

PAM-vermittelte Signaltransduktion bei peripherer Nozizeption

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Sabrina Marion Holland

aus Darmstadt

Frankfurt am Main 2010
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek
Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger

Datum der Disputation: 04. April 2011

Allen Versuchstieren

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	PAM (PROTEIN ASSOCIATED WITH MYC).....	1
1.1.1	<i>Strukturelle Domänen von PAM</i>	1
1.1.2	<i>Physiologische Funktionen von PAM</i>	2
1.2	REGULATION DES mTOR-SIGNALWEGES DURCH PAM	4
1.3	EINFLUSS VON PAM AUF DEN NEURONALEN p38 MAPK-SIGNALWEG	6
1.4	PERIPHERE NOZIZEPTION UND DEREN MODULATION AM BEISPIEL DES TRPV1-REZEPTORS ...	8
1.4.1	<i>Der TRPV1-Rezeptor</i>	9
1.4.2	<i>Desensibilisierung und Internalisierung von TRPV1</i>	10
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
2	MATERIAL UND METHODE	14
2.1	CHEMIKALIEN.....	14
2.2	STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	14
2.3	VERSUCHSTIERE	15
2.4	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN/ GENOTYPISIERUNG	16
2.4.1	<i>Herstellung chemisch kompetenter E.coli Bakterien</i>	16
2.4.2	<i>Transformation von E.coli Bakterien</i>	16
2.4.3	<i>Plasmidisolierung</i>	17
2.4.4	<i>Isolierung genomischer DNA</i>	17
2.4.5	<i>Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese</i>	17
2.4.6	<i>Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR)</i>	18
2.4.7	<i>Agarose Gelelektrophorese</i>	19
2.4.8	<i>Sequenzierung</i>	19
2.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	20
2.5.1	<i>Kultivierung und Lagerung von Zelllinien</i>	20
2.5.2	<i>Isolierung und Kultivierung primärer Gliazellen</i>	20
2.5.3	<i>Isolierung primär embryonaler Fibroblasten</i>	21
2.5.4	<i>Isolierung und Kultivierung primärer Neurone aus Dorsalganglien</i>	21
2.6	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	22
2.6.1	<i>Herstellung von Proteinlysaten</i>	22
2.6.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	22
2.6.3	<i>Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	23
2.6.4	<i>Coomassie Färbung von Proteingelen</i>	23
2.6.5	<i>Aufreinigung von PAM aus HeLa Zellen mittels FPLC</i>	23
2.6.6	<i>Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine</i>	24
2.6.7	<i>Proteintransfektion und Stimulierung von Zelllinien</i>	25
2.7	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	25
2.7.1	<i>Antikörper Microarray</i>	25
2.7.2	<i>Western Blot Analyse (Immunblot)</i>	26
2.7.3	<i>Immunhistochemie</i>	27
2.7.4	<i>Immunzytochemie</i>	28
2.7.5	<i>Immunpräzipitation</i>	30
2.8	CALCIUM IMAGING.....	31
2.9	NOZIZEPTIVE TIERMODELLE.....	32
2.10	STATISTIK.....	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	GENERIERUNG KONDITIONALER PAM-KNOCKOUT MÄUSE	34
3.1.1	<i>Neuronenspezifische PAM-Knockout Mäuse (NesCre)</i>	34
3.1.2	<i>Deletion von PAM in sensorischen Neuronen (SNSCre)</i>	37
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER KONDITIONALEN PAM-KNOCKOUT MÄUSE	38
3.2.1	<i>Deletion von PAM führt zu verstärktem neuronalem Wachstum</i>	38
3.2.2	<i>Funktionelle Bestätigung der PAM^{-/-} SNSCre-Mauslinie anhand des mTOR-Signalweges</i>	40
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM NOZIZEPTIVEN VERHALTEN PAM-DEFIZIENTER MÄUSE	44
3.3.1	<i>Basale Schmerzschwellen</i>	44
3.3.2	<i>Entzündlicher Schmerz</i>	45
3.4	PAM-VERMITTELT AKTIVIERUNG DES p38 MAPK-SIGNALWEGES	46
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON PAM AUF DEN REZEPTOR TRPV1.....	49
3.5.1	<i>Expression von TRPV1 in Abhängigkeit von PAM</i>	50

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	<i>Einfluss von PAM auf die Aktivierung und Desensibilisierung von TRPV1</i>	51
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON PAM AUF DEN REZEPTOR TRPA1	55
3.7	PAM-ABHÄNGIGE MECHANISMEN ZUR REGULATION VON REZEPTOR-DESENSIBILISIERUNG ..	57
3.7.1	<i>Auffinden möglicher Mechanismen zur Regulation von Rezeptordesensibilisierung mittels Antikörper Microarray</i>	57
3.7.2	<i>Regulation von Rezeptordesensibilisierung durch Myosine</i>	61
3.7.3	<i>Interaktionen zwischen PAM und APP (Amyloid Precursor Protein)</i>	65
4	DISKUSSION	68
4.1	PAM FUNKTIONEN UNABHÄNGIG VON DER UBIQUITINLIGASEAKTIVITÄT.....	68
4.2	DIE BEDEUTUNG VON PAM FÜR DAS NEURITENWACHSTUM.....	70
4.3	REGULATION DER SYNAPTISCHEN PLASTIZITÄT DURCH PAM	73
4.3.1	<i>Regulation der Synapsenmorphologie durch PAM</i>	73
4.3.2	<i>Regulation der Synapsenfunktionen durch PAM</i>	74
4.3.3	<i>Beeinflussung des Rezeptortraffickings</i>	77
4.4	POTENTIELLE KLINISCHE BEDEUTUNG VON PAM	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
7	ABBILDUNGS UND TABELLENVERZEICHNIS	84
8	LITERATURVERZEICHNIS	86
9	ANHANG	98
9.1	DANKSAGUNG	98
9.2	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	99
9.3	LEBENS LAUF	100

1 Einleitung

1.1 PAM (Protein associated with myc)

PAM (Protein Associated with Myc) wurde ursprünglich durch seine Interaktion mit dem Protoonkogen Myc in humanen Zellen identifiziert¹. Weniger geläufig ist die offizielle GenBank Bezeichnung „Myc-binding protein 2“. PAM-Orthologe werden gemeinsam als PHR-Proteine bezeichnet, zu denen Phr1 (*Mus musculus*), Esrom (*Danio. rerio*), Highwire (*Drosophila melanogaster*) und Rpm-1 (*Caenorhabditis elegans*) gehören. Im Folgenden wird die ursprüngliche Bezeichnung PAM als Überbegriff für orthologe Proteine aus Säugetieren verwendet.

1.1.1 Strukturelle Domänen von PAM

Mit einem Molekulargewicht von 510 kDa übersteigt PAM die durchschnittliche Proteingröße um ein Vielfaches und zählt zu den größten Proteinen des Säugetiergenoms. Aufgrund der enormen Größe sind Wechselwirkungen mit einer Vielzahl anderer Proteine wahrscheinlich. Neben der Interaktion mit Myc wurden für PAM bislang Interaktionen mit dem Tumorsuppressor TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2, vormals Tuberin)²⁻⁴, dem F-box Protein Fbxo45⁵, dem Ionenporter KCC2⁶, dem Strukturprotein Aktin⁷ und verschiedenen Isoformen der Adenylylzyklase beschrieben^{8,9} (vgl. Abbildung 1-1).

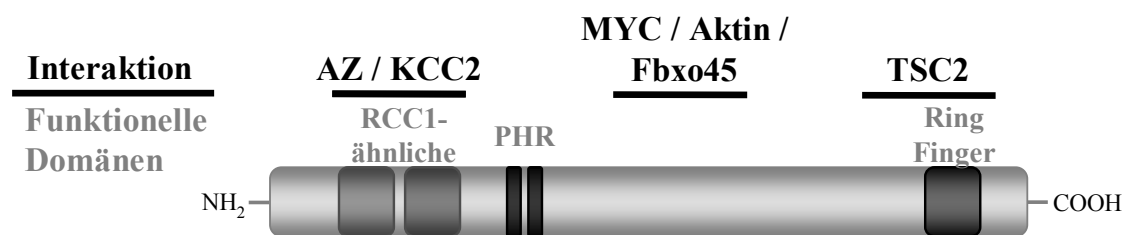


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des PAM Proteins. In die Darstellung integriert sind bekannte funktionelle Domänen und Protein Interaktionen von PAM. AZ, Adenylylzyklase; KCC2, Kalium-Chlorid-Kotransporter 2; TSC2, Tuberous Sclerosis Complex 2.

Die Aminosäuresequenz von PAM weist einige hochkonservierte Bereiche auf. Zum einen die PHR-Domäne, die erstmals in den Orthologen PAM, Highwire und Rpm-1 gefunden und nach ihnen benannt wurde. Eine eindeutige Funktion wurde ihr allerdings bisher nicht zugeschrieben. Zum anderen enthält PAM die sogenannte RCC1-ähnliche

Domäne (**R**egulator of **C**hromatine **C**ondensation **1**) und die RING (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) Finger Domäne (Abbildung 1-1).

Die ursprüngliche Identifizierung von RCC1 als Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (engl. **G**uaninenucleotide **E**xchange **F**actor, **GEF**) führte zu der Annahme, dass RCC1-ähnliche Domänen in anderen Proteinen eine ähnliche Funktion ausüben könnten¹⁰. Obwohl die meisten der RCC1-ähnlichen Domänen an Protein-Protein Interaktionen partizipieren, konnte bisher eine GEF-Funktion für RCC1-ähnliche Domänen nicht eindeutig gezeigt werden¹¹. Auch für PAM und Rpm-1 wird eine Funktion als GEF diskutiert, konnte aber auch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden^{4, 12}. Der RCC1-ähnlichen Domäne von PAM konnten dagegen bereits zwei andere Funktionen zugeordnet werden: zum einen vermittelt sie die Hemmung der Adenylylzyklase¹³ und ist zum anderen verantwortlich für die Interaktion mit dem Ionentransporter KCC2⁶.

Die RING-Struktur, auch als RING Finger bezeichnet, wurde erstmals im Zusammenhang mit Ubiquitinierung 1998 von Potuschak et al.¹⁴ beschrieben. Mittlerweile ist sie als katalytisch aktive Domäne in E3-RING-Ubiquitinligasen anerkannt. E3-RING-Ubiquitinligasen katalysieren den letzten Schritt der Ubiquitinierung von Proteinen indem sie den Transfer eines Ubiquitins von einem E2 Enzym zum Substrat vermitteln¹⁵. Auch für PAM konnte eine solche Ubiquitinligasefunktion im Zusammenhang mit TSC2 nachgewiesen werden^{3, 4}.

1.1.2 Physiologische Funktionen von PAM

Die physiologischen Funktionen von PAM sind durch die Interaktionen mit anderen Proteinen vielfältig. Dabei reguliert PAM direkt oder indirekt verschiedene zellphysiologische Vorgänge. Im Zebrafisch führt eine Mutagenese des entsprechenden PAM Orthologs zu einer Störung des Pteridin Stoffwechsels. Eine fehlende Pigmentierung von Retikulozyten und eine gestörte Tetrahydrobiopterin (BH4) Synthese in neuronalen Vorläuferzellen sind die direkt nachweisbaren physiologischen Konsequenzen¹⁶. Weiterhin bindet die mRNA von PAM an das Protein DAZL (**d**eleted in **a**zoospermia **l**ike), das für die Spermatogenese essentiell ist. Auch in *C.elegans* beeinflusst Rpm-1 keimbahnspezifische Vorgänge^{17, 18}. Die physiologischen Konsequenzen sind hierbei allerdings noch weitgehend unbekannt.

Eine Expression der PAM mRNA lässt sich in nahezu allen Zellen des adulten Organismus nachweisen, ist aber besonders stark im Rückenmark, Thymus und Gehirn ausgeprägt^{1, 19}. Zusätzlich wurden in einigen Geweben verschiedene Spleißvarianten

nachgewiesen, die sich in ihrer Affinität zu Bindungspartnern deutlich unterscheiden^{7, 20}.

Die PAM Expression variiert in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums und korreliert scheinbar mit einem verstärkten Wachstum, sei es im Zusammenhang mit erhöhten Replikationsraten oder einer verstärkten Ausbildung von Neuriten oder Synapsen^{1, 19, 21, 22}. Durch Untersuchungen an Knockout-Organismen konnte die These eines Einflusses von PAM auf das neuronale Wachstum bzw. die Synaptogenese gestärkt werden. In Neuronen von *D. melanogaster* bzw. *C. elegans* resultiert ein Knockout der entsprechenden PAM-Orthologe in einem gesteigerten Längenwachstum und verstärkter Dendritenverzweigung²³⁻²⁷. Dieses übersteigerte Wachstum geht mit einer morphologischen Veränderung und eingeschränkter Funktionalität der ausgebildeten Synapsen einher^{12, 28}. Diesen Beobachtungen liegt unter anderem der p38 MAPK Signalweg als molekularer Mechanismus zugrunde. Sowohl Highwire als auch Rpm-1 hemmen diesen Signalweg über die Ubiquitinierung von DLK und führen zu den beschriebenen neuronalen Fehlfunktionen^{27, 29} (siehe 1.3). Auch bei PAM-defizienten Mäusen ist eine fehlerhafte Bildung von Nervenendigungen durch das verstärkte Neuritenwachstum zu beobachten. Dieses führt durch Lungenfehlfunktionen zum Tode bei der Geburt^{30, 31}. Auch der Knockout des PAM-bindenden F-box Protein Fbxo45 in Mäusen führt zu einem ähnlichen Phänotyp. F-box Proteine sind Bestandteile von SCF-Komplexen (Skp, Cullin, F-box containing complex), die als Multi-Protein E3 Ubiquitinligase-Komplex die Ubiquitinierung von Proteinen katalysiert. Die Übereinstimmung der Phänotypen beider Knockouts ist ein Hinweis darauf, dass PAM zusammen mit Fbxo45 über Ubiquitinierung von Proteinen das Neuritenwachstum und die Synaptogenese beeinflussen⁵. Experimente in *C.elegans* deuten darauf hin, dass diese Funktion evolutiv konserviert zu sein scheint³². Ein weiterer Signalweg, der durch PAM beeinflusst wird, ist der 'bone morphogenetic protein' (BMP)-Signalweg. Eine Aktivierung dieses Signalweges führt in Highwire Mutanten ebenso zu einem übersteigerten Synapsenwachstum²⁶.

Im Rückenmark von adulten Ratten kommt es als Reaktion auf Schmerzreize oder Entzündungen zu einem erhöhten Vorkommen der mRNA von PAM in nozizeptiven Neuronen¹⁹. Eine Verminderung der PAM-Expression mittels Oligonukleotide führt in diesem Fall zu einer Steigerung des nozizeptiven Verhaltens und deutet somit auf antinozizeptive Eigenschaften von PAM hin¹⁹. Eine PAM-abhängige Hemmung der cAMP Synthese könnte hierfür eine Erklärung sein, da cAMP-abhängige

Signalkaskaden bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit eine zentrale Rolle spielen³³⁻³⁵. Tatsächlich konnte eine PAM-abhängige Hemmung von Adenylylzyklasen sowohl *in vivo* als auch an Zelllinien nachgewiesen werden. Sie beruht auf einer direkten Interaktion der RCC1-ähnlichen Domäne von PAM mit dem katalytischen Bereich der Adenylylzyklase^{13, 19, 36, 37}.

In HeLa Zellen geht der Hemmung der Adenylylzyklase eine signalvermittelte Aktivierung von PAM voraus, welche mit einer Translokation von PAM zur Plasmamembran verbunden ist. Als ein Signalmolekül dieser Aktivierung wurde das Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) identifiziert³⁷. S1P beeinflusst über membranständige Rezeptoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Es ist daher wahrscheinlich, dass neben der Hemmung der Adenylylzyklase auch weitere PAM-abhängige Vorgänge durch S1P gesteuert werden. Beispielsweise wird mTOR (engl. **mammalian Target of Rapamycin**) unter anderem durch Sphingosin-1-Phosphat über einen bisher unbekanntem Signalweg aktiviert³⁸⁻⁴². Diese Aktivierung könnte potentiell durch PAM vermittelt werden. Deshalb wurde im Folgenden die Regulation des mTOR-Signalweges durch PAM näher betrachtet. Des Weiteren wurde der Einfluss von PAM auf den p38 MAPK Signalweg näher untersucht, da diesem eine Rolle bei der Nozizeption und der PAM-vermittelten Funktionalität von Synapsen zugeschrieben wird.

1.2 Regulation des mTOR-Signalweges durch PAM

Das "Mammalian Target of Rapamycin" (mTOR) ist eine hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, die sich in zwei verschiedenen Komplexen, mTORC1 und mTORC2, in Zellen findet. Dabei beinhalten jeweils beide Komplexe neben mTOR auch GβL/mLST8 und Deptor. Andere Proteine sind exklusiv nur in einem der Komplexe zu finden. So beinhaltet mTORC1 weiterhin Raptor (**r**egulatory **a**ssociated **p**rotein of **mTOR**) und PRAS40, während sich mTORC2 zusätzlich aus Rictor (**r**apamycin **i**nsensitive **c**ompanion of **mTOR**), mSin1 und PRR5/protor zusammensetzt. Die Proteinkinasen Akt, SGK1 und PKCα sind bisher die bekanntesten Substrate des mTORC2, womit dieser Komplex die Organisation des Aktinzytoskelets, sowie Zellproliferation und Überleben beeinflusst⁴³. mTORC2 ist allerdings nicht sensitiv gegenüber Rapamycin, einem natürlichen mTORC1-Hemmstoff aus *Streptomyces hygroscopicus*, durch dessen Wirkung das vormals unbekannte Protein TOR erstmals

beschrieben wurde^{44, 45}. Durch die Verwendung von Rapamycin in dieser Arbeit beschränken sich die hier beschriebenen Funktionen von mTOR auf den Komplex mTORC1. mTORC1 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Proteinsynthese und der Integration von externen Signalen in Bezug auf Energiehaushalt und Nährstoffbedingungen. Unter anderem wird es durch Sphingosin-1-Phosphat über einen bisher unbekanntem Signalweg aktiviert³⁸⁻⁴². Der aktivierte mTORC1 reguliert primär durch direkte Phosphorylierung der Translations-Initiations-Faktoren 4E-binding Protein 1 (4E-BP1)⁴⁶ und p70S6 Kinase⁴⁷ die Translation von 5'-Oligopyrimidin und Cap-abhängigen mRNAs. Somit beeinflusst mTORC1 den Zellzyklus, Proliferation, Angiogenese und antiapoptotische Signalwege. Dementsprechend ist mTORC1 in Tumoren oft verstärkt aktiviert. Auch sind einige mTOR-aktivierende Onkogene und Tumorsuppressorgene in Tumoren häufig dysreguliert⁴⁸. Rapamycinanaloga wie z.B. Temsirolimus, Everolimus oder Deforolimus wurden bereits für die Krebsbehandlung entwickelt⁴⁹. Ebenso wird in klinischen Studien die kombinierte Verabreichung von mTORC1 Hemmstoffen und S1P-Rezeptoragonisten getestet⁵⁰⁻⁵². Hypertrophie ist eine der charakteristischen Eigenschaften von Krankheiten, die durch eine erhöhte mTORC1-Aktivität begleitet werden, auch im post-mitotischen Nervensystem^{53, 54}. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die neuronale Entwicklung, als auch das Axonwachstum, Dendritenentwicklung oder die Morphogenese von dendritischen Dornfortsätzen die Aktivität von mTORC1 benötigen⁵⁵⁻⁵⁷. Ebenso ist die Aktivität von mTORC1 essentiell für einige Formen der synaptischen Plastizität, die Prozessen des Lernens und der Erinnerung zugrunde liegen⁵⁸⁻⁶⁰.

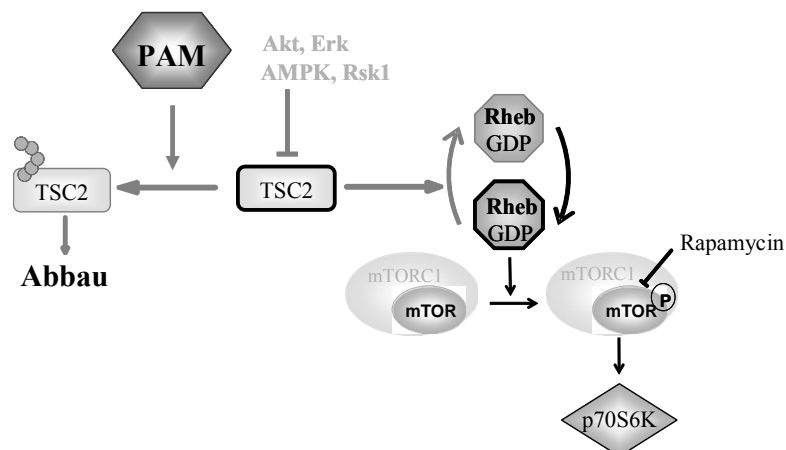


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des TSC2/mTOR-Signalweges. TSC2 (Tuberous Sklerosis Complex) verstärkt die Inaktivierung von Rheb indem es dessen intrinsische GTPase Aktivität verstärkt und somit den mTOR Signalweg hemmt. TSC2 kann durch eine Reihe von Proteinkinasen phosphoryliert und dadurch gehemmt werden. Weiterhin kann PAM TSC2 ubiquitinieren und so zu dessen Degradation führen. Aktiviertes mTOR reguliert primär durch direkte Phosphorylierung der Translations-Initiations-Faktoren 4E-binde Proteins 1 (4E-BP1) und p70S6 Kinase die Translation.

Unter physiologischen Bedingungen wird der mTORC1-Signalweg durch den Heteroproteinkomplex TSC1/TSC2 (Tuberous Sklerosis Complex) gehemmt. TSC2 besitzt an seinem C-Terminus eine GAP-Domäne (GTPase-activating Protein), mit der es die Funktion der mTOR-aktivierenden GTPase Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) hemmt und somit auch mTORC1 inhibiert (siehe Abbildung 1-2). Die Dissoziation des TSC1/TSC2 Komplexes, die durch eine Phosphorylierung von TSC2 eingeleitet wird, hat eine Verminderung der TSC2-GAP Aktivität auf Rheb zur Folge⁶¹. Daneben kann es nach der Dissoziation von TSC1 zu einer Ubiquitinierung von TSC2 durch PAM kommen. Diese Regulation durch PAM stellt neben den bekannten Hemmungen durch die Kinasen AKT, RSK1, AMPK und Erk einen neuen, bisher jedoch kaum untersuchten Mechanismus zur Inaktivierung von TSC2 und in Folge eine Aktivierung des mTORC1-Signalweges dar^{3,4}.

1.3 Einfluss von PAM auf den neuronalen p38 MAPK-Signalweg

p38 gehört zu der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Zusammen mit den 'Extracellular signal regulated' Kinasen (ERK) und den 'c-Jun N-terminal' Kinasen (JNK) bilden sie die drei Hauptvertreter dieser großen Proteinfamilie. Bisher wurden vier Isoformen der p38 MAPK identifiziert: p38 α ^{62, 63}, p38 β ⁶⁴, p38 γ (auch bekannt als ERK6 und SAPK3)⁶⁵ und p38 δ (auch bekannt als SAPK4)^{66, 67}. Ursprünglich wurde p38 α in humanen Zellen aufgrund seiner Hemmbarkeit durch experimentelle Pyridinyl-Imidazol Verbindungen, zu denen auch SB203580 (4-[5-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-3Himidazol-4-yl]pyridin) gehört, entdeckt. p38 α ist die am stärksten exprimierte Isoform in Neuronen der dorsalen Spinalganglien (engl. Dorsal root ganglia, DRG) und des Rückenmarks⁶⁸. Alle MAP Kinasen werden durch Phosphorylierung einer MAPK Kinase (MAPKK) aktiviert, die wiederum durch MAPKK Kinasen (MAPKKK) phosphoryliert wird. Gerüstproteine (engl. Scaffold proteins) sorgen dabei für eine räumliche Nähe der beteiligten Kinasen. Ursprünglich als Bindungspartner für JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) entdeckt, binden die Gerüstproteine JIP2⁶⁹⁻⁷¹ und JIP4⁷² (JNK-interacting protein) auch p38. MKK3 und MKK6 phosphorylieren als MAPKK die p38 und werden selbst durch MAPKK Kinasen, wie TAK1, ASK1 oder DLK (engl. Dual Leucine Zipper Bearing Kinase) aktiviert.

Der p38 MAPK Signalweg wandelt eine Vielzahl extrazellulärer Reize in verschiedene zelluläre Antworten um. Dabei reguliert p38 unter anderem über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie ATF-2⁷³ und CREB⁷⁴ neuronale Apoptose⁷⁵ und Differenzierung⁷⁶. Die Translation hingegen wird beispielsweise über die Phosphorylierung von eIF-4E und 4E-BP1 p38-abhängig reguliert⁷⁷⁻⁷⁹. Diese Faktoren werden unter anderem auch durch den mTOR-Signalweg beeinflusst⁴⁶ (siehe 1.2).

Des Weiteren induziert konstitutiv aktive ASK1 über p38 MAPK das Neuritenwachstum in PC12 Zellen⁸⁰. Auch in anderen Zellkultursystemen konnte ein p38 MAPK-abhängiges Neuritenwachstum beobachtet werden^{81, 82}. Für *C.elegans* und *D.melanogaster* wurde die MAPKKK DLK als wichtiger Regulator des neuronalen Wachstums beschrieben^{27, 29}. DLK aktiviert über die MEK4 die p38 MAPK²⁹. PAM kann DLK ubiquitinieren, was zu einem Abbau dieser MAPKKK führt. Wird DLK von PAM ubiquitiniert führt dies zu einer Hemmung des p38 MAPK-Signalweges (Abbildung 1-3).

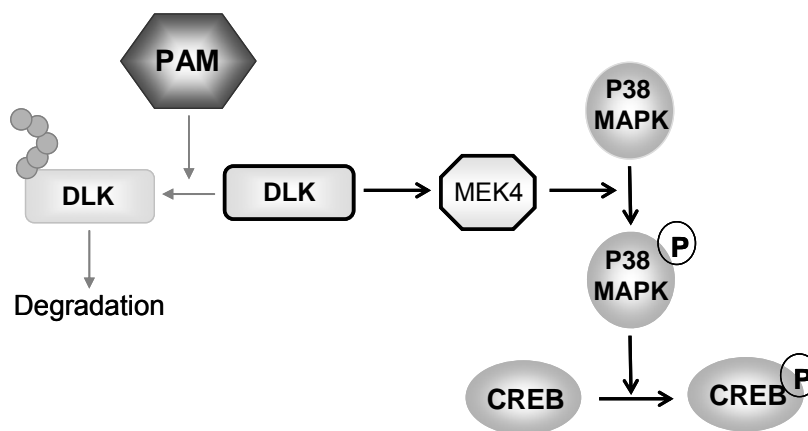


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des DLK/p38 MAPK Signalweges. PAM ubiquitiniert nach Arbeiten von Nakata et al.²⁹ DLK und führt so zu deren Abbau. Aktive DLK phosphoryliert in der Funktion als MAPKKK (mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase) MEK4. Dadurch wird die p38 MAPK und nachfolgende Proteine wie z.B. CREB ('cAMP response element-binding protein') aktiviert.

Axotomie oder periphere Entzündungen führen zu einer Aktivierung von p38 in Neuronen der dorsalen Spinalganglien (engl. **Dorsal root ganglia, DRG**)⁸³⁻⁸⁶. Dabei reduziert der p38 Inhibitor SB203580 neuropathische Schmerzen nach der Transektion des L5 Ventralganglions⁸⁷ und die thermische Hyperalgesie nach peripherer Entzündung⁸⁶. Periphere Entzündungen induzieren unter anderem eine anhaltende Erhöhung des Proteinlevels von TRPV1 in DRG-Neuronen und entzündeten Geweben. Dieser Anstieg im TRPV1-Gehalt konnte zusammen mit der Entstehung der

thermischen Hyperalgesie durch Hemmung der p38 MAPK verhindert werden^{86, 88}. Der TRPV1-Rezeptor wurde durch diesen Zusammenhang als Modellprotein zur Untersuchung der Rolle von PAM im Hinblick auf nozizeptive Sensibilisierungsmechanismen in der Peripherie verwendet.

1.4 Periphere Nozizeption und deren Modulation am Beispiel des TRPV1-Rezeptors

Adenylylzyklasen katalysieren die Synthese des Second Messenger cAMP, der auf vielfältige Weise an der Verarbeitung schmerzhafter Reize beteiligt ist³⁴. Die Fähigkeit von PAM die Adenylylzyklase zu inhibieren³⁶, ließ eine mögliche Beteiligung von PAM an nozizeptiven Prozessen vermuten und konnte in Bezug auf spinale Schmerzprozesse bereits gezeigt werden¹⁹. Daneben legen Arbeiten an orthologen Proteinen, die PAM im Zusammenhang mit synaptischem Wachstum und Plastizität beschreiben^{23, 25, 89, 90}, eine Rolle von PAM in der Nozizeption nahe.

Nozizeption (von lat. nocere, schaden) beinhaltet die auf einen noxischen Reiz hin entstehende Aktivierung eines peripheren Nozizeptors (Rezeptorpotentials), die Generierung eines Aktionspotentials in den primär afferenten Nervenfasern, die Weiterleitung des Reizes über Synapsen in den äußeren dorsalen Schichten des Rückenmarks (Lamina I und II) oder Hirnstammneuronen und schließlich die Verarbeitung der Signale in höheren Gehirnregionen⁹¹. Noxische Reize beinhalten sowohl chemische als auch physikalische Reize, wobei letztere in mechanische (Druck) und thermische Reize (Hitze, Kälte) unterteilt werden. Rezeptoren, die an den freien Endigungen der unmyelinisierten C- und leicht myelinisierten A δ -Nervenfasern lokalisiert sind, detektieren diese nozizeptiven Reize. Eine große bekannte Familie solcher Rezeptoren sind z.B. die transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle (TRP). Die Zellkörper dieser Neurone liegen in den somatosensorischen Ganglien: den dorsalen Spinalganglien (engl. **Dorsal root ganglia**, DRG), im Ganglion trigeminale und dem Ganglion jugulare⁹².

1.4.1 Der TRPV1-Rezeptor

Mit Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-*trans*-6-nonenamid, Abbildung 1-4A) war eine natürliche exogene Aktivatorsubstanz lange vor der Identifikation der entsprechenden Rezeptoren oder endogener Liganden bekannt und in klinischer Anwendung⁹³. Catarina et al.⁹⁴ charakterisierte 1997 diesen capsaicinsensitiven Membranrezeptor, der mittlerweile strukturell und funktionell der großen Familie der transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle (TRP) zugeordnet wird. Die Kanäle dieser Proteinfamilie bestehen alle aus sechs Transmembrandomänen (TM), einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6 und je einem zytosolischen N- und C-terminalen Ende (Abbildung 1-4B). Innerhalb dieser Familie gehört der TRPV1-Rezeptor dem Vanilloid-Rezeptor Subtyp1 an und wird deshalb kurz als TRPV1 bezeichnet.

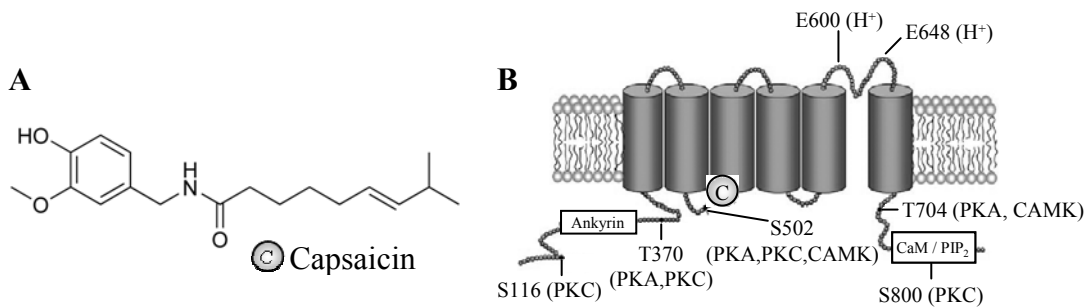


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des TRPV1 Kanals und seines Agonisten Capsaicin. **A)** Strukturformel von Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-*trans*-6-nonenamid). **B)** Darstellung des TRPV1 Moleküls mit Hervorhebung funktionaler Aminosäuren: Phosphorylierungsstellen (S116, T370, S502, T704; S800), sowie Bindungen für Protonen (E600, E646). Capsaicinbindungsstelle ist mit einem „C“ markiert. Carboxyterminale Domäne interagiert mit Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) und Calmodulin. N-terminal befindet sich die Ankyrinomäne (aus Messeguer et al. 2006⁹⁵).

Capsaicin wirkt an nozizeptiven C- und A δ -Faser-Neuronen als exogene Aktivatorsubstanz, die zu einer Öffnung dieses nicht-selektiven, aber eine Präferenz für Calcium zeigenden Kationenkanals TRPV1 führt. Abhängig von Zeit und Agonisten steigt die Permeabilität größerer Kationen aufgrund einer Weitung der Pore⁹⁶. Die resultierende Depolarisation der Neurone führt einerseits zur Auslösung von Aktionspotentialen, die afferent dem Zentralnervensystem zugeleitet werden, andererseits bewirkt sie auch in der Peripherie die Freisetzung verschiedener vasoaktiver Neuropeptide (z.B. Substanz P, CGRP, Neurokinin A). Die Freisetzung der Neuropeptide hat eine Vielzahl von physiologischen Effekten zur Folge wie z.B. Vasodilatation, Plasmaextravasation und Aktivierung nicht-neuronaler Zellen wie Mastzellen und Granulozyten, die dann ihrerseits (Entzündungs-) Mediatoren freisetzen^{93, 97}. Weiterhin wird TRPV1 durch noxische Temperaturen oberhalb von

43°C aktiviert und stellt so ein polymodales Molekül für physikalische und chemische Reize dar⁹⁸.

Direkte wie indirekte Mechanismen können zu einer Sensibilisierung von TRPV1 führen. Eine direkte sensibilisierende Wirkung auf diesen Membrankanal besitzen neben Vanilloiden^{99, 100} auch Protonen^{98, 101}, ATP¹⁰² und Arachidonsäurederivate¹⁰³⁻¹⁰⁶. Von besonderer physiologischer Relevanz ist die indirekte Modulation von TRPV1. Dabei vermitteln viele inflammatorische Substanzen, wie Bradykinin, Prostaglandine, Glutamat, Chemokine und ATP eine Sensibilisierung von TRPV1. Sie binden an G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), was über die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) zu Phosphorylierungen von TRPV1 führt^{107, 108}. Daneben kann TRPV1, beispielsweise vermittelt über NGF oder Insulin, durch die Tyrosinkinase Src phosphoryliert und zur Plasmamembran rekrutiert werden^{109, 110}. Im Rahmen von Entzündungen oder bei chronischen und neuropathischen Schmerzsyndromen werden jedoch nicht nur die Funktion, sondern auch das Expressionsniveau und das Verteilungsmuster von TRPV1 verändert^{86, 111}. Eine essentielle Funktion für TRPV1 bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie (erhöhte Schmerzempfindlichkeit für thermische Reize) konnte Davis et al. mit Hilfe von TRPV1-defizienten Mäusen zeigen¹¹².

Eine weitere typische Eigenschaft des TRPV1-Membrankanals ist seine ausgeprägte Inaktivierung während konstanter Reizung oder wiederholter Stimulierung (Desensibilisierung). Der physiologische Zweck liegt hierbei sehr wahrscheinlich in einem negativen Rückkopplungsmechanismus, der die betreffenden Neurone vor Schaden bewahrt⁹⁴.

1.4.2 Desensibilisierung und Internalisierung von TRPV1

Zelluläre Abläufe, im Speziellen neuronale Aktivitäten, sind das Ergebnis eines vielseitigen Zusammenspiels zwischen Membranrezeptoren an der Zelloberfläche und intrazellulären Signalmolekülen. Membranproteine übermitteln externe Signale in zelluläre Antworten durch das direkte oder indirekte Aktivieren von zytosolischen Signalwegen. Der Aktivierungsstatus, sowie die räumliche und zeitliche Anordnung von Rezeptoren an der Zelloberfläche spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Eine konstante Reizung oder wiederholte Stimulierung (Tachyphylaxie) mit Capsaicin induziert eine Desensibilisierung von TRPV1. Dieser Vorgang ist ein komplexer

Prozess, der in Abhängigkeit von Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen^{94, 98, 113} und durch Calmodulin vermittelt wird^{114, 115}. Dabei interagiert Calmodulin calciumabhängig, zumindest *in vitro*, mit der N-terminal gelegenen Ankyrindomäne von TRPV1^{114, 116} und calciumunabhängig mit der C-terminalen Region¹¹⁵. Weitere desensibilisierende Faktoren sind das Membranpotential^{117, 118}, Phosphatidylinositol-4,5,-bisphosphat (PIP2)¹⁰⁸, Calcineurin¹¹⁹⁻¹²¹ und Adenosin¹²². Auch können kurzzeitige Modifikationen der Synapsenfunktion durch die Veränderung der Rezeptorzahl an der Plasmamembran erreicht werden. Dieser Regulationstyp enthält eine langsamere Komponente, welche die Synthese neuer Proteine oder die Degradationsrate bestehender Proteine beinhaltet und eine schnellere Komponente, die durch einen intrazellulären Pool von einsatzbereiten Proteinen eine schnelle Änderung der Oberflächenproteine realisieren kann. Diese Proteinreserve befindet sich in Endosomen, die durch konstitutive Endozytose bzw. Internalisierung der Oberflächenproteine gebildet werden. Die Anzahl an intrazellulären Proteinen richtet sich nach der relativen Rate der Endo- und Exozytose (Abbildung 1-5).

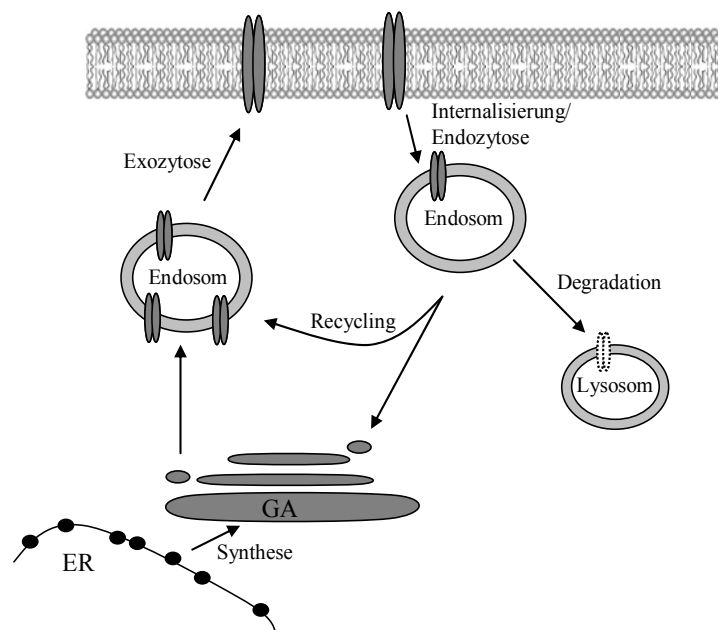


Abbildung 1-5: Schema der endo- und exozytotischen Vorgänge von Transmembranproteinen. Die Anzahl an Transmembranproteinen wie z.B. TRPV1 in der Plasmamembran richtet sich u.a. nach der relativen Rate der Endo- und Exozytose. Durch Exozytose werden die neu synthetisierten Proteine vom Golgi-Apparat oder aus einer intrazellulären Reserve in Endosomen zur Plasmamembran transloziert. Diese Reserve wird durch konstitutive Endozytose bzw. Internalisierung der Oberflächenproteine gebildet und kann auch zum Abbau der Proteine in Lysosomen führen. ER, Endoplasmatisches Retikulum; GA, Golgi Apparat

Transmembranproteine werden durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, während die Insertion in die Plasmamembran durch SNARE-Proteine (soluble NSF attachment receptor) auf Seiten der Vesikel und der Zielmembran vermittelt wird¹²³. Es wurden zwei Interaktionspartner von TRPV1, Snapin und Synaptotagmin IX gefunden, die calciumabhängig die neuronale SNARE-vermittelte Exozytose modulieren¹²⁴. Ebenso kann die Phosphorylierung an Serin 800 (S800) durch die PKCε die Sensitivität von desensibilisierten bzw. internalisierten TRPV1 wieder erhöhen¹²⁵. Hingegen ist bisher über den Mechanismus der Endozytose von TRPV1 nichts bekannt. Diese Interaktionen sind entscheidend für die Rezeptorenzahl an der Plasmamembran als Erwiderung auf die Aktivierung intrazellulärer Signalwege und Entzündungsfaktoren^{110, 124, 126}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der enormen Größe und der Vielzahl von potentiellen Proteinbindungsstellen hat PAM das Potential, in vielen regulatorischen und physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle zu spielen. Bisherige Arbeiten gingen hauptsächlich den Weg einer deskriptiven Untersuchung PAM-orthologer Proteine in defizienten Organismen. Die Untersuchung von PAM in Säugetieren gestaltet sich allerdings schwierig, da ein konstitutiver Knockout in Mäusen zu einer fehlerhaften Formation der Nervenendigungen an der motorischen Endplatte und durch Lungenfehlfunktionen zum Tode bei der Geburt führt^{30, 31}. Deshalb sollten in dieser Arbeit konditionale PAM-Knockout Mäuse generiert und charakterisiert werden. Dazu sollte ein neuronenspezifischer PAM-Knockout Mausstamm generiert werden, um die Funktionen von PAM im Hinblick auf die Nozizeption zu untersuchen. Eine Rolle von PAM in nozizeptiven Vorgängen wurde schon früh vermutet. Erste Hinweise kamen sowohl von Arbeiten an orthologen Proteinen, die sich vorwiegend mit synaptischer Plastizität und Neuritenwachstum beschäftigten^{23, 25, 30, 31}, als auch durch die Hemmbarkeit der Adenylzyklase durch PAM³⁶. Tatsächlich konnte eine Beteiligung an der spinalen Schmerzverarbeitung bereits gezeigt werden¹⁹, so dass in dieser Arbeit die Untersuchung der Rolle von PAM im Hinblick auf nozizeptive Sensibilisierungsmechanismen in der Peripherie im Vordergrund steht.

Vorarbeiten zeigen, dass PAM den für einige Ausprägungen der synaptischen Plastizität essentiellen mTOR Signalweg⁵⁸⁻⁶⁰ durch Abbau des mTOR-Inhibitors TSC2 aktivieren kann^{3, 4, 127}. Da weiterhin Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sowohl PAM als auch mTOR aktiviert³⁷, soll mit PAM-defizienten Neuronen der dorsalen Spinalganglien (engl. **Dorsal root ganglia, DRG**) zunächst eine S1P-induzierte und PAM-abhängige Aktivierung des mTOR Signalweges untersucht werden.

Aus Arbeiten mit PAM-Orthologen in *Drosophila* und *C.elegans* ist mit dem p38 MAPK Signalweg ein weiterer intrazellulärer Mechanismus zur Regulation des Neuritenwachstums und der Struktur und Funktion von Synapsen bekannt^{27, 29}. Da p38 MAPK den für die Schmerzerkennung wichtigen Ionenkanal TRPV1 in peripheren sensorischen Neuronen moduliert^{86, 128}, soll auch dieser Signalweg auf eine mögliche Rolle von PAM bei der peripheren Sensibilisierung hin untersucht werden.

2 Material und Methode

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden allgemeine Chemikalien von Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder von Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze) bezogen.

2.2 Stammlösungen und Puffer

Bakterien Lysispuffer	50 mM Tris pH 7.4; 2.5 mM DTT; 0,2 mg/ml; Lysozym; 1 mM PMSF; 40 µg/ml Trypsininhibitor
Bakterienmedium	10 g/l Trypton (BD, Heidelberg); 5 g/l Hefeextrakt (BD, Heidelberg); 10 g/l NaCl
Boratpuffer (pH 8,0)	50 mM Borsäure; 23,6 mM Borax
Coomassie Entfärbelösung	10% Methanol; 5% Eisessig
Coomassie Färbelösung	40% Methanol; 0, 2% Coomassie brilliant blue
DNA-Ladepuffer (6x)	60% Glycerol; 0, 25% Xylencyanol in TE-Puffer
DNase Puffer	50 mM Tris pH 7.4; 10 mM MgCl ₂ ; 3 units /ml; DNase I; 0,5% Tween 20
Diethylpyrocarbonat-H₂O(DEPC-H₂O)	0,2% DEPC (v/v) in A.dest bei 37° C über Nacht rühren und anschließend autoklavieren
HeLa-Lysispuffer	50 mM Tris, pH 7,4 ; 30 µg/µl Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin ; 1 mM PMSF ; 5 µg/ml Aprotinin ; 0,5 mM DTT
6x Laemmli-Puffer	100 mM Tris, pH 7,4; 8% SDS; 10% β-Mercaptoethanol; 40% Glycerin; 0,1% Bromphenol-blau
6x Phospho Laemmli-Puffer	50 mM Tris, pH 7,8 ;100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 5 mM EDTA ; 5 mM NaPyrophosphat; 10 mM NaF 5 mM aktiviertes Na-orthovanadat (NaVo); 20 mM Imidazol; 1x Lämmli-Puffer; DTT
Ponceau Färbelösung	0, 5% w/v Ponceau S; 3% Eisessig
Ringerlösung (Calcium Imaging)	145 mM NaCl; 1,25 mM CaCl ₂ *2 H ₂ O; 1 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O; 5 mM KCl; 10 mM D-Glukose; 10 mM HEPES; pH 7,3
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris pH 8.3; 200 mM Glyzin; 0, 1% (w/v) SDS
SDS PAGE Transferpuffer	50 mM Tris pH 8.3; 190 mM Glyzin; 20% (v/v) Methanol

Strippingpuffer	50 mM Tris, pH 7,8; 2% SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol
TAE-Puffer	4,84 g/l Tris; 1,1 ml/l Essigsäure; 744 mg/l Na ₂ EDTA (pH= 8,0)
TE-Puffer	50 mM Tris; 0,5 mM EDTA
TN-Puffer	50 mM Tris pH 7.4; 100 mM NaCl
TNT-Puffer	50 mM Tris pH 7.4; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20
Aktivierung von Natrium Orthovanadat	Um die inhibitorische Potenz von Vanadat auf Phosphasen zu verstärken, kann es durch Aufkochen mit HCL depolymerisiert werden. Dazu wurde 200 mM Vanadat auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Je höher der Anteil an polymerisiertem Vanadat ist, desto intensiver gestaltet sich die Gelbfärbung bei pH 10. Die Lösung wurde anschließend abwechselnd erhitzt und mit HCL adjustiert, bis sie auch bei pH 10 farblos blieb.

2.3 Versuchstiere

Um konditionale Knockout Mäuse zu generieren, wurde das *Pam* Gen so mutiert, dass es Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase enthält. Dazu wurde von der Firma GenOway (Lyon, Frankreich) das Exon 11 (Nummerierung richtet sich nach dem NCBI Eintrag NM_207215) mittels homologer Rekombination so modifiziert, dass es von zwei *loxP* Seiten (5' ATAACTTCGTATA atgtatgc TATACGAAGTTAT 3') flankiert wird. Exon 11 codiert für 13 Aminosäuren N-terminal der RCC1-ähnlichen Domäne (Abbildung 2-1). Diese konservierte Domäne ist essentiell für die Funktionsfähigkeit von PAM^{31, 36, 90}.

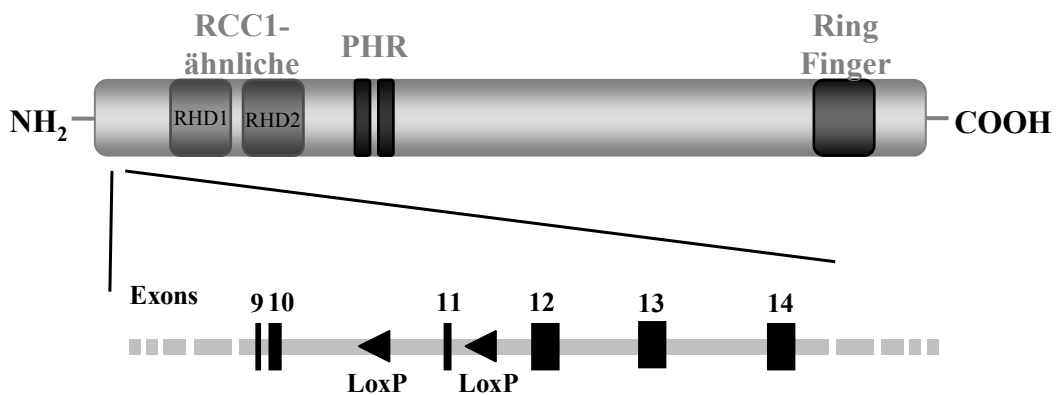


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Proteins PAM mit eingefügten *LoxP* Seiten. *LoxP* Seiten wurden beiderseits des Exon 11, das sich 13 Aminosäuren N-terminal der RCC1-ähnlichen Domäne befindet, eingefügt. RCC1, Regulator of Chromatine Condensation 1; RHD, RCC1-homology-domain PHR, PAM-Highwire-Rpm-1; RING, Really Interesting New Gene.

Durch die Orientierung in gleicher Richtung kommt es bei einer Bindung der Cre-Rekombinase an die *LoxP* Seiten zu einer Exzision des flankierten DNA-Abschnitts. In diesem Fall verursacht die Deletion des Exons 11 einen Shift im „open reading frame“. Dieses resultiert in einem vorzeitigem *Stop* Codon nach der Translation von 23 Aminosäuren. Um mit dieser Methode gewebspezifische PAM Knockout Mäuse zu erhalten, wurden die von GenOway generierten Mäuse mit der Nestin-Cre Linie B6Cg-Tg (*Nes-cre*)1Kln/J¹²⁹ oder der Mauslinie SNS-Cre¹³⁰ gekreuzt. Eine Deletion des Exons 11 wurde mittels PCR und Sequenzierung nachgewiesen (siehe Abbildung 3-2). Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22 ± 0,5° C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr). Sie erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt.

2.4 Molekulargenetische Methoden/ Genotypisierung

2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

Um transformierbare Bakterien zu erhalten wurde eine stationäre Kultur des jeweiligen *E. coli* Stammes 1:100 in 250 ml Bakterienmedium verdünnt und bei 37° C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde für 30 Minuten auf Eis platziert, bei 4000x g und 4° C für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 20 ml 0,1 M CaCl₂ vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet wieder in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauffolgend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml 15% Glycerin/0,1 M CaCl₂ aufgenommen. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.4.2 Transformation von *E.coli* Bakterien

Um Proteine überexprimieren und sie anschließend aufzureinigen zu können, muss die codierende DNA in Form von Plasmiden in Bakterien transformiert werden.

Für die Überexpression der Rheb Mutanten Q64L und D60K (Plasmide freundlicherweise überlassen von Dr. S. Pierre) wurden chemisch kompetente *E.coli* Zellen (siehe 2.4.1) auf Eis aufgetaut und mit den zu transfizierenden Plasmiden (~10 ng) vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein sogenannter „Hitzeschock“. Dazu inkubiert man die Bakterien für 60 Sekunden bei 42° C. Nach

kurzer Abkühlung auf Eis wurden 800 µl Bakterienmedium hinzugegeben und der gesamte Ansatz 45 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000x g und Raumtemperatur aufkonzentriert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen.

2.4.3 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mittels des Peqlab MiniPrep Kit (peqlab, Erlangen) nach Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch mit einem Biowave S2100 Spectrophotometer (WPA, Cambridge, UK) bei 260 nm bestimmt.

2.4.4 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde mit dem REExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis, USA) aus Mäuseschwänzen, embryonalen Gewebe, Rückenmark und Dorsalganglien nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

2.4.5 Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

RNA wurde aus Dorsalganglien und embryonalem Gewebe mit dem RNeasy® MicroKit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit einem Biowave S2100 Spectrophotometer (WPA, Cambridge, UK) bei 260 nm bestimmt.

Zur cDNA-Synthese wurden 2-3 µg der isolierten RNA verwendet. Zu dieser wurde 1 µl Primer (10 µM; 5'-CCTTCCCTCCTGGTTCAT-3') hinzugefügt und mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 15 µl gebracht. Zur Destabilisierung der Sekundärstrukturen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 70° C inkubiert und anschließend wieder auf 4° C heruntergekühlt. Danach wurden 15 µl des reversen Transkriptase-Mixes (s.u.) hinzugefügt und der gesamte Ansatz für 1h bei 37° C inkubiert.

Reverse Transkriptase-Mix :

6 µl 5x RT-Polymerase Puffer (Promega, Madison, USA)

1 µl dNTPs, 10 mM (Invitrogen, Karlsruhe)

1 µl RiboLockTM RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot)

1 µl RT-Polymerase (Promega, Madison, USA)

ad 15 µl DEPC-H₂O

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR)

Für die Genotypisierung wurden Abschnitte der DNA (Isolierung der genomischen DNA siehe 2.4.4) bzw. cDNA (siehe 2.4.5) mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dazu wurden Primer von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit denen in Tabelle 1 angegebenen Sequenzen bezogen. Die erwarteten Fragmentgrößen nach der Vervielfältigung der DNA-Abschnitten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

Primer Nr.	Sequenz (5' - 3')
290	TGCCAAGAGGGTGCTAGGAATTGAACC
291	TTAGCGCAAATTCTCGTCCTGCACC
294	GCAAGGGATATCTGCAGTTGGACACC
295	GGAACCTCGAGTAGCCATATTGGCTAGC
296	GAAAGCAGCCATGTCCAATTTACTGACCGTAC
297	GCGCGCCTGAAGATATAGAAGA
311	GAGACACTGGAACAGGA
337	CCATCTTCTCCTTTGCTTGC

a) Vervielfältigung von cDNA-Abschnitten

typischer PCR-Ansatz:

PCR-Programm:

0,5 µg	cDNA (aus 2.4.5)	95° C 5 Min.	} 34x
2 µl	10x Taq-Puffer	95° C 30s	
0,5 µM	dNTPs	54° C 30s	
(Invitrogen, Karlsruhe)		72° C 45s	
0,5 µM	forward-Primer 311	72° C 5 Min..	
0,5 µM	reverse-Primer 337	4° C Ende	
0,3 µl	Taq-DNA-Polymerase		
(Peqlab, Erlangen)			
ad 20 µl	A.dest		

b) Vervielfältigung von DNA-Abschnitten:

typischer PCR-Ansatz:

1 µg	DNA (aus 2.4.4)
10 µl	REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix (Sigma, St. Louis, USA)
0,5 µM	dNTPs (Invitrogen, Karlsruhe)
0,4 µM	forward-Primer
0,4 µM	reverse-Primer
ad 20 µl	A.dest

PCR-Programm (Primer 290/291) 95° C 5 Min. 95° C 30s 54° C 30s 72° C 45s 72° C 5 Min.. 4° C Ende	} 34x	PCR-Programm (Primer 294/295) 94° C 2 Min. 94° C 15s 65° C 1 Min. 72° C 2 Min. 72° C 5 Min.. 4° C Ende	} 34x	PCR-Programm (Primer 296/297) 94° C 5 Min. 94° C 45s 55° C 45s 72° C 1 Min.. 72° C 5 Min.. 4° C Ende	} 34x
---	-------	---	-------	---	-------

Tabelle 2: Erwartete Fragmentgrößen nach der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten.

Primerpaar (Gen)	Wildtyp	Knockout	Knockout (mit erfolgter Deletion)
290/291 (PAM)	530 bp	642 bp	---
294/295 (PAM)	---	2,7 kb	2,1 kb
296/297 (Cre)	200 bp	200 bp	200 bp
311/337 (PAM)	524 bp	447	447

2.4.7 Agarose Gelelektrophorese

Nach jeder PCR wurden die Reaktionsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Agarose (1-2%) wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA) versetzt (Endkonzentration: 0,1 µg/ml). Die Reaktionsprodukte wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und mit Hilfe des EasyCast™ Elektrophorese Systems (Thermo Scientific, Rochester, USA) und TAE-Puffer bei 5 V/cm aufgetrennt. Die aufgetrennte DNA wurde mit UV Licht (365 nm) sichtbar gemacht, digital aufgenommen und mit einem Größenstandard verglichen.

Für eine nachfolgende Sequenzierung der DNA-Fragmente wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem 'Gel Extraction Kit' (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eluiert

2.4.8 Sequenzierung

Eine Sequenzierung der Reaktionsprodukte aus der PCR wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die aus dem Gel aufgereinigten Wildtyp- und Knockoutfragmente mit dem Primer 311 oder 337 sequenziert.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung und Lagerung von Zelllinien

Adhärenz Zelllinien (HeLa und MCF7) wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37° C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit (HeraCell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Kulturschalen variabler Größe kultiviert.

Das Passagieren der Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 1 mM EDTA/ PBS von der Kulturschale gelöst und in einer Verdünnung von 1:5 auf neuen Kulturschalen plattiert. Falls erforderlich wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die langfristige Lagerung von Zelllinien wurden nicht-konfluente Zellen mit 1 mM EDTA/PBS geerntet und deren Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das durch Zentrifugation (1000x g; 5 Minuten, RT) erhaltene Pellet wurde anschließend in Einfriermedium (RPMI 1640; 50% FCS; 20% DMSO) suspendiert (1 Mio Zellen/ml). Jeweils 1ml wurde in ein Kryogefäße überführt und in einer Gefrierkammer mit Isopropanolumgebung sukzessive (1° C/Min.) auf -80° C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße kurz in einem Wasserbad bei 37° C erwärmt, die Zellsuspension in Medium 1:15 verdünnt und auf einer Zellkulturschale (Ø 100 mm) ausplattiert.

2.5.2 Isolierung und Kultivierung primärer Gliazellen

Für eine primäre Gliazellkultur wurden Rückenmäcker von Rattenembryonen (Sprague Dawley) 17 Tage *post coitus* präpariert und in eiskaltem HBSS (Sigma, St Louis, USA) gesammelt. Anschließend wurden sie für 25 Minuten in Trypsin/ EDTA (Sigma, St Louis, USA) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10% FCS/Neurobasal Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) erfolgte eine 30 minütige Inkubation in Neurobasal Medium, welches 500 U/ml Kollagenase (Biochrome AG, Berlin, Germany) enthält. Das verdaute Gewebe wurde danach zweimal mit 10% FCS/Neurobasalmedium gewaschen und abschließend in Neurobasalmedium, welchem 2 mM L-Glutamin, 0,1% Gentamycin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, sowie B27 Supplement zugefügt wurde, aufgenommen und auf unbeschichtete Kulturgefäße ausplattiert. Nach 2-4 Stunden wurde das Medium auf RPMI 1640 mit 10% FCS und den Antibiotika

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) umgestellt. Um zu gewährleisten, dass sich keine Neurone in der Kultur befinden, wurde diese vor der Stimulierung 2-3x passagiert. Die Stimulierung erfolgte sodann in serumfreiem Medium (RPMI 1640).

2.5.3 Isolierung primär embryonaler Fibroblasten

Für die Isolierung und Kultivierung embryonaler Fibroblasten wurden Mausembryonen (C57BL/6, Charles River, Wiga) 17 Tage *post coitus* von Kopf und Organen befreit und in eiskaltem HBSS (Sigma, St Louis, USA) gesammelt. Anschließend wurden die Embryonen grob mit einem Skalpell zerkleinert und in 10 ml Trypsin/EDTA (Sigma, St Louis, USA) für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Darauffolgend wurde das Gewebe nochmals durch auf- und abpipettieren zerkleinert. Durch Zugabe von Medium (DMEM Glutamax I), welches 10% FCS und 100 U/ml Penicillin, sowie 100 µg/ml Streptomycin enthielt, wurde die Aktivität von Trypsin gehemmt. Nachdem sich das Gewebe abgesetzt hatte, wurde der Überstand in eine neues Zentrifugationsgefäß überführt und bei 1000x g für 4 Minuten bei RT zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde wieder in Medium aufgenommen und auf eine Kulturschale (Ø 150 mm) ausplattiert. Nach 2-4 Stunden wurde das Medium gewechselt um Gewebereste und nicht adhärenente Zellen zu entfernen.

Das Passagieren der Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 1 mM Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und in einer Verdünnung von 1:5 auf neuen Kulturschalen plattiert. Sollte eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden, wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Auch wurde ein Teil der Zellen wie in 2.5.1 beschrieben langfristig gelagert und konnte für später nachfolgende Experimente verwendet werden.

2.5.4 Isolierung und Kultivierung primärer Neurone aus Dorsalganglien

Zur Zellgewinnung von Neuronen aus Dorsalganglien wurden 20-30 Dorsalganglien pro Maus (generierte SNSCre-Mäuse, 2.3) herauspräpariert und in eiskaltem HBSS (Sigma, St Louis, USA) gesammelt. Anschließend wurden sie in Neurobasal Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), welches 500 U/ml Kollagenase (Biochrome AG, Berlin, Germany) und 2,5 U/ml Dispase II (Roche, Mannheim, Germany) enthält, 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Das gelöste Gewebe wurde danach zweimal mit 10% FCS/Neurobasalmedium und einmal mit HBSS gewaschen. Anschließend erfolgte eine

zehnminütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (Sigma, St Louis, USA) und darauffolgend erneut ein Waschschrift mit 10% FCS/Neurobasalmedium. Abschließend wurden die Zellen in Neurobasalmedium (+Glutamin, +Gentamycin, +P/S, +B27) aufgenommen und je 50 µl auf Poly-L-Lysin (Sigma, St Louis, USA) beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Die Beschichtung erfolgte am Vortag. Dazu wurden die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (1 mg/ml Boratpuffer) bedeckt und so für mindestens 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und nach dem Trocknen bei 4° C bis zum nächsten Tag aufbewahrt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten

Adhärente Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und direkt mit 100° C warmen Phospholämmlis lysiert. Um die Lyse sicherzustellen erfolgte eine Ultraschallbehandlung (3x 10 s, Pulse 7; 60% Leistung, Sonoplus Bandelin, Berlin). Anschließend wurden die Proben 5 Minuten gekocht, um die genomische DNA zu zerstören und die Proteine vollständig zu denaturieren. Bis zur SDS-PAGE wurden die Proben bei -80° C aufbewahrt.

Gewebsproben wurden direkt nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Zell-Lysispuffer oder in Phospholämmlis mittels Potter und Ultraschall (3x 10 s, Pulse 7; 60% Leistung, Sonoplus Bandelin, Berlin) homogenisiert. Gewebs- und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (10 Minuten) bei 4° C und 12000x g pelletiert und der Proteinüberstand abgenommen.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad, München) bestimmt (190 µl Bradford Reagenz auf 10 µl Probe bzw. BSA-Standard). Die Messung der Absorption erfolgte 5 Minuten nach Zugabe des Bradfordreagenz zur Proteinprobe in einem „Microplate-Reader“ Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz wurde eine Eichreihe mit BSA verwendet.

Um die Proteinkonzentration in Lämmlislysaten bestimmen zu können, muss vor der Absorptionsmessung eine Fällung durchgeführt werden. Dazu wird die Proteineichreihe ebenfalls mit Lämmlis versetzt um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Proben,

wie auch die Eichreihe werden mit 100 mM K_2PO_4 -Puffer, pH 7,2 versetzt. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitates kann in dem Überstand die Proteinkonzentration wie oben beschrieben bestimmt werden.

2.6.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinanalyse mittels Western Blot wurden Zellen in kochendem 1x Lämmli geerntet oder Lysate (siehe 2.6.1) mit einer entsprechenden Menge an 6x Lämmli versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 100° C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS PAGE. Nach dem Gießen des Trenngels (7%-15% Acrylamid) und Sammelgels (4%) wurden jeweils 15-30 µg Protein, sowie ein Molekulargewichtsmarker (PepLab Erlangen) aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 10-20 V/cm für 90 Minuten in Laufpuffer durchgeführt.

Anschließend konnten die so aufgetrennten Proteine durch eine Coomassie Färbung (2.6.4) sichtbar gemacht oder einzelne Proteine durch die Western Blot Analyse (2.7.2) nachgewiesen werden.

2.6.4 Coomassie Färbung von Proteingelen

Sollten die aufgetrennten Proteine komplett visualisiert werden, wurde das Polyacrylamid Gel nach der Elektrophorese für 5 Minuten bei RT in Coomassie Färbelösung gefärbt und anschließend durch mehrmaliges Waschen in Entfärbelösung entfärbt und digital dokumentiert.

2.6.5 Aufreinigung von PAM aus HeLa Zellen mittels FPLC

Natives PAM wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von Scholich et al.⁸ aus HeLa Zellen mittels 'Fast Protein Liquid Chromatography' (FPLC) aufgereinigt. Die Zellen wurden von konfluenten Schalen mit 1 mM EDTA/PBS geerntet und die Pellets bei -80° C gelagert. Für die Aufreinigung wurde das Pellet von circa 50 konfluenten Schalen in 10 ml HeLa-Lysispuffer aufgenommen und die Zellen durch Ultraschall (3x 10s 50% Leistung; Sonoplus Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 18000x g und 4° C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R), der Überstand abgenommen, das Pellet erneut in 10 ml Lysispuffer suspendiert und sonifiziert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 5x wiederholt. Der gesammelte Überstand wurde danach auf eine mit Tris-NaCl Puffer (50 mM Tris pH 7.4 9 mM NaCl) voräquilibrierte DEAE Sepharose-Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen und die gebundenen Proteine mit einem steigenden NaCl Gradienten (9 mM–60 mM in 50 mM

Tris-HCl, pH 7.4 in 45 Minuten, Flussrate 2ml/Min.) eluiert. PAM positive Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (2.6.3) und anschließender Coomassiefärbung (2.6.4) identifiziert, vereinigt und mit 4 M NaCl auf 1,9 M NaCl eingestellt. Die Lösung wurde auf eine mit 1,9 M NaCl-50 mM Tris, pH 7.4 äquilibrierte Phenylsepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen und gebundene Proteine durch stufenweises Absenken der NaCl-Konzentration auf 1,3 M–0,6 M–0 M NaCl eluiert. Die PAM enthaltenden Fraktionen wurden mit Vivaspin 100 kDa (Sartorius, Göttingen) Filtrationsröhrchen auf ca. 1ml aufkonzentriert und über Nacht bei -80° C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde die Proteinlösung auf 2 ml 50 mM Tris aufgefüllt, um den NaCl Gehalt zu verringern. Die Probe wurde dann anschließend auf eine mit 50 mM Tris, pH 7,4 und 150 mM NaCl über Nacht voräquilibrierte Gelfiltrationssäule Super Dex (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) geladen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/Min. Die PAM positiven Fraktionen wurde erneut mit Vivaspin 100 kDa Filtrationsröhrchen auf ein Volumen von 50 µl konzentriert, aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.6.6 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Plasmide der zu exprimierenden Rhebmutanten wurden per Hitzeschock in chemisch kompetente *E.coli* BL21 Zellen transformiert (siehe auch 2.4.1 und 2.4.2). Transformierte Kolonien wurden über Nacht in Selektionsmedium (Bakterienmedium + 40 mg/ml Ampicillin) inkubiert. Diese Starterkultur wurde 1:100 in Selektionsmedium verdünnt und bei 30° C bis zur einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 angezogen. Durch Zugabe von 100 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die Proteinexpression gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurden die Bakterien pelletiert und bis zur Proteinaufreinigung bei -80° C aufbewahrt.

Zur Proteinaufreinigung wurden dann die Bakterienpellets in dreifachem Pelletvolumen Bakterien Lysispuffer suspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Sonifikation für 3x 10 Sekunden wurde das Lysat für 10 Minuten zentrifugiert (18000x g; 4° C). Der so erhaltene Überstand wurde mit DNase Puffer versetzt und für 60 Minuten bei 4° C zusammen mit 2 ml GST-Bind Resin (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend in Chromatographiesäulen (Poly Prep Biorad, München) überführt und nacheinander mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂-ATP; 1 mM DTT) gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM

Tris, pH 8; 10 mM reduziertes Glutathion). Das so gewonnene Eluat wurde mit Vivaspin 10kDA (Vivascience, Stockhouse Großbritannien) Filtrationsröhrchen auf 50 μ L Volumen konzentriert und 4mal mit 500 μ l 50 mM Tris pH 8; 1 mM DTT gewaschen. Das erhaltene Rheb oder Mutanten dessen wurden danach aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.6.7 Proteintransfektion und Stimulierung von Zelllinien

Die Proteintransfektion mittels des BioPorter Reagenz (Gene Therapy Systems, San Diego USA) ist eine lipidbasierte Methode, um Peptide in das Zytosol von Zellen zu translozieren. Die Lipid-Protein-Komplexe verschmelzen mit der Zellmembran und setzen das Protein im Zytosol frei. Für die Versuche wurden 150.000 HeLa oder MCF7 Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm ausplattiert und nach 24 Stunden für weitere 16 Stunden in serumfreien Medium ohne Antibiotika inkubiert. Jeweils 175 μ l der jeweiligen Proteinlösung (100 μ g/ml GST-Rhebmutanten oder 50 μ g/ml PAM jeweils in 10 mM Tris-HCL, pH 7,4) wurden zur Rehydrierung von 10 μ L BioPorter Reagenz verwendet. Die Ansätze wurden für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 800 μ l serumfreiem Medium gemischt. Dieser Ansatz wurde für 4 Stunden auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen behandelt. Dazu wurden die Zellen mit 0,5 μ M S1P für 30 Min. stimuliert und anschließend durch die Zugabe von heißem 1x Lämmli geerntet. Bei zusätzlicher Verwendung von Rapamycin wurden die Zellen vor der S1P Behandlung für 30 Min. mit 100 mM des mTOR Inhibitors vorinkubiert, dieser verblieb während der S1P Stimulierung im Medium.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Antikörper Microarray

Der Microarray diente dem Auffinden möglicher über- oder unterexprimierter Proteine in PAM-defizienten Dorsalganglien im Vergleich zu SNSCre-negativen Mäusen.

Dazu wurden jeweils 30 mg Dorsalganglien von 7-8 verschiedenen Individuen präpariert und gepoolt. Die nachfolgenden Schritte wurden von MicroBioChips (Paris, Frankreich) durchgeführt. Gesamtprotein wurde extrahiert und je 160 μ g mit Cy5 markiert. Zur Detektion von 725 Proteinen wurde der Antikörper „Microarray“ Panorama XP725 von Sigma (St. Louis, USA) benutzt. Die Fluoreszenz wurde mittels

des Innoscan700 Fluoreszenz MicroArray Scanner (Innoscan 700–Innopsys™) detektiert. Die so aufgenommenen Bilder (siehe auch Abbildung 3-23) wurden durch die Software Mapix© (Vers.2.8.2) bearbeitet. Der Hintergrund war niedrig und gleichmäßig. Auch befanden sich die Negativkontrollen auf dem Niveau des Hintergrundes. Positivkontrollen zeigten ein nahezu gesättigtes Signal. Interessante Proteine wurden ausgewählt und der Proteingehalt mittels Immunblot Analyse (2.7.2) validiert.

2.7.2 Western Blot Analyse (Immunblot)

Einzelne Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (2.6.3) durch Elektrotransfer in einer 'Wet-Blotting' Apparatur (BioRad, München) bei konstanter Spannung von 100 V für 75 Minuten oder 15 V für 16 Stunden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde anschließend für 1 Stunde in TN Puffer mit 5% Milchpulver oder 3% BSA blockiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu minimieren.

Der für das Zielprotein spezifische Primärantikörper wurde wie in Tabelle 3 verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder 12 Stunden bei 4° C zusammen mit der Membran in Polyvinyl Folie eingeschweißt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten in TNT folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000 in TNT). Ungebundener Antikörper wurde durch 5maliges waschen mit TNT entfernt und die Membran mit dem Western Lightning™ Plus Chemilumineszenz Substrat (Perkin Elmar, MA, USA) 2 Minuten inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mittels Exposition gegen einen Röntgenfilm. Um die Ergebnisse eines Westernblots zu validieren, wurde jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt. Sollte eine Membran noch auf ein anderes Protein untersucht werden, so wurde sie zunächst für 30 Minuten in 50° C warmen Strippingpuffer inkubiert und in TN Puffer gewaschen bevor ein erneuter Western Blot durchgeführt wurde.

Tabelle 3: Verdünnungen der eingesetzten Antikörper im Western Blot (Immunblot).

BSA= Rinderserumalbumin; MP= Milchpulver; (K)= Sekundärantikörper gewonnen aus Kaninchen; (M)= Sekundärantikörper gewonnen aus Mäusen

Primär-antikörper	Firma, Katalognummer	Verdünnung (in TNT+0,01% NaAzid)	Sekundär-antikörper (1:5000 in TNT)
APP (n-terminal)	Sigma, A8967	1:500 / 5% BSA	3% MP (K)
Creb-phospho	Cell Signaling, 9191	1:500 / 5% BSA	3% MP (K)
ERK	Santa Cruz, sc1647	1:1000 / 3% BSA	3% MP (M)
GAPDH	Ambion, 4300	1:4000 / 1% BSA	1% BSA (M)
GSK3 β	Sigma, G7914	1:2000 / 1% BSA	3% MP (K)
Gst	Sigma, G1160	1:1000 / 3% BSA	3% MP (M)
HSP90	Santa Cruz, sc13119	1:1000 / 3% BSA	1% BSA (M)
mTOR-phospho	Cell Signaling, 2971s	1:750 / 3% BSA	1% BSA (K)
Myosin Va	Sigma, M5062	1:500 / 1% BSA	3% MP (K)
Myosin VI	Sigma, M5187	1:500/1% BSA	3% MP (K)
PAM (44, bleed2)	eigene Herstellung	1:750/3% BSA	1% MP (K)
p38 MAPK	Cell Signaling, 9212	1:1000/5% BSA	3% MP (K)
p38 MAPK- α	Cell Signaling, 9218	1:1000/5% BSA	3% MP (K)
p38 MAPK- γ	Cell Signaling, 2307	1:1000/5% BSA	3% MP (K)
p38 MAPK-phospho	Cell Signaling, 4631	1:1000/5% BSA	3% MP (K)
p70S6K	Cell Signaling, 9202	1:500/3% BSA	3% MP (K)
p70S6K-phospho	Cell Signaling, 9206s	1:500/3% BSA	3% MP (M)
Rab-7	Sigma, R8779	1:2000/1% BSA	3% MP (M)
ROCK2	Sigma, R8653	1: 1000/1% BSA	3% MP (K)
TRPV1	Calbiochem, PC420	1:50/1% BSA	3% MP (K)

2.7.3 Immunhistochemie

Zur Detektion von Proteinen im Rückenmark wurde Lumbalrückenmark präpariert und sofort unfixiert in Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch) eingebettet und eingefroren. 10-15 μ m dünne Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) gebracht und sofort für 10 Minuten in 4% PFA fixiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 0,1% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschen mit PBS

wurde das Gewebe für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 3% BSA/PBS blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern in einer Verdünnung von 1:100 in 1% BSA/PBS für eine Stunde bei 37° C. Darauf folgend wurden die Schnitte mit dem jeweils angegebenen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe in Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) unter einem Deckglas (Marienfeld, Lauda Königshofen) oder einem Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) eingebettet. Die Fluoreszenz wurde mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1 und der Kamera AxioCam unter Zuhilfenahme des Apotomes aufgenommen und dokumentiert

2.7.4 Immunzytochemie

Die Lokalisation von Proteinen innerhalb Neuronen oder HeLa Zellen wurde mittels Immunzytochemie ermittelt. Die zu untersuchenden Dorsalganglienneurone wurden wie in 2.5.4 beschrieben isoliert und auf desinfizierte Deckgläschen (Marienfeld, Lauda Königshofen) für 48 Stunden kultiviert. HeLa Zellen (10.000 Zellen pro Deckgläschen) wurden, wie in 2.5.1 beschrieben, kultiviert und gegebenenfalls wie angegeben stimuliert.

Zur Detektion von Proteinen wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten mit 4% PFA in PBS für 10 Minuten fixiert und danach mit 0,1% Triton X-100 in TNT Puffer permeabilisiert. Sollte nur ein Protein pro Deckgläschen nachgewiesen werden, wurde wie in 2.7.3 beschrieben verfahren.

2.7.4.1 Nachweis von Koloalisationen

Bei dem Nachweis von Koloalisationen mittels zweier in Kaninchen produzierten Antikörper, wurde das 'TSA Fluorescence Sytem' von Perkin Elmar (MA, USA) verwendet. Dazu wurden die Deckgläschen mit 0,5% Blockierungsreagenz in PBS eine Stunde blockiert. Nach 3x Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper über Nacht bei 4° C. Dieser wurde in dem 0,5%igen Blockierungsreagenz stark verdünnt (TRPV1, 1:700) eingesetzt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde dieser Primärantikörper mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Biotin-XX goat anti-rabbit; Invitrogen, Karlsruhe) gekoppelt. Dies erfolgte mittels einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (Myosin Va/VI) jeweils in einer Verdünnung von 1:100 in 0,5%igen Blockierungsreagenz über Nacht bei 4° C. Dieser wurde mit dem

Zweitantikörper anti-rabbit A488 (Verdünnung 1:1000 in PBS; 2 Stunden bei RT) detektiert. Nachfolgend erfolgte eine 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit einer Streptavidin gekoppelten Peroxidase (Verdünnung 1:100 in PBS). Gefolgt wurde dieser Schritt von einer 3 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Amplifikationsreagenz Fluorophore Tyramide unter Verwendung einer Verdünnung von 1:100 in Amplifikationsverdünnungslösung. Alle Reagenzien bis auf die Primärantikörper und der biotinylierte Zweitantikörper stammen aus dem 'TSA Fluorescence' System von Perkin Elmer (MA, USA). Die Fluoreszenz wurde mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1 und der Kamera AxioCam unter zu Hilfenahme des Apotomes aufgenommen und dokumentiert.

Kolokalisationen wurden mittels der Software Image J 1.43m analysiert. Dabei wurden die Werte der Pearson Korrelation (R_p) und des Mander's Kolokalisations-Koeffizienten ermittelt.

2.7.4.2 Nachweis von Rezeptorinternalisierung

Um Rezeptorinternalisierungen nachzuweisen wurden Dorsalganglienneurone wie in 2.5.4 beschrieben isoliert und auf desinfizierte Deckgläschen (Marienfeld, Lauda Königshofen) bis zum nächsten Tag kultiviert. Daraufhin wurden sie in der Perfusionskammer der Calcium Imaging Apparatur zweimal mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Vor, zwischen und nach den Stimulierungen wurden die Zellen mit Puffer inkubiert. Die Waschzeit zwischen den beiden Stimulierungen betrug 12 Minuten. Drei Minuten nach der letzten Stimulierung wurden die Zellen in 4% PFA für 10 Minuten fixiert. Anschließend wie in 2.7.3 permeabilisiert und weiterbehandelt. Dabei wurde ein Antikörper gegen eine extrazelluläre Domäne von TRPV1 (OST00203W, Osenses) mit einer Verdünnung von 1:100 in 1%BSA/ PBS eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte mittels des Mikroskopes Axio Observer.Z1 und der Kamera AxioCam und des Apotomes. Damit konnten optische Schnitte durch die Zellen gemacht werden, wodurch nicht-internalisierte Rezeptoren an der Plasmamembran wie ein Kreis rings um die Zelle erschienen (siehe Abbildung 2-2A). Dabei wurde versucht den mittleren Bereich der Zelle zu treffen. Mittels der Software Image J 1.42q wurden durch jede so aufgenommene Zelle zwei geraden Linien gezogen. Die erste wurde innerhalb der Zelle gezogen ohne den Zellkern und die Plasmamembran zu kreuzen (gestrichelte Linie). Die zweite wurde durch die gesamte Zelle gezogen ohne den Zellkern zu berühren (durchgezogene Linie). Die Software erstellt einen zwei-dimensionalen Graph der Pixelintensitäten entlang dieser Linien (Abbildung 2-2B).

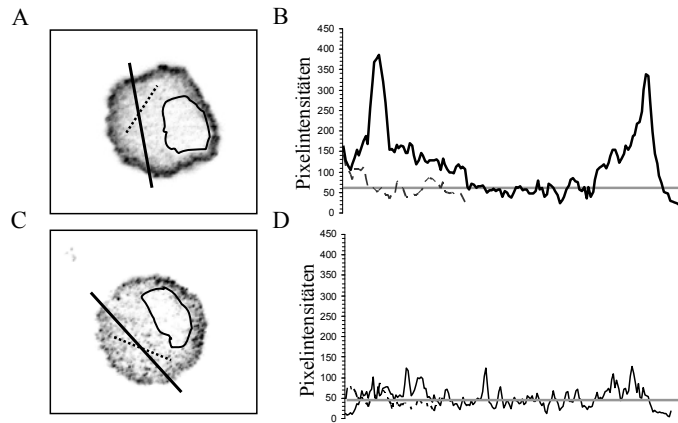


Abbildung 2-2: Auswertung der Rezeptorinternalisierung. A+C) Darstellung einer immunzytologischen TRPV1 Färbung in Falschfarben. Eingetragen sind die Linien zur Bestimmung der mittleren Pixelintensität im Zytoplasma (gestrichelte Linie) und die Linie zur Erhebung des Maximalwertes (durchgezogene Linie). Kernbereich ist umrandet. B+D) Zwei-dimensionaler Graph der Pixelintensitäten entlang der Linien aus (A) und (C). Graue Linie markiert jeweils den mittleren Wert der Signalstärke im Zytoplasma. Rezeptoren der Zelle A+B gelten als nicht-internalisiert, wohingegen TRPV1 der Zelle aus C+D als internalisiert bezeichnet wird.

Die Werte der internen Basislinie wurden jeweils gemittelt und von den jeweiligen Werten der durchgezogenen Linie abgezogen (in dem Beispiel von Abbildung 2-2B als graue durchgezogene Linie dargestellt). War der maximale Wert einer solchen Kurve mehr als das 2,5fache der durchschnittlichen Signalstärke im Zytoplasma unstimulierter Cre-positiver und Cre-negativer Neurone (220), wurden die Rezeptoren der Zellen als nicht-internalisiert deklariert. Rezeptoren von Zellen mit Maximalwerten unterhalb dieser Grenze gelten als internalisiert.

2.7.5 Immunpräzipitation

Für eine Immunpräzipitation wurden zwei 80% konfluente 150 mm Schalen mit HeLa Zellen über Nacht in serumfreiem RPMI 1640 Medium inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Schale mit 1 μ M S1P für 30 Minuten stimuliert und anschließend per Schaber in PBS geerntet und durch Zentrifugation bei 1000x g für 5 Minuten pelletiert. Das resultierende Pellet wurde in 50 μ l IP-Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7,5; 240 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 1% Triton X-100; 5 mM Benzamidin; 1 μ g/ml Trypsininhibitor und 1 mM PMSF) aufgenommen und Zellen durch Inkubation bei 4° C für 60 Minuten aufgeschlossen. Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des NanoDrops 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) festgestellt und auf 1 mg/ml Gesamtprotein mit IP-Lysepuffer verdünnt. Das erhaltene Lysat wurde für 30 Minuten mit 30 μ l A/G plus Agarose (Santa Cruz, CA, USA) versetzt (so genanntes „preclearing“), um unspezifisch an die Matrix bindende Proteine zu entfernen. Nach Entfernen der Agarose durch Zentrifugation (5 Min., 300x g; 4° C) wurden jeweils

800 µl des Überstandes mit 5 µg des Aβ Antikörpers (Sigma, # A8354) versetzt und auf einem Drehrotor bei 4° C über Nacht inkubiert. Parallel dazu wurden auch je 800 µl des Überstandes mit einem Kontrollantikörper KOR1 (SantaCrus, sc9112) versetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 50 µl A/G Agarose für 1 Stunde zu beiden Ansätzen gegeben und die Agarose anschließend durch Zentrifugation bei 300x g sedimentiert. Das Pellet wurde abschließend 3x mit IP-Lysepuffer und 1x mit Tris pH 7,4 gewaschen. Der gesamte Waschschrift erstreckte sich über mindestens 30 Minuten. Anschließend wurde die Agarose durch Zentrifugation bei 4° C und 1000x g für 60 Sekunden pelletiert und abschließend in 20 µl 1x Lämmli Puffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 90° C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand auf einem 7%igen SDS-Gel aufgetrennt und per Western Blot die Proteine PAM und Aβ analysiert.

2.8 Calcium Imaging

Zur Echtzeitbestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM (Biotium, Hayward, USA) als Calciumsensor verwendet. Dieser kann über die Zellmembran in das Zytosol diffundieren und entweicht nach Abspaltung des Esters durch intrazelluläre Esterasen nicht mehr aus der Zelle. Bei diesem Farbstoff erhöht sich bei Bindung von Calcium die Emission nach Anregung mit 340 nm und erniedrigt sich bei Anregung mit 380 nm. Nach Berechnung des Quotienten der beiden Emissionswerte kann die Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration im Zeitverlauf dargestellt werden.

Dorsalganglienneurone wurden wie in 2.5.4 isoliert und über Nacht kultiviert. Die Beladung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 10 µM Fura-2-AM und 1,5 µl/ml Pluronic F-127 (Biotium) in Medium für 30-45 Minuten bei 37° C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in die Perfusionskammer (ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) auf einem Mikroskopstativ Axioskop 2 FS plus (Carl Zeiss Jena) überführt. Die extrazelluläre Lösung (Ringerlösung, siehe 2.2) wurde von 50 ml-Spritzen (Dispomed, Gelnhausen) über einen Infusomat mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1-2 ml/Min. in die Kammer geleitet und am anderen Ende abgesaugt. Zur Stimulierung wurden verschiedene Konzentrationen von Capsaicin mittels Badapplikation auf die Zellen appliziert. Die Anregung der Zellen erfolgte abwechselnd mit 340 nm und 380 nm von einem Polychrom IV

Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing) und wurde mit der Software Tillvision (Till Photonics, Gräfelfing) durch die Interline Transfer CCD Kamera IMAGO Type super-VGA (Till Photonics, Gräfelfing) aufgenommen. Die Kamera machte alle 2 Sekunden eine Aufnahme der Emission nach 340 nm und 380 nm Anregung. Zur Auswertung wurden mit der Software Tillvision einzelne Zellen ausgewählt, der Quotient der Emission der Anregungen 340 nm/380 nm errechnet und als Funktion über die Zeit dargestellt.

2.9 Nozizeptive Tiermodelle

Der Begriff „Schmerz“ wird von der International Association for the Study of Pain (IASP) wie folgt definiert: „An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage“. Schmerzen sind also sehr subjektiv geprägt und können im Tiermodell deshalb nur indirekt erfasst werden. Man bedient sich daher meist der Beobachtung von zuvor definierter Verhaltensänderungen des Versuchstieres (z.B Zurückziehen oder Lecken der Hinterpfoten) und nimmt diese als Maß für die nozizeptive Antwort.

Sowohl die nozizeptiven Tiermodelle zur Erfassung der basalen Schmerzschwellen ('Hotplate'¹³¹ und 'Coldplate'¹³², sowie 'Dynamic Plantar Aesthesiometer'¹³³ und 'von Frey'^{134, 135}) und die Untersuchung der entzündlichen Schmerzen (Formalintest^{136, 137}, Hargreaves¹³⁸), als auch die Versuche zur Untersuchung der Motokoordination ('Rotarod'¹³⁹ und 'HangingWire'¹⁴⁰) wurden von Herrn Dr. Ovidiu Coste durchgeführt. Die thermischen Schmerzschwellen wurden durch Zeitnahme bis zur nozizeptiven Antwort bei 52° C und 5° C erfasst. Bei dem Dynamic Plantar Aesthesiometer wurde eine Stahlstift mit einem Durchmesser von 2 mm mit gleichmäßig ansteigender Kraft gegen eine Hinterpfote gedrückt. Das Ende eines Testes bildet ein plötzliches und starkes Wegziehen der Pfote. Die zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Kraft wurde erfasst. Die Ermittlung von mechanischen Schwellen mittels von Frey Filamenten wurde ähnlich durchgeführt. Hierbei wurden allerdings durch Filamente kalibrierter Dicke und Steifheit definierte Drücke auf die Hinterpfoten ausgeübt. Infolge dieser Druckausübung kommt es zum Wegziehen der Pfote, die dabei ausgeübte Kraft wurde erfasst und ausgewertet^{134, 135}. Bei dem Formalintest wurde durch eine subkutane Injektion von 5% Formalin in die Dorsalseite einer Hinterpfote ein zweiphasiges nozizeptives Verhalten ausgelöst. Während die erste Phase akuten Schmerzen

zuzuordnen ist, sind an der zweiten Phase überwiegend Entzündungsvorgänge und zentrale Sensibilisierungen beteiligt^{141, 142}. Erfasst wurden dabei nozizeptive Verhaltensweisen, die zu einem nozizeptiven Index zusammengefasst wurden. Bei der Methode nach Hargreaves¹³⁸ wird die Zeit bis zu einem nozifensiven Reflex auf einen Wärmestrahl als Maß für die thermische Hyperalgesie herangezogen. Zur Analyse der motorischen Fähigkeiten im Hanging-Wire Test wurden die Tiere für 5 Sekunden auf die Mitte eines Käfiggitters gesetzt. Anschließend wurde das Gitter langsam um 180° gedreht und die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gestoppt. Auch beim Rotarod Test wurde die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere von einem drehenden Rad erfasst. Die Versuche der mechanischen Allodynie wurden von Herrn DongDong Zhang mittels des Dynamic Plantar Aesthesiometer wie in Brenneis et al.¹⁴³ beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde statt Zymosan 5% Formalin injiziert. Die Auswahl der Tiere und die Auswertung der Ergebnisse wurden jeweils eigenständig durchgeführt.

2.10 Statistik

Ermittelte Werte wurden mittels des *t*-Testes für zwei ungepaarte Stichproben (homoskedastisch) oder mittels einer ein- bzw. zweifaktoriellen Varianzanalyse und einem anschließenden Bonferroni oder Dunnett Post-hoc Test analysiert. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Unterschiede gelten als signifikant bei einem *p*-Wert von höchstens 0,05 (*). Bei dem Vergleich von Banden einer Western Blot Analyse wurden die Daten zunächst durch Einscannen digitalisiert und die Intensität der Banden mit dem Programm ImageJ analysiert. Die Bandenstärke des untersuchten Proteins wurde in Relation zur entsprechenden Ladekontrolle gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung konditionaler PAM-Knockout Mäuse

Eine etablierte Methode, um die Funktionen von Proteinen zu untersuchen, ist die Verwendung von Knockout-Mäusen. Ein konstitutiver Knockout von PAM führt allerdings zu einer fehlerhaften Formation der Nervenendigungen an der motorischen Endplatte und durch Lungenfehlfunktionen zum Tode bei der Geburt^{30, 31}. Um die Funktionen von PAM in adulten Tieren studieren zu können, wurden daher konditionale PAM-Knockout Mäuse generiert. Dazu wurde das *Pam*-Gen zunächst so mutiert, dass es Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase beiderseits des Exons 11 enthält (Abbildung 3-1A, Nummerierung richtet sich nach dem NCBI Eintrag NM_207215). Durch eine Bindung der Cre-Rekombinase kommt es dann zu einer Exzision des flankierten Exons 11. Dieses codiert für 13 Aminosäuren N-terminal von der RCC1-Domäne. Dieser stark konservierte Abschnitt ist unabdinglich für die Funktionen von PAM^{31, 36, 90}, so dass auf diese Weise das Protein PAM in allen Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen ausgeschaltet wird.

3.1.1 Neuronenspezifische PAM-Knockout Mäuse (NesCre)

Durch das Einkreuzen der Nestin-Cre Linie B6Cg-Tg (Nes-cre)1Kln/J¹²⁹ wird die Cre-Rekombinase in Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen exprimiert (im nachfolgenden als NesCre bezeichnet). Bei der Verpaarung zweier PAM^{+/-}NesCre⁺ Mäuse wurden insgesamt 59 Jungtiere genotypisiert von denen allerdings kein Tier gleichzeitig homozygot für das Knockoutallel war und die NestinCre-Rekombinase trug (Daten nicht gezeigt). Dieses hat zu der Vermutung einer Letalität dieses Knockouts geführt. Um dies nachzuprüfen, wurde ein Wurf einer solchen Verpaarung pränatal (E18) präpariert und genotypisiert. Wie erwartet waren alle Embryonen Cre-positiv. Vier von sieben Embryonen trugen das Wildtypallel, zwei das Knockoutallel (Embryo Nr. 5,7) und ein Embryo trug beide Allele (Abbildung 3-1B). Diese Beobachtung erhärtet den Verdacht der Letalität dieses konditionalen Knockouts.

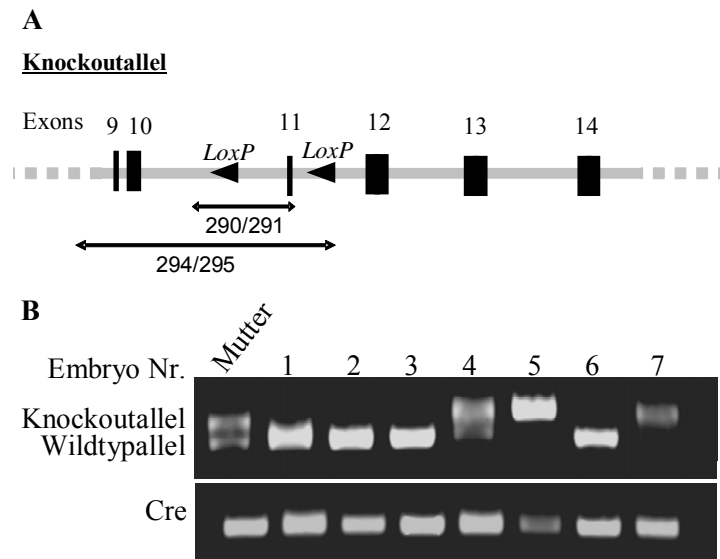


Abbildung 3-1: Genotypisierung der Embryonen aus einer PAM^{+/-}-NesCre⁺ Verpaarung. A) Schema des mutierten PAM Gens mit verwendeten Primerpaaren. B) 1%iges Agarosegel der Amplifikationsprodukte zur Genotypisierung von PAM und Cre. Für die Amplifikation des PAM Sequenzabschnittes wurden die Primer 290 und 291 und für Cre die Primer 296 und 297 verwendet.

Um sicherzugehen, dass die eingekreuzte NesCre-Rekombinase auch zu einer Exzision des Exon 11 führt, wurden weitere Amplifikationen durchgeführt. Mit einem zweiten Primerpaar (294/295, siehe Abbildung 3-1) konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des Exons 11 stattgefunden hat (Abbildung 3-2A). Dabei wurden ca. 500 bp herausgeschnitten, was zu einer Reduzierung der Länge des mutierten Amplifikationsproduktes führt. Da es sich bei dieser Mutation um einen sehr gewebsspezifischen Knockout handelt, bei dem PAM nur in wenigen Zellen ausgenockt ist, war zu erwarten, dass die Wildtypsequenz vorherrschend präsent sein wird und die deletierte Sequenz hingegen in weit geringerem Maße detektiert werden kann. Zusätzlich konnte auch auf Ebene der RNA die Deletion des Exons und somit der Knockout von PAM nachgewiesen werden. Ähnlich der Analyse der genomischen DNA wurden auch auf Ebene der RNA zwei unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte detektiert, wobei die kürzere Sequenz wiederum aus der Deletion des Exon 11 resultiert (Abbildung 3-2B).

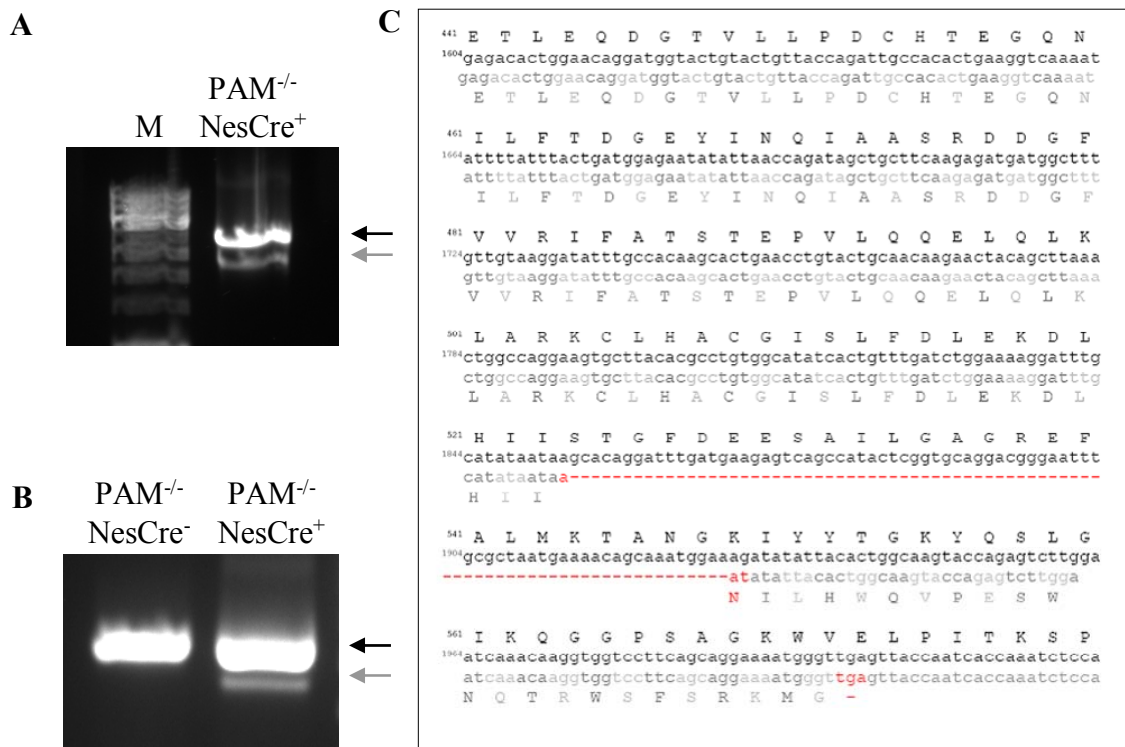


Abbildung 3-2: Nachweis der Deletion des PAM-Exon 11 in PAM^{-/-}NesCre⁺-Embryonen. A) DNA Amplifikation (Primer 294/295) eines Exon 11 beinhaltenden Genabschnittes von PAM aus einem PAM^{-/-}NesCre⁺-Embryo. Schwarzer Pfeil= Amplifikationsprodukt ohne Deletion; grauer Pfeil= Amplifikationsprodukt mit erfolgter Deletion des Exon 11; M= Marker B) cDNA Analyse eines Exon 11 beinhaltenden Genabschnittes von PAM aus einem NesCre-positiven und einem NesCre-negativen Embryo C) Basen- und Proteinsequenz der beiden Banden aus der cDNA-Analyse. Deletion des Exon 11 und Verschiebung des „open-reading-frames“, sowie das STOP-Codon sind in rot dargestellt.

Die Sequenzierung der beiden Banden bestätigt die Ergebnisse der Amplifikationen und zeigt eindeutig die Deletion des Exon 11 in dem kürzeren Produkt. Durch die Exzision entsteht ein Shift im „open reading frame“. Dieser resultiert in einem vorzeitigem Stop Codon nach der Translation von 23 Aminosäuren (Abbildung 3-2C). Im Ergebnis werden somit die funktional wichtige RHD1 Domäne³⁶ und alle davon C-terminal gelegenen Aminosäuren deletiert. Darunter befindet sich die Ringfinger Domäne, welche die Ubiquitinligaseaktivität von PAM vermittelt⁴ (vgl. Abbildung 1-1 und Abbildung 2-1).

Diese Daten beschreiben den erfolgreichen Knockout von PAM unter der Kontrolle des Nestinpromoters. Allerdings führt das Fehlen von PAM in Neuronen zu einem letalen Phänotyp. Mäuse dieser NesCre-Linie konnten deshalb für nachfolgende Versuche nicht verwendet werden.

3.1.2 Deletion von PAM in sensorischen Neuronen (SNSCre)

Um die Funktionen von PAM *in vivo* untersuchen zu können wurden $PAM^{-/-}Cre^{-}$ Tiere mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Promotorkontrolle des Na(v)1.8-Gen¹⁴⁴ exprimieren (im nachfolgenden als SNSCre bezeichnet). So soll PAM in allen nozizeptiven und thermorezeptiven Neuronen der Dorsalganglia und der Ganglia trigeminale und in propriozeptiven Neuronen deletiert werden. Phänotypisch unterscheiden sich diese SNSCre-positiven nicht von SNSCre-negativen $PAM^{-/-}$ Tieren. Wie Abbildung 3-3A zeigt, ist eine Deletion des Exon 11 in Dorsalgangliengewebe aus SNSCre-positiven Tieren erfolgt. Ein solches Deletionsereignis resultiert wie bei $PAM^{-/-}NesCre$ -Mäusen in einem verkürzten Amplifikationsprodukt. Erwartungsgemäß ist eine solch verkürzte Sequenz bei SNSCre-negativen Tieren nicht vorhanden. Ebenso ist auch im Rückenmark SNSCre-negativer wie auch –positiver Tiere kein verkürztes Amplifikationsprodukt, also kein Deletionsereignis, detektierbar. Dies bestätigt die Eingrenzung des PAM-Knockouts auf nozizeptive und thermorezeptive Neurone der Dorsalganglien. Ergänzend dazu zeigt die cDNA-Analyse von Dorsalgangliengewebe ebenfalls ein verkürztes Amplifikationsprodukt und damit die Deletion des Exon 11 (Abbildung 3-3B).

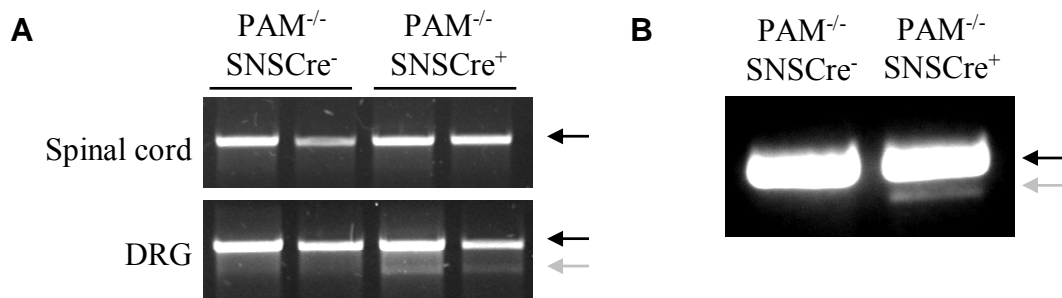


Abbildung 3-3: Nachweis der Generierung einer $PAM^{-/-} SNSCre^{+}$ -Mauslinie. **A)** DNA Amplifikation (Primer 294/295) des Exon 11 aus Rückenmark und Dorsalganglien von zwei SNSCre-positiven und zwei SNSCre-negativen $PAM^{-/-}$ Mäusen. **B)** cDNA Analyse der mRNA aus Dorsalganglien von einer SNSCre-positiven und einer SNSCre-negativen Maus. Schwarzer Pfeil= Amplifikationsprodukt ohne Deletion; grauer Pfeil= Amplifikationsprodukt mit erfolgter Deletion des Exon 11

Durch die Benutzung der Cre-Rekombinase unter der Promotorkontrolle des Na(v)1.8-Gen konnte erfolgreich eine PAM-Knockout Mauslinie generiert werden. Durch den Knockout in allen nozizeptiven und thermorezeptiven Neuronen der Dorsalganglien eignen sich diese Tiere vornehmlich zur Untersuchung PAM-vermittelter Signaltransduktion bei nozizeptiven Prozessen.

3.2 Charakterisierung der konditionalen PAM-Knockout Mäuse

Um den Erfolg des Knockouts auf funktioneller Ebene zu testen, wurden die konditionalen PAM Knockout-Mäuse auf den Verlust bekannter Funktionen von PAM hin getestet. So wurde zum einen die Hemmung des Neuritenwachstums^{23, 25, 30, 31} und zum anderen die Aktivierung des mTOR Signalweges^{3, 4, 127} untersucht.

3.2.1 Deletion von PAM führt zu verstärktem neuronalem Wachstum

PAM und seine orthologen Proteine sind sowohl als negative Regulatoren des Wachstums und der Entwicklung von Synapsen als auch des Neuritenwachstums bekannt^{23, 25, 30, 31}. Demgemäß war bei PAM^{-/-}SNSCre⁺ Tieren ein verstärktes Auswachsen spinaler Neuronenendigungen in die innere Lamina II zu beobachten (Abbildung 3-4).

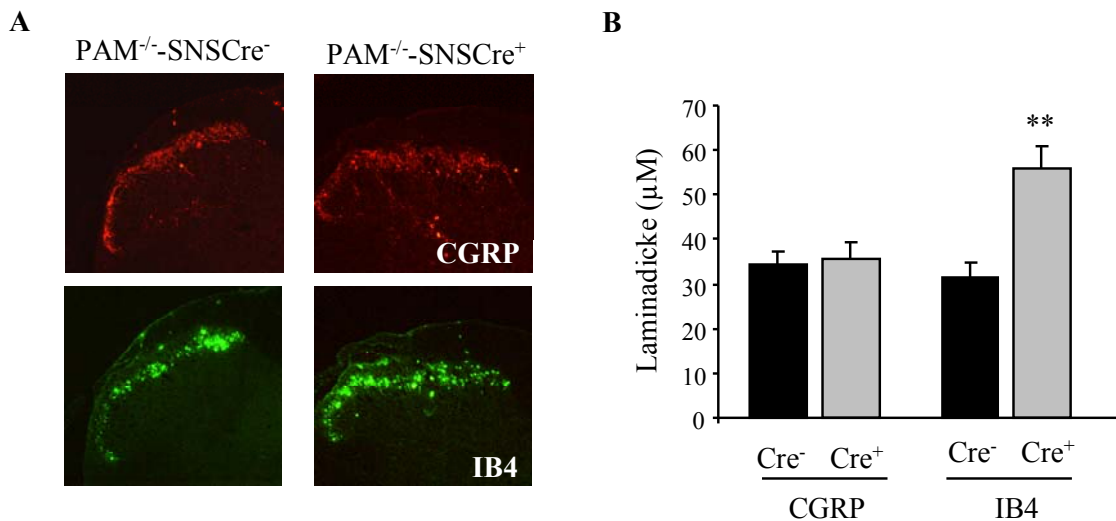


Abbildung 3-4: IB4-Färbung zeigt vergrößerte Lamina I/II in PAM^{-/-}SNSCre-positiven Mäusen. A) Querschnitt durch ein Lumbalrückenmark von SNSCre-positiven und SNSCre-negativen PAM^{-/-} Mäusen. Lamina I und II wurden jeweils durch die Detektion von CGRP und IB4 sichtbar gemacht. B) Graphische Darstellung von A. Gezeigt sind Mittelwerte von 4-8 Tieren + SEM. Statistische Signifikanz wurde durch einen 2-seitigen *t*-Test ermittelt, **P=0,003

Dabei wurden Endigungen der primären afferenten Neurone im Hinterhorn des Rückenmarkes mit Isolectin IB₄ angefärbt. IB₄ detektiert kleine nicht-myelinisierte Neurone der Dorsalganglien, zu denen die sensorischen und thermosensitiven Neurone gehören, deren Axone in der inneren Lamina II des Rückenmarkes enden¹⁴⁵. Der so angefärbte Bereich des Rückenmarks ist bei SNSCre-positiven Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nahezu verdoppelt. Die Größe, der mit CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) angefärbten Lamina I unterscheidet sich nicht (Abbildung 3-4). Dieses verstärkte Wachstum der Neuronenendigungen in die innere Lamina II unterstreicht so

die schon zuvor beschriebene Rolle von PAM als negativen Regulator des Neuritenwachstums.

Um die generierten $PAM^{-/-}SNSCre^{+}$ Mäuse für weitere Schmerz-Verhaltensversuche verwenden zu können, darf die Vergrößerung der inneren Lamina II die motorischen Fähigkeiten der PAM-defizienten Tiere nicht beeinflussen. Deshalb wurden an dieser Stelle die motorischen Fähigkeiten durch den „Rota Rod-“¹³⁹ und den „Hanging Wire-“¹⁴⁰ Test untersucht. Beim Hanging-Wire Test wurden die Tiere für 5 Sekunden auf die Mitte eines Käfiggitters gesetzt. Anschließend wurde das Gitter langsam um 180° gedreht und die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gestoppt. Dabei wurde der Test nach 90 Sekunden gestoppt auch wenn die Tiere sich noch an dem Gitter befanden. Bei diesem Test schafften sowohl die Wildtypiere als auch die Cre-positiven Knockoutmäuse diese maximale Zeit am Gitter auszuharren. Deshalb ist die Standardabweichung bei diesem Test auch gleich Null. Beim Rotarod Test hingegen wurde die Zeit bis zu Herunterfallen der Tiere von einem drehenden Rad erfasst. Dort gab es zwar individuelle Unterschiede zwischen den Tieren, aber zwischen beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Da sich bei beiden Tests die PAM-defizienten Tiere nicht von den Kontrolltieren unterscheiden, kann von uneingeschränkten motorischen Fähigkeiten ausgegangen werden. Somit können die generierten $PAM^{-/-}SNSCre$ -Mäuse für die Untersuchung der PAM-vermittelten Signaltransduktion bei peripherer Nozizeption herangezogen werden.

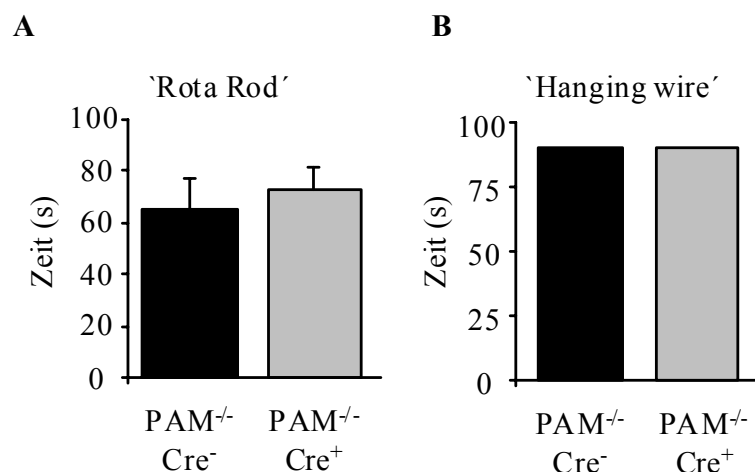


Abbildung 3-5: Untersuchung der Motokoordination SNSCre-positiver Mäuse. Durch den „Rota Rod“ Test (A) und den „Hanging wire“ Test (B) wurde die Motokoordination von SNSCre-negativen und SNSCre-positiven $PAM^{-/-}$ Mäusen untersucht. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte von 7-10 Tieren + SEM.

3.2.2 Funktionelle Bestätigung der PAM^{-/-}SNSCre-Mauslinie anhand des mTOR-Signalweges

Neben Beeinflussung des Synapsen- und Axonwachstum ist eine weitere bekannte Funktion von PAM die Regulation des mTOR-Signalweges. mTOR spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Krebsmetabolismus, des Zellwachstums und der Zellproliferation⁴³. Desweiteren beeinflusst dieser Signalweg auch die neuronale Entwicklung und die Modulation der synaptischen Plastizität^{45, 56, 146}.

Bekannterweise wird TSC2, ein negativer Regulator der mTOR- Kinaseaktivität, durch PAM ubiquitiniert und anschließend in Proteosomen degradiert^{3, 4, 127}. Ein Abbau von TSC2 durch PAM führt somit zu einer Aufhebung der hemmenden Wirkung von TSC2 auf mTOR und aktiviert diesen Signalweg (vgl. Abbildung 1-2). Ein weiterer Aktivator des mTOR-Signalweges ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P)^{4, 38-40}. Interessanterweise wird PAM durch S1P in der Krebszelllinie HeLa aktiviert³⁷. Diese Aktivierung äußert sich in einer Translokation zur Plasmamembran sowie einer Hemmung der Adenylylzyklaseaktivität. Allerdings zeigten Vorarbeiten keinen S1P-induzierten Abbau von TSC2 in HeLa-Zellen⁴. Die Verknüpfung beider Signalwege wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe PAM-defizienter (PAM^{-/-}SNSCre⁺) DRG-Neurone näher untersucht.

3.2.2.1 PAM vermittelt S1P-induzierte mTOR-Aktivierung

Tatsächlich kam es in DRG-Neuronen nach einer S1P Stimulierung mit einer physiologischen Konzentration von 0,5 µM (vgl. Hanel et al.¹⁴⁷) wie erwartet zu einer verstärkten Phosphorylierung von mTOR an Ser2448. Diese Phosphorylierung fiel bei PAM-defizienten Neuronen ebenso erwartet schwächer aus (Abbildung 3-6A) und bestätigt somit auch den Knockout von PAM auf funktioneller Ebene.

Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von mTOR auch tatsächlich mit einer Aktivierung einhergeht, wurde das mTOR-Substrat p70S6Kinase untersucht. Diese Kinase phosphoryliert das S6 Protein der 40S Ribosomenuntereinheit und dient der Kontrolle von Translationvorgänge der 5' Oligopyrimidin mRNAs¹⁴⁸. Wie Abbildung 3-6B zeigt, wurde die p70S6Kinase ebenfalls durch eine Behandlung mit S1P verstärkt phosphoryliert. Wie erwartet ist eine solche Phosphorylierung bei PAM-defizienten Zellen schwächer ausgeprägt und unterstützt hiermit die Vermutung einer PAM-abhängigen Aktivierung des mTOR Signalweges durch S1P.

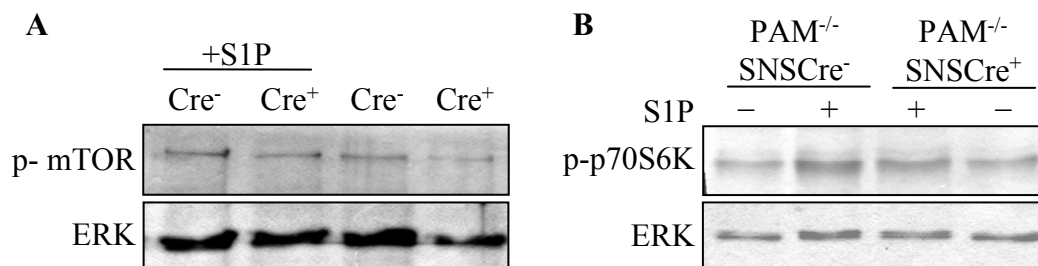


Abbildung 3-6: S1P induzierte mTOR-Aktivität ist vermittelt durch PAM. A) Western Blot Analyse der Phosphorylierung von mTOR in adulten DRG Kulturen induziert durch S1P (0,5 µM, 30 Min.) **B)** Detektion der S1P induzierten Phosphorylierung von p70S6Kinase in DRG Kulturen von SNSCre-negativen und SNSCre-positiven PAM^{-/-} Mäusen. Zur Kontrolle der Beladung diente die Detektion der 'extracellular signal-regulated kinase' (ERK)

Auch in weiteren Zellen, wie der Zelllinie MCF7 oder primären Zellkulturen wird p70S6Kinase nach S1P Stimulierung phosphoryliert. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Rapamycin, einem mTOR Inhibitor, verhindert eine solche Phosphorylierung und zeigt die Abhängigkeit von mTOR bei dieser Aktivierung der p70S6Kinase durch S1P (Abbildung 3-7).

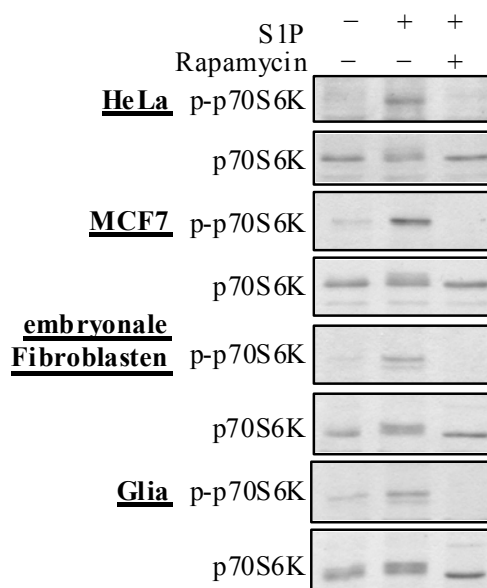


Abbildung 3-7: Western Blot Analyse der S1P induzierten Phosphorylierung von p70S6Kinase in verschiedenen Zelllinien. Verschiedene Zelllinien wurden zunächst für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und ggfs. für 30 Minuten mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (100 nM) vorinkubiert. Es folgte die Stimulierung mit 0,5 µM S1P gegebenenfalls in Anwesenheit von Rapamycin für 30 Minuten. Das Zell-Lysat wurde in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf phosphorylierte und unphosphorylierte p70S6Kinase untersucht.

Um den Einfluss von PAM auf die S1P-induzierte mTOR-Aktivierung zu bestätigen, wurde PAM aus HeLa Zellen aufgereinigt (Abbildung 3-8A, siehe auch 2.6.5) und in Form von liposomalen Komplexen in MCF7 Zellen transfiziert. Durch die Erhöhung der intrazellulären PAM-Konzentration sollte eine verstärkte PAM-abhängige Aktivierung des mTOR-Signalweges erkennbar werden.

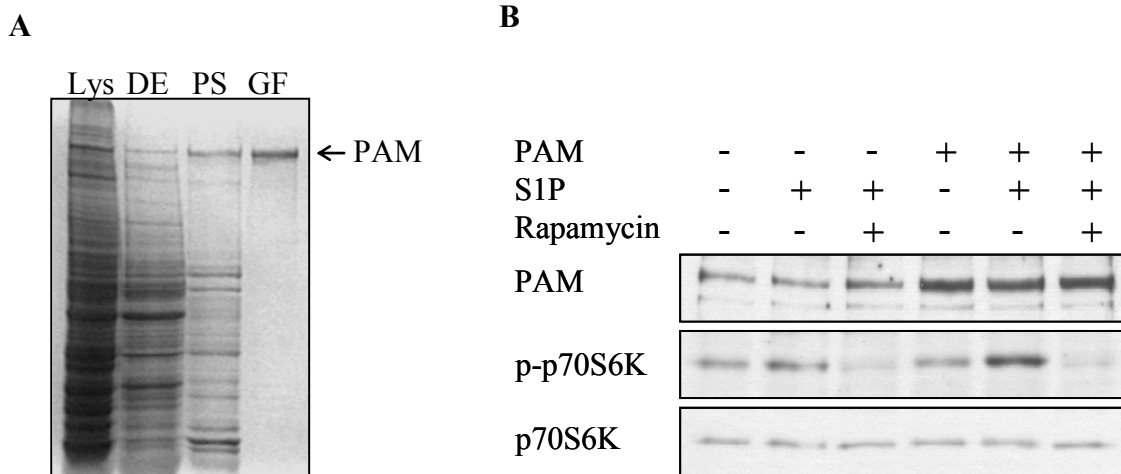


Abbildung 3-8: Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentrationen verstärkt die S1P induzierte p70S6Kinase Phosphorylierung. **A)** Native PAM-Aufreinigung aus HeLa-Zellen. Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 10% SDS-PAGE Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit „Coomassie-brilliant blue“ gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Lys: Zell-Lysat (30 µg); DEAE: Diethylaminoethyl-Sepharose Säule (15 µg); PS: Phenylsepharose Säule (5 µg); GF: Gelfiltrationssäule (0,5 µg). Angabe in Klammern: Menge an aufgetragener Proteinmenge **B)** Aufgereinigtes PAM wurde mittels BioPorter Reagenz in MCF7 Zellen transloziert. Dieses wurde durch Immunoblot überprüft. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 µM S1P stimuliert, geerntet und per Western Blot auf phospho-p70S6K und p70S6K untersucht. Bei Zusatz von Rapamycin wurden die Zellen vor der S1P Stimulierung für 30 Minuten mit dem mTOR-Inhibitor (100 nM) vorinkubiert.

Die basal vorhandene Aktivität bzw. Phosphorylierung von p70S6Kinase wurde durch die erhöhte Konzentration von PAM nicht beeinflusst. Nach Stimulierung mit S1P zeigte sich allerdings in den transfizierten Zellen eine deutlich stärkere Phosphorylierung von p70S6Kinase im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Eine PAM-abhängige Aktivierung des mTOR Signalweges wird demnach erst durch eine Stimulierung mit S1P eingeleitet. Eine Vorbehandlung mit Rapamycin verhinderte in transfizierten wie auch in nicht-transfizierten Zellen die Phosphorylierung der p70S6Kinase und bestätigt erneut, dass die gezeigte Phosphorylierung der p70S6Kinase mit einer Aktivierung von mTOR einhergeht (Abbildung 3-8B).

Damit konnte die PAM-vermittelte Aktivierung von mTOR durch S1P mittels PAM-Knockout und artifizieller Erhöhung der intrazellulären PAM-Konzentration gezeigt werden. Somit wurde auch der Knockout auf funktioneller Ebene nochmals bestätigt.

3.2.2.2 Beteiligung von Rheb an der PAM-abhängigen Aktivität von mTOR

Ein möglicher Mechanismus der PAM-vermittelten mTOR Aktivierung durch S1P könnte über TSC2 verlaufen (vgl. Abbildung 1-2). TSC2 wirkt negativ regulatorisch auf die mTOR-Aktivität, in dem es den stimulatorischen Einfluss von Rheb („Ras Homolog

Enriched in Brain“) auf mTOR durch seine Funktion als „GTPase activating protein“ (GAP) inhibiert¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Vorarbeiten sprechen allerdings gegen eine S1P-induzierte Ubiquitinierung von TSC2 als Mechanismus zur mTOR Aktivierung⁴. Deshalb wurde der Einfluss von Rheb auf den mTOR Signalweg im Zusammenhang mit PAM und S1P untersucht. Dazu wurden für Rheb codierende Plasmide in *E.coli* transformiert und überexprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 3-9).

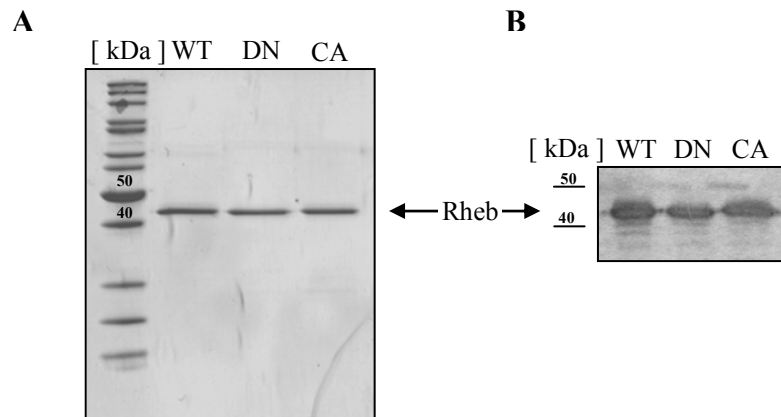


Abbildung 3-9: Aufreinigung von GST/Rheb-Mutanten aus E.coli. **A)** Nach Transformation und Induktion in *E.coli* wurden verschiedenen Rhebmutanten (WT, Wildtyp; DN, dominant-negative Mutante; CA, konstitutiv-aktive Mutante) mittels GST-Bind Sepharose aufgereinigt. Zur Überprüfung der Reinheit wurden je 0,5 µg aufgereinigtes Protein durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit „Coomassie-brilliant blue“ gefärbt. **B)** Western Blot der aufgereinigten Rhebmutanten zur eindeutigen Identifikation der Bands.

Zur Kontrolle der Phosphorylierung von p70S6Kinase durch aktives Rheb wurde die konstitutiv aktive Rhebmutante Q64L (CA) verwendet¹⁴⁹. Die Transfektion dieser Mutante in HeLa Zellen verstärkt, wie erwartet, sowohl die basale, als auch die S1P-induzierte, Rapamycin-sensitive Phosphorylierung von p70S6Kinase. Eine Aktivierung von p70S6Kinase durch S1P konnte hingegen mit der dominant-negativen Rhebmutante D60K¹⁵² (DN) in beiden Fällen deutlich verringert werden (Abbildung 3-10). Die Abhängigkeit der Phosphorylierung der p70S6Kinase wurde wieder durch die Verwendung von Rapamycin bestätigt.

Diese Daten zeigen, dass die GTPase Rheb Teil der PAM-vermittelten Signalkaskade zur Aktivierung von mTOR durch S1P ist.

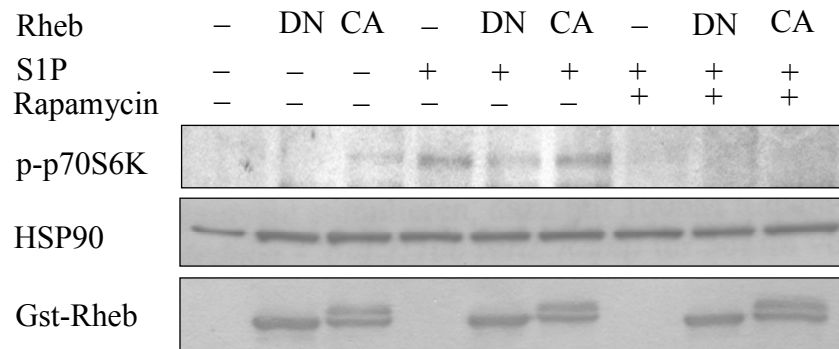


Abbildung 3-10: Dominant negative Rheb Mutante vermindert S1P induzierte p70S6Kinase Phosphorylierung. Vier Stunden nach liposomaler Translokation von dominant negativer- oder konstitutiv aktiver-Rhebmutante in HeLa Zellen wurden diese für 30 Minuten mit S1P (0,5 μ M) stimuliert. Rapamycinbehandlung (100nM) erfolgte 30 Minuten vor und während der Stimulierung mit S1P. Mittels Western Blot wurde die Translokation der Rhebmutanten überprüft, sowie die Phosphorylierung von p70S6Kinase untersucht. Als Ladekontrolle diente das 'Heat shock Protein 90' (HSP90).

Die Vermittlung der S1P-induzierten mTOR Aktivierung konnte durch die Verwendung der konditionalen PAM Knockout-Mäuse verifiziert werden. Darüberhinaus wurde Rheb als Teil dieser Signalkaskade identifiziert. Des Weiteren konnte die Funktion PAMs als negativer Regulator des Neuritenwachstums durch die Generierung der SNSCre-Mäuse gefestigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen weiterhin die Funktionalität der generierten SNSCre-Mauslinie zur Untersuchung der PAM-vermittelten Signaltransduktion bei peripherer Nozizeption.

3.3 Untersuchungen zum nozizeptiven Verhalten PAM-defizienter Mäuse

3.3.1 Basale Schmerzschwellen

Als Schmerzschwelle wird die niedrigste Stärke eines Reizes bezeichnet, der als schmerzhaft empfunden wird (nach IASP). Der „Hot Plate“¹³¹ und der „Cold Plate“¹³² Test sind Modelle zum Erfassen der Schwellen akuter, durch thermische Stimuli induzierter Schmerzen. Bei beiden Tests zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen PAM^{-/-}SNSCre⁺ und Kontrolltieren (Abbildung 3-11A+B).

Auch bei mechanischer Stimulierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Schmerzschwellen beider Tiergruppen (Abbildung 3-11C+D). Dabei wurde zum einen das Dynamic Plantar Aesthesiometer verwendet, bei dem eine Stahlscheibe mit einem Durchmesser von 2 mm mit gleichmäßig ansteigender Kraft gegen eine

Hinterpfote gedrückt wird. Das Ende eines Testes bildet ein plötzliches und starkes Wegziehen der Pfote. Die zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Kraft wurde erfasst. Zum anderen wurden die mechanischen Schwellen mittels von Frey Filamenten bestimmt. Hierbei werden durch Haare kalibrierter Dicke und Steifheit definierte Drücke auf die Hinterpfoten ausgeübt. Infolge dieser Druckausübung kommt es zum Wegziehen der Pfote, das als nozizeptive Reaktion erfasst wird^{134, 135}.

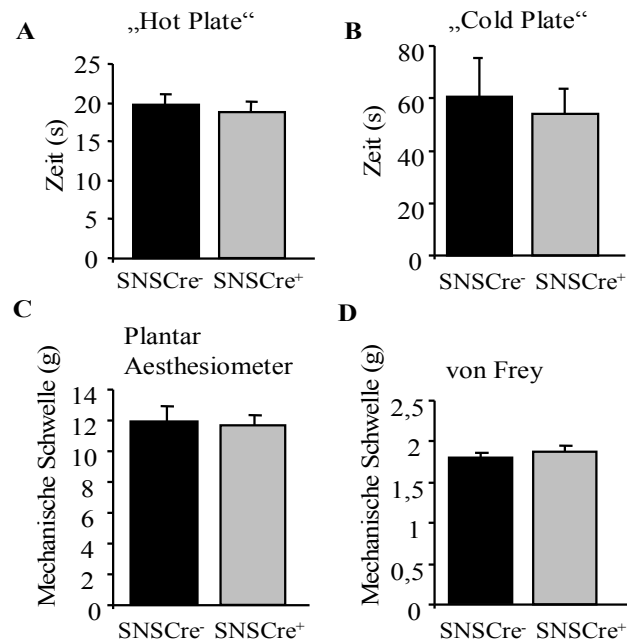


Abbildung 3-11: Basale Schmerzschwellen von Cre-positiven und Cre-negativen PAM^{-/-} Mäusen. Die basalen thermischen Schmerzschwellen wurden durch den „Hot Plate“- (A) und dem „Cold Plate“- (B) bestimmt. Durch den Plantar Aesthesiometer (C) und mittels von Frey Filamenten (D) wurden die mechanischen Schwellen untersucht. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte von 7-10 Tieren ± SEM.

3.3.2 Entzündlicher Schmerz

Um den Effekt von PAM unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden die Tiere einem Formalintest unterzogen. Der Test wurde von Dubuisson und Dennis¹³⁶ an Ratten eingeführt und von Hunskaar et al.¹³⁷ für die Verwendung mit Mäusen modifiziert. Dabei wird durch eine subkutane Injektion von 5% Formalin in die Dorsalseite einer Hinterpfote ein zweiphasiges nozizeptives Verhalten ausgelöst. Während die erste Phase akuten Schmerzen zuzuordnen ist, sind an der zweiten Phase überwiegend Entzündungsvorgänge und zentrale Sensibilisierungen beteiligt^{141, 142}. Zwischen PAM^{-/-}SNSCre⁺ und Kontrolltieren sind bei einem Formalintest über 45 Minuten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede im nozizeptiven Verhalten zu beobachten gewesen (Abbildung 3-12A).

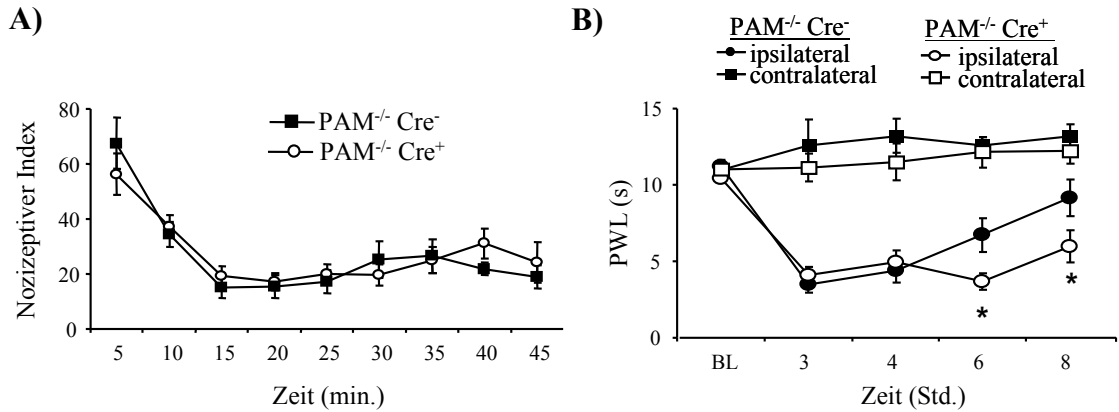


Abbildung 3-12: Untersuchungen des Schmerzverhaltens PAM-defizienter Mäuse unter pathophysiologischen Bedingungen. **A)** 20 μ l 5% Formaldehyd wurden subkutan auf der Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert und anschließend das Schmerzverhalten über einen Zeitraum von 45 Minuten beobachtet. Dabei wurden Leckzeiten und Anzahl der Zuckungen der injizierten Pfote zu einem nozizeptiven Index zusammengefasst. Dargestellt sind Mittelwerte in fünfminütigen Intervallen \pm SEM von je 8 Tieren. **B)** Zur Untersuchung der thermischen Hyperalgesie wurden SNSCre-negativen und SNSCre-positiven 5% Formaldehyd injiziert (ipsilateral) und anschließend mittels des „Hargreaves“-Tests das Schmerzverhalten untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Pfote („paw withdrawal latency“, PWL) von je 8 Tieren im Zeitverlauf (BL= Basislinie). Statistisch signifikanter Unterschied zu SNSCre-negativen Mäusen wurde ermittelt durch einen t-Test (2-seitig), * $p < 0,05$.

Untersucht man allerdings zu späteren Zeitpunkten die formalininduzierte thermische Hyperalgesie (erhöhte Schmerzempfindlichkeit für thermische Reize) mittels des „Hargreaves“ Testes, wurde bei SNSCre-positiven Tieren ein verlängertes Andauern des hyperalgetischen Schmerzverhaltens festgestellt. Bei der Methode nach Hargreaves¹³⁸ wird der nozifensive Reflex auf Hitze als Maß für die thermische Hyperalgesie herangezogen. Sechs bis acht Stunden nach Formalininjektion waren die Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Pfote (PWL) bei SNSCre-positiven Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (ipsilateral) signifikant verkürzt. Das bedeutet, dass die Dauer der thermischen Hyperalgesie bei PAM-defizienten Mäusen verlängert ist (Abbildung 3-12B).

3.4 PAM-vermittelt Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges

Aus Arbeiten mit PAM-Orthologen in *Drosophila* und *C.elegans* ist ein weiterer PAM-abhängiger Signalweg bekannt. Der p38 MAPK Signalweg reguliert das Neuritenwachstum, die Struktur und Funktion von Synapsen, sowie die Entstehung und Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie. Für *C.elegans* und *Drosophila* wurde die 'Dual Leucine Zipper Bearing' Kinase (DLK) als Vermittler der PAM-abhängigen Wachstumshemmung beschrieben^{27, 29}. PAM ubiquitiniert nach Arbeiten von Nakata et

al.²⁹ DLK und führt so zu deren Abbau. Aktive DLK phosphoryliert in der Funktion als MAPKKK (mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase, auch MAP3K) unter anderem p38 MAPK und aktiviert weitere darauffolgende Proteine wie z.B. CREB (Abbildung 1-3). Der p38 MAPK Signalweg reguliert weiterhin die Entstehung und Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie⁸⁰⁻⁸².

Da PAM in Dorsalganglienneuronen von SNSCre-positiven Tieren nicht vorhanden ist, ist davon auszugehen, dass DLK weniger abgebaut wird und im Vergleich zu Wildtypen verstärkt vorhanden ist. Dieses konnte leider nicht überprüft werden, da kommerziell erhältliche Antikörper für die Detektion von DLK in DRGs nicht sensitiv genug sind. Eine DLK-Überexpression in PAM-defizienten Neuronen müsste allerdings zu einer verstärkten Aktivierung des p38 MAPK Signalweges führen.

Um dies zu untersuchen wurden DRG-Lysate von PAM-defizienten Mäusen und Kontrolltieren mittels Western Blot analysiert. Dabei wurden drei unterschiedlich große Proteine durch den Phospho-p38 Antikörper detektiert (Abbildung 3-13A).

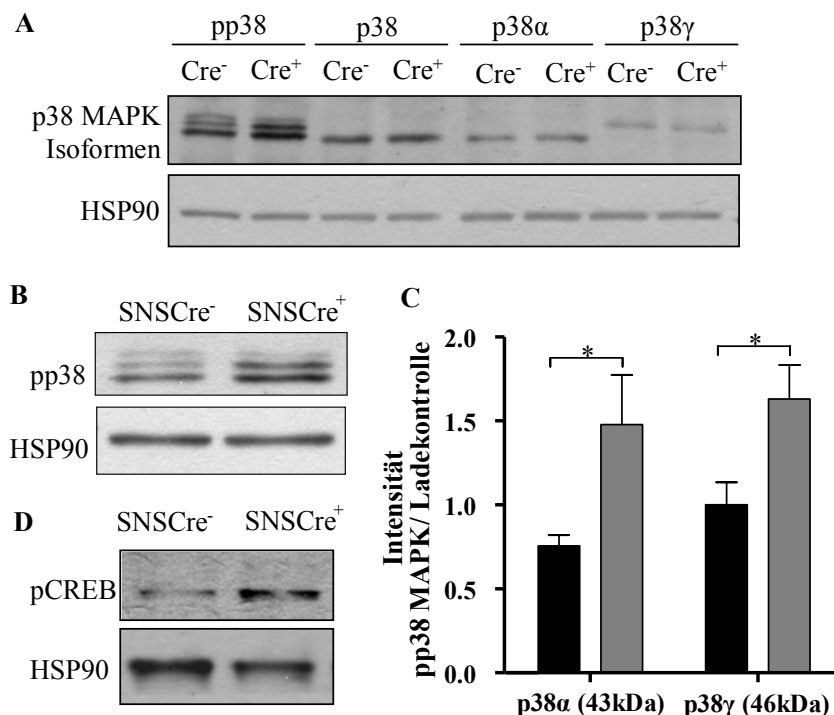


Abbildung 3-13: Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges in PAM-defizienten Dorsalganglienslysaten. **A)** Vergleichende Detektion der verschiedenen Isoformen der p38 MAPK mit isoform-spezifischen Antikörpern zur Identifikation mittels Western Blot Analyse. Als Ladekontrolle diente jeweils das 'Heat shock Protein 90' (HSP90). **B+D)** Durch Western Blot Analysen wurden phosphorylierte MAPK Isoformen (**B**) und 'cAMP response element-binding protein' (CREB) (**D**) nachgewiesen. **C)** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung aus A+B), n=3. Statistische Signifikanz wurde durch einen 1-seitigen *t*-Test ermittelt, *p<0,05

Die gezeigten Phosphorylierungsmuster könnten aus dem Vorhandensein verschiedener Isoformen der p38 MAPKinase resultieren. Bisher wurden vier Isoformen identifiziert: p38 α ⁶², p38 β ⁶⁴, p38 γ (auch bekannt als ERK6 und SAPK3)⁶⁵ and p38 δ (auch bekannt als SAPK4)^{66, 67}. Die vergleichende Detektion der verschiedenen Isoformen der p38 MAPK mit spezifischen Antikörpern in Abbildung 3-13A zeigt, dass es sich bei dem am stärksten exprimierten und kleinsten Protein sehr wahrscheinlich um die p38 α Isoform handelt. Das mittlere Protein lässt sich durch diesen Vergleich der γ -Isoform zuordnen. Auch die erwarteten Molekulargewichte der Isoformen α und γ von 43kDa und 46kDa unterstützen diese Annahme. Der Isoform-unspezifische p38 Antikörper kann laut Herstellerangaben alle Isoformen mit Ausnahme von p38 δ detektieren. Dabei wurde eine Präferenz zu p38 α angegeben. Durch die recht schwache Expression der anderen p38-Isoformen ist es nicht verwunderlich, dass dieser nur eine Proteinbande auf Höhe der vermuteten p38 α -Isoform detektiert. Die densitometrische Analyse der phosphorylierten Isoformen α und γ ergibt dabei eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung bei Abwesenheit von PAM (Abbildung 3-13B+C).

Eine Aktivierung der p38 MAPK führt über die Aktivierung von MSK1 (mitogen- und stressaktivierte Protein Kinase 1) zu einer Phosphorylierung des 'cAMP response element-binding' Proteins (CREB)^{74, 153, 154}. Die Western Blot Analyse zeigt auch hier in SNSCre-positiven Tieren eine gesteigerte Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-13D). Dies bestätigt eine erhöhte Kinaseaktivität von p38 und somit die verstärkte Aktivierung des p38 MAPK Signalweges in PAM-defizienten Dorsalganglien.

p38 MAPK ist unter anderem involviert in die Regulation Capsaicin- und CFA- (Complete Freund's Adjuvant) induzierter thermischer Hyperalgesie^{86, 155} und in Prozessen neuropathischer Schmerzen⁸⁴. Der konstitutiv aktivierte p38 MAPK Signalweg in PAM-defizienten Neuronen (siehe Abbildung 3-13) legt die Vermutung einer Abhängigkeit der PAM-vermittelten thermischen Hyperalgesie von p38 MAPK nahe.

Um dies zu überprüfen, wurde SNSCre-positiven Mäusen intrathekal der p38 MAPK Inhibitor SB203580 vier und sechs Stunden nach Formalininjektion verabreicht. Die Western Blot Analyse der Dorsalganglien zeigt dabei eine stark verminderte Phosphorylierung der p38 MAPK (Abbildung 3-14A). Dies kann allerdings nicht auf

einen direkten Effekt des Hemmstoffes zurückgeführt werden, da dieser zwar die Aktivität von p38 MAPK hemmt, aber nicht dessen Phosphorylierung^{156, 157}.

Wie erwartet wurde aber nach Applikation des MAPK Hemmstoffes die Ausbildung einer thermischen Hyperalgesie verhindert. Während Kontrolltiere (Injektion von PBS) 4 Stunden nach Injektion kürzere Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Pfote aufwiesen, also ein verstärktes nozizeptives Verhalten zeigten, war bei den behandelten Tieren kein signifikanter Unterschied zur Basislinie erkennbar (Abbildung 3-14B). Dies zeigt eine Beteiligung der p38 MAPK in der PAM-vermittelten Aufrechterhaltung der thermischen Hyperalgesie, während PAM bei kürzeren Zeitpunkten (Formalintest über 45 Min.) keine Rolle zu spielen scheint (Abbildung 3-12A).

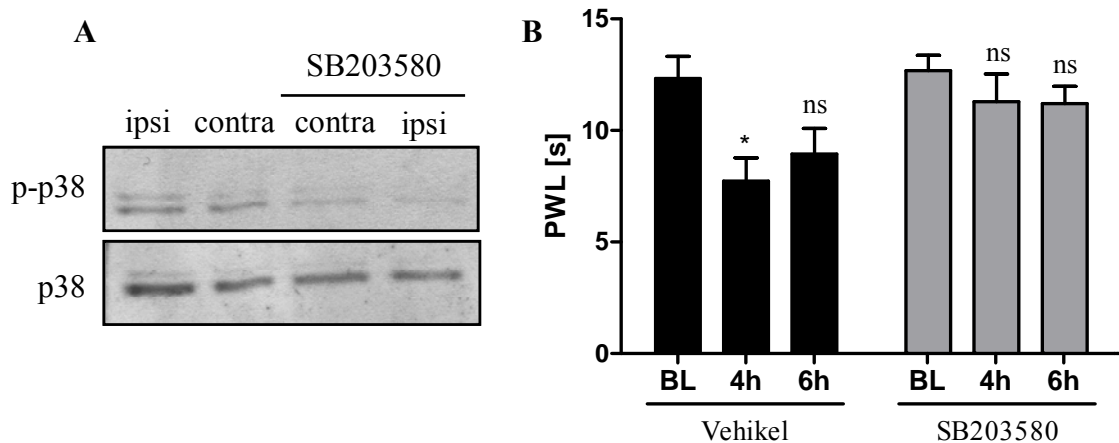


Abbildung 3-14: Verlängerung der thermischen Hyperalgesie in SNSCre-positiven Mäusen ist vermittelt über p38 MAPK. SNSCre-positiven Mäusen wurde 5% Formaldehyd subkutan auf der Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert und anschließend mittels des „Hargreaves“-Tests das Schmerzverhalten untersucht. Zusätzlich wurde den Tieren 10 µg SB203580 oder PBS 4 und 6 Stunden nach Formaldehydinjektion intrathekal verabreicht. **A)** Zur Überprüfung der Wirksamkeit des p38 MAPK-Inhibitors wurden nach dem Experiment die Dorsalganglien L4/5 ipsi- und contralateral präpariert und auf die Phosphorylierung von p38 MAPK mittels Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente unphosphorylierte p38 MAPK. **B)** Dargestellt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Pfote („paw withdrawel latency“, PWL) von je 5-6 Tieren zu den Zeitpunkten 4 und 6 Stunden (BL= Basislinie). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, *p<0,05.

3.5 Untersuchungen zum Einfluss von PAM auf den Rezeptor TRPV1

TRPV1 (Transient-Receptor-Potential-Vanilloid-1) Rezeptoren können durch noxische Wärme, Säure und endogene Liganden, wie Capsaicin, aktiviert werden und sind an der Vermittlung von Hyperalgesie und Allodynie beteiligt¹⁵⁸. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse, die eine konstitutive Aktivierung des p38 MAPK Signalweges in PAM-defizienten DRG Neuronen (siehe 3.4) und eine p38 MAPK-vermittelte Aufrechterhaltung thermischer Hyperalgesie in PAM^{-/-}SNSCre⁺ Mäusen

zeigen (siehe 3.3.2), wurde deshalb im Folgenden der Einfluss von PAM auf die Aktivität von TRPV1 untersucht.

3.5.1 Expression von TRPV1 in Abhängigkeit von PAM

Eine Aktivierung der p38 MAPK nach peripheren Entzündungen führt zu einem erhöhten Proteingehalt von TRPV1 in der Peripherie^{86, 128}. Auch bei SNSCre-negativen Mäusen konnte eine Erhöhung des Proteingehaltes an TRPV1 in Pfotengewebe nach peripheren Entzündungsreaktionen (ipsilateral) festgestellt werden. Bei SNSCre-positiven Tieren ist der Gehalt an TRPV1 schon basal auf das Niveau der ipsilateralen Seite der Kontrolltiere erhöht und erfährt keine weitere Zunahme nach Formalininjektion (Abbildung 3-15).

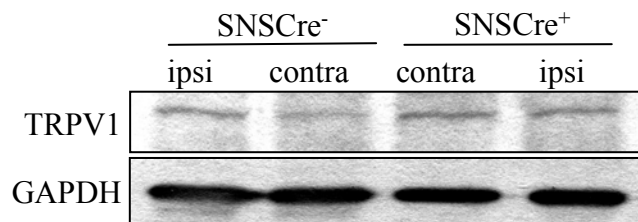


Abbildung 3-15: Proteingehalt von TRPV1 nach Formalin-induzierter Entzündung in der Pfote. Acht Stunden nach subkutaner Injektion von 5% Formaldehyd in die Dorsalseite einer Hinterpfote (ipsilateral) SNSCre-negativer und -positiver Mäuse wurde das betroffene Gewebe präpariert und mittels Western Blot der „transient receptor potential cation channel“ (TRPV1) analysiert. Zum Vergleich diente das Gewebe der contralateralen, nichtinjizierten Pfote. Als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Auch in Dorsalganglien ist der Proteingehalt an TRPV1 basal in PAM-defizienten Gewebe höher als in Gewebe von SNSCre-negativen Tieren. Im Rückenmark hingegen ist der basale Proteingehalt an TRPV1 in SNSCre-positiven Tieren geringer als bei den Kontrolltieren (Abbildung 3-16). Dies deutet auf einen gerichteten Transport hin, wie er schon von Ji et al.⁸⁶ und Camprubi-Robles et al.¹⁵⁹ beschrieben wurde. Dabei wird TRPV1 in einer Entzündungssituation, ausgehend von den Zellkörpern in den Dorsalganglien, in die Peripherie transportiert. Unter normalen Bedingungen wird TRPV1 von den Zellkörpern in den Dorsalganglien gleichmäßig zu zentralen und peripheren Nervenendigungen transportiert⁸⁶. Zusammenfassend gleichen die beobachteten Expressionslevel von TRPV1 in PAM-defizienten Dorsalganglien denen, die für Entzündungsreaktionen beschrieben werden⁸⁶.

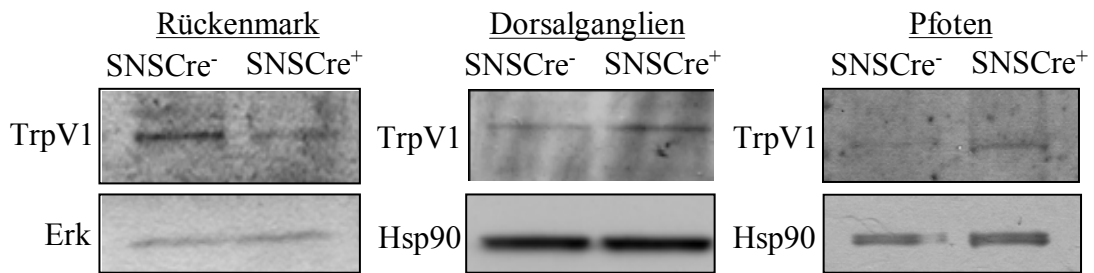


Abbildung 3-16: Vergleich der basalen Proteinlevel von TRPV1 in verschiedenen PAM-defizienten Geweben. Detektion von TRPV1 Expressionen im Rückenmark, Dorsalganglien und Pfoten von SNSCre-positiven und -negativen Tieren mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente entweder Erk (‘extracellular signal-regulated kinase’) oder Hsp90 (‘heat shock protein 90’).

3.5.2 Einfluss von PAM auf die Aktivierung und Desensibilisierung von TRPV1

Der erhöhte Gehalt an TRPV1 in Dorsalganglien lässt vermuten, dass er für die beobachtete verlängerte Phase der Hyperalgesie verantwortlich sein könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden Dorsalganglienkulturen mit steigenden Capsaicinkonzentrationen stimuliert. Die durch die Stimulierungen induzierte Änderung des Emmissionquotienten der Wellenlängen 340 nm und 380 nm wurde durch „Calcium Imaging“ erfasst (siehe 2.8). Als Calciumsensor diente Fura-2-AM. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ändert seine Emmissionseigenschaften nach Bindung von Calcium. Bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm wird weniger, wohingegen bei Anregung mit 380 nm mehr Licht emittiert. So ist davon auszugehen, dass bei steigendem Quotienten (340 nm/380 nm) die intrazelluläre Calciumkonzentration ebenfalls ansteigt.

Wie erwartet erhöht sich bei ansteigender Capsaicinkonzentration auch der Emmissionquotient von Fura-2-AM. Ein signifikanter Unterschied zwischen PAM-defizienten Neuronen und Kontrollzellen konnte hierbei allerdings nicht festgestellt werden. Der erhöhte Proteingehalt an TRPV1 in PAM-defizienten Neuronen bedingt also keine erhöhte Sensibilisierung gegenüber TRPV1-aktivierenden Substanzen.

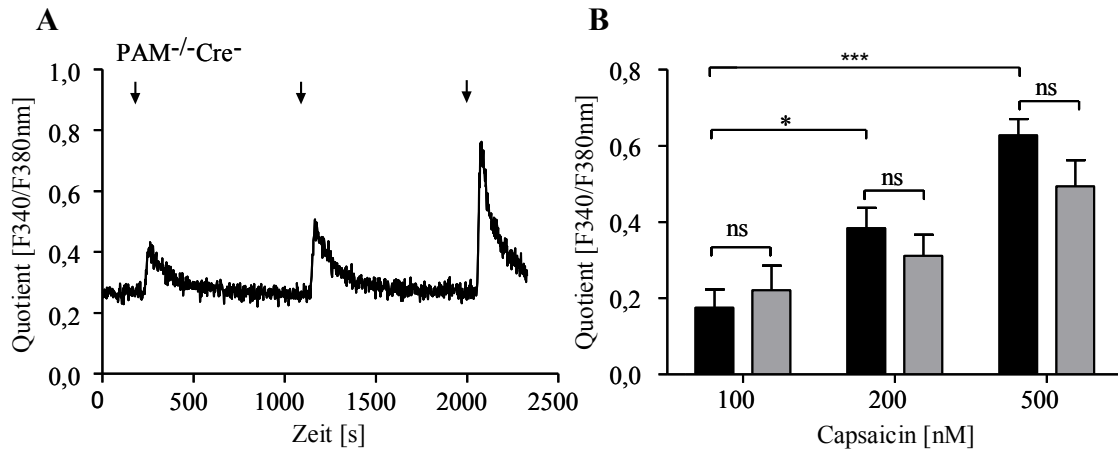


Abbildung 3-17: Capsaicindosis abhängige Calciumkonzentrationsänderung in Neuronen der Dorsalganglien. Neuronale Kulturen der Dorsalganglien aus adulten SNSCre-negativen Mäusen wurden zu den angezeigten Zeitpunkten mit 100nM, 200nM und 500nM Capsaicin für 10 Sekunden stimuliert. Die Änderungen im Gehalt an zytosolischen Calcium wurden durch „Calcium Imaging“ gemessen. **A)** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf einer repräsentativen Messung einer Cre-negativen Zelle **B)** Darstellung der Mittelwerte +SEM der maximalen Quotientenänderungen SNSCre-negativer (schwarze Säulen, n= 42) und SNSCre-positiver Neurone (graue Säulen, n= 22). Statistische Signifikanzen wurden durch eine ein- bzw zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-Test ermittelt, *p<0,05, ***p<0,002.

Die Aktivität von TRPV1 wird durch eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen kontrolliert, die entweder eine Sensibilisierung oder eine Desensibilisierung des Ionenkanals verursachen. Anhaltende oder wiederholte Stimulierung des Rezeptors führt zu einer Desensibilisierung und zu einer Unempfindlichkeit gegenüber nachfolgenden Stimulierungen^{113, 160, 161}. Eine Störung der Desensibilisierung könnte demnach zu andauernden und stärkeren Schmerzen führen. Deshalb wurde als nächstes eine mögliche Modulation der Desensibilisierung als Ursache der verlängerten Hyperalgesie untersucht.

Dazu wurden die kultivierten Neurone zunächst viermal in gleichen Abständen hintereinander mit Capsaicin (0,2 μ M) stimuliert. In die Auswertung flossen nur Zellen ein, die eine Änderung des Emissionquotienten bei allen vier Stimulierungen zeigten. Der so detektierte Calciumeinstrom nimmt, wie erwartet, mit steigender Anzahl an Stimulierungen tendenziell ab (Abbildung 3-18A). Bei PAM-defizienten DRG-Neuronen ist eine solche Abnahme der vier Kurvenmaxima in der Tendenz nicht zu erkennen. (Abbildung 3-18B).

Ergebnisse

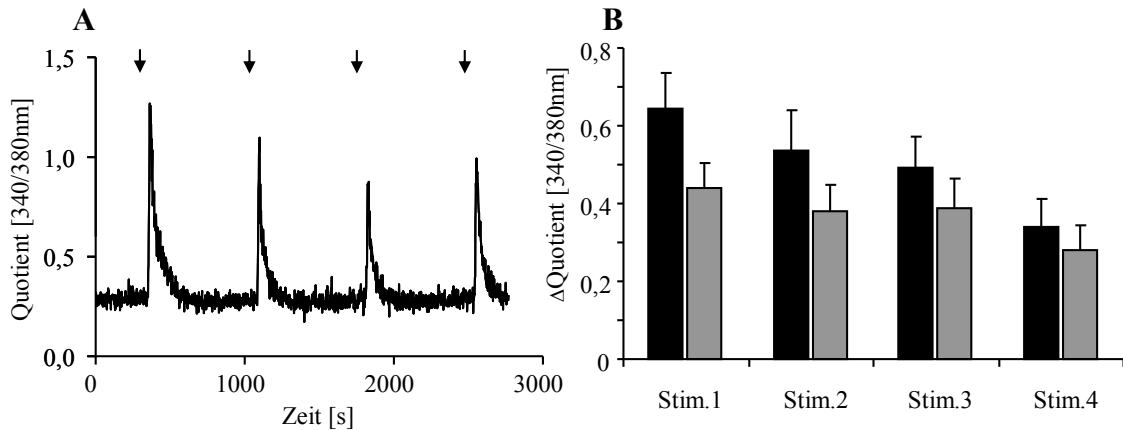


Abbildung 3-18: Desensibilisierung der DRG-Neuronen in Abhängigkeit von PAM induziert durch niedrig dosiertes Capsaicin (vier Stimulierungen). Neuronale Kulturen der Dorsalganglien aus adulten SNSCre-negativen und SNSCre-positiven Mäusen wurden viermal für 10 Sekunden mit 0,2 μ M Capsaicin zu den angezeigten Zeitpunkten in A) stimuliert. Die Änderungen der Emissionswerte des Calciumsensors Fura-2-AM wurden durch „Calcium Imaging“ gemessen. A) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf einer repräsentativen Messung SNSCre-negativer DRG-Neurone. B) Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der maximalen Quotientenänderung SNSCre-negativer (schwarze Säulen, n=18) und PAM-defizienter DRG-Neurone (graue Säulen, n=11). Unterschiede zwischen den Tiergruppen oder den Stimulationen waren nicht signifikant.

Um ein deutlicheres Ergebnis zu erhalten, wurde die Capsaicinkonzentration für die Stimulierungen erhöht. Durch diese Erhöhung der Capsaicinkonzentration bedarf es auch einer längeren Auswaschphase, sodass die Anzahl der Stimulierungen von vier auf zwei reduziert wurde. Bei Verwendung von 0,5 μ M und 1 μ M Capsaicin ist jeweils eine signifikante Reduktion des Calciumeinstromes nach der zweiten Stimulierung zu erkennen (Abbildung 3-19A+B). Im Gegensatz dazu konnte in keinem der beiden Protokolle eine Desensibilisierung der PAM-defizienten Neurone beobachtet werden (Abbildung 3-19C+D). Dieses Ergebnis zeigt deutlich einen Unterschied im Desensibilisierungsverhalten von TRPV1 in Anwesenheit oder Abwesenheit von PAM.

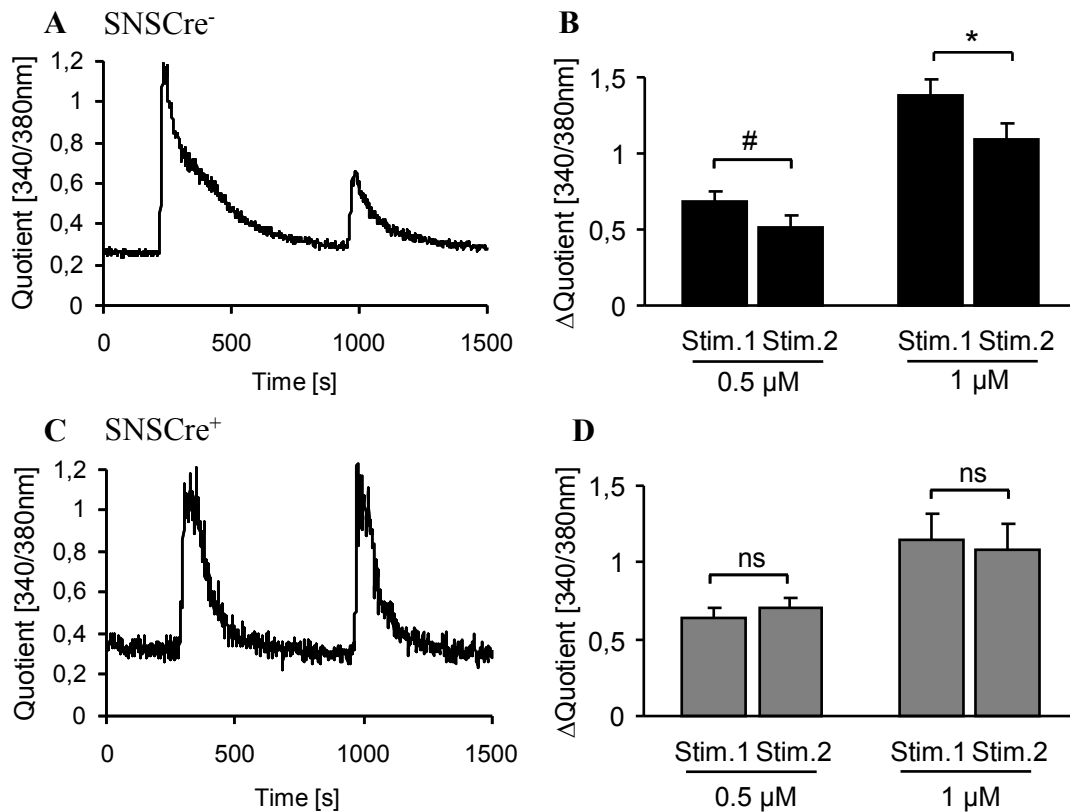


Abbildung 3-19: Desensibilisierung der DRG-Neuronen in Abhängigkeit von PAM induziert durch zwei unterschiedliche Konzentrationen Capsaicin (zwei Stimulierungen). Dorsalganglienkulturen aus adulten SNSCre-negativen (A+B) und SNSCre-positiven (C+D) Mäusen wurden je zweimal für 10 Sekunden mit 0,5 μM oder 1 μM Capsaicin zu den angezeigten Zeitpunkten stimuliert. Anschließend erfolgte ein Kontrollstimulierung (10s) mit 50 mM KCl. Die Änderungen der Emissionswerte des Calciumsensors Fura-2-AM wurden durch „Calcium Imaging“ gemessen. A+C) Jeweilige Darstellung eines repräsentativen Kurvenverlaufs mit der Verwendung von 1 μM Capsaicin B+D) Darstellung der Mittelwerte +SEM der maximalen Quotientenänderungen unter Verwendung von 1 μM und 0,5 μM Capsaicin. Getestet wurden 19-41 DRG-Neurone aus SNSCre-negative (B) und 17-31 DRG-Neurone aus SNS-Cre-positiven (D) Mäusen aus je 2-3 unabhängigen Präparationen. Statistische Signifikanzen wurde durch den *t*-Test ermittelt, **p*<0,05 (2-seitig), #*p*<0,05 (1-seitig)

Interessanterweise stellt eine Vorinkubation mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB203580 die Fähigkeit zur Desensibilisierung wieder her (Abbildung 3-20). Das bedeutet, dass die konstitutive Aktivität von p38 MAPK in PAM-defizienten Neuronen (siehe 3.4) eine effektive Desensibilisierung des TRPV1 verhindert und auf diesem Wege zu der beobachteten verlängerten thermischen Hyperalgesie führt.

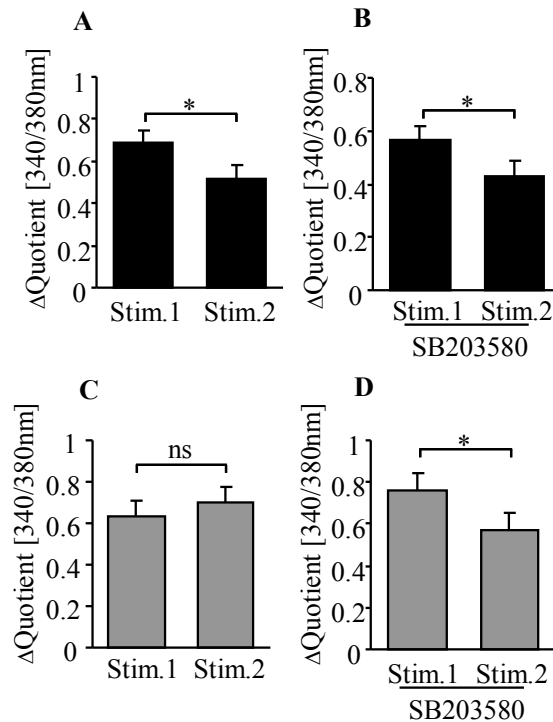


Abbildung 3-20: Capsaicin induzierte Desensibilisierung von DRG-Neuronen PAM- defizienter Mäuse in Abhängigkeit von p38 MAPK. Neurone von SNSCre-negativen (A+B) und SNSCre-positiven (C+D) Mäusen wurden zweimal für 10 Sekunden mit 0,5 μM Capsaicin stimuliert. Die Inkubation mit 10 μM SB203580 (B+D) erfolgte für die Dauer einer halben Stunde direkt vor der Messung. Dargestellt sind Mittelwerte (n= 30-50) der maximalen Quotientenänderung +SEM. Statistische Signifikanzen wurden durch einen *t*-Test (1-seitig) ermittelt, **p*<0,05

3.6 Untersuchungen zum Einfluss von PAM auf den Rezeptor TRPA1

Neben dem TRPV1 Rezeptor spielt auch ein weiterer Rezeptor der Trp-Ionenkanalfamilie, der TrpA1, bei entzündlicher Hyperalgesie eine Rolle. Dabei scheint er bei Bradykinin und Morphin-induzierten Calciumeinströmen funktional mit TRPV1 gekoppelt zu sein^{162, 163}. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Modulation der Desensibilisierung durch PAM für TRPA1 untersucht.

Dabei wurde, ähnlich dem Protokoll für die Desensibilisierung von TRPV1, der TRPA1 Ionenkanal durch zwei Stimulierungen mit je 100 μM Senföl stimuliert und die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Calcium Imaging erfasst. Sowohl bei PAM-defizienten Tieren als auch bei der Kontrollgruppe war der Calciumeinstrom nach der zweiten Stimulierung signifikant niedriger. Eine Desensibilisierung des TRPA1 Rezeptors findet somit auch in Abwesenheit von PAM statt und steht somit im Gegensatz zu den Ergebnissen von TRPV1 (vgl. 3.5.2).

Ergebnisse

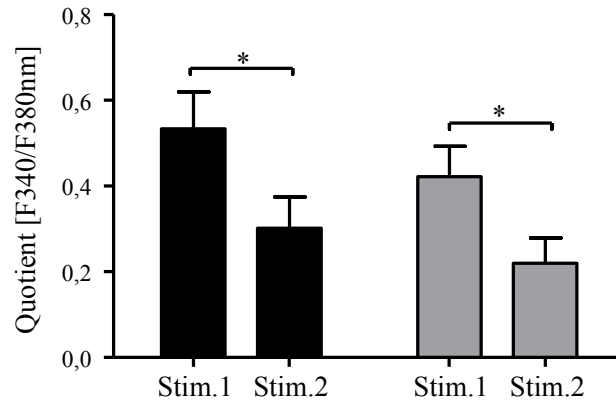


Abbildung 3-21: Senföl-induzierte Desensibilisierung der Neuronen aus Dorsalganglien PAM-defizienter Mäuse. Neuronale Kulturen der Dorsalganglien aus adulten SNSCre-negativen (schwarze Säulen) und-positiven Mäusen (graue Säulen) wurden zweimal für 10 Sekunden mit 100 μ M Senföl stimuliert. Die Änderungen im Gehalt an zytosolischem Calcium wurden durch „Calcium Imaging“ gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (n=11-19) der maximalen Emmissionsquotienten +SEM. Statistische Signifikanz wurde durch einen *t*-Test (2-seitig) ermittelt, **p*<0,05.

Neben der Beteiligung bei entzündlichen Schmerzen, spielt TRPA1 auch bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen nach mechanischen Stimuli eine Rolle¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Sollten die Änderungen der Desensibilisierung des TRPV1 Rezeptors für das veränderte Schmerzverhalten verantwortlich sein, müsste eine mechanische Allodynie in PAM-defizienten Mäusen keinen Veränderungen unterworfen sein. Zur Untersuchung der mechanischen Allodynie wurde deshalb SNSCre-negativen und SNSCre-positiven Mäusen 5% Formaldehyd injiziert (ipsilateral). Anschließend wurde das Schmerzverhalten mittels des Dynamic Plantartestes untersucht. Wie erwartet zeigten sich zwischen beiden Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede.

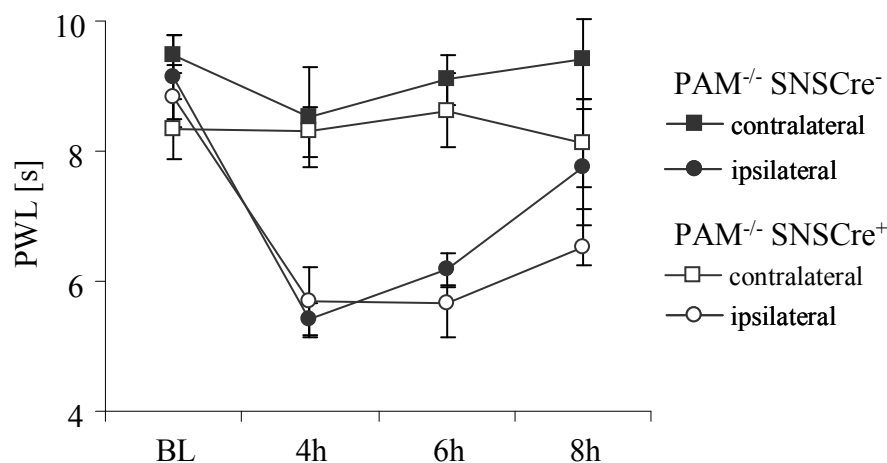


Abbildung 3-22: Verlauf einer formalininduzierten mechanischen Allodynie. Zur Untersuchung der mechanischen Allodynie wurden SNSCre-negativen und SNSCre-positiven Mäusen 5% Formaldehyd injiziert (ipsilateral) und anschließend mittels des Dynamic Plantartestes das Schmerzverhalten untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Pfote („paw withdrawel latency“, PWL) von je 7 Tieren im Zeitverlauf (BL= Basislinie). Unterschiede zwischen den Tiergruppen waren nicht signifikant.

Da die Desensibilisierung von TRPA1 Rezeptoren bei PAM-defizienten Neuronen nicht verändert ist und auch bei einer Formalin-induzierten mechanischen Allodynie keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen erkennbar sind, scheint es, dass PAM die thermische Hyperalgesie spezifisch über die p38 MAPK-vermittelte Desensibilisierung von TRPV1 moduliert.

3.7 PAM-abhängige Mechanismen zur Regulation von Rezeptor-desensibilisierung

Da spezifisch die TRPV1-Rezeptoren in PAM-defizienten DRG-Neuronen Defekte in der Desensibilisierung aufweisen, richtete sich die weitere Fragestellung an die zugrunde liegenden Mechanismen. Mandadi et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Serin 800 (S800) durch die PKC ϵ die Sensitivität von desensibilisierten bzw. internalisierten TRPV1 wieder erhöhen kann¹²⁵. Allerdings war eine basale Phosphorylierung von Serin 800 weder in PAM-defizienten DRGs noch in Kontrollgewebe zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Bisher wurden zwei Interaktionspartner von TRPV1, Snapin und Synaptotagmin IX gefunden, die calciumabhängig die neuronale SNARE-vermittelte Exozytose modulieren¹²⁴. Hingegen ist über den Mechanismus der Endozytose von TRPV1 bisher nichts bekannt. Deshalb wurde hier im Folgenden versucht durch einen *Antikörper Microarray*, neben Phosphorylierungen von Serin 800, Hinweise auf einen möglichen PAM-abhängigen Mechanismus zur TRPV1-Desensibilisierung zu finden.

3.7.1 Auffinden möglicher Mechanismen zur Regulation von Rezeptordesensibilisierung mittels Antikörper *Microarray*

Um PAM-abhängige Mechanismen im Zusammenhang mit Rezeptordesensibilisierung zu finden, wurde ein *Antikörper Microarray*, welcher 725 verschiedene Antikörper beinhaltet, verwendet. Damit sollten Unterschiede in der Expression oder Phosphorylierung verschiedener Proteine in PAM-defizienten Dorsalganglien im Vergleich zu SNSCre-negativen Mäusen gefunden werden. Dazu wurden die extrahierten Proteine aus den Dorsalganglien mit Cy5 markiert und auf den *Antikörper Microarray* Panorama XP725 von Sigma (St. Louis, USA) aufgebracht. Die Fluoreszenz der gebundenen Proteine wurde mit einem *MicroArray Scanner* dokumentiert (Abbildung 3-23).

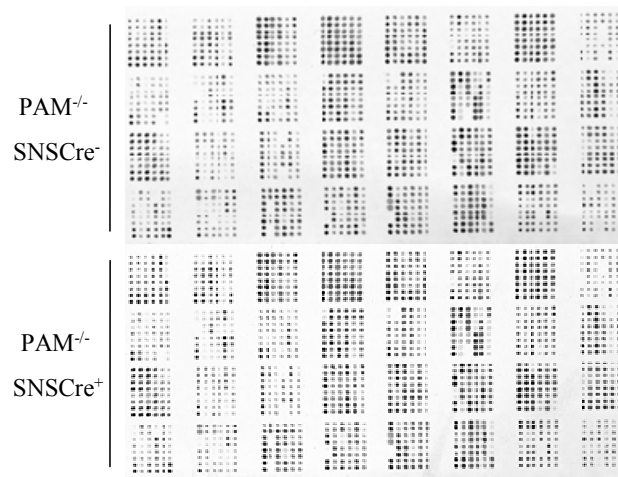


Abbildung 3-23: Negativbild des Antikörper Microarrays zum Auffinden PAM-abhängiger Signalwege. Cy5-markierte Proteine aus Dorsalganglien SNSCre-negativer und -positiver Mäuse wurden mittels „Panorama® 725 Antibody Array“ (Sigma, St.Louis, MO) auf Unterschiede in Expression und Phosphorylierung untersucht. Die Fluoreszenz wurde mittels Microarray Scanner (Innoscan 700-Innopsys™) dokumentiert.

Tatsächlich zeigten einige der untersuchten Proteine Unterschiede in der Expression zwischen beiden Tiergruppen. Tabelle 4 zeigt Proteine deren Zweierlogarithmus des Quotienten von PAM-defizienten und SNSCre-negativen Messwerten $>0,5$ oder $<-0,5$ ist. Diese Proteine stehen vorwiegend im Zusammenhang mit endo- oder exozytotischen Vorgängen. Darunter befinden sich Annexin VII¹⁶⁷, GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1, auch bekannt als Cytohesin3 oder ARNO3)¹⁶⁸, Tal1 (Tsg101-assoziierte Ligase)¹⁶⁹, p115/TAP1 (transcytosis associated protein)¹⁷⁰, Rab7¹⁷¹ und die Myosine V und VI^{172, 173}.

Die Ergebnisse aus dem *Microarray* sind zusammengesetzt aus zwei abhängigen Messungen, weshalb die Aussagekraft insgesamt nur begrenzt ist. Aus diesem Grund wurden zunächst die Überexpression zweier Proteine durch eine Western Blot Analyse überprüft. Dafür und für weitere Western blot Analysen wurden die Antikörper der gleichen Firma und gleicher Katalognummer des *Micrarrays* benutzt, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten (siehe Tabelle 4). Für die Überprüfung wurde ein Protein mit großem Log_2 -Wert (ROCK2) und eins mit einem Wert kleiner als 0,5 (GSK3 β) ausgewählt, um die Ausprägung der zu erwartenden Unterschiede vergleichen zu können.

Ergebnisse

Tabelle 4: Expressionsunterschiede in PAM-defizienten Dorsalganglien. Angegeben wurden Expressionsunterschiede als Zweierlogarithmus des Quotienten von PAM-defizienten und SNSCre-negativen Messwerten, wenn er $>0,5$ oder $<-0,5$ ist. Detektiert wurden die Werte mit Hilfe des Antikörper Microarrays. In die Berechnungen eingegangen ist dabei jeweils der Mittelwert zweier abhängige Messungen nach Subtraktion des Hintergrundes und Normalisierung. Abkürzungen siehe Text.

Protein	Log ₂ (Verhältnis Cre+/Cre-)
<i>Zytoskelett assoziierte Proteine</i>	
Cadherin	1,26
ROCK2	1,23
PKCβ1	0,92
P130 ^{Cas}	0,74
Tenascin	0,63
Rab7	0,631
Myosin VI	0,60
Myosin Va	0,55
Reelin	0,5
GRP1	-0,53
Neurofilament 200	-0,53
MAPT	-0,58
<i>Signalwege/Ubiquitinierung</i>	
SUMO1	1,14
Oaz3	1,06
Adap	0,94
APP (n-terminal)	0,94
Siah2	0,72
Calretinin	0,6
APP (KPI Domäne)	0,52
Caspase4	0,5
GSK3β	0,44
Psen	-0,51
<i>Transkription</i>	
Tal	1,53
WSTF	0,86
SP1	0,62
AP Endonuklease	0,57
Y14	0,57
c-myc	-0,56

Im Falle der GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) handelte es sich um einen sehr unspezifischen Antikörper, welches an dem Vorhandensein von mehr als einer Bande erkennbar ist. Der *Microarray* beschreibt eine Herunterregulierung von GSK3 β in PAM-defizienten Gewebe. Die Überprüfung mittels Western Blot weißt darauf hin, dass dieses Ergebnis wahrscheinlich durch die Detektion unspezifischer Banden zustandekommt. Auch in Gehirnlysaten, in denen GSK3 β stark exprimiert sein sollte, sind unspezifische Banden zu erkennen. Splicevarianten oder posttranslationelle Modifikationen sind, ausgenommen Phosphorylierungen, keine bekannt. Vermutet werden könnte, dass die stärkste Bande, die auch die richtige Proteingröße aufweist, GSK3 β zuzuordnen ist (in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet). Davon ausgehend könnte hier sogar, im Gegensatz zum *Microarray*, eine leichte Überexpression vermutet werden. Allerdings kann durch die ungesicherte Identifizierung der GSK3 β Bande keine Aussage über die Expression gemacht werden. Weitere Ergebnisse des *Microarrays* müssen also zwingend auf ihre Aussagekraft hin überprüft werden.

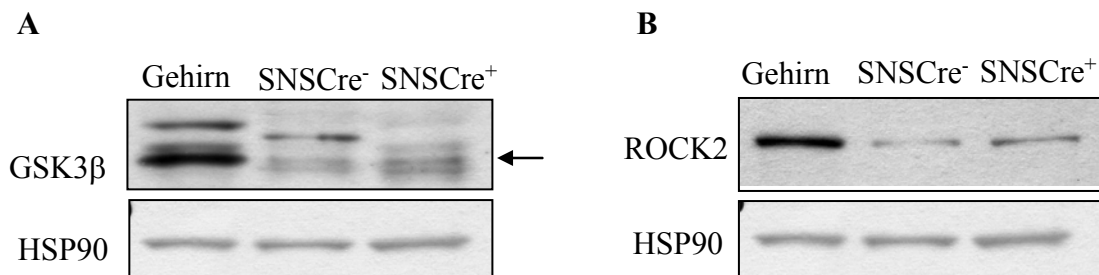


Abbildung 3-24: Validierung der mittels des *Microarray* ermittelten Expressionunterschiede durch Western Blot Analyse. Detektion von GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) (A) und ROCK2 (Rho-associated protein kinase 2) (B) zur Überprüfung der Daten aus dem „*Microarray*“ Versuch.

Bei dem zweiten Protein, der ROCK2 (Rho-associated protein kinase 2), wird durch den verwendeten Antikörper nur eine distinkte Bande detektiert. Diese ist, wie aus der *Microarray* Analyse zu erwarten gewesen ist, bei PAM-defizienten Gewebe stärker ausgeprägt als bei Kontrollgewebe. Auch der Vergleich mit Gehirnlysaten zeigt eine solche Bande auf gleicher Höhe. Da dieser Antikörper sehr viel spezifischer ist als der von GSK3 β , konnte diesmal das Ergebnis des *Microarrays* bestätigt werden. Die Aussagekraft des *Microarrays* beruht demnach auf der Spezifität des jeweiligen Antikörpers und muss für jedes Protein einzeln überprüft werden.

3.7.2 Regulation von Rezeptordesensibilisierung durch Myosine

Aufgrund der *Microarray* Ergebnisse, die Hinweise zur Überexpression der Myosine Va und VI, sowie Rab-7 in PAM-defizienten Neuronen gaben (siehe Tabelle 4), wurde die Expression mittels Western Blot Analyse nachgeprüft.

Rab7 steht im Zusammenhang mit späten Endosomen und Lysosomen¹⁷¹. Allerdings bestätigt die Western Blot Analyse den *Microarray* nicht. Es konnten keine Expressionsunterschiede bei der Analyse von SNSCre-negativen und -positiven Dorsalganglien detektiert werden (Abbildung 3-25). Dazu ist die Spezifität des Antikörpers fraglich, da er zwei Proteine ähnlichen Molekulargewichtes erkennt.

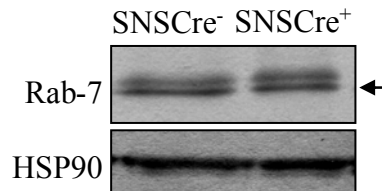


Abbildung 3-25: Expressionsanalyse von Rab-7 in PAM-defizienten Dorsalganglienlysaten. Detektion von Rab-7 durch Western Blot. Zur Kontrolle der Beladung diente jeweils HSP90 („heat shock protein 90“).

Bei der Analyse der Myosine stimmt das Microarrayergebnis mit den Resultaten der Western Blot Analysen überein. Beide Myosine zeigen eine signifikant verstärkte Expression in PAM-defizienten DRG-Lysaten (Abbildung 3-26A+B).

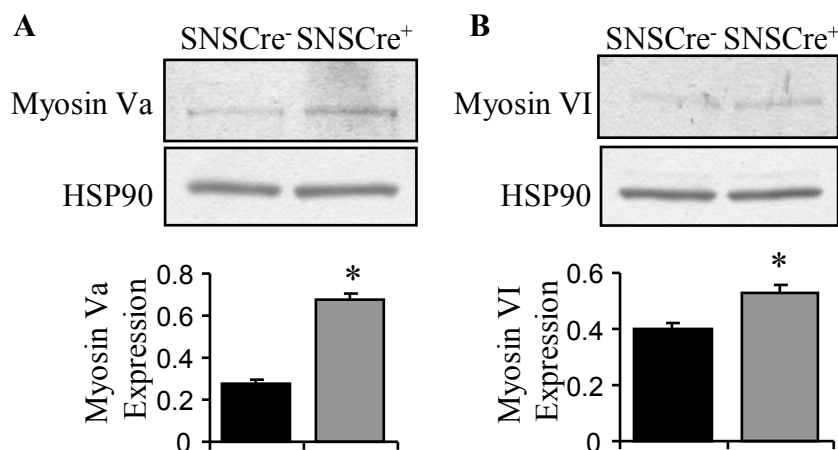


Abbildung 3-26: Expressionsunterschiede der Myosine Va und VI in PAM-defizienten Dorsalganglienlysaten. Detektion von Myosin Va (A) und Myosin VI (B) durch Western Blot. Zur Kontrolle der Beladung diente jeweils HSP90 („heat shock protein 90“). Statistische Signifikanz (n= 3-4) wurde durch einen 2-seitigen *t*-Test ermittelt, * $p < 0,05$.

Die Myosine Va und VI spielen beide eine Rolle im Rezeptortrafficking. Während Myosin Va an der Exozytose beteiligt ist, vermittelt Myosin VI die Endozytose von Rezeptoren^{172, 173}. Die detektierte Überexpression beider Myosine deutet also auf ein verändertes Rezeptortrafficking in Abwesenheit von PAM hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde durch Immunzytologische Färbungen eine mögliche Kolokalisation beider Myosine mit TRPV1 in unstimulierten und Capsaicin-stimulierten DRG-Neuronen untersucht. Beide Myosine zeigen eine partielle Kolokalisation mit dem Rezeptor TRPV1 in DRG-Neuronen. (Abbildung 3-27, Tabelle 5).

Tabelle 5: Kolokalisationsanalyse der Myosine Va und VI mit dem Rezeptor TRPV1 in DRG-Neuronen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM (n=10) des Manders overlap Faktors (R) und des gesplitteten Mander Faktors für die Myosine, sowie das Verhältnis beider Kanäle. Die Faktoren wurde mittels der „Intensity Correlation Analysis“ der Software Image J 1.43m erhoben. * bedeutet signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (n=10; t-Test (2-seitig) $p < 0,05$)

Kolokalisationsfaktoren	Myosin Va		Myosin VI	
	Kontrolle	Capsaicin	Kontrolle	Capsaicin
R	0,82 \pm 0,0062	0,89 \pm 0,0111*	0,79 \pm 0,0119	0,91 \pm 0,0145*
Kanal1:Kanal2	0,90 \pm 0,0419	0,95 \pm 0,0202	0,88 \pm 0,0522	1,02 \pm 0,0097
M_{Myosin}	0,92 \pm 0,0207	0,99 \pm 0,0023*	0,89 \pm 0,0273	0,996 \pm 0,0007*

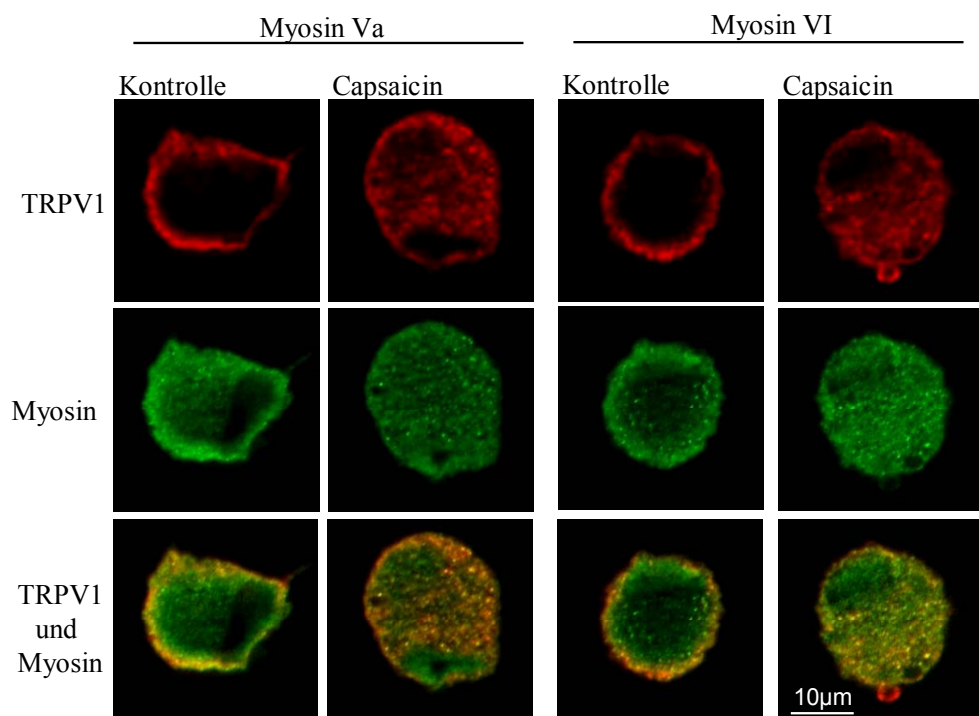


Abbildung 3-27: Kolokalisation des Rezeptors TRPV1 mit den Myosinen Va und VI. Adulte Neuronenkultur aus Dorsalganglien wurde nach zwei Tagen in Kultur zweimal mit 1 μ M Capsaicin stimuliert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. TRPV1 wurde mittels Cy3 gekoppelten, die Myosine (A Myosin Va; B Myosin VI) jeweils mittels A488 gekoppelten Antikörper gefärbt. Dabei wurde das TSA Fluoreszenz System von Perkin Elmar zur Benutzung von zwei Antikörpern der gleichen Spezies verwendet. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1, AxioCam Mrm und Apotome (Carl Zeiss Göttingen).

Die Auswertung der Immunzytologischen Färbungen mittels der „Intensity Correlation Analysis“ der Software Image J 1.43m bestätigt die partielle Kolokalisierung. Der Manders overlap Faktor (R) reicht von 0 bis 1 und beschreibt so eine starke Kolokalisierung mit dem Wert 1. Dabei ist er stark abhängig von dem Verhältnis der Pixelintensitäten der Kanäle rot und grün und sollte nur angewendet werden, wenn die Pixelintensitäten der beiden Kanäle ähnlich sind. Im Falle der Myosine ist der Quotient der Pixelintensitäten der beiden Kanäle bei ca. 0,9. Damit ist auch der Manders overlap Faktor anwendbar. Dieser beschreibt mit den Werten $0,82 \pm 0,0062$ und $0,79 \pm 0,0119$ eine partielle Kolokalisierung der beiden Myosine mit TRPV1 in unstimulierten DRG-Neuronen. Der gesplittete Manders Kolokalisationsfaktor setzt sich zusammen aus der Summe der Pixelintensitäten des angegebenen Kanals (rot oder grün), die ebenso eine Komponente des anderen Kanals aufweisen, geteilt durch die Summe aller Pixelintensitäten des entsprechenden Kanals. So bekommt man Informationen wie gut ein Kanal mit dem anderen überlappt und umgekehrt. Auch diese Faktoren beschreiben für beide Kanäle eine partielle Kolokalisierung. Wobei insgesamt die Werte für Myosin Va tendenziell höher sind als für Myosin VI.

Vergleicht man nun diese Faktoren der unstimulierten DRG-Neurone mit denen der Capsaicin-stimulierten, erhöhen sich die beiden Faktoren R und M_{Myosin} signifikant. Das heißt, dass bei einer Capsaicinstimulierung mehr Myosine mit TRPV1 kolokalisiert sind als im unstimulierten Zustand. Das bedeutet, dass bei einer Stimulierung das „freie“ Myosin abnimmt und sich zunehmend mit TRPV1 kolokalisiert. Dies ist bei beiden Myosinen gleichermaßen zu beobachten.

Die Kolokalisation zusammen mit der Überexpression der Myosine unterstützt die Annahme, dass PAM die Desensibilisierung des TRPV1 über den Mechanismus des Rezeptortraffickings modulieren könnte. Um dies nachzuweisen, wurden DRG-Kulturen ähnlich der Calcium Imaging Experimente (siehe 3.5.2) präpariert und stimuliert. Nach der Detektion von TRPV1 mittels Immunzytochemie wurden mit dem Mikroskop Bilder aufgenommen, die einen mittigen optischen Schnitt durch die Zellen zeigen. So stellen sich die Rezeptoren an der Plasmamembran bei unstimulierten Zellen als ringförmige Struktur um die Zelle dar. Desensibilisiert man die Zellen zweimal hintereinander mit Capsaicin löst sich diese Ringstruktur auf und die Signale kommen vermehrt aus dem Zytoplasma der Zelle. Die Rezeptoren verteilen sich also innerhalb der Zelle und befinden sich nicht mehr vorwiegend an der Plasmamembran (Abbildung 3-28A).

Ergebnisse

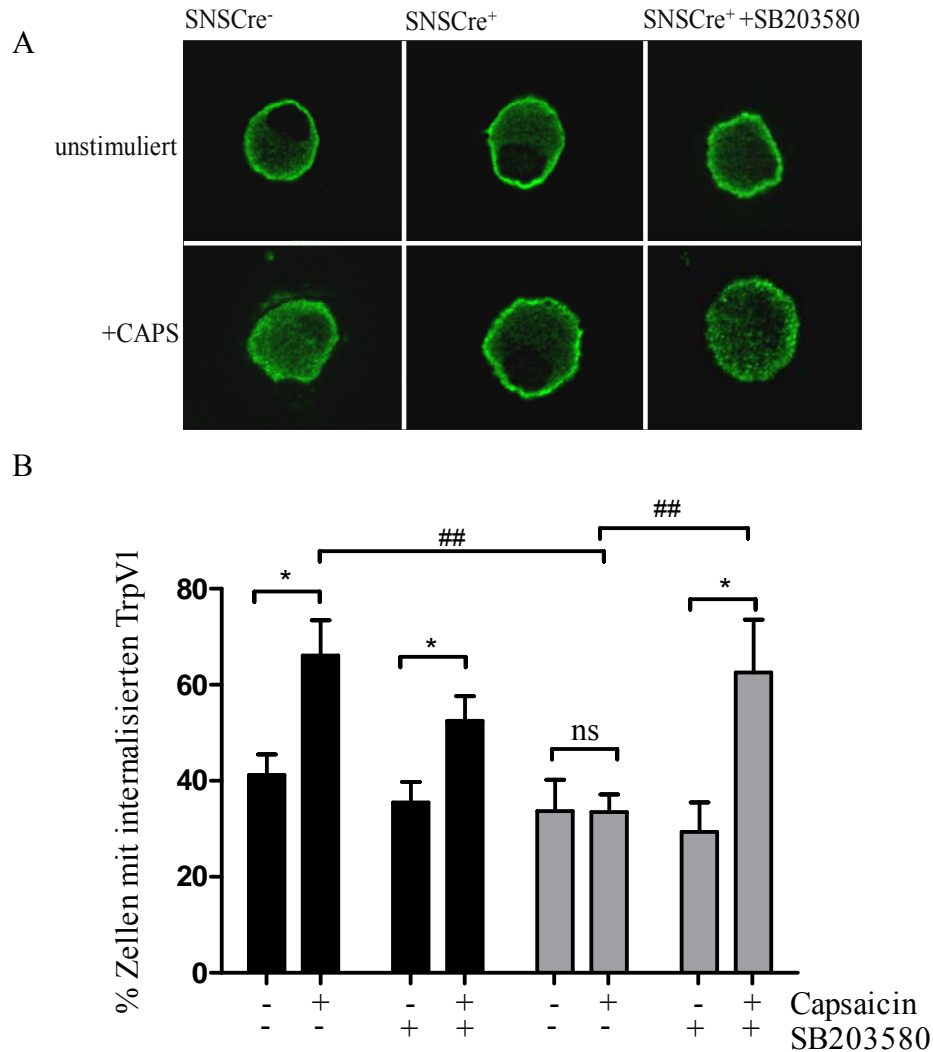


Abbildung 3-28: PAM-abhängige TRPV1-Internalisierung nach Capsaicinstimulierung. **A)** Dorsalganglienneurone wurden wie in 3.5.2 zweimal mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Anschließend sofort in 4% Paraformaldehyd fixiert und der Rezeptor TRPV1 mittels Immunzytochemie detektiert. Um die Internalisierung des Rezeptors nach darstellen zu können wurden Aufnahmen mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1, AxioCam Mrm und Apotome (Carl Zeiss Göttingen) gemacht, die optische Schnitte mittig durch die Zelle darstellen. **B)** Die statistische Auswertung erfolgte wie in 2.7.4.2 beschrieben mit Hilfe der Software Image J. Dargestellt sind Mittelwerte +SEM der Prozentzahlen aus vier Stimulierungen, die sich aus je ca. 78-83 einzelnen Zellen und 3-4 unabhängigen Präparationen zusammensetzen. Die Aufnahmen und die Auswertung wurden verblindet durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch einen *t*-Test (2-seitig) ermittelt, * $p < 0,05$ oder durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-Test ## $p < 0,01$.

Um diesen optischen Eindruck statistisch erfassen zu können, wurde durch jede Zelle wie in 2.7.4.2 beschrieben die maximalen Pixelintensitäten erfasst und so die Rezeptoren einer Zelle überwiegend als internalisiert oder nicht-internalisiert deklariert. Abbildung 3-28 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, deren Rezeptoren überwiegend internalisiert waren. Dabei steigt deren Zahl bei Wildtyp-tieren nach Desensibilisierung wie zu erwarten an. Bei PAM-defizienten Neuronen wurde keine Erhöhung der Internalisierung von TRPV1 festgestellt. Dies erklärt die fehlende Fähigkeit zur

Desensibilisierung SNSCre-positiver Neurone mit einem Defekt in der Rezeptorinternalisierung von TRPV1. Vergleichbar mit der Desensibilisierung konnte auch die Internalisierung durch die Hemmung der p38 MAPK wiederhergestellt werden.

Die fehlende Desensibilisierung von TRPV1 in PAM-defizienten Neuronen scheint daher ursächlich in einem Defekt der Rezeptorinternalisierung begründet zu liegen. Beide Vorgänge sind p38 MAPK-abhängig und können durch die Hemmung dieser wiederhergestellt werden.

3.7.3 Interaktionen zwischen PAM und APP (Amyloid Precursor Protein)

APP (Amyloid Precursor Protein) ist durch seine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung bekannt. Die physiologischen Funktionen von APP im Nervensystem sind größtenteils unbekannt aber werden dem Neuritenwachstum und der neuronalen Migration zugerechnet¹⁷⁴. Neuerdings wird APP zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Regulation des Rezeptortraffickings von NMDA, GluR1 und AMPA Rezeptoren zugeschrieben¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Nach der *Microarray* Analyse (siehe Tabelle 4) ist APP in PAM-defizienten Neuronen der Dorsalganglien verstärkt exprimiert. Die Überprüfung durch einen Western Blot bestätigt dieses Ergebnis (Abbildung 3-29).

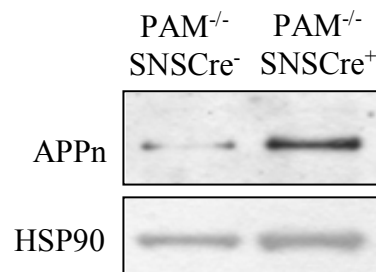


Abbildung 3-29: Western Blot Analyse zur Detektion von APPn (Amyloid Precursor Protein, n-terminal) in Dorsalganglien. Zur Kontrolle der Beladung diente jeweils HSP90 („heat shock protein 90“).

Eine Translokation von PAM an die Plasmamembran nach einer Aktivierung durch SIP ist bereits bekannt³⁷. So wurde im Folgenden mittels Immunzytochemie die Translokation von PAM und APP in HeLa Zellen untersucht. Für diese Untersuchung konnte der N-terminale APP Antikörper aufgrund einer Kreuzreaktion mit PAM nicht verwendet werden (Daten nicht gezeigt). Anstatt wurde der Antikörper gegen β -Amyloid (A8354, Sigma Aldrich) verwendet, der ebenso das gesamte Protein und die lösliche Form detektiert. β -Amyloid ($A\beta$) wird von APP durch die γ -Sekretase, welche auch Pen2 (vgl. Tabelle 4) enthält, abgespalten. Extrazelluläre Ansammlungen von β -

Amyloid führen zu der Formation von Aggregaten, Neurofibrillen und eventuell zu der Ablagerung von Plaques, die ein Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung darstellen¹⁷⁸ Translokationsexperimente in HeLa Zellen zeigen eine gleichzeitige Translokation von APP und PAM zur Plasmamembran nach Stimulierung mit S1P (Abbildung 3-30A). Dabei sind beide Proteine an der Plasmamembran partiell kolokalisiert (Abbildung 3-30B).

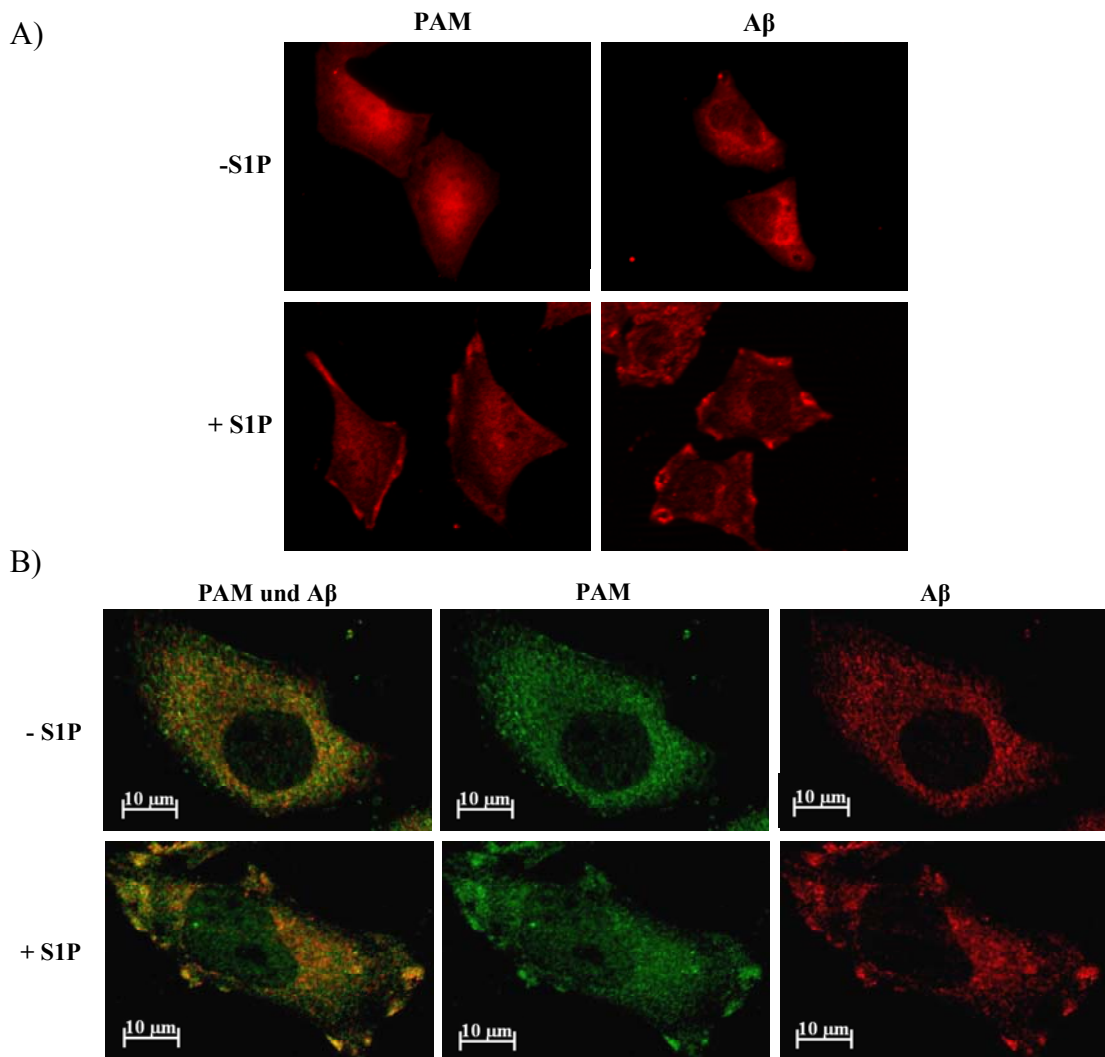


Abbildung 3-30: Translokation von PAM und APP (Amyloid Precursor Protein) zur Plasmamembran nach S1P Stimulierung. HeLa Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und mit 1 μ M S1P für 30 Min stimuliert. Anschließend fixiert und mit Hilfe von Antikörpern gegen PAM oder APP (Region von A β) (A) und mittels Kofärbung beide Proteine sichtbar gemacht (B). Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1, AxioCam Mrm und Apotome (Carl Zeiss Göttingen).

Die Überexpression von APP in PAM-defizienten Neuronen der Dorsalganglien zusammen mit der gemeinsamen Translokation zur Plasmamembran nach S1P Stimulierung könnte auf eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine im Hinblick auf Neuritenwachstum und/oder Rezeptortrafficking hindeuten.

Um weitere Hinweise auf eine mögliche funktionelle Interaktion der Proteine PAM und APP zu erhalten wurde eine Immunpräzipitation von APP mit Hilfe des A β -Antikörpers durchgeführt und durch Western Blot Analyse überprüft, ob PAM koimmunpräzipitiert wird.

Da durch die Translokationsversuche gezeigt wurde, dass beide Proteine nach S1P Behandlung partiell kolokalisiert sind, wurden für die Immunpräzipitation stimulierte wie unstimulierte HeLa-Zellen (humanen Ursprungs) verwendet. Die Western Blot Analyse detektiert zwei prominente APP Signale aus unstimulierten HeLa Zellen. Hingegen zeigte die Analyse der stimulierten Zellen nur noch eines dieser Signale. Nach dem Proteingrößenstandard liegen beide Banden zwischen 85 und 100 kDa. Das weist auf zwei Isoformen des humanen APPs hin: Isoform b besitzt eine Größe von 85kDa, wohingegen Isoform a eine Größe von 87 kDa aufweist (GenBank Eintrag: NP_000475 und NP_958816). Das Vorhandensein nur einer Bande bei der stimulierten Probe deutet auf eine Regulation posttranslationeller Modifikationen durch S1P hin. Unspezifische Bindungen an die Agarose sind durch die Verwendung eines Kontrollantikörpers (Spur K) im Bezug auf die Immunpräzipitation von A β auszuschließen.

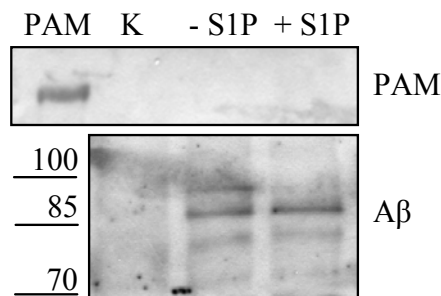


Abbildung 3-31: Koimmunpräzipitation von PAM und A β . HeLa Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und mit 3 μ M S1P stimuliert. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper A β . Immunpräzipitierte Proteine wurden in einer 7%igen SDS PAGE aufgetrennt und per Western Blot die Proteine PAM und A β analysiert. K steht für eine Immunpräzipitation mit einem Kontrollantikörper und PAM für das Auftragen von aufgereinigtem PAM als Kontrolle. Zahlen stehen für Banden des Proteinmarkers in kDa.

PAM wurde allerdings nicht koimmunpräzipitiert. Zum besseren Vergleich wurde aufgereinigtes PAM aufgetragen. Eine funktionelle Interaktion beider Proteine ist damit nicht auszuschließen, die Bildung eines stabilen Komplexes ist aber nach den Ergebnissen der Immunpräzipitation eher unwahrscheinlich.

4 Diskussion

PAM hat aufgrund seiner enormen Größe von 510 kDa und der Vielzahl von Proteinbindungsstellen das Potential viele regulatorische und physiologische Prozesse zu regulieren. Die bisher am besten untersuchten Domänen von PAM sind die Ring-Finger Domäne und die RCC1-ähnliche Domäne. Die Ring-Finger Domäne vermittelt die E3-Ubiquitinligaseaktivität, womit PAM Einfluss auf den mTOR- und den p38 MAPK-Signalweg nimmt. Davon unabhängig sind mit der RCC1-ähnlichen Domäne weitere Funktionen von PAM, wie beispielsweise Interaktionen mit der Adenylylzyklase^{13,36} und dem Iontransporters KCC2⁶ beschrieben.

4.1 PAM Funktionen unabhängig von der Ubiquitinligaseaktivität

Funktionen von PAM unabhängig von seiner Ubiquitinligaseaktivität wurden in verschiedenen Studien beschrieben. So entsteht durch Deletionen oder Insertionen im Bereich der RCC1-ähnlichen Domäne bei *C. elegans* der gleiche Phänotyp wie bei Mutationen am C-terminus des Proteins, der die Ubiquitinligasefunktion trägt⁹⁰. Des Weiteren ist der Bereich der RCC1-ähnlichen Domäne von PAM ausreichend, um die Adenylylzyklase mit der gleichen Affinität wie das Gesamtprotein zu hemmen. Hinzu kommt, dass PAM zwar die G α -induzierte Adenylylzyklaseaktivität hemmt, aber keinen Einfluss auf die Forskolin-induzierte Aktivität hat, was eine Hemmung durch den ubiquitinvermittelten Abbau ausschließt^{13,36}.

Die PAM-vermittelte Hemmung der Adenylylzyklase wird durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P) induziert. S1P ist der Ligand einer Familie von fünf G-protein gekoppelten Rezeptoren (S1PR₁₋₅). Über die Aktivierung dieser Rezeptoren oder direkt als sekundärer Botenstoff nimmt S1P Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen¹⁷⁹. Beispielsweise werden die Signalkaskaden von cAMP, Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K), Phospholipase C (PLC) und die der kleinen G-Proteine Ras, Rho und Rac reguliert. So nimmt S1P auch Einfluss auf den mTOR-Signalweg^{4, 38-40}. Interessanterweise verläuft der Signaltransduktionsmechanismus der S1P-induzierten mTORC1-Stimulierung über dieselben Komponenten (GPCR, G_{i/o}, PLC und PKC), die auch zu der S1P-abhängigen Aktivierung von PAM führen^{4, 37}. Tatsächlich wurde eine Aktivierung von mTOR durch PAM gezeigt^{3, 4, 127} und im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung der PAM-defizienten DRG-Neurone bestätigt. Die regulatorische Rolle von PAM bei der S1P-induzierten mTOR-Aktivierung wurde durch eine Erhöhung der

intrazellulären PAM-Konzentration in MCF-7 Zellen evident. Denn diese hatte als solche keinen Einfluss auf die mTOR-Aktivierung. Eine Stimulierung der transfizierten Zellen mit S1P hingegen führte zu einer deutlich stärkeren mTOR-Phosphorylierung als in nicht-transfizierten Zellen. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass PAM erst nach Aktivierung durch S1P zu einer mTOR-Aktivierung beiträgt. Die Vermittlung der mTOR-Aktivierung über PAM scheint allerdings nicht auf S1P beschränkt zu sein, da ebenfalls eine PAM-abhängige Induktion der mTOR-Aktivität durch Insulin stattfindet⁴.

Der Mechanismus, der zu der PAM-vermittelten mTOR Aktivierung durch S1P führt, könnte über die beschriebene Poly-Ubiquitinierung von TSC2 führen^{3, 4}. Die anschließende Degradation von TSC2 hebt die hemmende Wirkung von TSC2 auf mTOR auf und aktiviert damit diesen Signalweg (siehe Abbildung 4-1). Obwohl der Abbau von TSC2 für eine Hemmung nicht zwingend notwendig ist¹⁸⁰, könnte diese Expressionskontrolle ein Mechanismus zur langfristigen Regulation oder für die Regulation der basalen mTOR Aktivität darstellen. Die Aktivierung des mTOR-Signalweges über die Ubiquitinierung und den Abbau von TSC2 durch PAM kann allerdings ausgeschlossen werden, da ein S1P-induzierter und PAM-vermittelter Abbau von TSC2 nicht beobachtet wurde⁴.

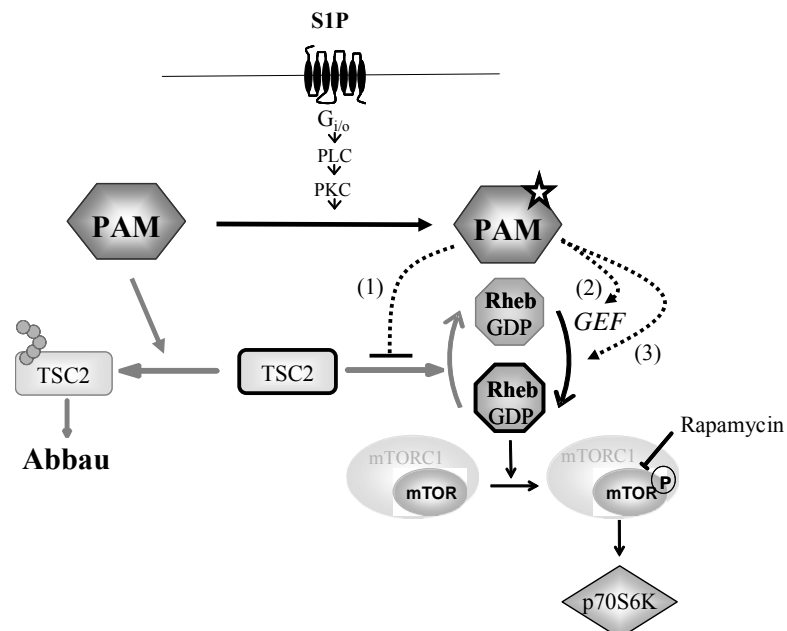


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des PAM/mTOR Signalweges. PAM wird durch S1P aktiviert und aktiviert in Folge den mTORC1-Komplex über Rheb. Dies könnte über eine Hemmung einer GAP (1) oder über eine Aktivierung einer GEF (2) geschehen. Möglich wäre auch, dass PAM selbst als GEF Rheb aktiviert (3). Aktiviertes mTOR reguliert durch direkte Phosphorylierung von Translations-Initiations-Faktoren, wie p70S6 Kinase die Translation. Weiterhin kann PAM S1P-unabhängig TSC2 ubiquitinieren und so zu dessen Abbau führen. Durch den Wegfall der mTOR-Hemmung durch TSC2 wird ebenfalls der mTOR-Signalweg aktiviert.

Alternativ könnte PAM direkt den Aktivitätszustand von Rheb beeinflussen. Aufgrund der RCC1-ähnlichen Domäne wird seit längerem eine Funktion von PAM als Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (Guaninenucleotide Exchange Factor, **GEF**) diskutiert⁴. GEFs katalysieren den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an kleinen G-Proteinen (Guanin Nukleotid bindende Proteine). Dieser Wechsel bedingt eine Konformationsänderung der G-Proteine, sodass sie in der aktivierten Konformation mit ihrem Zielprotein interagieren können. Einen ersten Hinweis auf eine Beeinflussung von G-Proteinen durch PAM bietet das PAM-Ortholog aus *C.elegans* für das eine funktionale Interaktion mit der Rab GEF GLO-4 nachgewiesen werden konnte¹⁸¹.

Für eine Funktion als GEF spricht, neben der Sequenzhomologie zu der GEF RCC1, dass PAM die GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ -Bindung, sowie die GDP-Freisetzung von Rheb *in vitro* erhöht⁴. Durch Transfektion von konstitutiv aktiver (Q64L) und dominant negativer (D60K9) Rhebmutanten im Rahmen dieser Arbeit konnte Rheb als Komponente der PAM-vermittelten und S1P-induzierten mTOR-Aktivierung bestätigt werden. Für die S1P-induzierte mTOR Aktivierung lassen die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Daten einen TSC2-unabhängiger Mechanismus vermuten, der (1) entweder zu einer Regulation seines Aktivators Rheb oder (2) einer Regulation von Rheb über eine bislang unbekannt Komponente führt. So scheint PAM auf zwei verschiedenen Wegen die Kinaseaktivität von mTOR zu steigern. Zum einen durch die Inaktivierung von TSC2 mittels Poly-Ubiquitinierung und zum anderen durch eine ubiquitinligase-unabhängige Aktivierung von Rheb. Welche dieser beiden Möglichkeiten genutzt wird, scheint Stimulus-abhängig zu sein.

4.2 Die Bedeutung von PAM für das Neuritenwachstum

Die bisher am besten untersuchten Funktionen von PAM betreffen die Synapsenbildung und das Axonwachstum. Burgess und Kollegen beschreiben im Rahmen einer Untersuchung der Piebald Deletion bei Mäusen ein Überschießen der terminalen Endigungen von Motoneuronen. Sensorische Neurone waren gleichfalls betroffen³⁰. Die Piebald Deletion beinhaltet neben dem Gen für PAM, *phr1*, zwei weitere Gene. Durch eine nachfolgende Studie konnte allerdings bestätigt werden, dass der beschriebene Phänotyp auf die Deletion von PAM zurückzuführen ist³¹. Zusätzlich werden Defekte im Auswachsen von Axonen beschrieben. Auch das Zebrafisch (*Danio rerio*)-Ortholog

Esrom ist verantwortlich für das Auswachsen und die Orientierung von Axonen^{90, 182}. Ebenso entdeckten Lewcock et al.¹⁸³ bei der Suche nach Genen, die Orientierung und das Auswachsen von Axonen betreffend, PAM als verantwortliches Gen für die Mausmutation Magellan.

Dabei scheint es durchaus funktionelle Unterschiede in den verschiedenen Neuronenpopulationen zu geben, die vielleicht sogar evolutiv begründet sein könnten. Denn Mutationen der orthologen Proteine zu PAM bei Invertebraten (*D. melanogaster* und *C. elegans*) sind vital^{12, 23, 25}, wohingegen ein konstitutiver Knockout von PAM bei Vertebraten (*D. rerio*⁹⁰ und *M. musculus*^{30, 31}) einen letalen Phänotyp hervorbringt. Für die vorliegende Arbeit wurde das Cre-Lox System verwendet, um konditionale PAM-Knockout Mausstämme zu generieren. Die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promotors verhindert eine funktionale Expression von PAM in allen Neuronentypen¹⁸⁴. Diese gewebsspezifische Deletion von PAM führte zu einer pränatalen Letalität. Ein Eingrenzen des Knockouts ausschließlich auf Motoneurone führte hingegen bei Studien von Bloom et al.³¹ zu einer variablen Überlebensrate. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Funktionalität von PAM während der Neuronenentwicklung von Vertebraten. Eine Eingrenzung des Knockouts auf nozizeptive und thermorezeptive Neurone der Dorsalganglien und der Ganglia trigeminale im Rahmen dieser Arbeit führte hingegen zu einem vitalen Phänotyp. Dabei wurde die Cre-Rekombinase unter der Promotorkontrolle des Na(v)1.8-Gens¹⁴⁴ exprimiert (im Folgenden als SNSCre bezeichnet). Der Beginn der Cre-Rekombinaseaktivität und des damit verbundenen Zeitpunktes der PAM-Deletion liegt dabei nach dem embryonalen Tag 17 (E17)¹⁴⁴. Bis dahin ist die Formation von Synapsen im Rückenmark nahezu abgeschlossen¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Das resultiert in einer nur kurzen Zeitspanne in der das Fehlen von PAM die Entwicklung der Neurone beeinflussen kann und erhöht somit auch die Möglichkeit einer vitalen Knockoutlinie. Trotzdem ist ein geringes, aber signifikant verstärktes Auswachsen der spinalen Neuronenendigungen in die innere Lamina II zu beobachten. Dies bestätigt die evolutiv konservierte Funktion von PAM das Neuritenwachstum negativ zu regulieren. Diese morphologische Veränderung führt aber zu keinen Defekten in der Motokoordination. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Mauslinie generiert werden, in der PAM in nozizeptiven Neuronen ausgenockt ist, dabei aber die Auswirkungen auf die Neuronenentwicklung minimiert werden konnten.

Als einziger bekannter Mechanismus, der das überschießende neuronale Wachstum in PAM-defizienten Tieren bedingt, wird der p38 MAPK- Signalweg angeführt. Lewcock et al.¹⁸³ beschreibt in seiner Mausmutation Magellan Defekte im Auswachsen der Axone bei motorischen und sensorischen Neuronen, die durch eine Hemmung der p38 MAPK verhindert werden konnten. Ursächlich dafür ist ein instabiles Zytoskelett. Durch die Hemmung der p38 MAPK werden Microtubuli stabilisiert und ein einwandfreies Wachstum gewährleistet. Interessanterweise findet auch eine funktionelle Interaktion zwischen PAM und Aktin statt⁷. Dabei hat PAM allerdings keinen Einfluss auf die Polymerisierung oder Depolymerisierung von Aktin, sondern die Bindung zu F-Aktin hemmt die Ubiquitinligaseaktivität von PAM, das aus HeLa-Zellen isoliert wurde. Allerdings unterscheidet sich die Interaktion von PAM und F-Aktin stark zwischen den verschiedenen PAM Splice-Formen, die gewebs- und zellspezifisch exprimiert werden. Es scheint daher möglich, dass PAM neben dem Tubulinzytoskelett auch das Aktinzytoskelett modulieren kann und über unterschiedliche Wege das Neuritenwachstum beeinflusst.

Neben dem p38 MAPK-Signalweg ist auch eine Beteiligung des mTOR-Signalweges bei dem Neuritenwachstum bekannt⁵⁴. PAM ist dabei mit TSC2 entlang der Neuriten und im Wachstumskegel colokalisiert. Eine Überexpression von TSC2 und TSC1 führt zu verkleinerten Augen von Drosophilamutanten. Eine Mutation im Hgwire-Gen verstärkt diesen Phänotyp und bestärkt so die negative Regulation von TSC2 im Sinne einer Wachstumsregulation¹²⁷. Die Verknüpfung der Signalwege S1P, PAM und mTOR durch die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen ein solches Stimulus-abhängiges Einwirken von PAM auf mTOR zur Regulation des Wachstums.

Schließlich zeigte der Antikörper Microarray eine interessante Expressionsveränderung von APP (Amyloid Precursor Protein) und anderen Proteinen dieses Signalweges wie beispielsweise Rubin, Tau, Pen2, GSK3 β oder Caspase4 zwischen PAM-defizienten DRGs und Kontrollgewebe.

Amyloid- β wie auch APP ist durch seine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung bekannt. Es gehört zu einer kleinen Genfamilie zu der neben den humanen APLP1 and APLP2 auch APPL (*D. melanogaster*) und APL-1 (*C. elegans*) gehören¹⁸⁸. Obwohl viele Studien zur Klärung der pathophysiologischen Funktion von APP vorgenommen wurden, ist die physiologische Bedeutung von APP bisher noch

nicht vollständig geklärt. Eine der ersten beschriebenen physiologischen Funktionen zeigt eine auto- und parakrine Wirkung in der Wachstumsregulation von Fibroblasten¹⁸⁹. Daneben stimuliert APP das Auswachsen von Neuriten und fördert die Synaptogenese¹⁷⁴. So zeigen die Proteine PAM und APP gegensätzliche Wirkungen, so dass spekuliert werden könnte, dass PAM ein negativer Regulator des APP Signalweges ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mehrere Signalwege in DRG-Neuronen von PAM beeinflusst werden, die unabhängig von p38 MAPK das Neuronenwachstum beeinflussen.

4.3 Regulation der synaptischen Plastizität durch PAM

Neben der Regulation des Neuritenwachstums beeinflusst PAM auch die synaptische Plastizität und legt somit eine Beteiligung an nozizeptiven Vorgängen nahe.

4.3.1 Regulation der Synapsenmorphologie durch PAM

Die *D.melanogaster* Mutation Highwire ist charakterisiert durch eine erhöhte Anzahl an synaptischen Verzweigungen und präsynaptischen Endigungen an der neuromuskulären Endplatte²³. Das *C.elegans* ortholog Rpm-1 wurde durch zwei unabhängige Studien identifiziert^{12, 25}. Dabei wurden im Gegensatz zur Highwire Mutante unterschiedliche Veränderungen der motorischen Neuronenendigungen beschrieben. Einige Neurone zeigten weniger präsynaptische Neuronenendigungen, die aber dafür größer waren und multiple Aktivitätszonen aufwiesen. Wohingegen andere präsynaptische Endigungen kleiner oder gänzlich abwesend waren. Ungleich der *Drosophila* Mutante zeigten sich in Motoneuronen der Rpm-1 Mutante keine Verzweigungsdefekte. Dies könnte auf die unterschiedliche Morphologie der neuromuskulären Endplatten in *C.elegans* und *D.melanogaster* zurückzuführen sein. Denn in mechanosensorischen Neuronen der Rpm-1 Mutante zeigten sich Verzweigungsdefekte und Wegfindungsprobleme ähnlich der Highwire Mutante. Auch bei der Piebald-Deletion wurden auffällige morphologische Änderungen der Endigungen von motorischen und sensorischen Neuronen beschrieben³⁰.

Diese Beobachtungen scheinen erneut im Gegensatz zu denen von APP-defizienten Tieren zu stehen. Durch Experimente mit Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der APP-Familie als essentielle Gene teilweise überlappende Funktionen

ausüben¹⁹⁰. Im peripheren Nervensystem besitzen *App^{-/-}/Aplp2^{-/-}* Doppel-Knockouttiere fehlerhaft gebildete motorische Endplatten mit einem reduzierten Besatz an prä- und postsynaptischen Elementen¹⁹¹. Diese Funktion scheint evolutiv konserviert zu sein, da eine erniedrigte Anzahl an synaptischen Nervenendigungen an der neuromuskulären Endplatte auch bei *Appl*-defizienten Drosophilalarven erkennbar ist¹⁹². Während bei Abwesenheit von *Appl* die Anzahl an synaptischen Nervenendigungen reduziert ist, sind mehr und verzweigtere Endigungen bei PAM-defizienten Fliegen zu beobachten^{27, 193}. Es ist daher möglich, dass PAM als Gegenspieler des APP-Signalweges agiert und somit nicht nur das Wachstum von Neuronen sondern auch die Morphologie von Synapsen über den Signalweg von APP beeinflusst.

4.3.2 Regulation der Synapsenfunktionen durch PAM

Neben den morphologischen Änderungen der Neuronenendigungen durch PAM, beeinflusst PAM über verschiedene Signalwege auch die Synapsenfunktion.

cAMP-Signalwege

cAMP-abhängige Signalkaskaden spielen bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit eine zentrale Rolle³³⁻³⁵. Schmerzmediatoren wie beispielsweise Prostaglandine oder Adenosin vermitteln ihre Effekte über die Aktivierung der Adenylylzyklase und damit über erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen³⁴. PAM kann verschiedene Isoformen der Adenylylzyklase hemmen und beeinflusst somit die Synapsenfunktion über cAMP-abhängige Signalwege^{36, 37}. Tatsächlich führt eine Verminderung der PAM-Expression im Rückenmark mittels Oligonukleotide zu einer Verstärkung der cAMP Synthese und einer Steigerung des nozizeptiven Verhaltens und deutet somit auf antinozizeptive Eigenschaften von PAM hin¹⁹. Eine Regulation des cAMP Signalweges in DRG-Neuronen wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

mTOR-Signalwege

Beständigere Änderungen der synaptischen Plastizität beinhalten die Expression neuer Proteine. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Translation spielt mTOR und führt so zu andauernden Veränderungen der Synapsenfunktion¹⁹⁴. PAM reguliert den mTOR-Signalweg über zwei Wege. Zum einen über die Ubiquitinierung von TSC2, die zu einem Abbau dieses Proteins und zu einer Aktivierung von mTOR führt und zum anderen über die GTPase Rheb. Die Vermittlung der PAM-abhängigen mTOR-

Aktivierung über Rheb in DRG-Neuronen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden.

p38 MAPK-Signalwege

In *C.elegans* zeigt die Mutation des orthologen Proteins Rpm-1 eine verminderte Anzahl an synaptischen Vesikeln von cholinergen und GABAergen Synapsen²⁹. Weiterhin reguliert Rpm-1 die Internalisierung von AMPA-Rezeptoren an zentralen Synapsen¹⁹⁵. Sowohl die Anzahl an synaptischen Vesikeln als auch die Internalisierung der AMPA-Rezeptoren waren p38 MAPK-abhängige Vorgänge.

p38 MAPK wird üblicherweise durch Stressfaktoren und proinflammatorische Zytokine aktiviert¹⁹⁶ und reguliert die Synthese vieler Entzündungsmediatoren wie TNF α und IL-1 β ¹⁹⁷. Dieses machte p38 MAPK zu einem potentiellen therapeutischen Target. Systemische oder intrathekale Gabe von p38 MAPK Hemmstoffen verringert dementsprechend effektiv Entzündungen und Arthritis (Zusammengefasst in Kumar et al. 2003¹⁹⁷). Dementsprechend führt in neuropathischen Schmerzmodellen eine Aktivierung der p38 MAPK zu einer Verlängerung der thermischen Hyperalgesie^{86, 155}. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte die andauernde thermische Hyperalgesie bei PAM^{-/-}SNSCre⁺ Mäusen durch die Hemmung der p38 MAPK verhindert werden. Trotz dieses neuen erfolgversprechenden Zielproteins für die Therapie chronischer entzündlicher Schmerzen passierten die wenigsten p38 MAPK Hemmstoffe die Klinische Phase II. Denn p38 fördert nicht nur die Synthese proinflammatorischer Zytokine, sondern wird selbst durch sie aktiviert. Eine solche endlose Aktivierungsschleife wird zum Teil durch p38-abhängige antiinflammatorische Mechanismen verhindert, die bei einer Hemmung der p38 MAPK ebenfalls unterbunden werden. Beispielsweise ist die Expression von IL-10 stark p38-abhängig^{196, 198}. So stellte sich die Hemmung der p38 MAPK für therapeutische Zwecke als ungünstig heraus und macht es umso nötiger Signalwege oberhalb und unterhalb dieser zentralen Kinase aufzuklären.

Ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie ist die Funktion und räumliche Verteilung des Rezeptors TRPV1^{112, 199}.

Periphere Entzündungen resultieren in einer Umgestaltung der Neuropeptide, Ionenkanäle und der Rezeptordichte im Zellkörper von Dorsalganglien-neuronen²⁰⁰. Durch Phosphorylierungen herbeigeführte Rezeptoraktivitätssteigerung und das

Ansteigen der Rezeptordichte an der Plasmamembran bilden die Haupteffekte, die zu einer Nozizeptoraktivierung führen und schlussendlich in der Ausbildung thermischer Hyperalgesie resultieren^{112, 201}. Dabei ist TRPV1 bei verschiedenen Krankheitszuständen, wie beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen¹¹¹ vermehrt exprimiert. TRPV1-defizienten Tieren fehlt entsprechend die Fähigkeit eine thermische Hyperalgesie zu entwickeln^{112, 199}.

In entzündeten Dorsalganglienneuronen unterliegt die Bildung und Verteilung von TRPV1 einer Regulation durch p38 MAPK⁸⁶. Entsprechend zu der konstitutiven Aktivierung von p38 MAPK in PAM-defizienten Neuronen, wurde in Pfotengewebe von PAM Knockout-Mäusen basal eine Zunahme von TRPV1 auf etwa das Niveau der entzündeten Wildtypkonzentration festgestellt. Bei peripheren Entzündungen wird TRPV1 verstärkt im Zellkörper der DRG-Neurone gebildet und vermehrt in die Peripherie transportiert (siehe Abbildung 4-2)⁸⁶. Die aus dem PAM-Knockout resultierende konstitutive Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges führt zu einer verstärkten Expression von TRPV1 in nozizeptiven Neuronen, sowie einem vermehrten Transport in die Peripherie. Allerdings sind die TRPV1-Konzentrationen in den entzündeten Pfoten von Knockout- und Kontrollmäusen nahezu gleich und können somit das unterschiedliche Schmerzverhalten der Tiere nicht erklären.

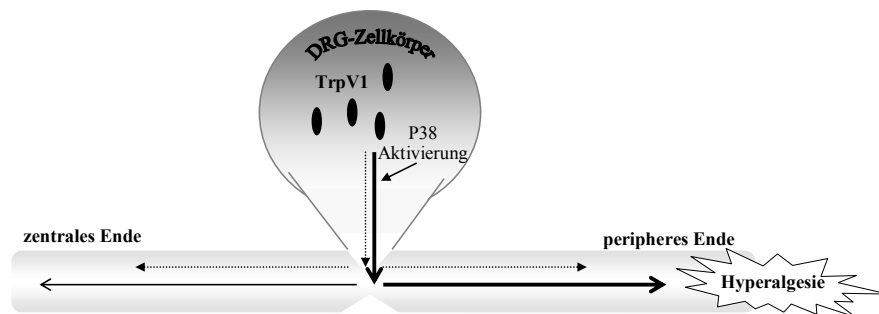


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des TRPV1-Transportes in DRG-Neuronen bei peripherer Entzündung. Unter normalen Bedingungen wird TRPV1 im Zellkörper von DRG-Neuronen exprimiert und gleichmäßig zu den zentralen und peripheren Endigungen transportiert. Bei peripherer Entzündung wird p38 MAPK aktiviert was zu einer gesteigerten Translation von TRPV1 führt. Unter diesen Bedingungen wird der Rezeptor vorwiegend in die Peripherie transportiert, was zu einer hyperalgetischen Entwicklung beiträgt (verändert nach Ji et al.,2002⁸⁶).

Identisch mit TRPV1-defizienten Tieren zeigen PAM-defiziente Tiere, trotz erhöhter basaler TRPV1-Dichte in Pfoten, keine Unterschiede bei basalen Schmerzschwellen nach thermischen Stimuli¹¹² und im Schmerzverhalten beim Formalintest über 45 Minuten²⁰². Konträre Ergebnisse über das Verhalten beim Formalintest in Abwesenheit

von TRPV1 wurden unter der Verwendung von TRPV1-Hemmstoffen publiziert¹⁹⁹. Ob diese gegensätzlichen Ergebnisse auf Kompensationsmechanismen der Knockoutmäuse oder auf unzureichende Spezifität des Hemmstoffes resultieren ist unklar.

Die Expressionslevel von TRPV1 können somit die verlängerte thermische Hyperalgesie der PAM-defizienten Tiere nicht erklären. Während allerdings keine erhöhte Sensibilisierung gegenüber TRPV1-aktivierenden Substanzen festgestellt werden konnte, fehlten PAM-defizienten Neuronen die Fähigkeit zur Desensibilisierung. Die Hemmung der p38 MAPK stellt die Fähigkeit zur Desensibilisierung wieder her. So verhindert durch die Abwesenheit von PAM konstitutiv aktivierte p38 MAPK eine effektive Desensibilisierung von TRPV1, was in einer verlängerten thermischen Hyperalgesie resultiert.

Ein weiterer Rezeptor der TRP-Familie, TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1), wurde häufig als alleiniger Vermittler von Formalin-induzierten Schmerzen beschrieben^{166, 203, 204}. Allerdings spielt eine direkte Aktivierung von Rezeptoren bei Zeitpunkten der Hyperalgesie keine Rolle. Einen Einfluss von PAM auf TRPA1 konnte dementsprechend durch Senfölin-induzierte Desensibilisierung und durch die Untersuchung der mechanischen Allodynie ausgeschlossen werden. Die andauernde thermische Hyperalgesie bei PAM-Knockout Mäusen ist somit auf eine spezifische Hemmung der Desensibilisierung des TRPV1 durch eine konstitutive Aktivierung des p38 MAPK Signalweges zurückzuführen.

4.3.3 Beeinflussung des Rezeptortraffickings

Die fehlende Fähigkeit von TRPV1 in PAM^{-/-}SNSCre⁺ Neuronen, bei konstitutiv aktivierter p38 MAPK, zur Desensibilisierung war äußerst überraschend. Im Zusammenhang mit AMPA-Rezeptoren wurde eine Internalisierung durch das PAM-Ortholog Rpm-1 an zentralen Synapsen verhindert¹⁹⁵. Dabei wurde die Endozytose von AMPA-Rezeptoren, gegenteilig zu den Ergebnissen dieser Arbeit, durch die Hemmung des p38 MAPK Signalweges verhindert. Die Hemmung des p38 MAPK Signalweges wurde durch den Rpm-1-abhängigen Abbau von DLK ausgelöst. Auch konnte eine Regulation der Internalisierung von μ -Opioid Rezeptoren durch p38 MAPK gezeigt werden, wobei die Rab5-Effektor-Proteine EEA1 und Rabenosyn-5 p38-abhängig phosphoryliert wurden²⁰⁵. Diese unterschiedlichen PAM-Funktionen im Bezug auf

Rezeptortrafficking lassen eine hohe Rezeptorspezifität und Zelltypspezifität, aber auch Speziesunterschiede annehmen. Unterstützt wird die erste Annahme durch Ergebnisse, die eine Phosphorylierung an Serin 1046 und 1047 des EGF-Rezeptors (engl. epidermal growth factor, EGF) durch p38 MAPK zeigen. Diese Phosphorylierungen führen zu einem Abbau von internalisierten Rezeptoren, beeinflussen jedoch nicht die Internalisierung dieser Rezeptoren an sich^{206, 207}, so dass p38 MAPK im Bezug auf Rezeptorinternalisierung vielfältige Funktionen ausüben kann. Kürzlich wurde zudem eine p38 MAPK-abhängige Aktivierung von Myosin II beschrieben²⁰⁸. Ob p38 MAPK auch die in PAM-defizienten Mäusen überexprimierten Myosine Va und VI aktivieren bzw. zur Phosphorylierung dieser Myosine führt bedarf erst weiterer Untersuchungen. Die Möglichkeit einer Desensibilisierung von TRPV1 durch eine direkte PAM-vermittelte Ubiquitinierung, ähnlich des Heme Rezeptors Rev-erba, kann durch die Abhängigkeit von p38 MAPK allerdings ausgeschlossen werden²⁰⁹.

Tatsächlich geben Arbeiten an Rpm-1 in *C.elegans* Hinweise auf ein Wirken von PAM bei Prozessen des Vesikeltraffickings¹⁸¹. Grill et al. identifizierte die Rab GEF Glo-4 als Interaktionspartner für Rpm-1. Dabei waren in Motoneuronen von Rpm-1^{-/-} Mutanten Rab-5, Rab-7 und Rab-11 markierte Vesikel verändert, während in GLO-4^{-/-} Mutanten nur RAB-7 markierte Vesikel anders gestaltig vorgefunden wurden¹⁸¹. Während Rab5 in Prozessen der frühen Endozytose involviert ist, reguliert Rab7 späte Endosomen und Lysosomen¹⁷¹. Wie bei anderen kleinen G-Proteinen kommen auch die Mitglieder der Rab-Familie in einer GDP-bindenden (inaktiven) und einer GTP-bindenden (aktiven) Form vor. Weiterhin wechselt Rab mit Hilfe von Rab GDI (Guanyl-nucleotide dissociation inhibitor) auch zwischen membrangebundenen- und zytosolischen Formen. Stress-induzierte p38 MAPK kann GDI aktivieren, was zu einer verstärkten Komplexbildung von GDI und Rab5 führt und so zu einer beschleunigten Endozytoserate in HeLa und BHK Zellen²¹⁰. Dieser Prozess vermittelt auch die verstärkte Internalisierung von AMPA-Rezeptoren in akuten Hippocampus-Schnitten^{211, 212}. Auch TSC2, das durch PAM ubiquitiniert werden kann, übt neben seiner Funktion im mTOR-Signalweg einen Einfluss auf die Endozytose aus²¹³. Dabei hemmt TSC2 Rab5, was in einer geringeren Endozytoserate resultiert und zu einer fehlenden Desensibilisierung der PAM-defizienten Neurone beitragen könnte.

An der A β -induzierten synaptischen Dysfunktion ist auch die erhöhte Endozytoserate von AMPA Rezeptoren beteiligt²¹⁴. Die Akkumulation von A β (auch β -Amyloid genannt), einem Spaltprodukt von APP, ist eines der Kennzeichen der Alzheimer

Erkrankung und geht unter anderem mit einer verminderten Anzahl an synaptischen Proteinen und dem Verlust von Synapsen einher. APP untersteht regulatorisch proteolytischen Prozessen bei denen verschiedene Proteinfragmente mit distinkten biologischen Funktionen entstehen. Dabei wird unter anderem das neurotoxische Amyloid- β Protein gebildet¹⁷⁶ (siehe Abbildung 4-3).

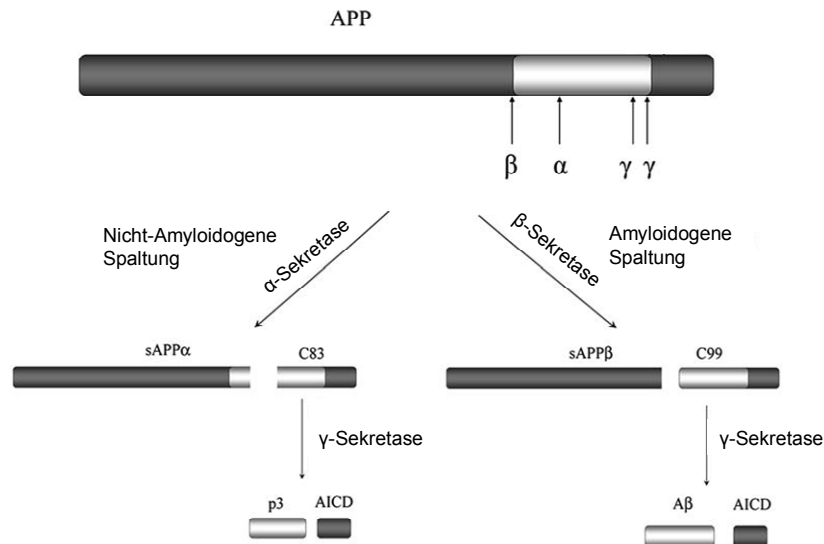


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der APP-Spaltung. Die hauptsächlichste Spaltung von APP in der ektoplasmatischen Domäne durch α - oder β -Sekretase resultiert in der Sekretion von sAPP α oder sAPP β . Das verbleibende C-terminale membrangebundene Fragment C83 oder C99 wird durch die γ -Sekretase in der Transmembranregion weitergespalten. Dabei entsteht eine freie APP intrazelluläre Domäne (AICD) und p3 oder A β .

In diesem Zusammenhang konnten Gu et al.¹⁷⁷ zeigen, dass eine vermehrte Bildung von A β eine Veränderung der Verteilung der CaMKII induziert und somit zu dem Verlust der AMPA Rezeptoren an der synaptischen Membran führt. Ebenso kommt es durch A β zu einer Reduzierung der Anzahl des Glutamatrezeptors GluR1 an der Synapse¹⁷⁵.

Schließlich wird zurzeit eine Rolle von APP als Membrancargo-Rezeptor diskutiert: Kamal et al.^{215, 216} zeigten dass APP als Kinesin-1 Membranrezeptor den axonalen Transport von β -Sekretase und Presinilin-1 vermittelt. Strittig wurde diese These durch Versuche von Lazarov et al., die durch Glutathione S-transferase pull-down und Koimmunopräzipitationsversuche keine direkte Interaktion von APP und Kinesin feststellen konnten. Zusätzlich waren keine Unterschiede im Transport von Kinesin im *Nervus ischadicus* von APP-defizienten Mäusen erkennbar²¹⁷. Cousin et al. zeigten allerdings durch Koimmunopräzipitationen Interaktionen zwischen APP und NMDA Rezeptoren, die in einem verstärkten Vorkommen der Rezeptoren an der Zelloberfläche von Säugerzellen resultierten¹⁷⁶.

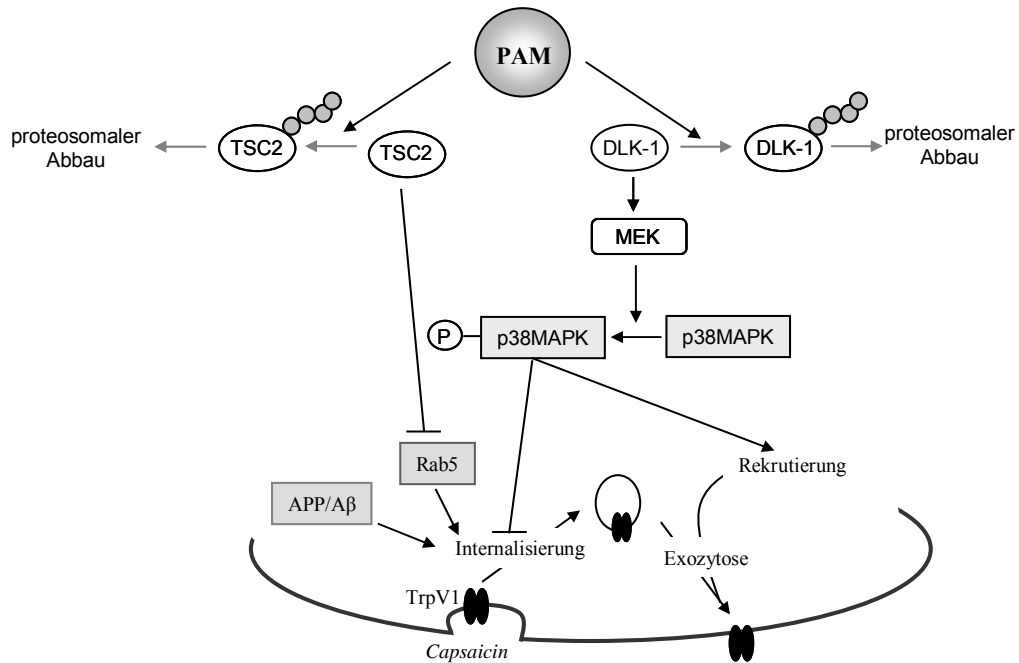


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung des PAM/p38 MAPK Signalweges in DRGs. PAM hemmt den p38 MAPK Signalweg durch die Ubiquitinierung der DLK²⁹. So akkumuliert DLK in PAM-defizienten Neuronen und aktiviert p38 MAPK. Dadurch sind p38-abhängige Proteine wie TRPV1 verstärkt am Nozizeptor vorhanden. Durch Einflussnahme auf das Rezeptortrafficking kommt es zu einer andauernden thermischen Hyperalgesie.

So ist eine Störung der endo- und/oder exozytotischen Prozesse für die fehlende Fähigkeit der Desensibilisierung von PAM-defizienten Neuronen wahrscheinlich. Der genaue Mechanismus bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen, um herauszufinden wie sich die Effekte von PAM auf APP, TSC2 und p38 MAPK verhalten (vgl. Abbildung 4-4). Das Wissen des genauen Mechanismus ist auch für das Verständnis der Wirkungen von TRPV1-Agonisten als Therapeutikum gegen Schmerzen von Interesse. Topische Capsaicincremes oder Pflaster sind schon seit langem in klinischer Verwendung, beispielsweise für die Indikation von diabetischer Neuropathie²¹⁸. Auch werden injizierbare TRPV1 Agonisten, wie Adlea, für die Behandlung von postoperativen, neuropathischen und musculoskeletalen Schmerzen entwickelt²¹⁹. Trotzdem ist weder der Mechanismus der Desensibilisierung von TRPV1, noch die Signalwege des dazugehörigen Rezeptortraffickings bisher vollständig aufgeklärt²¹⁹. Bei einer gestörten Funktion von PAM dürfte durch die fehlende Fähigkeit zur Desensibilisierung des TRPV1 Rezeptors eine Therapie mit Capsaicinanaloga wirkungslos bleiben. Die Fähigkeit zur Desensibilisierung könnte allerdings durch die Hemmung der p38 MAPK wiederhergestellt werden. Während entzündlichen Prozessen ist p38 MAPK bekanntlich stark aktiviert und könnte so

folglich die Therapie mit Capsaicinanaloga erschweren. Die Kenntnis des dahinterstehenden Mechanismus ist daher von großem Interesse.

4.4 Potentielle klinische Bedeutung von PAM

PAM könnten somit antinozizeptive Eigenschaften in der Peripherie zugeschrieben werden. Auch zentral wirkt PAM antinozizeptiv indem es die Adenylzyklase hemmt und somit die Synthese von cAMP verhindert¹⁹. So könnte man sich eine Aktivierung von PAM vorstellen, um einen antinozizeptiven Effekt zu erzielen. Damit würden zwei wichtige Signalwege gehemmt werden, der cAMP und der p38 MAPK Signalweg. Neben den zuvor erwähnten Nebenwirkungen einer p38 MAPK Hemmung würde eine Aktivierung von PAM zudem mTOR aktivieren und damit verbunden möglicherweise das Krebsrisiko erhöhen. Als einziger Aktivator von PAM ist bisher S1P bekannt, das zudem den Signalweg von mTOR aktiviert. Daneben besitzt S1P unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf Nozizeption. Zentral zeigt es überwiegend antinozizeptive Effekte²²⁰⁻²²², wohingegen in der Peripherie pronozizeptive Eigenschaften beschrieben werden²²³. So führen sowohl intra- als auch extrazelluläre Erhöhungen der S1P-Konzentrationen zu einer erhöhten Erregbarkeit von Neuronen der Dorsalganglien^{224, 225}. Auch wurde eine Aktivierung von PAM durch S1P bisher nur eindeutig in der Zelllinie HeLa gezeigt und benötigt weiterführende Untersuchungen in anderen Zelltypen. Das Auffinden weiterer PAM aktivierender Substanzen und interagierender Proteine wäre deshalb in Zukunft erstrebenswert. Ein Ansatzpunkt könnte der Signalweg des Insulins sein, da der mTOR Signalweg nicht nur durch S1P, sondern auch durch Insulin PAM-vermittelt aktiviert werden konnte⁴.

5 Zusammenfassung

'Protein Associated with Myc' (PAM) hat aufgrund seiner enormen Größe von 510 kD und der Vielzahl an Proteinbindungsstellen das Potential viele regulatorische und physiologische Prozesse zu regulieren. Mit der Funktion als E3-Ubiquitinligase und davon unabhängigen Proteininteraktionen reguliert es beispielsweise Prozesse der Synaptogenese und der spinalen Schmerzverarbeitung, wie auch die Regulation des Pteridin Stoffwechsels und des cAMP-Signalweges. Im Gegensatz zur spinalen Schmerzverarbeitung war eine Beteiligung von PAM an der peripheren Nozizeption bisher unbekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu wurden konditionale PAM-Knockout Mäuse generiert und charakterisiert. Zum einen wurde PAM in Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen und zum anderen in allen nozizeptiven und thermorezeptiven Neuronen der Dorsalganglia und der Ganglia trigeminalia deletiert. Der Knockout in Neuronen und Gliazellen führte zu einer pränatalen Letalität und unterstreicht so die Bedeutung von PAM während der Neuronenentwicklung. Mit Hilfe des spezifischen Knockouts in nozizeptiven Neuronen konnte eine Rolle von PAM bei der Regulation der thermischen Hyperalgesie gezeigt werden. Keinen Einfluss hatte die Deletion von PAM auf basale thermische und mechanische Schmerzschwellen, sowie auf Formalin-induzierte akute Schmerzen.

Als potentieller Mechanismus wurde der mTOR- und der p38 MAPK-Signalweg untersucht. Dabei konnte eine Vermittlung der S1P-induzierten mTOR-Aktivierung durch PAM nachgewiesen werden und Rheb als eine Komponente dieser Aktivierung ermittelt werden. Der p38 MAPK Signalweg war in Abwesenheit von PAM konstitutiv aktiviert und einige Proteine des Rezeptortraffickings waren verstärkt exprimiert. Als ursächlich für die beobachtete verlängerte Hyperalgesie in PAM-defizienten Mäusen konnte die Unterbindung der Internalisierung des TRPV1-Rezeptors nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist spezifisch für TRPV1, da der verwandte Ionenkanal TRPA1 durch die PAM-Deletion nicht beeinträchtigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte so zum ersten Mal gezeigt werden, dass PAM in peripheren nozizeptiven Neuronen über die p38 MAPK-vermittelte Internalisierung von TRPV1 die Dauer der thermischen Hyperalgesie reguliert.

6 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylylzyklase
bp	(Nukleotid-)basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CREB	cAMP response element-binding protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	dorsale Spinalganglien (engl. Dorsal root ganglia)
engl.	englisch
Erk	extracellular signal-regulated kinases
GAP	GTPase-activating Protein
GEF	Guaninenucleotide Exchange Factor
ggfs.	gegebenenfalls
HSP	Heat-shock-protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen (oder SAPK, Stress-aktivierte Phosphokinasen)
KCC2	Kalium-Chlorid-Kotransporter 2
kDa	Kilo-Dalton
lat.	Lateinisch
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
Min.	Minute(n)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. Nerve Growth Factor)
Nr.	Nummer
PAM	Protein Associated with Myc
Phr1	PAM-Highwire-Rpm-1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCC1	Regulator of Chromatine Condensation 1
Rheb	Ras Homolog Enriched in Brain
RING	Really Interesting New Gene
Rpm-1	Regulator of Presynaptic Morphology 1
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1, vormals Hamartin
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2, vormals Tuberin
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

7 Abbildungs und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PAM PROTEINS	1
ABBILDUNG 1-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TSC2/MTOR-SIGNALWEGES.....	5
ABBILDUNG 1-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DLK/p38 MAPK SIGNALWEGES.....	7
ABBILDUNG 1-4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TRPV1 KANALS UND SEINES AGONISTEN CAPSAICIN.....	9
ABBILDUNG 1-5: SCHEMA DER ENDO- UND EXOZYTOTISCHEN VORGÄNGE VON TRANSMEMBRANPROTEINEN.....	11
ABBILDUNG 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROTEINS PAM MIT EINGEFÜGTEN <i>LoxP</i> SEITEN...	15
ABBILDUNG 2-2: AUSWERTUNG DER REZEPTORINTERNALISIERUNG.....	30
ABBILDUNG 3-1: GENOTYPISIERUNG DER EMBRYONEN AUS EINER PAM ^{+/-} -NesCre ⁺ VERPAARUNG.....	35
ABBILDUNG 3-2: NACHWEIS DER DELETION DES PAM-EXON 11 IN PAM ^{-/-} -NesCre ⁺ -EMBRYONEN.....	36
ABBILDUNG 3-3: NACHWEIS DER GENERIERUNG EINER PAM ^{-/-} SNSCre ⁺ -MAUSLINIE.....	37
ABBILDUNG 3-4: IB4-FÄRBUNG ZEIGT VERGRÖßERTE LAMINA I/II IN PAM ^{-/-} -SNSCre-POSITIVEN MÄUSEN.....	38
ABBILDUNG 3-5: UNTERSUCHUNG DER MOTOKOORDINATION SNSCre-POSITIVER MÄUSE.....	39
ABBILDUNG 3-6: S1P INDUZIERT MTOR-AKTIVITÄT IST VERMITTELT DURCH PAM.....	41
ABBILDUNG 3-7: WESTERN BLOT ANALYSE DER S1P INDUZIERTEN PHOSPHORYLIERUNG VON p70S6KINASE IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN.....	41
ABBILDUNG 3-8: ERHÖHUNG DER INTRAZELLULÄREN PAM KONZENTRATIONEN VERSTÄRKT DIE S1P INDUZIERTEN p70S6KINASE PHOSPHORYLIERUNG.....	42
ABBILDUNG 3-9: AUFREINIGUNG VON GST/RHEB-MUTANTEN AUS E.COLI.....	43
ABBILDUNG 3-10: DOMINANT NEGATIVE RHEB MUTANTE VERMINDERT S1P INDUZIERTEN p70S6KINASE PHOSPHORYLIERUNG.....	44
ABBILDUNG 3-11: BASALE SCHMERZSCHWELLEN VON CRE-POSITIVEN UND CRE-NEGATIVEN PAM ^{-/-} MÄUSEN.....	45
ABBILDUNG 3-12: UNTERSUCHUNGEN DES SCHMERZVERHALTENS PAM-DEFIZIENTER MÄUSE UNTER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.....	46
ABBILDUNG 3-13: AKTIVIERUNG DES p38 MAPK-SIGNALWEGES IN PAM-DEFIZIENTEN DORSALGANGLIENLYSATEN.....	47
ABBILDUNG 3-14: VERLÄNGERUNG DER THERMISCHEN HYPERALGESIE IN SNSCre-POSITIVEN MÄUSEN IST VERMITTELT ÜBER p38 MAPK.....	49
ABBILDUNG 3-15: PROTEINGEHALT VON TRPV1 NACH FORMALIN-INDUZIRTER ENTZÜNDUNG IN DER PFOTE.....	50
ABBILDUNG 3-16: VERGLEICH DER BASALEN PROTEINLEVEL VON TRPV1 IN VERSCHIEDENEN PAM- DEFIZIENTENGEWEBEN.....	51
ABBILDUNG 3-17: CAPSAICINDOSIS ABHÄNGIGE CALCIUMKONZENTRATIONÄNDERUNG IN NEURONEN DER DORSALGANGLIEN.....	52
ABBILDUNG 3-18: DESENSIBILISIERUNG DER DRG-NEURONEN IN ABHÄNGIGKEIT VON PAM INDUZIERT DURCH NIEDRIG DOSIERTES CAPSAICIN (VIER STIMULIERUNGEN).....	53
ABBILDUNG 3-19: DESENSIBILISIERUNG DER DRG-NEURONEN IN ABHÄNGIGKEIT VON PAM INDUZIERT DURCH ZWEI UNTERSCHIEDLICHE KONZENTRATIONEN CAPSAICIN (ZWEI STIMULIERUNGEN).....	54
ABBILDUNG 3-20: CAPSAICIN INDUZIERT DESENSIBILISIERUNG VON DRG-NEURONEN PAM- DEFIZIENTER MÄUSE IN ABHÄNGIGKEIT VON p38 MAPK.....	55
ABBILDUNG 3-21: SENFÖL-INDUZIERT DESENSIBILISIERUNG DER NEURONEN AUS DORSALGANGLIEN PAM-DEFIZIENTER MÄUSE.....	56
ABBILDUNG 3-22: VERLAUF EINER FORMALININDUZIRTE MECHANISCHEN ALLODYNIE.....	56
ABBILDUNG 3-23: NEGATIVBILD DES ANTIKÖRPER MICROARRAYS ZUM AUFFINDEN PAM-ABHÄNGIGER SIGNALWEGE.....	58
ABBILDUNG 3-24: VALIDIERUNG DER MITTELS DES <i>MICROARRAY</i> ERMITTELTE EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE DURCH WESTERN BLOT ANALYSE.....	60
ABBILDUNG 3-25: EXPRESSIONSANALYSE VON RAB-7 IN PAM-DEFIZIENTEN DORSALGANGLIEN- LYSATEN.....	61
ABBILDUNG 3-26: EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE DER MYOSINE VA UND VI IN PAM-DEFIZIENTEN DORSALGANGLIENLYSATEN.....	61
ABBILDUNG 3-27: KOLOKALISATION DES REZEPTORS TRPV1 MIT DEN MYOSINEN VA UND VI.....	62
ABBILDUNG 3-28: PAM-ABHÄNGIGE TRPV1-INTERNALISIERUNG NACH CAPSAICINSTIMULIERUNG.....	64

Abbildungen und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 3-29: WESTERN BLOT ANALYSE ZUR DETEKTION VON APPN (AMYLOID PRECURSOR PROTEIN, N-TERMINAL) IN DORSALGANGLIEN.	65
ABBILDUNG 3-30: TRANSLOKATION VON PAM UND APP (AMYLOID PRECURSOR PROTEIN) ZUR PLASMA-MEMBRAN NACH S1P STIMULIERUNG.	66
ABBILDUNG 3-31: KOIMMUNPRÄZIPITATION VON PAM UND AB.	67
ABBILDUNG 4-1: SCHEMATISCHE DARTSTELLUNG DES PAM/MTOR SIGNALWEGES.	69
ABBILDUNG 4-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TRPV1-TRANSPORTES IN DRG-NEURONEN BEI PERIPHERER ENTZÜNDUNG.	76
ABBILDUNG 4-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER APP-SPALTUNG.	79
ABBILDUNG 4-4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PAM/p38 MAPK SIGNALWEGES IN DRGs.	80

TABELLE 1: SEQUENZEN DER VERWENDETEN PRIMER.	18
TABELLE 2: ERWARTETE FRAGMENTGRÖßEN NACH DER VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA-ABSCHNITTEN. .	19
TABELLE 3: VERDÜNNUNGEN DER EINGESETZTEN ANTIKÖRPER IM WESTERN BLOT (IMMUNBLOT).	27
TABELLE 4: EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN PAM-DEFIZIENTEN DORSALGANGLIEN.	59
TABELLE 5: KOLOKALISATIONSANALYSE DER MYOSINE VA UND VI MIT DEM REZEPTOR TRPV1 IN DRG-NEURONEN.	62

8 Literaturverzeichnis

1. Guo, Q., Xie, J., Dang, C. V., Liu, A. T. & Bishop, J. M. Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 9172-9177 (1998).
2. Murthy, V. et al. Pam and its ortholog highwire interact with and may negatively regulate the TSC1.TSC2 complex. *J Biol Chem* 279, 1351-8 (2004).
3. Han S, W. R., Santos TM, Polizzano C, Sabatini BL, Ramesh V. Pam (Protein associated with Myc) functions as an E3 Ubiquitin ligase and regulates TSC/mTOR signaling. *Cellular signalling* (2008).
4. Maeurer, C., Holland, S., Pierre, S., Potstada, W. & Scholich, K. Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM. *Cell Signal* 21, 293-300 (2009).
5. Saiga, T. et al. Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development. *Mol Cell Biol* (2009).
6. Garbarini, N. & Delpire, E. The RCC1 domain of protein associated with Myc (PAM) interacts with and regulates KCC2. *Cell Physiol Biochem* 22, 31-44 (2008).
7. Pierre, S. et al. Toponomics analysis of functional interactions of the ubiquitin ligase PAM (Protein Associated with Myc) during spinal nociceptive processing. *Mol Cell Proteomics* 7, 2475-85 (2008).
8. Scholich, K., Pierre, S. & Patel, T. B. Protein associated with Myc (PAM) is a potent inhibitor of adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 276, 47583-9 (2001).
9. Gao, X. & Patel, T. B. Histidine residues 912 and 913 in protein associated with Myc are necessary for the inhibition of adenylyl cyclase activity. *Mol Pharmacol* 67, 42-9 (2005).
10. Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-2 (1991).
11. Hadjebi, O., Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F. R. & Rosa, J. L. The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1467-79 (2008).
12. Zhen, M., Huang, X., Bamber, B. & Jin, Y. Regulation of Presynaptic Terminal Organization by *C. elegans* RPM-1, a Putative Guanine Nucleotide Exchanger with a RING-H2 Finger Domain. *Neuron* 26, 331-343 (2000).
13. Gao, X. & Patel, T. B. Histidine Residue 912 and 913 in Protein Associated with Myc Are Necessary for the Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity. *Molecular Pharmacology* 67, 42-49 (2005).
14. Potuschak, T. et al. PRT1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7904-8 (1998).
15. Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434 (2009).
16. Le Guyader, S., Maier, J. & Jesuthasan, S. *Esrom*, an ortholog of PAM (protein associated with *c-myc*), regulates pteridine synthesis in the zebrafish. *Developmental Biology* 277, 378-386 (2005).
17. Gao MX, L. E., Yu B, Wang Y, Zhen M, Derry WB. The SCF(FSN-1) ubiquitin ligase controls germline apoptosis through CEP-1/p53 in *C. elegans*. *Cell Death and Differentiation Epub* (2008).
18. Jiao, X., Trifillis, P. & Kiledjian, M. Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein. *Biol Reprod* 66, 475-85 (2002).

19. Ehnert, C. et al. Protein associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing. *J Neurochem* 88, 948-957 (2004).
20. Santos TM, H. S., Bowser M, Sazani K, Beauchamp RL, Murthy V, Bhide PG, Ramesh V. Alternative splicing in protein associated with Myc (Pam) influences its binding to c-Myc. *Journal of Neuroscience Research* 83, 222-232 (2006).
21. Yang, H. et al. Developmental expression of PAM (protein associated with MYC) in the rodent brain. *Brain Res Dev Brain Res* 136, 35-42 (2002).
22. Semov, A., Marcotte, R., Semova, N., Ye, X. & Wang, E. Microarray analysis of E-box binding-related gene expression in young and replicatively senescent human fibroblasts. *Anal Biochem* 302, 38-51 (2002).
23. Wan HI, D. A., Fetter RD, Bergstrom K, Strauss R, Goodman CS. Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 26, 313-329 (2000).
24. Chang, Q. & Balice-Gordon, R. J. Highwire, rpm-1, and futsch: balancing synaptic growth and stability. *Neuron* 26, 287-90 (2000).
25. Schaefer, A. M., Hadwiger, G. D. & Nonet, M. L. rpm-1, A Conserved Neuronal Gene that Regulates Targeting and Synaptogenesis in *C. elegans*. *Neuron* 26, 345-356 (2000).
26. McCabe, B. D. et al. Highwire Regulates Presynaptic BMP Signaling Essential for Synaptic Growth. *Neuron* 41, 891-905 (2004).
27. Wu C, D. R., DiAntonio A. Dfsn collaborates with Highwire to down-regulate the Wallenda/DLK kinase and restrain synaptic terminal growth. *Neural Development* 2, 16 (2007).
28. Wu C, W. Y., Collins CA, DiAntonio A. Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements. *The Journal of neuroscience* 25, 9557-9566 (2005).
29. Nakata K, A. B., Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD, Jin Y. Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* 120, 407-420 (2005).
30. Burgess RW, P. K., Johnson MJ, Roix JJ, Welsh IC, O'Brien TP. Evidence for a conserved function in synapse formation reveals Phr1 as a candidate gene for respiratory failure in newborn mice. *Molecular and cellular biology* 24, 1096-1105 (2004).
31. Bloom AJ, M. B., Sanes JR, DiAntonio A. The requirement for Phr1 in CNS axon tract formation reveals the corticostriatal boundary as a choice point for cortical axons. *Genes Development* 21, 2593-2606 (2007).
32. Liao, E. H., Hung, W., Abrams, B. & Zhen, M. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* 430, 345-350 (2004).
33. Ferreira, S. H. & Nakamura, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins* 18, 179-90 (1979).
34. Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G. & Scholich, K. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 8, 321-35 (2009).
35. Taiwo, Y. O. & Levine, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44, 131-5 (1991).
36. Scholich, K., Pierre, S. C. & Patel, T. B. Protein Associated with Myc (PAM) Is a Potent Inhibitor of Adenylyl Cyclases. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47583-47589 (2001).
37. Pierre, S. C., Häusler, J., Birod, K., Geisslinger, G. & Scholich, K. PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate. *EMBO J.* 23, 3031-3040 (2004).

38. Chung, T., Crilly, K. S., Anderson, W. H., Mukherjee, J. J. & Kiss, Z. ATP-dependent choline phosphate-induced mitogenesis in fibroblasts involves activation of pp70 S6 kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase through an extracellular site. Synergistic mitogenic effects of choline phosphate and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 272, 3064-72 (1997).
39. Grey, A. et al. The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology* 143, 4755-63 (2002).
40. Kluk, M. J. & Hla, T. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 89, 496-502 (2001).
41. Liu, G. et al. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* 10, 769-77 (2009).
42. Lavieu, G. et al. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 281, 8518-27 (2006).
43. Foster, K. G. &ingar, D. C. mTOR: Conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* (2010).
44. Heitman, J., Movva, N. R. & Hall, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-9 (1991).
45. Arsham, A. M. & Neufeld, T. P. Thinking globally and acting locally with TOR. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 589-597 (2006).
46. Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N. & Sonenberg, N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J* 15, 658-64 (1996).
47. Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. & Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227-36 (1992).
48. Gibbons, J. J., Abraham, R. T. & Yu, K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin Oncol* 36 Suppl 3, S3-S17 (2009).
49. Graziani, E. I. Recent advances in the chemistry, biosynthesis and pharmacology of rapamycin analogs. *Nat Prod Rep* 26, 602-9 (2009).
50. Pan, S. et al. A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chem Biol* 13, 1227-34 (2006).
51. Kovarik, J. M., Tedesco-Silva, H., Lorber, M. I. & Foster, C. Exposure-efficacy relationships of a fingolimod-everolimus regimen in kidney transplant patients at risk for delayed graft function. *Transplant Proc* 38, 3479-82 (2006).
52. Wijkstrom, M. et al. Islet allograft survival in nonhuman primates immunosuppressed with basiliximab, RAD, and FTY720. *Transplantation* 77, 827-35 (2004).
53. Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J. & Baker, S. J. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12923-8 (2003).
54. Swiech, L., Perycz, M., Malik, A. & Jaworski, J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1784, 116-32 (2008).
55. Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J. & Sabatini, B. L. Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8, 1727-34 (2005).

56. Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J. & Wu, G. Y. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25, 11288-99 (2005).
57. Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C. & Sheng, M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25, 11300-12 (2005).
58. Cammalleri, M. et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14368-73 (2003).
59. Hou, L. & Klann, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24, 6352-61 (2004).
60. Tang, S. J. et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 467-72 (2002).
61. Cai, S. L. et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 173, 279-89 (2006).
62. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. & Ulevitch, R. J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-11 (1994).
63. Lee, J. C. et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-46 (1994).
64. Jiang, Y. et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920-6 (1996).
65. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J. & Han, J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 334-40 (1996).
66. Jiang, Y. et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272, 30122-8 (1997).
67. Wang, X. S. et al. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 23668-74 (1997).
68. Svensson, C. I. et al. Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. *J Neurochem* 92, 1508-20 (2005).
69. Schoorlemmer, J. & Goldfarb, M. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol* 11, 793-7 (2001).
70. Schoorlemmer, J. & Goldfarb, M. Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 49111-9 (2002).
71. Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. & Feig, L. A. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 22, 4073-85 (2002).
72. Lee, C. M., Onesime, D., Reddy, C. D., Dhanasekaran, N. & Reddy, E. P. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14189-94 (2002).
73. Raingeaud, J. et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-6 (1995).
74. Xing, J., Kornhauser, J. M., Xia, Z., Thiele, E. A. & Greenberg, M. E. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-

- activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18, 1946-55 (1998).
75. Scuteri, A. et al. Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology* 30, 312-9 (2009).
 76. Yanagisawa, M. et al. Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes Cells* 6, 1091-9 (2001).
 77. Waskiewicz, A. J. et al. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 1871-80 (1999).
 78. Morley, S. J. & McKendrick, L. Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 272, 17887-93 (1997).
 79. Liu, G., Zhang, Y., Bode, A. M., Ma, W. Y. & Dong, Z. Phosphorylation of 4E-BP1 is mediated by the p38/MSK1 pathway in response to UVB irradiation. *J Biol Chem* 277, 8810-6 (2002).
 80. Takeda, K. et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem* 275, 9805-13 (2000).
 81. Ishii, T., Satoh, E. & Nishimura, M. Integrin-linked kinase controls neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276, 42994-3003 (2001).
 82. Choi, W. S., Chun, S. Y., Markelonis, G. J., Oh, T. H. & Oh, Y. J. Overexpression of calbindin-D28K induces neurite outgrowth in dopaminergic neuronal cells via activation of p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 656-61 (2001).
 83. Kim SY, B. J., Kim JY, Lee HL, Lee KM, Kim DS, Cho HJ. Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. *Neuroreport*. 13, 2483-2486 (2002).
 84. Jin, S. X., Zhuang, Z. Y., Woolf, C. J. & Ji, R. R. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 4017-22 (2003).
 85. Schafers, M., Svensson, C. I., Sommer, C. & Sorkin, L. S. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23, 2517-21 (2003).
 86. Ji RR, S. T., Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36, 57-68 (2002).
 87. Xu, J. T. et al. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. *Exp Neurol* 204, 355-65 (2007).
 88. Chen, Y., Geis, C. & Sommer, C. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Neurosci* 28, 5836-45 (2008).
 89. Abrams, B., Grill, B., Huang, X. & Jin, Y. Cellular and molecular determinants targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR protein RPM-1 to perisynaptic regions. *Dev Dyn* 237, 630-9 (2008).
 90. D'Souza, J. et al. Formation of the retinotectal projection requires Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with Myc). *Development* 132, 247-256 (2005).

91. Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Urban & Fischer Verlag, München, 2001).
92. Mandadi, S. & Roufogalis, B. D. ThermoTRP Channels in Nociceptors: Taking a Lead from Capsaicin Receptor TRPV1. *Curr Neuropharmacol* 6, 21-38 (2008).
93. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51, 159-212 (1999).
94. Caterina, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-24 (1997).
95. Messeguer, A., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, A. Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr Neuropharmacol* 4, 1-15 (2006).
96. Chung, M. K., Guler, A. D. & Caterina, M. J. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11, 555-64 (2008).
97. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-10 (2001).
98. Tominaga, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-43 (1998).
99. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A. & Eid, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6, 357-72 (2007).
100. Jordt, S. E. & Julius, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108, 421-30 (2002).
101. Jordt, S. E., Tominaga, M. & Julius, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8134-9 (2000).
102. Grycova, L. et al. ATP binding site on the C-terminus of the vanilloid receptor. *Arch Biochem Biophys* 465, 389-98 (2007).
103. Huang, S. M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8400-5 (2002).
104. Hwang, S. W. et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6155-60 (2000).
105. Moriyama, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1, 3 (2005).
106. Zygmunt, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-7 (1999).
107. Huang, J., Zhang, X. & McNaughton, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4, 197-206 (2006).
108. Chuang, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411, 957-62 (2001).
109. Zhang, X., Huang, J. & McNaughton, P. A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *Embo J* 24, 4211-23 (2005).
110. Van Buren, J. J., Bhat, S., Rotello, R., Pauza, M. E. & Premkumar, L. S. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain* 1, 17 (2005).
111. Yiangou, Y. et al. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* 357, 1338-9 (2001).
112. Davis, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-7 (2000).

113. Koplas, P. A., Rosenberg, R. L. & Oxford, G. S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17, 3525-37 (1997).
114. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M. & Gordon, S. E. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123, 53-62 (2004).
115. Numazaki, M. et al. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8002-6 (2003).
116. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905-18 (2007).
117. Piper, A. S., Yeats, J. C., Bevan, S. & Docherty, R. J. A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol* 518 (Pt 3), 721-33 (1999).
118. Nilius, B. et al. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567, 35-44 (2005).
119. Jung, J. et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279, 7048-54 (2004).
120. Mohapatra, D. P. & Nau, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 13424-32 (2005).
121. Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S. & Boddeke, H. W. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch* 431, 828-37 (1996).
122. Puntambekar, P., Van Buren, J., Raisinghani, M., Premkumar, L. S. & Ramkumar, V. Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *J Neurosci* 24, 3663-71 (2004).
123. Royle, S. J. & Murrell-Lagnado, R. D. Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* 25, 39-46 (2003).
124. Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N. & Ferrer-Montiel, A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 279, 25665-72 (2004).
125. Mandadi, S. et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123, 106-16 (2006).
126. Johansen, M. E., Reilly, C. A. & Yost, G. S. TRPV1 antagonists elevate cell surface populations of receptor protein and exacerbate TRPV1-mediated toxicities in human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 89, 278-86 (2006).
127. Murthy, V. et al. Pam and Its Ortholog Highwire Interact with and May Negatively Regulate the TSC1.TSC2 Complex. *J Biol Chem*. 279, 1351-1358 (2004).
128. Bron, R., Klesse, L. J., Shah, K., Parada, L. F. & Winter, J. Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 22, 118-32 (2003).
129. Tronche, F. et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99-103 (1999).
130. Agarwal, N., Offermanns, S. & Kuner, R. Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. *Genesis* 38, 122-9 (2004).
131. Woolfe, G. & MacDonald, A. in *J Pharmacol Exp* 300-307 (1944).

132. Jasmin, L., Kohan, L., Franssen, M., Janni, G. & Goff, J. R. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75, 367-82 (1998).
133. Green, A. F. & Young, P. A. A comparison of heat and pressure analgesiometric methods in rats. *Br J Pharmacol Chemother* 6, 572-85 (1951).
134. Tal, M. & Bennett, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57, 375-82 (1994).
135. Decosterd, I. & Woolf, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-58 (2000).
136. Dubuisson, D. & Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-74 (1977).
137. Hunskaar, S., Fasmer, O. B. & Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 14, 69-76 (1985).
138. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88 (1988).
139. Bogo, V., Hill, T. A. & Young, R. W. Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicology* 2, 765-87 (1981).
140. Sango, K. et al. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet* 14, 348-52 (1996).
- 141.Coderre, T. J., Vaccarino, A. L. & Melzack, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535, 155-8 (1990).
142. Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H. & Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17 (1992).
143. Brenneis, C. et al. Consequences of altered eicosanoid patterns for nociceptive processing in mPGES-1-deficient mice. *J Cell Mol Med* 12, 639-48 (2008).
144. Agarwal N, O. S., Kuner R. Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. *Genesis* 38, 122-129 (2004).
145. Silverman, J. D. & Kruger, L. Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol* 19, 789-801 (1990).
146. Martin KC, Z. R. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *The Journal of neuroscience* 26, 7131-7134 (2006).
147. Hanel, P., Andreani, P. & Graler, M. H. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *Faseb J* 21, 1202-9 (2007).
148. Pullen, N. & Thomas, G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 410, 78-82 (1997).
149. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K.-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* 17, 1829-1834 (2003).
150. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. & Avruch, J. Rheb binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current Biology* 15, 702-713 (2005).

151. Li Y, I. K., Guan KL. Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7965-7975 (2004).
152. Tabançay, A. P., Jr. et al. Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *J Biol Chem* 278, 39921-30 (2003).
153. Gustin, J. A. et al. Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C547-55 (2004).
154. Delghandi, M. P., Johannessen, M. & Moens, U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal* 17, 1343-51 (2005).
155. Mizushima, T. et al. Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia. *Pain* 113, 51-60 (2005).
156. Kumar, S., Jiang, M. S., Adams, J. L. & Lee, J. C. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 825-31 (1999).
157. Young, P. R. et al. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem* 272, 12116-21 (1997).
158. Willis, W. D., Jr. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res* 196, 5-11 (2009).
159. Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, A. Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *Faseb J* 23, 3722-33 (2009).
160. Santicioli, P., Patacchini, R., Maggi, C. A. & Meli, A. Exposure to calcium-free medium protects sensory fibers by capsaicin desensitization. *Neurosci Lett* 80, 167-72 (1987).
161. Holzer, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br J Pharmacol* 155, 1145-62 (2008).
162. Bautista, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-82 (2006).
163. Forster, A. B., Reeh, P. W., Messlinger, K. & Fischer, M. J. High concentrations of morphine sensitize and activate mouse dorsal root ganglia via TRPV1 and TRPA1 receptors. *Mol Pain* 5, 17 (2009).
164. Kwan, K. Y. et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277-89 (2006).
165. Kwan, K. Y., Glazer, J. M., Corey, D. P., Rice, F. L. & Stucky, C. L. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29, 4808-19 (2009).
166. Kerstein, P. C., del Camino, D., Moran, M. M. & Stucky, C. L. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol Pain* 5, 19 (2009).
167. Bandorowicz-Pikula, J. & Pikula, S. Annexins and ATP in membrane traffic: a comparison with membrane fusion machinery. *Acta Biochim Pol* 45, 721-33 (1998).
168. Jackson, T. R., Kearns, B. G. & Theibert, A. B. Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 489-95 (2000).

169. Amit, I. et al. Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev* 18, 1737-52 (2004).
170. Sollner, T. H. Vesicle tethers promoting fusion machinery assembly. *Dev Cell* 2, 377-8 (2002).
171. Zhang, M., Chen, L., Wang, S. & Wang, T. Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Biosci Rep* 29, 193-209 (2009).
172. Eichler, T. W., Kogel, T., Bukoreshtliev, N. V. & Gerdes, H. H. The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. *Biochem Soc Trans* 34, 671-4 (2006).
173. Buss, F. & Kendrick-Jones, J. How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun* 369, 165-75 (2008).
174. Thinakaran, G. & Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283, 29615-9 (2008).
175. Almeida, C. G. et al. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20, 187-98 (2005).
176. Cousins, S. L., Hoey, S. E., Anne Stephenson, F. & Perkinson, M. S. Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery. *J Neurochem* 111, 1501-13 (2009).
177. Gu, Z., Liu, W. & Yan, Z. β -Amyloid impairs AMPA receptor trafficking and function by reducing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II synaptic distribution. *J Biol Chem* 284, 10639-49 (2009).
178. Nathalie, P. & Jean-Noel, O. Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res* 5, 92-9 (2008).
179. Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 397-407 (2003).
180. Huang, J. & Manning, B. D. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412, 179-90 (2008).
181. Grill B, B. W., Brown HM, Ackley BD, Quadroni M, Jin Y. C. *C. elegans* RPM-1 Regulates Axon Termination and Synaptogenesis through the Rab GEF GLO-4 and the Rab GTPase GLO-1. *Neuron* 55, 587-601 (2007).
182. Hendricks, M. & Jesuthasan, S. PHR regulates growth cone pausing at intermediate targets through microtubule disassembly. *J Neurosci* 29, 6593-8 (2009).
183. Lewcock JW, G. N., Lettieri K, Pfaff SL. The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* 56, 604-620 (2007).
184. Tronche F, K. C., Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature genetics* 23, 99-103 (1999).
185. Bennett, M. R. & Pettigrew, A. G. The formation of synapses in striated muscle during development. *J Physiol* 241, 515-45 (1974).
186. Dennis, M. J., Ziskind-Conhaim, L. & Harris, A. J. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev Biol* 81, 266-79 (1981).
187. Noakes, P. G., Phillips, W. D., Hanley, T. A., Sanes, J. R. & Merlie, J. P. 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev Biol* 155, 275-80 (1993).
188. Jacobsen, K. T. & Iverfeldt, K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* 66, 2299-318 (2009).

189. Saitoh, T. et al. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615-22 (1989).
190. Anliker, B. & Muller, U. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3, 239-46 (2006).
191. Wang, P. et al. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-25 (2005).
192. Wang, B., Yang, L., Wang, Z. & Zheng, H. Amyloid precursor protein mediates presynaptic localization and activity of the high-affinity choline transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14140-5 (2007).
193. Fulga, T. A. & Van Vactor, D. Synapses and growth cones on two sides of a highwire. *Neuron* 57, 339-44 (2008).
194. Hoeffer, C. A. & Klann, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33, 67-75.
195. Park, E. C., Glodowski, D. R. & Rongo, C. The ubiquitin ligase RPM-1 and the p38 MAPK PMK-3 regulate AMPA receptor trafficking. *PLoS ONE* 4, e4284 (2009).
196. Ji, R. R., Gereau, R. W. t., Malcangio, M. & Strichartz, G. R. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* (2008).
197. Kumar, S., Boehm, J. & Lee, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2, 717-26 (2003).
198. Clark, A. R., Dean, J. L. & Saklatvala, J. The p38 MAPK pathway mediates both antiinflammatory and proinflammatory processes: comment on the article by Damjanov and the editorial by Genovese. *Arthritis Rheum* 60, 3513-4 (2009).
199. Santos, A. R. & Calixto, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett* 235, 73-6 (1997).
200. Woolf, C. J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q. P., Crilly, P. & Winter, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 62, 327-31 (1994).
201. Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C. & Ferrer-Montiel, A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* 451, 151-9 (2005).
202. Bolcskei, K. et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117, 368-376 (2005).
203. McNamara, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13525-30 (2007).
204. Macpherson, L. J. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* 27, 11412-5 (2007).
205. Mace, G., Miaczynska, M., Zerial, M. & Nebreda, A. R. Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *Embo J* 24, 3235-46 (2005).
206. Tong, J., Taylor, P., Peterman, S. M., Prakash, A. & Moran, M. F. Epidermal growth factor receptor phosphorylation sites Ser991 and Tyr998 are implicated in the regulation of receptor endocytosis and phosphorylations at Ser1039 and Thr1041. *Mol Cell Proteomics* 8, 2131-44 (2009).
207. Frey, M. R., Dise, R. S., Edelblum, K. L. & Polk, D. B. p38 kinase regulates epidermal growth factor receptor downregulation and cellular migration. *Embo J* 25, 5683-92 (2006).

208. Betapudi, V., Rai, V., Beach, J. R. & Egelhoff, T. Novel regulation and dynamics of myosin II activation during epidermal wound responses. *Exp Cell Res* 316, 980-91.
209. Yin, L., Joshi, S., Wu, N., Tong, X. & Lazar, M. A. E3 ligases Arf-bp1 and Pam mediate lithium-stimulated degradation of the circadian heme receptor Rev-erb $\{\alpha\}$. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
210. Cavalli, V. et al. The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol Cell* 7, 421-32 (2001).
211. Huang, C. C., You, J. L., Wu, M. Y. & Hsu, K. S. Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem* 279, 12286-92 (2004).
212. Zhong, P., Liu, W., Gu, Z. & Yan, Z. Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *J Physiol* 586, 4465-79 (2008).
213. Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A. & Yeung, R. S. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem* 272, 6097-100 (1997).
214. Snyder, E. M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8, 1051-8 (2005).
215. Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. & Goldstein, L. S. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-59 (2000).
216. Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. & Goldstein, L. S. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414, 643-8 (2001).
217. Lazarov, O. et al. Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *J Neurosci* 25, 2386-95 (2005).
218. Mason, L., Moore, R. A., Derry, S., Edwards, J. E. & McQuay, H. J. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *Bmj* 328, 991 (2004).
219. Knotkova, H., Pappagallo, M. & Szallasi, A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 24, 142-54 (2008).
220. Coste, O. et al. Sphingosine 1-phosphate modulates spinal nociceptive processing. *J Biol Chem* 283, 32442-51 (2008).
221. Coste, O. et al. Antinociceptive activity of the S1P-receptor agonist FTY720. *J Cell Mol Med* 12, 995-1004 (2008).
222. Sim-Selley, L. J. et al. Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *J Neurochem* 110, 1191-202 (2009).
223. Pettus, B. J. et al. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *Faseb J* 17, 1411-21 (2003).
224. Zhang, Y. H., Vasko, M. R. & Nicol, G. D. Intracellular sphingosine 1-phosphate mediates the increased excitability produced by nerve growth factor in rat sensory neurons. *J Physiol* 575, 101-13 (2006).
225. Zhang, Y. H., Fehrenbacher, J. C., Vasko, M. R. & Nicol, G. D. Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 96, 1042-52 (2006).

9 Anhang

9.1 Danksagung

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

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

Besonders möchte ich Herrn PD Dr. Scholich für die engagierte Betreuung danken.

Bei Herrn Dr. Ovidiu Coste und Herrn DongDong Zhang bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Für technische und beratende Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Kai Altenrath, Frau Wiebke Becker, Herrn Dr. Christian Brenneis, Frau Marina Henke, Frau Bona Linke, Herrn Dr. Christian Mäurer, Frau Dr. Sandra Pierre, Herrn Claus Schuh, Herrn Marco Sissignano und bei Frau Antje Vennemann.

Für private Unterstützung danke ich herzlichst meiner Familie und besonders Mark Hoffmann.

9.2 Veröffentlichungen

Holland S, Coste O, Zhang DD, Pierre SC, Geisslinger G and Scholich K (2011) “*The ubiquitin ligase MYCBP2 regulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV) -internalization through inhibition of p38 MAPK signaling*” J Biol Chem 286(5), 3671-3680

Maeurer C, **Holland S**, Pierre S, Potstada W, Scholich K (2009) “*Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM*” Cell Signal 21, 293-300

Pierre S, Maeurer C, Coste O, Becker W, Schmidtko A, **Holland S**, Wittpoth C, Geisslinger G, Scholich K (2008) „*Toponomics analysis of functional interactions of the ubiquitin ligase PAM (Protein Associated with Myc) during spinal nociceptive processing*” Mol Cell Proteomics 7, 2475-85

Winnenburg R, Urban M, Beacham A, Baldwin TK, **Holland S**, Lindeberg M, Hansen H, Rawlings C, Hammond-Kosack KE, Köhler J (2008) “*PHI-base update: additions to the pathogen host interaction database*” Nucleic Acids Res 36, D572-6

Christian Brenneis, Bona Linke, Wiebke Becker, Sandra Pierre, **Sabrina Holland**, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich “*Analysis of nociceptive signalling combining calcium imaging, FRET based cAMP imaging and multi epitope ligand cartography (MELC)*”; **Poster im Rahmen des wissenschaftliches meeting des interdisciplinary centre for neuroscience (ICN), April 2007, Frankfurt**

Sandra Pierre, **Sabrina Holland**, Ovidio Coste, Claus Wittpoth, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich. “*Toponomic analysis of functional interactions of the ubiquitin ligase PAM during spinal nociceptive processing*”; **Poster im Rahmen des wissenschaftliches meeting des interdisciplinary centre for neuroscience (ICN), September 2008, Frankfurt**

Sabrina Holland “*PAM- vermittelte Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie mittels p38 MAPK und DLK*“: **Präsentation im Rahmen der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie; 11. März 2009; Mainz**

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Sabrina Marion Holland
Adam-Karrillon-Str. 33
55118 Mainz

geboren am 21.08.1981 in Darmstadt

Schulausbildung

1988 – 1992	Grundschule Schwenkschule Groß- Gerau
1992 – 2001	Prälat-Diehl-Gymnasium Groß- Gerau Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium

2001 – 2006	Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz Abschluss als Diplom-Biologin
2007 - 2011	Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für klinische Pharmakologie an der Johann- Wolfgang Goethe Universität Frankfurt, Prof. Dr. Dr. Geisslinger