen und inflammatorischen Schmerzmodellen kommt (Kim et al. 2004, Mao et al. 2009, Lu et al. 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von α -Phenyl-Nt-Butylnitron (PBN) im Rahmen eines neuropathischen Schmerzmodells (Spinal Nerve Ligation, SNL) einer Abnahme von inhibitorischen GABA Neuronen im Rückenmark entgegenwirkt, was zu einem reduzierten Schmerzverhalten bei Mäusen führt (Yowtak et al. 2013). Weiterhin ist eine Gabe von N-Acetylcystein (NAC) in Kombination mit Pregabalin der alleinigen Gabe von Pregabalin bei der schmerzhaften diabetischen Neuropathie (Painful diabetic neuropathy, PDN) überlegen. Unter der oralen Therapie mit NAC kam es zudem kaum zu Nebenwirkungen und es zeigte sich eine allgemein gute Verträglichkeit (Heidari et al. 2019).

Neben der Gabe von Antioxidantien spielt auch die Beeinflussung von endogenen ROS-Quellen (Mitochondrien, NAPH Oxidasen u. a.) und potentiellen endogenen ROS-Targets eine Rolle. Hier sind beispielsweise synthetische mitochondriale ROS (mtROS) Scavenger und Nox-Inhibitoren zu nennen. Obwohl sich gezeigt hat, dass die Gabe von natürlichen Antioxidantien auch mitochondriale ROS-Level erniedrigt, besteht ein Nachteil in der geringen mitochondrialen Anreicherung und in dem Unvermögen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Gilgun-Sherki et al. 2001). Daher wurde der Versuch unternommen, Substanzen zu entwickeln, die biologische Membranen und die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Murphy and Smith 2007). Eine der entwickelten Substanzen ist MitoVit-E, bei der Vitamin E kovalent an ein Triphenylphosphonium Kation gebunden ist. MitoVit-E konnte zu einer ROS Reduktion in aortalen Endothelzellen führen, zeigte jedoch keine Wirkung bei hypoxisch induziertem Schlaganfall bei neonatalen Ratten (Smith et al. 1999). Ein weiterer mtROS Scavenger ist MitoQ10, welcher aus einem lipophilen

Diskussion

Triphenylphosphonium Kation besteht das kovalent über einen aliphatischen Linker an ein Ubiquinon Derivat gebunden ist (Kelso et al. 2001). Bemerkenswert bei MitoQ10 ist, dass MitoQ10 nach der Detoxifizierung von ROS über die Atmungskette regeneriert wird. In Versuchen an Nagern konnte gezeigt werden, dass MitoQ10 mitochondriale oxidative Schäden in Modellen von kardialer Ischämie und in Reperfuisionsmodellen reduziert. Eine weitere vielversprechende Substanz ist SkQ1, die ebenfalls als mtROS Scavenger fungiert (Skulachev 2007, Antonenko et al. 2008).

Neben mtROS Scavengern ist die Entwicklung von selektiven, potenten und effizienten Nox-Inhibitoren eine weitere Herausforderung. Die ersten Vertreter von Nox-Inhibitoren wurden innerhalb eines Screenings für Nox2 Inhibitoren entdeckt. Dabei handelt es sich um die Triazol Pyrimidinderivate VAS2870 (ten Freyhaus et al. 2006) und VAS3947 (Wind et al. 2010). Allerdings konnte bei diesen Substanzen keine Nox Spezifität belegt werden, weshalb sie auch als *pan*-Nox Inhibitoren bezeichnet werden. Eine weitere Gruppe potentieller Nox2-Inhibitoren sind Komponenten mit einer Pyrazolpyrimidinstruktur (Seno 2006). Jedoch konnte auch hier keine selektive Hemmung nachgewiesen werden. Eine weitere Gruppe von Nox2-Inhibitoren sind Ebselen und dessen Analoga. Diese Substanzgruppe hemmt kompetitiv die p47^{phox} und p22^{phox} Untereinheiten. Jene Inhibitoren sind zwar primär potente Nox2-Inhibitoren, jedoch in ihrer Wirkung nicht selektiv und hemmen - allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß - auch die NADPH-Oxidasen Nox1, Nox4 und Nox5 (Smith et al. 2012). Weiterhin konnten Forschungsarbeiten zeigen, dass der Opioidrezeptorantagonist Naloxon durch eine Hemmung der Translokation von p47^{phox} in die Plasmamembran eine ROS Generierung hemmt (Wang et al. 2012). Anhand eines High-Throughput Screenings (HTS) wurden duale Nox1/4 Inhibitoren identifiziert (Laleu et al. 2010, Gaggini et al. 2011). Unter diesen Komponenten sind die Pyrazolpyrimidine GKT136901 und GKT137831 zu nennen, welche die ersten oral aktiven dualen Nox1- und Nox4-Inhibitoren darstellen (Aoyama et al. 2012, Jiang et al. 2012). Diese GKT Substanzen sind bezüglich der Untersuchung von Nebenwirkungen, des pharmakokinetischen Profils und der Bioverfügbarkeit, die aktuell am besten charakterisierten Nox-Inhibitoren und befinden sich derzeit in klinischen Studien (Laleu et al. 2010, Aoyama et al. 2012). Während eine Hemmung von Nox1/4 mit GKT137831 zu einer reduzierten Entzündungsreaktion innerhalb von ischämischen Retinopathie-Modellen in Ratten führte (Deliyanti and Wilkinson-Berka 2015), konnte jedoch in neuropathischen Schmerzmodellen (hier

Diskussion

CCI-Modell) bei Mäusen keine Schmerzreduktion nach der Gabe des Nox1/4-Inhibitors festgestellt werden (Geis et al. 2017). Es wurde diskutiert, dass die fehlende Schmerzreduktion wahrscheinlich mit einer sehr frühen Wirkung von Nox4 direkt nach der Verletzung (innerhalb der Operation) in Verbindung steht, sodass die Gabe eines Inhibitors nach der CCI-Operation keine analgetische Wirkung besitzt. Es ist jedoch auch zu beachten, dass sich die Modelle stark unterscheiden und jeweils unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors gegeben wurden. Weiterhin konnten Fulven und dessen Derivate als potente und effiziente Nox2 und Nox4 Inhibitoren identifiziert werden (Perry et al. 2006). Anhand von *in-vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Fulven-5 Nox2 und Nox4 hemmt und in *in-vivo* Versuchen das Tumorwachstum von Endothelzelltumoren hemmt (Bhandarkar et al. 2009). Allerdings muss die Spezifität in zukünftigen Kontrolleexperimenten noch belegt werden.

Modulatorische Eingriffe in das endogene Redoxsystem sind Bestandteil vieler aktueller Forschungsarbeiten und stellen ein relevantes Forschungsfeld für die Untersuchung von Krankheiten dar. Bei vielen der genannten Substanzen und Derivate liegt bisher eine mangelnde Spezifität für die jeweiligen Enzyme und Proteine vor, sodass auch weiterhin ein Bedarf an der Erforschung des Redoxsystems besteht, mit dem Ziel der Etablierung von zuverlässigen Therapieoptionen.

5 Zusammenfassung

Während hohe Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) in Form von oxidativem Stress schädliche Auswirkungen auf den Körper haben können, zeigen aktuelle Forschungsarbeiten, dass Redox-Modifikationen an Thiolresten von Proteinen reversible Signalprozesse steuern können. Dieses Prinzip der posttranslationalen Proteinmodifikation durch Redox-Signale scheint auch bei der Verarbeitung und Chronifizierung von Schmerzen von Bedeutung zu sein. Über die potenziellen Redox-modulierten Zielstrukturen im nozizeptiven System ist jedoch bisher nur wenig bekannt.

Ein potentielles Redoxziel im nozizeptiven System ist das kleine EF-Hand Ca^{2+} -bindende Protein S100A4. Wie die anderen Familienmitglieder der S100-Proteinfamilie enthält S100A4 Cysteinreste, die in der Lage sind, redoxabhängig modifiziert zu werden. Studien an menschlichen Biopsien nach Gehirnverletzungen und an Mäusen in Verletzungsmodellen konnten zeigen, dass S100A4 neuroprotektiv wirkt. Darüber hinaus kann S100A4 sezerniert werden und vermittelt extrazellulär insbesondere regulatorische Funktionen innerhalb der Angiogenese, bei der Zellmigration sowie bei zellulären Differenzierungsprozessen. Die Funktionen von S100A4 im nozizeptiven System sind jedoch weitgehend unbekannt. In Vorarbeiten zu diesem Projekt wurde in einem Proteom-Screen beobachtet, dass S100A4 nach einer peripheren Nervenverletzung redoxabhängig im verletzten Nervengewebe hochreguliert wird. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation von S100A4 innerhalb des nozizeptiven Systems sowie die funktionelle Bedeutung nach peripherer Nervenverletzung genauer untersucht.

Anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen konnte gezeigt werden, dass S100A4 basal in Subpopulationen Peripherin- und NF200-positiver sensorischer Neurone lokalisiert ist. Interessanterweise führt eine Nervenverletzung nicht nur zu einer deutlichen Steigerung der S100A4-Expression im Bereich der Verletzungsstelle, sondern auch zu einer Änderung des neuronalen Verteilungsmusters. Die funktionelle Bedeutung von S100A4 für die Verarbeitung von Schmerzen wurde anhand von Verhaltenstests an Mäusen näher charakterisiert. Dafür wurden gewebsspezifische S100A4 Knockout Mäuse (Adv-S100A4^{-/-}) und globale S100A4 Knockout Mäuse (S100A4^{-/-}) generiert. In Modellen der akuten Nozizeption zeigten sowohl Adv-S100A4^{-/-} als auch S100A4^{-/-} Mäuse eine normale Reaktion auf thermische und mechanische Stimuli. Im „Spared

Zusammenfassung

Nerve Injury“ (SNI) Modell für periphere Neuropathien zeigten die S100A4^{-/-} Mäuse eine im Vergleich zu wildtypischen (WT) Mäusen signifikant reduzierte mechanische Hyperalgesie, während bei den gewebsspezifischen Adv-S100A4^{-/-} Mäusen kein verändertes Schmerzverhalten beobachtet werden konnte. Im „Crush Injury“ Modell für periphere Neuropathien war die mechanische Hyperalgesie der S100A4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Tieren jedoch nicht verändert. Zusätzlich zur mechanischen Hyperalgesie wurden auch weitere Methoden der Quantifizierung des Schmerzverhaltens (Sciatic Functional Index, Brush Test und Wühlverhalten) etabliert. Allerdings war auch hier das Verhalten der S100A4^{-/-} Mäuse mit dem der WT Mäuse vergleichbar. Darüber hinaus war das durch Applikation eines ROS-Donors induzierte nozizeptive Verhalten von S100A4^{-/-} und WT Mäusen ähnlich. Man kann daher schlussfolgern, dass nach einer peripheren Nervenverletzung die S100A4-Expression insbesondere im Bereich der Verletzungsstelle hochreguliert wird. Dem gegenüber scheint S100A4 jedoch für die Schmerzverarbeitung funktionell nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Ein weiteres potentielles Redoxtarget im nozizeptiven System ist die lösliche Epoxidhydrolase (soluble epoxide hydrolase, sEH). Die funktionelle Bedeutung von sEH für die Schmerzverarbeitung wurde bereits in früheren Studien belegt, da eine Behandlung mit sEH-Inhibitoren bei Ratten zu einer reduzierten Hypersensitivität in inflammatorischen und neuropathischen Schmerzmodellen führte. Während die analgetische Wirkung von sEH-Inhibitoren bereits gut bekannt ist, wurde eine redoxabhängige Modulation der sEH-Aktivität im nozizeptiven System in bisherigen Forschungsarbeiten kaum untersucht. Bestimmte Elektrophile können die sEH inhibieren, indem sie an das redoxaktive Cystein an Position 521 der sEH binden. Forschungsarbeiten konnten in diesem Zusammenhang bereits zeigen, dass die Cys521-vermittelte Inhibition von sEH durch das Prostaglandin 15d-PGJ₂ oder 9-/10-Nitrooleonsäure (NO₂-OA) im kardiovaskulären System zu einer Dilatation der Koronargefäße und einer Reduktion des Blutdrucks führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob es durch eine redoxabhängige Hemmung der sEH-Funktion auch innerhalb des nozizeptiven Systems zu einer veränderten Schmerzreaktion bei Mäusen kommt. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden sEH-Knockin (sEH-KI) Mäuse verwendet, deren redox-sensitives Cystein 521 durch ein Serin ersetzt wurde. Bei diesen Knockin-Mäusen können Elektrophile wie 15d-PGJ₂ oder 9-/10-NO₂-OA keine Enzyminhibition erzeugen. Die Charakterisierung der sEH-

Zusammenfassung

KI Mäuse zeigte sowohl in akuten als auch inflammatorischen Schmerzmodellen (Formalin Test und Zymosan-Pfotenentzündungsmodell) keinen Zusammenhang der Redoxmodifikation mit dem Schmerzverhalten der Mäuse. Auch in neuropathischen und viszeralen Schmerzmodellen (SNI-Modell und Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis) konnte kein verändertes Schmerzverhalten der sEH-KI-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Darüber hinaus war das nozizpetive Verhalten nach Applikation von 15d-PGJ₂ bei sEH-KI und WT Mäusen vergleichbar. Die redoxabhängige Modulation der sEH an Cystein 521 scheint demnach, im Gegensatz zum kardiovaskulären System, im nozizeptiven System keine Rolle zu spielen.

6 Abkürzungsverzeichnis

15d-PGJ2	15-Deoxy- Δ -Prostaglandin J ₂
ad	Auf
AF488	Alexa Fluor 488
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	‚brain-derived neurotrophic factor‘
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca²⁺	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CI	‚Crush injury‘
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	‚calcitonin gene-related peptide‘
Cl⁻	Chloridion
CO₂	Kohlendioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
Cre	‚cyclization recombination‘
CREB	‚cAMP response element-binding protein‘
C_T	‚Cycle Threshold‘
Cys521	Cystein 521
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

Abkürzungsverzeichnis

dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DRGs	,dorsal root ganglia‘ (Spinalganglien)
DWB	Dynamic Weight Bearing
EET	,epoxyeicosatrienoic acids‘
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	,extracellular signal-regulated‘ Kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
fwd	forward
g	Gramm
G6PD	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSH	Glutathion
h	Stunde
H⁺	Proton, Wasserstoffatom
H₂O	<i>Aqua purificata</i>
H₂O₂	Wasserstoff-Peroxid
HCl	Salzsäure
HO[•]	Hydroxyl-Radikal
HOCl	Hypochlorsäure
HRP	,horseradish peroxidase‘ (Meerrettich-Peroxidase)
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
IASP	International Association for the Study of Pain
IB4	Isolectin B4
IL	Interleukin
IP₃	Inositoltriphosphat
IκB	Inhibitor of κ B
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
K⁺	Kaliumion

Abkürzungsverzeichnis

KA	,kainic acid', Kainsäure
kb	Kilobase
KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ -Ko-Transporter
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KI	,knockin'
l	Liter
L4	Lumbalsegmet 4
L5	Lumalsegment 5
LiCl	Lithiumchlorid
loxP	'locus of crossing over of bacteriophage P1'
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesiumion
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mGlu-Rezeptor	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPZ	,Myelin Protein Zero'
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
n.d.	nicht detektiert
Na⁺	Natriumion
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogencarbonat
NAC	N-Acetyl-Cystein
NaCl	physiologische Kochsalzlösung (0,9%)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid

Abkürzungsverzeichnis

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDS	Normal donkey serum
NeuN	Neuronal Nuclei
NF200	Neurofilament 200
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher-Farbstoff
NF-κB	„Nuclear factor κB“
NGF	„nerve growth factor“
NGS	Normal goat serum (Ziegenserum)
NK-1	Neurokinin-1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NO₂-OA	„10-nitro-oleic acid“
Nox	NADPH-Oxidase
NOXA1	Nox Activator 1
NOXO1	Nox Organizer 1
Nrf2	NF-E2-related Faktor 2
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika (non steroidal anti inflammatory drug)
NSAR	nicht-steriodale Antirheumatika
O₂	molekularer Sauerstoff
O₂⁻	Superoxid-Radikal
ONNO⁻	Peroxynitrit
PBN	Phenyl- <i>N-tert</i> -butyl-nitron
PBS	„Phosphat buffered saline“ (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	Potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Protein Kinase A/ cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Protein Kinase C

Abkürzungsverzeichnis

PKG	Protein Kinase G/ cGMP-abhängige Proteinkinase
R	Rezeptor
rev	reverse
RM	Rückenmark
RNA	‚ribonucleic acid‘ (Ribonukleinsäure)
RO•	Alkoxy-Radikal
ROO•	Peroxy-Radikal
ROS	‚reactive oxygen species‘ (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	‚round per minute‘ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
S100A4	S100 Calcium bindendes Protein A4
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
sEH	soluble epoxide hydrolase
s	Sekunde
SEM	‚standard error of the mean‘ (Standardfehler des Mittelwerts)
SNI	Spared nerve injury
SNL	Spinal nerve ligation
SOD	Superoxid-Dismutase
SPSS	‚Statistical Product and Service Solution‘
SubP	Substanz P
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBI	Traumatic brain injury
t-BOOH	<i>tert</i> -buty-Hydroperoxid
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
TGF-β	‚Transforming growth factor β‘
Tks5	Tyrosin Kinase Substrat mit fünf Src Homologen Domänen
TLR4	Toll-like receptor 4

Abkürzungsverzeichnis

TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TR	Thioredoxin-Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkB Rezeptor	Tyrosinkinase B-Rezeptor
tRNA	transfer-RNA
TRP-Kanal	„Transient Receptor Potential“-Kanal
Trx	Thioredoxin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V	Volt
VE-H₂O	vollentsalztes Wasser
VGS-Kanal	„Voltage-gated Sodium“-Kanal
VSMC	vaskulären glatten Muskelzellen
WDR	„wide-dynamic-range“
WT	Wildtyp
Z	Zielgen
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
° C	Grad Celsius
μm	Mikrometer

7 Literaturverzeichnis

- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P and Lomri A (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74(4): 324-329.
- Albisetti GW, Pagani M, Platonova E, Hosli L, Johannssen HC, Fritschy JM, Wildner H and Zeilhofer HU (2019). Dorsal Horn Gastrin-Releasing Peptide Expressing Neurons Transmit Spinal Itch But Not Pain Signals. *J Neurosci* 39(12): 2238-2250.
- Alexander B, Warner-Schmidt J, Eriksson T, Tamminga C, Arango-Lievano M, Ghose S, Vernov M, Stavarache M, Musatov S, Flajolet M, Svenningsson P, Greengard P and Kaplitt MG (2010). Reversal of depressed behaviors in mice by p11 gene therapy in the nucleus accumbens. *Sci Transl Med* 2(54): 54ra76.
- Alexandre C, Latremoliere A, Ferreira A, Miracca G, Yamamoto M, Scammell TE and Woolf CJ (2017). Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. *Nat Med* 23(6): 768-774.
- Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y and Lukanidin E (2001). The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20(34): 4685-4695.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S and Bevan S (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28(10): 2485-2494.
- Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, Pheby T, Huang W, Burgess G, Machin I and Rice AS (2012). Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain* 16(4): 485-495.
- Antonenko YN, Roginsky VA, Pashkovskaya AA, Rokitskaya TI, Kotova EA, Zaspaa AA, Chernyak BV and Skulachev VP (2008). Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. *J Membr Biol* 222(3): 141-149.
- Anzai K, Ogawa K, Goto Y, Senzaki Y, Ozawa T and Yamamoto H (1999). Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid Redox Signal* 1(3): 339-347.
- Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, Molango S, Heitz F, Merlot C, Szyndralewicz C, Page P and Brenner DA (2012). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology* 56(6): 2316-2327.
- Apel K and Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD and Zubieta JK (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9(4): 463-484.
- Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD and Christianson DW (1999). Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10637-10642.
- Bachi A, Dalle-Donne I and Scaloni A (2013). Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chem Rev* 113(1): 596-698.
- Bai JZ and Lipski J (2010). Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology* 31(2): 204-214.
- Bain JR, Mackinnon SE and Hunter DA (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83(1): 129-138.
- Banfi B, Clark RA, Steger K and Krause KH (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 278(6): 3510-3513.

Literaturverzeichnis

- Baptista AF, Gomes JR, Oliveira JT, Santos SM, Vannier-Santos MA and Martinez AM (2007). A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse - adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Methods* 161(2): 259-264.
- Barger SW, Wolchok SR and Van Eldik LJ (1992). Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1160(1): 105-112.
- Baron R, Maier C, Attal N, Binder A, Bouhassira D, Cruccu G, Finnerup NB, Haanpaa M, Hansson P, Hulleman P, Jensen TS, Freynhagen R, Kennedy JD, Magerl W, Mainka T, Reimer M, Rice AS, Segerdahl M, Serra J, Sindrup S, Sommer C, Tolle T, Vollert J and Treede RD (2017). Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *Pain* 158(2): 261-272.
- Barracough R and Rudland PS (1994). The S-100-related calcium-binding protein, p9Ka, and metastasis in rodent and human mammary cells. *Eur J Cancer* 30A(10): 1570-1576.
- Barry AM, Sondermann JR, Sondermann JH, Gomez-Varela D and Schmidt M (2018). Region-Resolved Quantitative Proteome Profiling Reveals Molecular Dynamics Associated With Chronic Pain in the PNS and Spinal Cord. *Front Mol Neurosci* 11: 259.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G and Julius D (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139(2): 267-284.
- Basbaum AI and Jessel TM (2000). The perception of pain.
- Beckel JM and de Groat WC (2018). The effect of the electrophilic fatty acid nitro-oleic acid on TRP channel function in sensory neurons. *Nitric Oxide*.
- Bedard K and Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1): 245-313.
- Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB and Priestley JV (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(8): 3059-3072.
- Bern M, Saladino J and Sharp JS (2010). Conversion of methionine into homocysteic acid in heavily oxidized proteomics samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24(6): 768-772.
- Bhandarkar SS, Jaconi M, Fried LE, Bonner MY, Lefkove B, Govindarajan B, Perry BN, Parhar R, Mackelfresh J, Sohn A, Stouffs M, Knaus U, Yancopoulos G, Reiss Y, Benest AV, Augustin HG and Arbiser JL (2009). Fulvene-5 potently inhibits NADPH oxidase 4 and blocks the growth of endothelial tumors in mice. *J Clin Invest* 119(8): 2359-2365.
- Bienert GP, Schjoerring JK and Jahn TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758(8): 994-1003.
- Bjork P, Kallberg E, Wellmar U, Riva M, Olsson A, He Z, Torngren M, Liberg D, Ivars F and Leanderson T (2013). Common interactions between S100A4 and S100A9 defined by a novel chemical probe. *PLoS One* 8(5): e63012.
- Blocher R, Wagner KM, Gopireddy RR, Harris TR, Wu H, Barnych B, Hwang SH, Xiang YK, Proschak E, Morisseau C and Hammock BD (2018). Orally Available Soluble Epoxide Hydrolase/Phosphodiesterase 4 Dual Inhibitor Treats Inflammatory Pain. *J Med Chem* 61(8): 3541-3550.
- Bobe J and Goetz FW (2000). A S100 homologue mRNA isolated by differential display PCR is down-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) post-ovulatory ovary. *Gene* 257(2): 187-194.
- Boronat S, Garcia-Santamarina S and Hidalgo E (2015). Gel-free proteomic methodologies to study reversible cysteine oxidation and irreversible protein carbonyl formation. *Free Radic Res* 49(5): 494-510.
- Borsook D, Hargreaves R, Bountra C and Porreca F (2014). Lost but making progress-- Where will new analgesic drugs come from? *Sci Transl Med* 6(249): 249sr243.
- Boye K and Maelandsmo GM (2010). S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol* 176(2): 528-535.
- Boye K, Nesland JM, Sandstad B, Maelandsmo GM and Flatmark K (2010). Nuclear S100A4 is a novel prognostic marker in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 46(16): 2919-2925.
- 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.

Literaturverzeichnis

- Bratic A and Larsson NG (2013). The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123(3): 951-957.
- Braz J, Solorzano C, Wang X and Basbaum AI (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82(3): 522-536.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R and Gallacher D (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10(4): 287-333.
- Brenneis C, Sisignano M, Coste O, Altenrath K, Fischer MJ, Angioni C, Fleming I, Brandes RP, Reeh PW, Woolf CJ, Geisslinger G and Scholich K (2011). Soluble epoxide hydrolase limits mechanical hyperalgesia during inflammation. *Mol Pain* 7: 78.
- Brockes JP, Fields KL and Raff MC (1979). Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 165(1): 105-118.
- Butterfield DA and Dalle-Donne I (2014). Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom Rev* 33(1): 1-6.
- Cabezón T, Celis JE, Skibshøj I, Klingelhofer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Maelandsmo GM, Lukanidin E and Ambartsumian N (2007). Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* 121(7): 1433-1444.
- Carlton JM and Goldberg N (1986). Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg. Forum* 37: 611.
- Carlton JMaG, N. (1986). "Quantitating integrated muscle function following reinnervation."
- Carrasco C, Naziroglu M, Rodriguez AB and Pariente JA (2018). Neuropathic Pain: Delving into the Oxidative Origin and the Possible Implication of Transient Receptor Potential Channels. *Front Physiol* 9: 95.
- Casas AI, Dao VT, Daiber A, Maghzal GJ, Di Lisa F, Kaludercic N, Leach S, Cuadrado A, Jaquet V, Seredenina T, Krause KH, Lopez MG, Stocker R, Ghezzi P and Schmidt HH (2015). Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal* 23(14): 1171-1185.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653): 816-824.
- Charles RL, Burgoyne JR, Mayr M, Weldon SM, Hubner N, Dong H, Morisseau C, Hammock BD, Landar A and Eaton P (2011). Redox regulation of soluble epoxide hydrolase by 15-deoxy-delta-prostaglandin J2 controls coronary hypoxic vasodilation. *Circ Res* 108(3): 324-334.
- Charles RL, Rudyk O, Pryszyzhna O, Kamynina A, Yang J, Morisseau C, Hammock BD, Freeman BA and Eaton P (2014). Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(22): 8167-8172.
- Cheng L, Duan B, Huang T, Zhang Y, Chen Y, Britz O, Garcia-Campmany L, Ren X, Vong L, Lowell BB, Goulding M, Wang Y and Ma Q (2017). Identification of spinal circuits involved in touch-evoked dynamic mechanical pain. *Nat Neurosci* 20(6): 804-814.
- Chernov AV, Dolkas J, Hoang K, Angert M, Srikrishna G, Vogl T, Baranovskaya S, Strongin AY and Shubayev VI (2015). The calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 initiate the early inflammatory program in injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 290(18): 11771-11784.
- Chiamvimonvat N, Ho CM, Tsai HJ and Hammock BD (2007). The soluble epoxide hydrolase as a pharmaceutical target for hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 50(3): 225-237.
- Cho KJ, Seo JM and Kim JH (2011). Bioactive lipoxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Mol Cells* 32(1): 1-5.
- Chuang HH and Lin S (2009). Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(47): 20097-20102.
- Chung RS, Hidalgo J and West AK (2008). New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J Neurochem* 104(1): 14-20.

Literaturverzeichnis

- Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K and Woolf CJ (2012). Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain* 153(4): 876-884.
- Coderre TJ, Vaccarino AL and Melzack R (1990). Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535(1): 155-158.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH and Raja SN (2017). Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17002.
- Coste B, Crest M and Delmas P (2007). Pharmacological dissection and distribution of Na^v1.9, T-type Ca²⁺ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. *J Gen Physiol* 129(1): 57-77.
- Costigan M, Scholz J and Woolf CJ (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32: 1-32.
- Cowie AM, Moehring F, O'Hara C and Stucky CL (2018). Optogenetic Inhibition of CGRPalpha Sensory Neurons Reveals Their Distinct Roles in Neuropathic and Incisional Pain. *J Neurosci* 38(25): 5807-5825.
- 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 and Woods CG (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444(7121): 894-898.
- Cronin A, Mowbray S, Durk H, Homburg S, Fleming I, Fisslthaler B, Oesch F and Arand M (2003). The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1552-1557.
- Cuello F and Eaton P (2019). Cysteine-Based Redox Sensing and Its Role in Signaling by Cyclic Nucleotide-Dependent Kinases in the Cardiovascular System. *Annu Rev Physiol* 81: 63-87.
- de Medinaceli L, Freed WJ and Wyatt RJ (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77(3): 634-643.
- Deacon R (2012). Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp*(59): e2607.
- Decosterd I and Woolf CJ (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87(2): 149-158.
- Deliyanti D and Wilkinson-Berka JL (2015). Inhibition of NOX1/4 with GKT137831: a potential novel treatment to attenuate neuroglial cell inflammation in the retina. *J Neuroinflammation* 12: 136.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC and Scherer SS (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24(5): 1236-1244.
- Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M and Courtneidge SA (2009). Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal* 2(88): ra53.
- Diebold BA and Bokoch GM (2001). Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2(3): 211-215.
- Dmytriyeva O, Pankratova S, Owczarek S, Sonn K, Soroka V, Ridley CM, Marsolais A, Lopez-Hoyos M, Ambartsumian N, Lukanidin E, Bock E, Berezin V and Kiryushko D (2012). The metastasis-promoting S100A4 protein confers neuroprotection in brain injury. *Nat Commun* 3: 1197.
- Doherty NS, Poubelle P, Borgeat P, Beaver TH, Westrich GL and Schrader NL (1985). Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 30(5): 769-789.
- Donato R (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33(7): 637-668.
- Donato R (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60(6): 540-551.

Literaturverzeichnis

- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C and Giambanco I (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793(6): 1008-1022.
- Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI and Anderson DJ (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106(5): 619-632.
- Drohat AC, Baldisseri DM, Rustandi RR and Weber DJ (1998). Solution structure of calcium-bound rat S100B(beta-beta) as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 37(9): 2729-2740.
- Du X, Wang C and Zhang H (2011). Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. *Mol Pain* 7: 35.
- Dubuisson D and Dennis SG (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4(2): 161-174.
- Dziennis S and Alkayed NJ (2008). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 19(4-5): 341-361.
- Eddy NB and Leimbach D (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107(3): 385-393.
- Edwards RR, Dworkin RH, Turk DC, Angst MS, Dionne R, Freeman R, Hansson P, Haroutounian S, Arendt-Nielsen L, Attal N, Baron R, Brell J, Bujanover S, Burke LB, Carr D, Chappell AS, Cowan P, Etropolski M, Fillingim RB, Gewandter JS, Katz NP, Kopecky EA, Markman JD, Nomikos G, Porter L, Rappaport BA, Rice AS, Scavone JM, Scholz J, Simon LS, Smith SM, Tobias J, Tockarshewsky T, Veasley C, Versavel M, Wasan AD, Wen W and Yarnitsky D (2016). Patient phenotyping in clinical trials of chronic pain treatments: IMMPACT recommendations. *Pain* 157(9): 1851-1871.
- Emberley ED, Murphy LC and Watson PH (2004). S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol* 82(4): 508-515.
- Evans JG and Todorovic SM (2015). Redox and trace metal regulation of ion channels in the pain pathway. *Biochem J* 470(3): 275-280.
- Evans MJ, Choi WG, Gilroy S and Morris RJ (2016). A ROS-Assisted Calcium Wave Dependent on the AtRBOHD NADPH Oxidase and TPC1 Cation Channel Propagates the Systemic Response to Salt Stress. *Plant Physiol* 171(3): 1771-1784.
- Fernandez-Valle C, Bunge RP and Bunge MB (1995). Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 24(9): 667-679.
- Finnerup NB and Attal N (2015). Tapentadol prolonged release in the treatment of neuropathic pain related to diabetic polyneuropathy--authors' reply. *Lancet Neurol* 14(7): 685-686.
- Finnerup NB and Attal N (2016). Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? *Pain Manag* 6(1): 1-3.
- Fornage M, Lee CR, Doris PA, Bray MS, Heiss G, Zeldin DC and Boerwinkle E (2005). The soluble epoxide hydrolase gene harbors sequence variation associated with susceptibility to and protection from incident ischemic stroke. *Hum Mol Genet* 14(19): 2829-2837.
- Forst B, Hansen MT, Klingelhofer J, Moller HD, Nielsen GH, Grum-Schwensen B, Ambartsumian N, Lukanidin E and Grigorian M (2010). Metastasis-inducing S100A4 and RANTES cooperate in promoting tumor progression in mice. *PLoS One* 5(4): e10374.
- Freyenhagen R, Parada HA, Calderon-Ospina CA, Chen J, Rakhmawati Emril D, Fernandez-Villacorta FJ, Franco H, Ho KY, Lara-Solares A, Li CC, Mimenza Alvarado A, Nimmaanrat S, Dolma Santos M and Ciampi de Andrade D (2019). Current understanding of the mixed pain concept: a brief narrative review. *Curr Med Res Opin* 35(6): 1011-1018.
- Fuller SJ, Sivarajah K and Sugden PH (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 44(5): 831-854.
- Gaggini F, Laleu B, Orchard M, Fioraso-Cartier L, Cagnon L, Houngrinou-Molango S, Gradia A, Duboux G, Merlot C, Heitz F, Szyndralewicz C and Page P (2011). Design, synthesis

Literaturverzeichnis

- and biological activity of original pyrazolo-pyrido-diazepine, -pyrazine and -oxazine dione derivatives as novel dual Nox4/Nox1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19(23): 6989-6999.
- Gamper N, Zaika O, Li Y, Martin P, Hernandez CC, Perez MR, Wang AY, Jaffe DB and Shapiro MS (2006). Oxidative modification of M-type K(+) channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *EMBO J* 25(20): 4996-5004.
- Gao YJ and Ji RR (2010). Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther* 126(1): 56-68.
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ and Bresnick AR (2006). S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281(2): 677-680.
- Geis C, Geuss E, Sommer C, Schmidt HH and Kleinschnitz C (2017). NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. *Exp Neurol* 288: 94-103.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P and Leto TL (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8010-8014.
- Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL and Leto TL (2003). NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol* 171(1): 299-306.
- Geiszt M, Lekstrom K, Witta J and Leto TL (2003). Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 278(22): 20006-20012.
- Gerke V and Weber K (1985). The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J* 4(11): 2917-2920.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E and Offen D (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40(8): 959-975.
- Gosselin RD, Suter MR, Ji RR and Decosterd I (2010). Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 16(5): 519-531.
- Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5): 494-501.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ and Rittinger K (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113(3): 343-355.
- Guedes A, Galuppo L, Hood D, Hwang SH, Morisseau C and Hammock BD (2017). Soluble epoxide hydrolase activity and pharmacologic inhibition in horses with chronic severe laminitis. *Equine Vet J* 49(3): 345-351.
- Guedes AG, Morisseau C, Sole A, Soares JH, Ulu A, Dong H and Hammock BD (2013). Use of a soluble epoxide hydrolase inhibitor as an adjunctive analgesic in a horse with laminitis. *Vet Anaesth Analg* 40(4): 440-448.
- Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M and Caterina M (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22(15): 6408-6414.
- Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J and Mukhtar H (2003). Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 21(1): 106-112.
- Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA and Lambeth JD (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273(27): 16663-16668.
- Harris TR and Hammock BD (2013). Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene* 526(2): 61-74.
- Heidari N, Sajedi F, Mohammadi Y, Mirjalili M and Mehrpooya M (2019). Ameliorative Effects Of N-Acetylcysteine As Adjunct Therapy On Symptoms Of Painful Diabetic Neuropathy. *J Pain Res* 12: 3147-3159.
- Heizmann CW and Cox JA (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* 11(4): 383-397.
- Heizmann CW, Fritz G and Schafer BW (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7: d1356-1368.

Literaturverzeichnis

- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E and Grigorian M (2005). The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92(11): 1955-1958.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I and Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90(1): 291-366.
- Hobbs JA, May R, Tanousis K, McNeill E, Mathies M, Gebhardt C, Henderson R, Robinson MJ and Hogg N (2003). Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. *Mol Cell Biol* 23(7): 2564-2576.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D and Schmidt AM (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97(7): 889-901.
- Hohmann AG, Farthing JN, Zvonok AM and Makriyannis A (2004). Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. *J Pharmacol Exp Ther* 308(2): 446-453.
- Holmes D (2016). The pain drain. *Nature* 535(7611): S2-3.
- Holmstrom KM and Finkel T (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(6): 411-421.
- Hooijmaijers C, Rhee JY, Kwak KJ, Chung GC, Horie T, Katsuhara M and Kang H (2012). Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 125(1): 147-153.
- Hsiao CD, Ekker M and Tsai HJ (2003). Skin-specific expression of ictacalcin, a homolog of the S100 genes, during zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn* 228(4): 745-750.
- Hunskar S, Fasmer OB and Hole K (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 14(1): 69-76.
- Hurd T and Murphy M (2009). *Biological Systems Relevant for Redox Signaling and Control.*, WILEY-VCH Verlag gmbh & Co. KgaA.
- Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T and Yabe-Nishimura C (2017). Depressive-Like Behaviors Are Regulated by NOX1/NADPH Oxidase by Redox Modification of NMDA Receptor 1. *J Neurosci* 37(15): 4200-4212.
- Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N and Yabe-Nishimura C (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci* 28(38): 9486-9494.
- Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A and Malan TP, Jr. (2003). Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10529-10533.
- Ichinari K, Kakei M, Matsuoka T, Nakashima H and Tanaka H (1996). Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cells: its potentiation by MgADP. *J Mol Cell Cardiol* 28(9): 1867-1877.
- Im YB, Jee MK, Jung JS, Choi JI, Jang JH and Kang SK (2012). miR23b ameliorates neuropathic pain in spinal cord by silencing NADPH oxidase 4. *Antioxid Redox Signal* 16(10): 1046-1060.
- Imig JD (2005). Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(3): F496-503.
- Imig JD, Carpenter MA and Shaw S (2009). The Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor AR9281 Decreases Blood Pressure, Ameliorates Renal Injury and Improves Vascular Function in Hypertension. *Pharmaceuticals (Basel)* 2(3): 217-227.
- Imig JD and Hammock BD (2009). Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 8(10): 794-805.
- Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C and Hammock BD (2002). Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension* 39(2 Pt 2): 690-694.

Literaturverzeichnis

- Imig JD, Zhao X, Zaharis CZ, Olearczyk JJ, Pollock DM, Newman JW, Kim IH, Watanabe T and Hammock BD (2005). An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 46(4): 975-981.
- Inceoglu B, Jinks SL, Schmelzer KR, Waite T, Kim IH and Hammock BD (2006). Inhibition of soluble epoxide hydrolase reduces LPS-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of inflammatory pain. *Life Sci* 79(24): 2311-2319.
- Inceoglu B, Jinks SL, Ulu A, Hegedus CM, Georgi K, Schmelzer KR, Wagner K, Jones PD, Morisseau C and Hammock BD (2008). Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48): 18901-18906.
- Inceoglu B, Schmelzer KR, Morisseau C, Jinks SL and Hammock BD (2007). Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4): 42-49.
- Inceoglu B, Wagner K, Schebb NH, Morisseau C, Jinks SL, Ulu A, Hegedus C, Rose T, Brosnan R and Hammock BD (2011). Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12): 5093-5097.
- Inceoglu B, Wagner KM, Yang J, Bettaieb A, Schebb NH, Hwang SH, Morisseau C, Haj FG and Hammock BD (2012). Acute augmentation of epoxygenated fatty acid levels rapidly reduces pain-related behavior in a rat model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28): 11390-11395.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX and Laurindo FR (2005). Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280(49): 40813-40819.
- Jensen TS and Finnerup NB (2014). Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol* 13(9): 924-935.
- Jensen TS and Finnerup NB (2014). A brief history of pain. *Lancet Neurol* 13(9): 872.
- Jevtovic-Todorovic V and Todorovic SM (2006). The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium* 40(2): 197-203.
- Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schroder K, Brandes RP, Devaraj S and Torok NJ (2012). Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med* 53(2): 289-296.
- Johannes CB, Le TK, Zhou X, Johnston JA and Dworkin RH (2010). The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J Pain* 11(11): 1230-1239.
- Julius D and Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852): 203-210.
- Kahya MC, Naziroglu M and Ovey IS (2017). Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol* 54(3): 2345-2360.
- Kallenborn-Gerhardt W, Hohmann SW, Syhr KM, Schroder K, Sisignano M, Weigert A, Lorenz JE, Lu R, Brune B, Brandes RP, Geisslinger G and Schmidtko A (2014). Nox2-dependent signaling between macrophages and sensory neurons contributes to neuropathic pain hypersensitivity. *Pain* 155(10): 2161-2170.
- Kallenborn-Gerhardt W, Moser CV, Lorenz JE, Steger M, Heidler J, Scheving R, Petersen J, Kennel L, Flauaus C, Lu R, Edinger AL, Tegeder I, Geisslinger G, Heide H, Wittig I and Schmidtko A (2017). Rab7-a novel redox target that modulates inflammatory pain processing. *Pain* 158(7): 1354-1365.
- Kallenborn-Gerhardt W, Schroder K, Del Turco D, Lu R, Kynast K, Kosowski J, Niederberger E, Shah AM, Brandes RP, Geisslinger G and Schmidtko A (2012). NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 32(30): 10136-10145.
- Kallenborn-Gerhardt W, Schroder K, Geisslinger G and Schmidtko A (2013). NOXious signaling in pain processing. *Pharmacol Ther* 137(3): 309-317.

Literaturverzeichnis

- Kawahara T, Ritsick D, Cheng G and Lambeth JD (2005). Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* 280(36): 31859-31869.
- Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA and Murphy MP (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 276(7): 4588-4596.
- Kemp PJ and Peers C (2007). Oxygen sensing by ion channels. *Essays Biochem* 43: 77-90.
- Kettenhofen NJ and Wood MJ (2010). Formation, reactivity, and detection of protein sulfenic acids. *Chem Res Toxicol* 23(11): 1633-1646.
- Khan MI, Yuan T, Chou RH and Yu C (2019). S100A4 inhibits cell proliferation by interfering with the S100A1-RAGE V domain. *PLoS One* 14(2): e0212299.
- Khodorova A, Nicol GD and Strichartz G (2013). The p75NTR signaling cascade mediates mechanical hyperalgesia induced by nerve growth factor injected into the rat hind paw. *Neuroscience* 254: 312-323.
- Kim D, You B, Jo EK, Han SK, Simon MI and Lee SJ (2010). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33): 14851-14856.
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabue G, Chung K, Coggeshall RE and Chung JM (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111(1-2): 116-124.
- Kim S, Tachikawa T, Fujitsuka M and Majima T (2014). Far-red fluorescence probe for monitoring singlet oxygen during photodynamic therapy. *J Am Chem Soc* 136(33): 11707-11715.
- Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y and Sasaki T (2000). Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 16(6): 1125-1131.
- King CH and Scherer SS (2012). Kv7.5 is the primary Kv7 subunit expressed in C-fibers. *J Comp Neurol* 520(9): 1940-1950.
- Kinuta Y (1989). [Lipid peroxidation and changes in xanthine oxidase in cerebral ischemia]. *Nihon Geka Hokan* 58(1): 59-70.
- Kinuta Y, Kimura M, Itokawa Y, Ishikawa M and Kikuchi H (1989). Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. *J Neurosurg* 71(3): 417-420.
- Kiryushko D, Novitskaya V, Soroka V, Klingelhofer J, Lukanidin E, Berezin V and Bock E (2006). Molecular mechanisms of Ca(2+) signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol Cell Biol* 26(9): 3625-3638.
- Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N and Schmidt HH (2010). Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8(9).
- Klingelhofer J, Moller HD, Sumer EU, Berg CH, Poulsen M, Kiryushko D, Soroka V, Ambartsumian N, Grigorian M and Lukanidin EM (2009). Epidermal growth factor receptor ligands as new extracellular targets for the metastasis-promoting S100A4 protein. *FEBS J* 276(20): 5936-5948.
- Ko YK, Youn AM, Hong BH, Kim YH, Shin YS, Kang PS, Yoon KJ and Lee WH (2012). Antinociceptive effect of phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, on the rat formalin test. *Korean J Anesthesiol* 62(6): 558-564.
- Kosek E, Cohen M, Baron R, Gebhart GF, Mico JA, Rice AS, Rief W and Sluka AK (2016). Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 157(7): 1382-1386.
- Kosek E, Rosen A, Carville S, Choy E, Gracely RH, Marcus H, Petzke F, Ingvar M and Jensen KB (2017). Lower Placebo Responses After Long-Term Exposure to Fibromyalgia Pain. *J Pain* 18(7): 835-843.
- Kozai D, Ogawa N and Mori Y (2014). Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal* 21(6): 971-986.

Literaturverzeichnis

- Kozak W, Kluger MJ, Kozak A, Wachulec M and Dokladny K (2000). Role of cytochrome P-450 in endogenous antipyresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2): R455-460.
- Kozlova EN and Lukanidin E (1999). Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury. *Glia* 27(3): 249-258.
- Kozlova EN and Lukanidin E (2002). Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia* 37(4): 337-348.
- Kuner R (2015). Spinal excitatory mechanisms of pathological pain. *Pain* 156 Suppl 1: S11-17.
- Kuner R and Flor H (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 18(1): 20-30.
- Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, Jones G, Cornish CJ, Hu S, Simpson RJ, Moritz RL and Geczy CL (1993). Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol* 150(7): 2981-2991.
- Laforenza U, Pellavio G, Marchetti AL, Omes C, Todaro F and Gastaldi G (2016). Aquaporin-Mediated Water and Hydrogen Peroxide Transport Is Involved in Normal Human Spermatozoa Functioning. *Int J Mol Sci* 18(1).
- Laleu B, Gaggini F, Orchard M, Fioraso-Cartier L, Cagnon L, Houngninou-Molango S, Gradia A, Duboux G, Merlot C, Heitz F, Szyndralewicz C and Page P (2010). First in class, potent, and orally bioavailable NADPH oxidase isoform 4 (Nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Chem* 53(21): 7715-7730.
- Lallemend F and Ernfors P (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* 35(6): 373-381.
- Lambeth JD (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4(3): 181-189.
- Latremoliere A and Woolf CJ (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10(9): 895-926.
- Laux-Biehlmann A, Boyken J, Dahllof H, Schmidt N, Zollner TM and Nagel J (2016). Dynamic weight bearing as a non-reflexive method for the measurement of abdominal pain in mice. *Eur J Pain* 20(5): 742-752.
- Lee KY, Chung K and Chung JM (2010). Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol* 103(1): 382-391.
- Li W, Gao SB, Lv CX, Wu Y, Guo ZH, Ding JP and Xu T (2007). Characterization of voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Cell Physiol* 212(2): 348-357.
- Li Y, Gamper N and Shapiro MS (2004). Single-channel analysis of KCNQ K⁺ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *J Neurosci* 24(22): 5079-5090.
- Li ZH, Dulyaninova NG, House RP, Almo SC and Bresnick AR (2010). S100A4 regulates macrophage chemotaxis. *Mol Biol Cell* 21(15): 2598-2610.
- Lim H, Kim D and Lee SJ (2013). Toll-like receptor 2 mediates peripheral nerve injury-induced NADPH oxidase 2 expression in spinal cord microglia. *J Biol Chem* 288(11): 7572-7579.
- Linley JE, Pettinger L, Huang D and Gamper N (2012). M channel enhancers and physiological M channel block. *J Physiol* 590(4): 793-807.
- Lisachev PD, Shtark MB, Sokolova OO, Pustyl'nyak VO, Salakhutdinova MY and Epstein OI (2010). A Comparison of the Dynamics of S100B, S100A1, and S100A6 mRNA Expression in Hippocampal CA1 Area of Rats during Long-Term Potentiation and after Low-Frequency Stimulation. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010.
- Little JW, Doyle T and Salvemini D (2012). Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids* 42(1): 75-94.
- Lorenz JE, Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Syhr KM, Eaton P, Geisslinger G and Schmidtko A (2014). Oxidant-induced activation of cGMP-dependent protein kinase I α mediates neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Antioxid Redox Signal* 21(10): 1504-1515.

Literaturverzeichnis

- Lu R, Flauaus C, Kennel L, Petersen J, Drees O, Kallenborn-Gerhardt W, Ruth P, Lukowski R and Schmidtko A (2017). KCa3.1 channels modulate the processing of noxious chemical stimuli in mice. *Neuropharmacology* 125: 386-395.
- Lu R, Kallenborn-Gerhardt W, Geisslinger G and Schmidtko A (2011). Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS One* 6(12): e29240.
- Lu R and Schmidtko A (2013). Direct intrathecal drug delivery in mice for detecting in vivo effects of cGMP on pain processing. *Methods Mol Biol* 1020: 215-221.
- Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassegue B and Griendling KK (2009). Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 105(3): 249-259.
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt B, Corey DP and Patapoutian A (2007). An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* 27(42): 11412-11415.
- Maher P and Schubert D (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 57(8-9): 1287-1305.
- Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F and Makriyannis A (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93(3): 239-245.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S and Basbaum AI (1997). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science* 278(5336): 279-283.
- Mansfield KE, Sim J, Jordan JL and Jordan KP (2016). A systematic review and meta-analysis of the prevalence of chronic widespread pain in the general population. *Pain* 157(1): 55-64.
- Mao YF, Yan N, Xu H, Sun JH, Xiong YC and Deng XM (2009). Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. *Brain Res* 1248: 68-75.
- Marenholz I, Heizmann CW and Fritz G (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322(4): 1111-1122.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC and Knaus UG (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18(1): 69-82.
- Materazzi S, Fusi C, Benemei S, Pedretti P, Patacchini R, Nilius B, Prenen J, Creminon C, Geppetti P and Nassini R (2012). TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch* 463(4): 561-569.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM and Fanger CM (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33): 13525-13530.
- Meller ST and Gebhart GF (1997). Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain* 1(1): 43-52.
- Minett MS, Nassar MA, Clark AK, Passmore G, Dickenson AH, Wang F, Malcangio M and Wood JN (2012). Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons. *Nat Commun* 3: 791.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM and Devor M (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80(1-2): 67-82.
- Moldovan M, Pinchenko V, Dmytriyeva O, Pankratova S, Fugleholm K, Klingelhofer J, Bock E, Berezin V, Krarup C and Kiryushko D (2013). Peptide mimetic of the S100A4 protein modulates peripheral nerve regeneration and attenuates the progression of neuropathy in myelin protein P0 null mice. *Mol Med* 19: 43-53.
- Molliver DC and Snider WD (1997). Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 381(4): 428-438.

Literaturverzeichnis

- Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q and Snider WD (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19(4): 849-861.
- Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M and Touyz RM (2011). Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond)* 120(4): 131-141.
- Moore BW (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19(6): 739-744.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H and Woolf CJ (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22(15): 6724-6731.
- Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kurokawa T, Takeda N and Inoue M (2016). Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Arch* 468(1): 85-97.
- Morisseau C and Hammock BD (2013). Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 37-58.
- Murphy MP and Smith RA (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 629-656.
- Myers RR, Campana WM and Shubayev VI (2006). The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today* 11(1-2): 8-20.
- Nackley AG, Makriyannis A and Hohmann AG (2003). Selective activation of cannabinoid CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 119(3): 747-757.
- Nakamura T, Ajiki T, Murao S, Kamigaki T, Maeda S, Ku Y and Kuroda Y (2002). Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 20(5): 937-941.
- Nassif J, Abbasi SA, Nassar A, Abu-Musa A and Eid AA (2016). The role of NADPH-derived reactive oxygen species production in the pathogenesis of endometriosis: a novel mechanistic approach. *J Biol Regul Homeost Agents* 30(1): 31-40.
- Nayernia Z, Jaquet V and Krause KH (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 20(17): 2815-2837.
- Naziroglu M (2007). New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 32(11): 1990-2001.
- Naziroglu M (2011). TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* 36(3): 355-366.
- Naziroglu M, Cig B and Ozgul C (2013). Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels. *Neuroscience* 242: 151-160.
- Newman JW, Morisseau C, Harris TR and Hammock BD (2003). The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1558-1563.
- Nishikawa T, Lee IS, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y and Nishikimi M (1997). Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* 272(37): 23037-23041.
- Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC and Liao JK (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285(5431): 1276-1279.
- Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E and Lukanidin E (2000). Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 275(52): 41278-41286.
- Ogawa N, Kurokawa T and Mori Y (2016). Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium* 60(2): 115-122.
- Otterbein LR, Kordowska J, Witte-Hoffmann C, Wang CL and Dominguez R (2002). Crystal structures of S100A6 in the Ca(2+)-free and Ca(2+)-bound states: the calcium sensor mechanism of S100 proteins revealed at atomic resolution. *Structure* 10(4): 557-567.

Literaturverzeichnis

- Passmore GM, Reilly JM, Thakur M, Keasberry VN, Marsh SJ, Dickenson AH and Brown DA (2012). Functional significance of M-type potassium channels in nociceptive cutaneous sensory endings. *Front Mol Neurosci* 5: 63.
- Patapoutian A, Tate S and Woolf CJ (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 8(1): 55-68.
- Pathuri P, Vogeley L and Luecke H (2008). Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form. *J Mol Biol* 383(1): 62-77.
- Pedersen KB, Nesland JM, Fodstad O and Maelandsmo GM (2002). Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 87(11): 1281-1286.
- Pedersen MV, Kohler LB, Grigorian M, Novitskaya V, Bock E, Lukanidin E and Berezin V (2004). The Mts1/S100A4 protein is a neuroprotectant. *J Neurosci Res* 77(6): 777-786.
- Peirs C and Seal RP (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 354(6312): 578-584.
- Perry BN, Govindarajan B, Bhandarkar SS, Knaus UG, Valo M, Sturk C, Carrillo CO, Sohn A, Cerimele F, Dumont D, Losken A, Williams J, Brown LF, Tan X, Ioffe E, Yancopoulos GD and Arbiser JL (2006). Pharmacologic blockade of angiopoietin-2 is efficacious against model hemangiomas in mice. *J Invest Dermatol* 126(10): 2316-2322.
- Persechini A, Moncrief ND and Kretsinger RH (1989). The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci* 12(11): 462-467.
- Petersen J, Mergia E, Kennel L, Drees O, Steubing RD, Real CI, Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Friebe A, Koesling D and Schmidtko A (2019). Distinct functions of soluble guanylyl cyclase isoforms NO-GC1 and NO-GC2 in inflammatory and neuropathic pain processing. *Pain* 160(3): 607-618.
- Pinto LG, Souza GR, Kusuda R, Lopes AH, Sant'Anna MB, Cunha FQ, Ferreira SH and Cunha TM (2019). Non-Peptidergic Nociceptive Neurons Are Essential for Mechanical Inflammatory Hypersensitivity in Mice. *Mol Neurobiol* 56(8): 5715-5728.
- Polgar E, Gray S, Riddell JS and Todd AJ (2004). Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111(1-2): 144-150.
- Poon HF, Hensley K, Thongboonkerd V, Merchant ML, Lynn BC, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V and Butterfield DA (2005). Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice--a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 39(4): 453-462.
- Price TJ and Gold MS (2018). From Mechanism to Cure: Renewing the Goal to Eliminate the Disease of Pain. *Pain Med* 19(8): 1525-1549.
- Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A and Malan TP, Jr. (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99(4): 955-960.
- Reichling DB, Green PG and Levine JD (2013). The fundamental unit of pain is the cell. *Pain* 154 Suppl 1: S2-9.
- Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F and Lewit-Bentley A (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 6(1): 89-95.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM and Aggarwal BB (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49(11): 1603-1616.
- Rexed B (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96(3): 414-495.
- Rice AS, Smith BH and Blyth FM (2016). Pain and the global burden of disease. *Pain* 157(4): 791-796.
- Riffel AP, de Souza JA, Santos Mdo C, Horst A, Scheid T, Kolberg C, Bello-Klein A and Partata WA (2016). Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res Bull* 121: 169-177.
- Rivera-Arconada I and Lopez-Garcia JA (2006). Retigabine-induced population primary afferent hyperpolarisation in vitro. *Neuropharmacology* 51(4): 756-763.

Literaturverzeichnis

- Rose KE, Lunardi N, Boscolo A, Dong X, Erisir A, Jevtovic-Todorovic V and Todorovic SM (2013). Immunohistological demonstration of CaV3.2 T-type voltage-gated calcium channel expression in soma of dorsal root ganglion neurons and peripheral axons of rat and mouse. *Neuroscience* 250: 263-274.
- Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH and Goggins M (2002). Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* 160(1): 45-50.
- Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT and Orkin SH (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322(6074): 32-38.
- Roza C, Puel JL, Kress M, Baron A, Diochot S, Lazdunski M and Waldmann R (2004). Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *J Physiol* 558(Pt 2): 659-669.
- Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ and Christoph T (2014). Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 18(2): 204-212.
- Sahoo N, Hoshi T and Heinemann SH (2014). Oxidative modulation of voltage-gated potassium channels. *Antioxid Redox Signal* 21(6): 933-952.
- Salvemini D, Little JW, Doyle T and Neumann WL (2011). Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med* 51(5): 951-966.
- Sanchez-Gomez FJ, Espinosa-Diez C, Dubey M, Dikshit M and Lamas S (2013). S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker. *Biol Chem* 394(10): 1263-1280.
- Sandelin M, Zabihi S, Liu L, Wicher G and Kozlova EN (2004). Metastasis-associated S100A4 (Mts1) protein is expressed in subpopulations of sensory and autonomic neurons and in Schwann cells of the adult rat. *J Comp Neurol* 473(2): 233-243.
- Sandri G, Panfili E and Ernster L (1990). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim Biophys Acta* 1035(3): 300-305.
- Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH and Sofroniew MV (2010). Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One* 5(3): e9532.
- Sato F, Kohsaka A, Takahashi K, Otao S, Kitada Y, Iwasaki Y and Muragaki Y (2017). Smad3 and Bmal1 regulate p21 and S100A4 expression in myocardial stromal fibroblasts via TNF-alpha. *Histochem Cell Biol* 148(6): 617-624.
- Schafer BW, Fritschy JM, Murmann P, Troxler H, Durussel I, Heizmann CW and Cox JA (2000). Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily. *J Biol Chem* 275(39): 30623-30630.
- Schafers M and Tolle TR (2013). [Current therapy of neuropathic pain]. *Nervenarzt* 84(12): 1445-1450.
- Schlereth T (2019) Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
- Schmelzer KR, Inceoglu B, Kubala L, Kim IH, Jinks SL, Eiserich JP and Hammock BD (2006). Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37): 13646-13651.
- Schmidtko A, Gao W, Sausbier M, Rauhmeier I, Sausbier U, Niederberger E, Scholich K, Huber A, Neuhuber W, Allescher HD, Hofmann F, Tegeder I, Ruth P and Geisslinger G (2008). Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain. *J Neurosci* 28(6): 1320-1330.
- Schneider M, Kostin S, Strom CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, Grigorian M, Andersen CB, Lukanidin E, Lerche Hansen J and Sheikh SP (2007). S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 75(1): 40-50.

Literaturverzeichnis

- Scholz A, Gruss M and Vogel W (1998). Properties and functions of calcium-activated K⁺ channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol* 513 (Pt 1): 55-69.
- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE and Woolf CJ (2005). Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25(32): 7317-7323.
- Scholz J, Finnerup NB, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Cruccu G, Davis KD, Evers S, First M, Giamberardino MA, Hansson P, Kaasa S, Korwisi B, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Nurmiikko T, Perrot S, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham MC, Schug S, Simpson DM, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang SJ, Barke A, Rief W, Treede RD and Classification Committee of the Neuropathic Pain Special Interest G (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain* 160(1): 53-59.
- Scholz J and Woolf CJ (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1062-1067.
- Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM and Brandes RP (2012). Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 110(9): 1217-1225.
- Schwartz ES, Lee I, Chung K and Chung JM (2008). Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138(3): 514-524.
- Sedaghat F and Notopoulos A (2008). S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia* 12(4): 198-204.
- Segal AW and Jones OT (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276(5687): 515-517.
- Segal AW, Jones OT, Webster D and Allison AC (1978). Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 2(8087): 446-449.
- Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D and Alakhov V (2005). Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 280(21): 20833-20841.
- Seno K (2006). Pyrazolo[1, 5-A]pyrimidine derivative and NAD(P)H oxidase inhibitor containing the same. US 2006/0089362.
- Sharma S, Yang B, Xi X, Grotta JC, Aronowski J and Savitz SI (2011). IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res* 1373: 189-194.
- Shepherd AJ, Cloud ME, Cao YQ and Mohapatra DP (2018). Deficits in Burrowing Behaviors Are Associated With Mouse Models of Neuropathic but Not Inflammatory Pain or Migraine. *Front Behav Neurosci* 12: 124.
- Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL and Halliday GM (2006). Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27(11): 1554-1563.
- Shin JB, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA and Lewin GR (2003). A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6(7): 724-730.
- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y and Sumimoto H (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276(2): 1417-1423.
- Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M and Holcman M (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75(9): 770-787.
- Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D and Tessier PA (2013). S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* 8(8): e72138.

Literaturverzeichnis

- Skulachev VP (2007). A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochemistry (Mosc)* 72(12): 1385-1396.
- Smith RA, Porteous CM, Coulter CV and Murphy MP (1999). Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur J Biochem* 263(3): 709-716.
- Smith SM, Min J, Ganesh T, Diebold B, Kawahara T, Zhu Y, McCoy J, Sun A, Snyder JP, Fu H, Du Y, Lewis I and Lambeth JD (2012). Ebselen and congeners inhibit NADPH oxidase 2-dependent superoxide generation by interrupting the binding of regulatory subunits. *Chem Biol* 19(6): 752-763.
- Sorce S and Krause KH (2009). NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 11(10): 2481-2504.
- Spector AA (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res* 50 Suppl: S52-56.
- Spector AA, Fang X, Snyder GD and Weintraub NL (2004). Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 43(1): 55-90.
- Spector AA and Norris AW (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(3): C996-1012.
- Stadtman ER and Levine RL (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25(3-4): 207-218.
- Stadtman ER, Moskovitz J and Levine RL (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 5(5): 577-582.
- Stark A, Schwenk R, Wack G, Zuchtriegel G, Hatemler MG, Brautigam J, Schmidtko A, Reichel CA, Bischoff I and Furst R (2019). Narciclasine exerts anti-inflammatory actions by blocking leukocyte-endothelial cell interactions and down-regulation of the endothelial TNF receptor 1. *FASEB J* 33(8): 8771-8781.
- Stary M, Schneider M, Sheikh SP and Weitzer G (2006). Parietal endoderm secreted S100A4 promotes early cardiomyogenesis in embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 343(2): 555-563.
- Subbanna PK, Prasanna CG, Gunale BK and Tyagi MG (2007). Acetyl salicylic acid augments functional recovery following sciatic nerve crush in mice. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* 2: 3.
- Sudhahar V, Shaw S and Imig JD (2010). Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr Med Chem* 17(12): 1181-1190.
- Sultana R, Perluigi M and Butterfield DA (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 8(11-12): 2021-2037.
- Tabner BJ, El-Agnaf OM, German MJ, Fullwood NJ and Allsop D (2005). Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1082-1086.
- Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ and Allsop D (2005). Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem* 280(43): 35789-35792.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D and Bayliss DA (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21(19): 7491-7505.
- Tarabykina S, Scott DJ, Herzyk P, Hill TJ, Tame JR, Kriajevska M, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Maitland NJ, Lukanidin EM and Bronstein IB (2001). The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1): in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem* 276(26): 24212-24222.
- Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N and Segal AW (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327(6124): 720-721.
- ten Freyhaus H, Huntgeburth M, Wingler K, Schnitker J, Baumer AT, Vantler M, Bekhite MM, Wartenberg M, Sauer H and Rosenkranz S (2006). Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc Res* 71(2): 331-341.

Literaturverzeichnis

- Thacker MA, Clark AK, Marchand F and McMahon SB (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* 105(3): 838-847.
- Thongboonkerd V and Malasit P (2005). Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics* 5(4): 1033-1042.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunnskaar S, Rosland JH and Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51(1): 5-17.
- Toda T, Yamamoto S, Yonezawa R, Mori Y and Shimizu S (2016). Inhibitory effects of Tyrphostin AG-related compounds on oxidative stress-sensitive transient receptor potential channel activation. *Eur J Pharmacol* 786: 19-28.
- Todd AJ, Polgar E, Watt C, Bailey ME and 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(4): 718-726.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW and Zorumski CF (2001). Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31(1): 75-85.
- Touyz RM (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44(3): 248-252.
- Turchan J, Pocernich CB, Gairola C, Chauhan A, Schifitto G, Butterfield DA, Buch S, Narayan O, Sinai A, Geiger J, Berger JR, Elford H and Nath A (2003). Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology* 60(2): 307-314.
- van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH and Torrance N (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 155(4): 654-662.
- von Hehn CA, Baron R and Woolf CJ (2012). Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73(4): 638-652.
- Wagner BA, Buettner GR and Burns CP (1994). Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 33(15): 4449-4453.
- Wagner K, Inceoglu B and Hammock BD (2011). Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 96(1-4): 76-83.
- Wagner K, Lee KS, Yang J and Hammock BD (2017). Epoxy fatty acids mediate analgesia in murine diabetic neuropathy. *Eur J Pain* 21(3): 456-465.
- Wagner K, Yang J, Inceoglu B and Hammock BD (2014). Soluble epoxide hydrolase inhibition is antinociceptive in a mouse model of diabetic neuropathy. *J Pain* 15(9): 907-914.
- Wang Q, Zhou H, Gao H, Chen SH, Chu CH, Wilson B and Hong JS (2012). Naloxone inhibits immune cell function by suppressing superoxide production through a direct interaction with gp91phox subunit of NADPH oxidase. *J Neuroinflammation* 9: 32.
- Wang R (2012). Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(23): 8801-8802.
- Wang S and Chuang HH (2011). C-terminal dimerization activates the nociceptive transduction channel transient receptor potential vanilloid 1. *J Biol Chem* 286(47): 40601-40607.
- Watanabe S, Moniaga CS, Nielsen S and Hara-Chikuma M (2016). Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 471(1): 191-197.
- Weiss KE, Dahlquist LM and Wohlheiter K (2011). The effects of interactive and passive distraction on cold pressor pain in preschool-aged children. *J Pediatr Psychol* 36(7): 816-826.
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED and Aschner M (2008). Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 29(3): 489-503.

Literaturverzeichnis

- Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K and Schmidt HH (2010). Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* 56(3): 490-497.
- Woolf CJ (2004). Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci* 74(21): 2605-2610.
- Woolf CJ and Costigan M (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 7723-7730.
- Woolf CJ and Ma Q (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55(3): 353-364.
- Wright NT, Varney KM, Ellis KC, Markowitz J, Gitti RK, Zimmer DB and Weber DJ (2005). The three-dimensional solution structure of Ca(2+)-bound S100A1 as determined by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 353(2): 410-426.
- Yamada K and Inagaki N (2005). Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 945-949.
- Yammani RR, Long D and Loeser RF (2009). Interleukin-7 stimulates secretion of S100A4 by activating the JAK/STAT signaling pathway in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60(3): 792-800.
- Yang HC, Farooqui AA and Horrocks LA (1996). Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14(1-3): 9-13.
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y and Mori Y (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* 2(11): 596-607.
- Yowtak J, Wang J, Kim HY, Lu Y, Chung K and Chung JM (2013). Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse. *Pain* 154(11): 2469-2476.
- Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, Parker C, Graham L, Engler MM, Hammock BD, Zeldin DC and Kroetz DL (2000). Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 87(11): 992-998.
- Zhang G, Kodani S and Hammock BD (2014). Stabilized epoxygenated fatty acids regulate inflammation, pain, angiogenesis and cancer. *Prog Lipid Res* 53: 108-123.
- Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP and Shah AM (2010). NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(42): 18121-18126.
- Zheng Q, Fang D, Liu M, Cai J, Wan Y, Han JS and Xing GG (2013). Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* 154(3): 434-448.
- Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ and Mata M (2009). Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J Neurochem* 110(5): 1617-1627.
- Zimmer DB, Chaplin J, Baldwin A and Rast M (2005). S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(2): 201-214.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A and Song W (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37(4): 417-429.
- Zimmer DB, Wright Sadosky P and Weber DJ (2003). Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech* 60(6): 552-559.