

**I-kappaB Kinase epsilon -
ein neues Zielprotein für die Pharmakotherapie
bei Schmerz und Entzündung?**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Christine Verena Möser
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main 2010
(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

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

Datum der Disputation: 29.10.2010

Für Michael und Leonhard

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nozizeption	1
1.2	Schmerzarten	3
1.3	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	6
1.4	Die IKK-NF- κ B-Signalwege	9
1.5	NF- κ B und Schmerz	12
1.6	IKB-Kinasen als potenzielle Zielproteine bei der Behandlung von Schmerzen und Entzündung	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und Substanzen	17
2.1.2	Geräte und Materialien	20
2.1.3	Kits	21
2.1.4	Antikörper	21
2.1.5	Primer	22
2.2	Zellkultur	23
2.2.1	Kultivierung von Zellen	23
2.2.2	Passagieren von Zellen	23
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.2.4	Stimulation von Zellen	24
2.2.5	Transfektion von Zellen mit siRNA	24
2.2.6	Zytotoxizitätsassay	25
2.3	Tierexperimentelle Methoden	26
2.3.1	Versuchstiere	26
2.3.2	Genotypisierung	26
2.3.3	Untersuchungen zur IKK ϵ -Expression	27
2.3.4	Verhaltenstests	27
2.3.5	Nozizeptive Tiermodelle	29
2.3.6	Gewebeentnahme	31
2.3.7	Herstellung von Gefrierschnitten	32

2.4 Molekularbiologische Methoden	32
2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.4.2 Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation)	32
2.4.3 Präparative Plasmidisolierung (Maxipräparation)	33
2.4.4 RNA-Isolierung	33
2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.7 Elution von DNA aus Agarosegelen	38
2.4.8 Sondenherstellung für die <i>in situ</i> Hybridisierung	38
2.4.9 <i>In situ</i> Hybridisierung	41
2.5 Proteinbiochemische Methoden	43
2.5.1 Proteinextraktion	43
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	44
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.5.4 Western Blot	45
2.5.5 Immunfluoreszenz an <i>in situ</i> hybridisiertem Gewebe	46
2.5.6 Transkriptionsfaktor-ELISA	47
2.6 Statistik	47
3 ERGEBNISSE	49
3.1 Expression von IKKϵ in schmerzrelevanten murinen Geweben	49
3.1.1 Untersuchung der IKK ϵ mRNA-Expression mittels RT-PCR	49
3.1.2 Untersuchung der mRNA-Lokalisation von IKK ϵ im Lumbalmark	49
3.1.3 Untersuchung der mRNA-Lokalisation von IKK ϵ in DRG's	51
3.2 Expression von IKKϵ in Lumbalmark und DRG's nach nozizeptiver Stimulation	52
3.2.1 mRNA-Expression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin	52
3.2.2 Proteinexpression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin	53
3.2.3 mRNA-Expression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Zymosan	54
3.2.4 Proteinexpression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Zymosan	56
3.3 Nozizeptives Verhalten von IKKϵ-Knockout Mäusen	58
3.3.1 Untersuchung von Veränderungen in der Motorik und im akuten nozizeptiven Verhalten	58
3.3.2 Formalintest	59
3.3.3 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion	61
3.4 Regulation NF-κB-abhängiger Gene nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin	63

3.5	Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-κBp65 und IRF-3 im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin	65
3.6	Spezifischer Knockdown von IKKϵ durch siRNA	66
3.6.1	Transfektion spezifischer siRNA gegen IKK ϵ	66
3.6.2	Phosphorylierung von NF- κ Bp65 am Serinrest 536 durch IKK ϵ	69
4	DISKUSSION	72
4.1	Lokalisation und Regulation von IKK ϵ im zentralen Nervensystem	73
4.2	Reduziertes nozizeptives Verhalten in IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäusen	75
4.3	Regulation NF- κ B-abhängiger Gene und NF- κ Bp65-Aktivität in IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäusen	77
4.4	IKK ϵ bei der Regulation von TypI Interferon	78
4.5	Pharmakologische Ansätze zur IKK ϵ -Hemmung	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
7	LITERATURVERZEICHNIS	87
8	ANHANG	98
8.1	Danksagung	98
8.2	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	99
8.3	Lebenslauf	100
8.4	Eidesstattliche Erklärung	101

1 Einleitung

Schmerz ist eine multidimensionale sensorische Empfindung und wird von der Internationalen Schmerzgesellschaft (International Association for the Study of Pain (IASP)) als ein „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ definiert.

Das akute Schmerzempfinden dient als natürliches Warn- und Schutzsystem und ist elementar zur Erhaltung der körperlichen Integrität. Bei lang anhaltenden Schmerzen kann es jedoch zu pathophysiologischen Veränderungen im peripheren und zentralen Nervensystem kommen, sodass der Schmerz nicht länger als Warnsignal fungiert, sondern selbst zur Krankheit wird (Mutschler et al. 2008). Vor allem die Behandlung chronischer Schmerzen ist mit den derzeit zu Verfügung stehenden Medikamenten häufig nur unzureichend und mit zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert. Daher ist die Entwicklung neuer, spezifischer und wirksamer Analgetika nach wie vor von großer Wichtigkeit. Dies ist allerdings nur dann möglich, wenn die molekularen Mechanismen der Schmerzverarbeitung vor allem im zentralen Nervensystem detailliert aufgeklärt sind.

1.1 Nozizeption

Als Nozizeption versteht man die Aufnahme noxischer Reize, deren Übersetzung in neuronale Erregung und die Weiterleitung und zentrale Verarbeitung der nozizeptiven Information im Nervensystem (Messlinger 2002). Nozizeption wird durch Stimuli initiiert, welche periphere Nervenendigungen, die sogenannten Nozizeptoren, aktivieren (Woolf 2004). Dabei handelt es sich um spezialisierte primäre sensorische Neurone, deren Erregung beim Menschen zur Schmerzempfindung und zu entsprechenden nozizeptiven Reflexen bei Tieren führt (Messlinger 2002; Woolf 2004). Die schmerzleitenden primären Afferenzen gehören zu den langsam leitenden afferenten Nervenfasern mit dünn myelinisierten A δ (Gruppe III)- und unmyelinisierten C (Gruppe IV)-Fasern, die mit ihren freien Endigungen praktisch alle Gewebe innervieren (Messlinger 1997). Die meisten Nozizeptoren sind polymodal, das heißt sie können durch chemische, thermische und noxisch mechanische Reize erregt werden. Lang

andauernde noxische Reizung (z.B. bei Entzündung) kann zur Sensibilisierung von Nozizeptoren und so zur Senkung der Schmerzschwelle führen (Messlinger 2002).

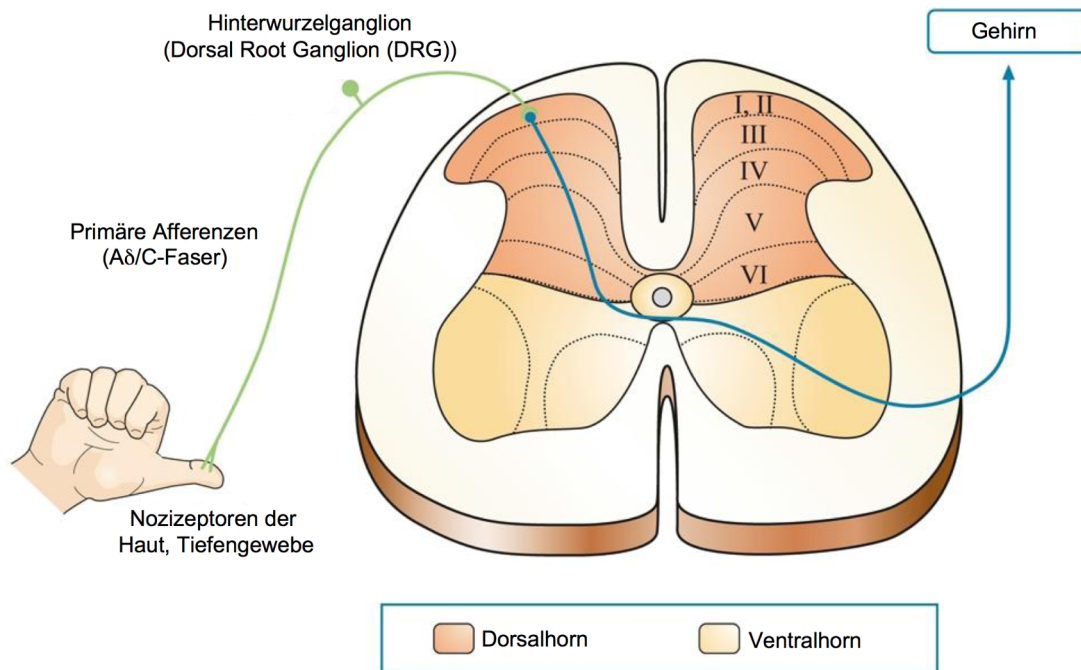


Abbildung 1-1: Nozizeptives System. Laminae I-VI sind mit römischen Ziffern beschriftet (aus (Schmidtke et al. 2009)).

Am Nozizeptor selbst findet die Transduktion, das heißt die Umsetzung der Reizenergie in Aktionspotentiale statt. Die Aktionspotentiale werden über periphere afferente Nervenfasern und die Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia (DRG's)) in das dorsale Hinterhorn der grauen Substanz des Rückenmarks geleitet, wo die synaptische Übertragung auf sekundäre Neurone im zentralen Nervensystem stattfindet (Abbildung 1-1). Wichtige Transmitter sind dabei Glutamat, Calcitonin-Gene-Related-Peptide (CGRP) und Substanz P. In der oberflächlichen Schicht des Dorsalhorns (Laminae I) findet man nozizeptiv-spezifische Neurone, die synaptischen Kontakt ausschließlich mit den nozizeptiven Aδ- und C-Fasern ausbilden. In tieferen Schichten (vor allem Laminae V) liegen vorwiegend multimodale Neurone, deren Dendritenbäume sich in die Substantia gelatinosa (Laminae II und III) erstrecken, wo afferente Fasern verschiedener Sinnesmodalitäten aufgeschaltet sind. Diese Neurone reagieren daher sowohl auf nicht-noxische als auch auf noxische Reize und werden

deshalb Wide-Dynamic-Range (WDR)-Neurone genannt. Die Neurone des Hinterhorns erhalten nicht nur direkten synaptischen Eingang von Afferenzen, sondern sind auch mit einer Vielzahl erregender und hemmender Interneurone verschaltet, die über prä- und postsynaptische Verbindungen das Erregungsniveau der aufsteigenden Neurone kontrollieren. Auf diese Weise agiert das Dorsalhorn des Rückenmarks wie eine Art Filter. Die nozizeptiven Nervenfasern kreuzen anschließend auf der Gegenseite des Rückenmarks und verlaufen im Vorderseitenstrang, von wo sie in Hirnstammkerne ziehen oder nach weiterer Umschaltung in laterale und mediale Kerngebieten des Thalamus schließlich sensorische Areale der Großhirnrinde und andere Kortexareale erreichen (Iadarola and Caudle 1997; Messlinger 2002; Schmidtke et al. 2009).

1.2 Schmerzarten

Auch wenn bei Schmerz im Allgemeinen an ein homogenes Ereignis gedacht wird, werden verschiedene Schmerztypen unterschieden. Akuter physiologischer Nozizeptorschmerz dient dem schnellen Erkennen und der Abwehr gewebeschädigender Einflüsse. Er dient somit als lebensnotwendiges Warn- und Schutzsystem und klingt in der Regel nach Entfernen des auslösenden Reizes schnell wieder ab. Für den klinischen Alltag eine größere Herausforderung und für die Entwicklung neuer Medikamente entscheidender sind die pathophysiologischen Schmerzen. Man unterscheidet dabei zwei Gruppen. Pathophysiologischer Nozizeptorschmerz wird durch Schmerzmediatoren hervorgerufen, die nach Schädigung oder Entzündung im Gewebe ausgeschüttet werden und lokal die Erregungsschwelle der peripheren Nozizeptoren herabsetzen. Er kann sich als Ruheschmerz, Hyperalgesie (verstärkte nozizeptive Reaktion auf noxische Reize) und/oder Allodynie (nozizeptive Reaktion auf nicht-noxische Reize) äußern. Neuropathischer Schmerz entsteht durch direkte Verletzung von Nervengewebe. Er äußert sich in spontanen Entladungen von Aktionspotentialen, Hyperalgesie und Allodynie (Woolf 2004; Mutschler et al. 2008).

Im Folgenden werden die Mechanismen des pathophysiologischen Nozizeptorschmerz näher betrachtet. Im gesunden Gewebe sind nozizeptive Primärafferenzen durch eine hohe Erregungsschwelle für noxische Reize charakterisiert. Zusätzlich gibt es „stille“ bzw. „schlafende“ Nozizeptoren, welche unter Normalbedingungen nicht aktivierbar sind. Bei

einer Entzündungsreaktion in Folge einer Gewebeschädigung durch physikalische Reizung (z.B. Verbrennung, Verkühlung, mechanische Schäden), bakterielle Infektion oder chemische Reizung (z.B. Säure) kommt es im geschädigten Gewebe zu einer lokalen Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren. Dazu gehören z.B. Bradykinin, Prostaglandine, Leukotriene, Serotonin, Histamin, Substanz P, Thromboxan, aber auch Zytokine und Neurotrophine (Schaible et al. 2002). Diese bewirken im Gewebe die Entwicklung der klassischen Entzündungszeichen Rötung (rubor), Überwärmung (calor) und Schwellung (tumor). Außerdem kommt es zu einer Sensibilisierung der nozizeptiven Primärafferenzen, unter anderem durch Aktivierung der stillen Nozizeptoren, was zur Entwicklung des vierten Entzündungssymptoms führt, dem Schmerz (dolor). Als fünftes Symptom versteht man die gestörte Funktion (functio laesa). Die Wirkung der Entzündungsmediatoren auf die Nozizeptoren wird dabei über spezifische Membranrezeptoren vermittelt, welche entweder eine direkte Aktivierung der Nozizeptoren bewirken (z.B. Bradykinin) oder diese für andere Stimuli sensibilisieren. So setzen z.B. Prostaglandine durch Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren die Aktivierungsschwelle von Nozizeptoren herab, wodurch diese leichter erregbar werden. Die Absenkung der Erregungsschwelle der Nozizeptoren, Aktivierung von „schlafenden“ Nozizeptoren sowie eine gesteigerte neuronale Entladungsrate in den primären Afferenzen bei überschwelligem Reizen wird unter dem Begriff periphere Sensibilisierung zusammengefasst (Lopshire and Nicol 1998; Schaible and Richter 2004; Mutschler et al. 2008). Neben der peripheren Sensibilisierung kommt es in Folge von Entzündungen auch zur zentralen Sensibilisierung. Diese äußert sich in gesteigerter Erregbarkeit spinaler Neurone. Die Rückenmarksneurone reagieren dabei empfindlicher auf periphere Reize und antworten verstärkt auf Stimulation, zudem vergrößert sich ihr rezeptives Feld. Dadurch werden auch in Arealen mit intaktem Gewebe innerhalb des erweiterten rezeptiven Feldes nozizeptive Afferenzen durch nicht-noxische Reize aktiviert. Dieses veränderte Verhalten der Rückenmarksneurone führt zur sekundären Hyperalgesie, die für entzündetes Gewebe typisch ist (Woolf 1983; Coderre and Melzack 1992; Yaksh et al. 1999; Schaible and Richter 2004). Bisherige Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der zentralen Sensibilisierung fokussieren in erster Linie auf das Dorsalhorn des Rückenmarks, wo die synaptische Übertragung von Schmerzimpulsen aus der Peripherie auf zentrale Neurone stattfindet. So kann eine Modulation der neuronalen Aktivität im Dorsalhorn zur Reduzierung von Schmerzen führen (Fournier et al. 2005; Martin et al. 2005). Der synaptische Transfer wird dabei vorwiegend durch Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat vermittelt (Abbildung 1-2). Postsynaptisch bindet Glutamat an

α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)-Rezeptoren und es kommt zur Depolarisation des Neurons. Erst unter fortgesetzter Stimulation bzw. durch noxische Reizung werden zusätzlich N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, durch Aufhebung der spannungsabhängigen Blockade durch Magnesiumionen, aktiviert (Coderre and Melzack 1992; Woolf and Mannion 1999). Neben Glutamat sind auch verschiedene Neuropeptide wie z.B. Substanz P, Neurokinin A und CGRP in die zentrale Sensibilisierung involviert. Die Neuropeptide binden an spezifische Rezeptoren, die von vielen Rückenmarksneuronen exprimiert werden, und führen ebenfalls zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Neurone (Ikeda et al. 2003; Schaible and Richter 2004). Die daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration setzt zahlreiche Signalübertragungsprozesse in Gang, unter anderem eine Aktivierung der Proteinkinasen A und C (PKA und PKC), der Phospholipase A₂ (PLA₂), sowie Änderungen der Genexpression (Yaksh et al. 1999). Die Phosphorylierung zahlreicher Zielmoleküle durch die oben genannten Kinasen führt auf direktem oder indirektem Weg zu einer gesteigerten Transkription verschiedener Gene wie z.B. Cyclooxygenase (COX)-2 (Bliss and Collingridge 1993; Park et al. 2000) oder induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). So kommt es nach peripherer Entzündung, z.B. durch Formalininjektion, zu einer Hochregulation von COX-2 im Rückenmark (Beiche et al. 1996; Beiche et al. 1998), was zu einer gesteigerten Synthese von proinflammatorischem Prostaglandin E₂ (PGE₂) führt (Baba et al. 2001; Vasquez et al. 2001). PGE₂ spielt als pronozizeptiver Mediator eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Schmerzen und Hyperalgesie (Svensson and Yaksh 2002). Durch die Induktion der iNOS im Rückenmark (Guhring et al. 2000; Tao et al. 2003; Bian et al. 2006) kommt es zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Wie auch PGE₂ ist NO ein Mediator, der bei Sensibilisierungsprozessen im Dorsalhorn des Rückenmarks während entzündlicher Schmerzen eine wichtige Rolle spielt (Luo and Cizkova 2000; Schmidtke et al. 2009). Bei lang anhaltenden Schmerzen kommt es also zu weitreichenden und nachhaltigen Veränderungen der Proteinexpression in den Rückenmarksneuronen des Dorsalhorns, die möglicherweise zur Chronifizierung von Schmerzen beitragen (Beiche et al. 1996; Scholz and Woolf 2002; Woolf 2004; D'Mello and Dickenson 2008). Die detaillierten Mechanismen sind aber bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt. Zur Behandlung von Entzündungsschmerzen haben sich insbesondere nicht-steroidale Antiphlogistika (non steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs)) bewährt. Ihre Anwendung bei der Langzeittherapie chronischer Schmerzen ist jedoch häufig durch unerwünschte Nebenwirkungen limitiert und die erwünschten Wirkungen sind nicht immer ausreichend (Gabriel et al. 1991; Langman et al. 1994; Singh 1998; Wolfe et al. 1999). Die

Entwicklung neuer Analgetika ist daher weiterhin hochaktuell. Die Aufklärung von Mechanismen, die spezifisch für die zentrale Sensibilisierung bei chronischen Schmerzen sind, ist dabei von entscheidender Bedeutung.

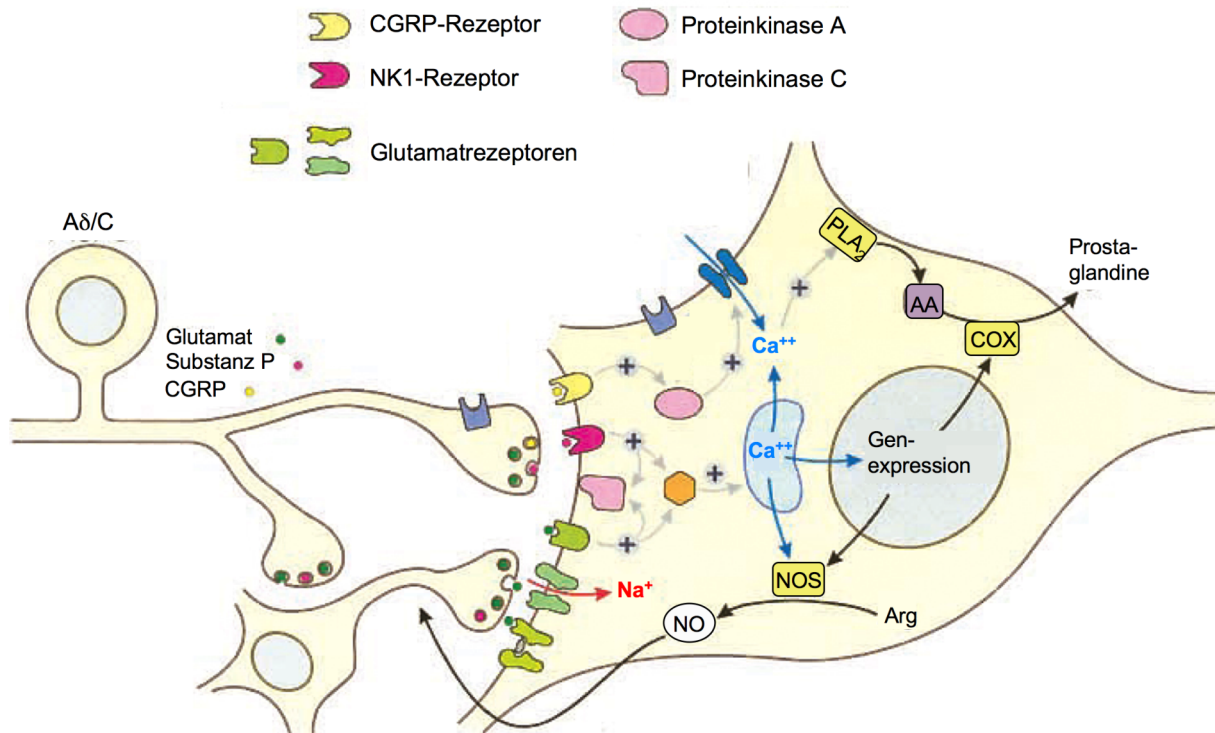


Abbildung 1-2: Vereinfachte schematische Darstellung der nozizeptiven Erregungsübertragung im Dorsalhorn des Rückenmarks. Eine nozizeptive A δ - oder C-Faser ist sowohl direkt als auch über ein erregendes Interneuron mit einem Dorsalhornneuron synaptisch verschaltet. Bei starken bzw. lang anhaltenden Schmerzreizen aus der Peripherie kommt es zu einem intrazellulären Calcium (Ca^{2+})-Anstieg und dadurch zur Sensibilisierung des postsynaptischen Neurons. Dies kann zur Aktivierung der Proteinkinase A und C und zur Beeinflussung der Genexpression führen, u.a. zur Neusynthese von Prostaglandinen durch Cyclooxygenase (COX) und von Stickstoffmonoxid (NO) durch Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). (AA) Arachidonsäure; (Arg) Arginin; (CGRP) Calcitonin-Gen-Related-Peptide; (NK1) Neurokinin 1; (PLA₂) Phospholipase A₂ (aus(Messlinger 2002)).

1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) wurde 1986 von Sen und Baltimore im Kern von murinen B-Lymphozyten entdeckt (Sen and Baltimore 1986). Seit dem wurde sehr viel Energie in die Erforschung seiner Signal- und Aktivierungswege sowie

in die Aufdeckung von NF- κ B-regulierten Genen gesteckt, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielen. So sind NF- κ B-abhängige Zielgene an der Regulation von Entzündungsprozessen, der Immunantwort, Zellzyklus und Apoptose beteiligt (Ghosh et al. 1998; Li and Verma 2002; Ghosh and Hayden 2008).

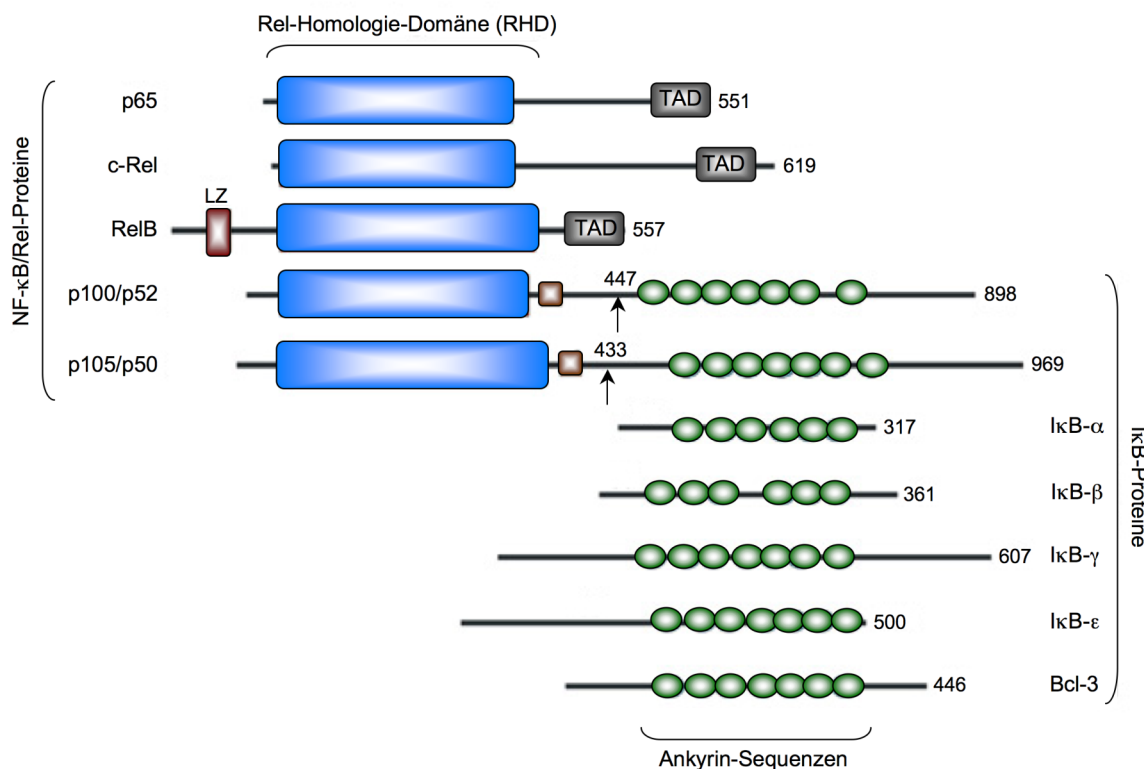


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der NF- κ B- und I κ B-Proteine. Die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Proteine ist an der rechten Seite angegeben. Die entsprechenden Prozessierungsstellen von p100 (Aminosäure 447) und p105 (Aminosäure 433) sind mit Pfeilen markiert. Die Ankyrin-Sequenzen der I κ B-Proteine lagern sich an die Rel-Homologie-Domäne (RHD) der NF- κ B-Proteine an und ermöglichen auf diese Weise deren Inaktivierung im Zytoplasma. (TAD) Transaktivierungsdomäne. (LZ) Leucin-Zipper. (nach (Karin et al. 2004)

In Säugetieren besteht die NF- κ B-Protein-Familie aus fünf strukturell verwandten Rel-Proteinen: p65 (Rel-A), Rel-B, c-Rel, p50 und p52, wobei die beiden letztgenannten durch proteolytische Prozessierung aus den Vorläuferproteinen p105 (p50) und p100 (p52) entstehen (Ghosh et al. 1998; Karin and Ben-Neriah 2000; Ghosh and Karin 2002). Die NF- κ B/Rel-Proteine bilden miteinander zahlreiche Homo- und Heterodimere, wobei als

häufigste Variante das Heterodimer aus p65 und p50 auftritt (Karin et al. 2004). Allen Mitgliedern der Rel-Familie ist eine N-terminale, hochkonservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD) gemein, die für die Dimerisierung, DNA-Bindung und allgemeine regulatorische Vorgänge von NF- κ B verantwortlich ist. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Kernlokalisationssequenz, die so genannte nuclear localisation sequence (NLS), die für den Transport von NF- κ B in den Zellkern entscheidend ist. p65, RelB und c-Rel enthalten außerdem eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die über Wechselwirkungen mit Coaktivatoren die Transkription eines Gens induzieren kann (Ghosh et al. 1998; Karin et al. 2004; Leung et al. 2004), (Abbildung 1-3).

In unstimulierten Zellen befinden sich NF- κ B-Dimere im Zytoplasma und werden durch Interaktion mit einem der Inhibitoren von NF- κ B (I κ B) blockiert (Ghosh et al. 1998). Die I κ B-Familie besteht aus I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3 und den NF- κ B Vorläufern p100 und p105. Das am besten untersuchte I κ B-Protein ist I κ B- α . Gemeinsam sind den I κ B-Proteinen fünf bis sieben Wiederholungen einer Ankyrin-Sequenz am C-terminalen Ende, sowie verschiedene Phosphorylierungsstellen am N-Terminus. Ankyrin-Sequenzen sind für die Interaktion der inhibitorischen Proteine mit NF- κ B essentiell. Sie binden an die RHD und maskieren dadurch die NLS von NF- κ B-Dimeren, wodurch verhindert wird, dass NF- κ B in den Zellkern wandert und dort an die DNA bindet (Baeuerle and Baltimore 1988; Hayden and Ghosh 2008), (Abbildung 1-3).

Zahlreiche inflammatorische, bakterielle und virale Signale können die Aktivierung von NF- κ B induzieren, doch erfolgt dies nicht immer über die gleiche Signalkette (Pahl 1999; Hayden and Ghosh 2004; Niederberger and Geisslinger 2008). So werden heute verschiedene Wege der NF- κ B-Aktivierung beschrieben (siehe 1.4). Allen ist gemein, dass NF- κ B in unstimulierten Zellen durch Bindung an eines der inhibitorischen I κ B-Proteine in seinem inaktiven Zustand im Zytosol gehalten wird. Durch Stimulation kommt es in den meisten Fällen zur Phosphorylierung von I κ B durch aktivierte I κ B-Kinasen (IKKs) was zu einer sofortigen Polyubiquitinierung und dem proteolytischen Abbau von I κ B durch das 26S-Proteasom führt. Dadurch wird die NLS von NF- κ B freigesetzt, es kann in den Zellkern translozieren und die Transkription unterschiedlicher Zielgene induzieren. Dazu gehören Zytokine (z.B. Tumornekrosisfaktor (TNF) α , Interleukin (IL)-1, IL-6), Chemokine (z.B. Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted (RANTES)), Adhäsionsfaktoren

(z.B. intercellular adhesion molecule (ICAM), vascular cell adhesion molecule (VCAM)), proinflammatorische Enzyme (COX-2, iNOS), Proteasen (Matrixmetalloproteasen (MMPs)) und anti-apoptotische Proteine (Karin and Ben-Neriah 2000; Li and Verma 2002; Hayden and Ghosh 2004; Karin et al. 2004; Yamamoto and Gaynor 2004; Ghosh and Hayden 2008). Damit NF- κ B allerdings die Transkription aktivieren kann, sind neben der Degradierung von I κ B diverse posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen und Phosphorylierungen notwendig (Ghosh and Karin 2002; Li and Verma 2002; Hayden and Ghosh 2008).

1.4 Die IKK-NF- κ B-Signalwege

Die Phosphorylierung von I κ B-Proteinen durch aktivierte I κ B-Kinase (IKK)-Komplexe, die schließlich zum Abbau von I κ B führt, ist ein entscheidender Schritt für die Aktivierung von NF- κ B. Derzeit unterscheidet man mehrere unterschiedliche IKK-NF- κ B-Signalwege aufgrund der Zusammensetzung des IKK-Komplexes, der Stimulierbarkeit und der regulierten Zielproteine (Abbildung 1-4).

Im klassischen, kanonischen IKK-NF- κ B-Signalweg wird die Phosphorylierung von I κ B- α durch den IKK α / β / γ -Komplex vermittelt. Dieser besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2), sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO). Aktivierung des IKK α / β / γ -Komplexes erfolgt durch proinflammatorische Stimuli wie TNF α , IL-1 β und Liganden von Toll-like-Rezeptoren (TLRs), wie z.B. bakterielle DNA und Lipopolysaccharid (LPS) (Israel 2000; Hayden and Ghosh 2004). Die β -Untereinheit des aktiven Komplexes bewirkt die Phosphorylierung von I κ B- α an den beiden Serinresten 32 und 36. Dies führt zum proteolytischen Abbau von I κ B- α im 26S-Proteasom und zur Demaskierung der NLS des NF- κ Bp65/p50-Dimers (Karin and Ben-Neriah 2000; Ghosh and Hayden 2008; Hayden and Ghosh 2008). Die darauf folgende Einwanderung von p65/p50 in den Zellkern und Bindung an entsprechende DNA-Promotoren aktiviert die Transkription von Genen, die für die Aktivierung der angeborenen Immunität, Entzündung und Inhibition der Apoptose verantwortlich sind (Niederberger and Geisslinger 2008).

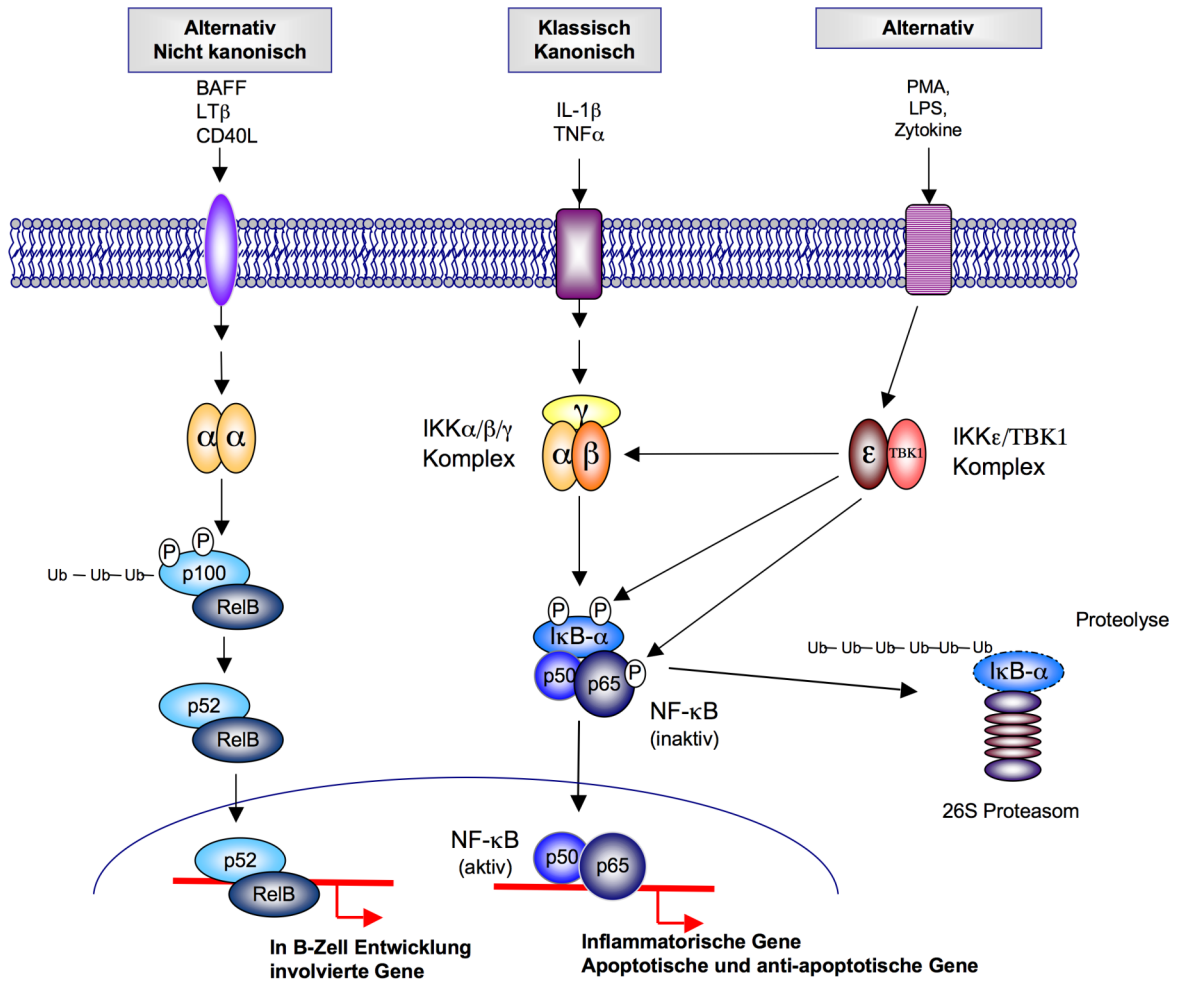


Abbildung 1-4: Vereinfachte schematische Darstellung der verschiedenen NF-κB-Aktivierungswege. Der nicht-kanonische Signalweg wird durch B-cell-activating-factor (BAFF), Lymphotoxin (LT)α/β oder CD40 Liganden (CD40L) aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von IKKα-Homodimeren, welche die Prozessierung des NF-κB-Inhibitors p100 induzieren. In Folge der Proteolyse entsteht das aktive p52 welches als Heterodimer mit Rel-B in den Zellkern transloziert und dort Gene aktiviert, die in die B-Zell-Entwicklung involviert sind. Der Kanonische Signalweg wird durch inflammatorische Stimuli wie Zytokine (z.B. TNFα, IL-1β) oder Chemokine aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung des klassischen IKKα/β/γ-Komplexes, welcher den NF-κB-Inhibitor IκB-α phosphoryliert. Es folgt eine sofortige Ubiquitinierung von IκB-α mit anschließendem Abbau im 26S-Proteasom. Auf diese Weise wird das p50/p65-Heterodimer freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription einer Reihe von NF-κB-abhängigen Zielgenen (z.B. COX-2, iNOS, MMP-9, TNFα) aktivieren. Ein neuer, alternativer Signalweg wird durch Lipopolysaccharid (LPS), Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) oder Zytokine induziert. Dies führt zu Aktivierung des IKKε/TBK1-Komplexes. Durch Phosphorylierung von IκB-α oder IKKβ des klassischen Signalwegs kommt es zur Freisetzung des p50/p65-Heterodimers, dessen Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung einer Reihe von NF-κB-abhängigen Zielgenen (nach (Niederberger and Geisslinger 2008)).

Der alternative, auch nicht-kanonisch genannte Signalweg wird durch andere Stimuli wie B-cell-activating-factor (BAFF), Lymphotoxin (LT) α/β und CD40 Liganden (CD40L) aktiviert (Hacker and Karin 2006). Er verläuft unabhängig von der regulatorischen Untereinheit IKK γ über die Aktivierung von IKK α -Homodimeren und führt zur Kerntranslokation von NF- κ Bp52/RelB-Dimeren (Senftleben et al. 2001a; Hayden and Ghosh 2008). Der alternative Signalweg kommt vor allem in B-Lymphozyten vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe (Niederberger and Geisslinger 2008).

1999 wurde von Shimada et al. IKK ϵ als eine I κ B-verwandte Kinase identifiziert und somit ein weiterer, alternativer Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B (Shimada et al. 1999). Dieser alternative Signalweg wird, ähnlich wie der klassische Signalweg, durch LPS, Phorbolester (PMA) und Zytokine (z.B. TNF α , IL-1 β und IL-6) aktiviert (Shimada et al. 1999; Peters et al. 2000). Dabei wird jedoch ein neuer IKK-Komplex, bestehend aus IKK ϵ und TANK binding kinase 1 (TBK1), angesprochen (Pomerantz and Baltimore 1999; Shimada et al. 1999; Bonnard et al. 2000; Peters et al. 2000; Peters and Maniatis 2001; Harris et al. 2006). DNA-Sequenzanalysen zeigten eine 30 %ige Sequenzhomologie zu IKK α und IKK β , jedoch keine NEMO-bindende Domäne (NBD) und somit keine Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit IKK γ (Kishore et al. 2002). Die genaue Funktion des neuen IKK-Komplexes ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass der IKK ϵ /TBK1-Komplex wie der klassische IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplex I κ B- α phosphoryliert, allerdings vorzugsweise an Serinrest 36, was zu einer Aktivierung des NF- κ Bp65/p50-Dimers führt (Peters et al. 2000). Darüber hinaus wird postuliert, dass der IKK ϵ /TBK1-Komplex den IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplexes direkt über die Phosphorylierung der β -Untereinheit aktiviert, was über den klassischen Signalweg ebenfalls zu einer Freisetzung von NF- κ Bp65/p50 führt (Tojima et al. 2000; Huynh et al. 2002). Des Weiteren wurde bereits mehrfach eine direkte Phosphorylierung von NF- κ Bp65 an den Serinresten 536 und 468 durch IKK ϵ gezeigt (Buss et al. 2004; Adli and Baldwin 2006; Mattioli et al. 2006), die auch für IKK α und IKK β beschrieben wird (Sizemore et al. 2002; Buss et al. 2004). Neben der Beteiligung des IKK ϵ /TBK1-Komplexes an der Aktivierung von NF- κ B werden die beiden Kinasen hauptsächlich mit der Aktivierung des Interferon-Signalwegs assoziiert, welcher durch ähnliche Stimuli aktiviert wird wie der NF- κ B-Signalweg (Fitzgerald et al. 2003). So spielt der IKK ϵ /TBK1-Komplex, durch Phosphorylierung der Interferon-regulierten

Faktoren (IRF)-3 und IRF-7 eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Virusinfektionen (Sharma et al. 2003; Hemmi et al. 2004; McWhirter et al. 2004; Civas et al. 2006).

1.5 NF- κ B und Schmerz

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass NF- κ B auch bei der Entstehung und Verarbeitung von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen eine Rolle spielt. Fehlregulationen von NF- κ B-Signalübertragungswegen werden mit pathologischen Prozessen wie chronischen Entzündungen (Niederberger et al. 2001; Tegeder et al. 2001) und Nervendegeneration (Kaltschmidt et al. 1999) assoziiert. Nach nozizeptiver Stimulation kommt es sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten und Mikroglia zu einer Aktivierung von NF- κ B und so zur Modulation der Transkription verschiedener proinflammatorischer Proteine (unter anderem Zytokine, COX-2, iNOS und MMPs) (Madrigal et al. 2001; Kaltschmidt et al. 2002; Lilienbaum and Israel 2003; Weng et al. 2004; Kim et al. 2005). Des Weiteren kommt es im peripheren und zentralen Nervensystem durch Ausschüttung von Schmerzmediatoren wie z.B. des Neurotransmitters Glutamat, Prostaglandinen sowie Zytokinen und Bradykinin zu einer Aktivierung von NF- κ B (Kaltschmidt et al. 2005; McMahon and Koltzenburg 2006; Mutschler et al. 2008). Im Nervensystem liegt NF- κ B hauptsächlich als p65/p50- und p50/p50-Dimer vor (Meffert et al. 2003; Kaltschmidt et al. 2005). Interessanterweise konnte bei p50^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine geringere nozizeptive Antwort auf akute und inflammatorisch noxische Stimulation gezeigt werden, was mit einer verringerten Expression von COX-2 im Rückenmark einherging (Niederberger et al. 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass NF- κ B an verschiedenen schmerzhaften Erkrankungen beteiligt zu sein scheint. Bei rheumatoider Arthritis wurde sowohl in frühen als auch in späten Phasen der Gelenkentzündung eine erhöhte NF- κ B-Aktivität im Synovialgewebe nachgewiesen. Dementsprechend führte eine Hemmung von NF- κ B im Mausmodell zu einer Hemmung der Zytokinproduktion und milderte die Krankheitssymptome (McIntyre et al. 2003; Podolin et al. 2005). Auch im Verlauf von Migräne scheint NF- κ B über die Regulation von iNOS eine Rolle zu spielen, was sowohl im Tiermodell als auch bei Migränepatienten gezeigt werden konnte (Reuter et al. 2002; Sarchielli et al. 2006). In Tiermodellen für neuropathische Schmerzen wurde außerdem nachgewiesen, dass NF- κ B nach Durchtrennung des Ischiasnervs eine verstärkte Aktivität in ipsilateralen Spinalnerven aufwies (Pollock et al. 2005).

1.6 κ B-Kinasen als potenzielle Zielproteine bei der Behandlung von Schmerzen und Entzündung

Aufgrund der oben aufgeführten Funktionen und Regulationen von NF- κ B im Schmerzgeschehen erscheint es naheliegend, dass ein Eingriff in die NF- κ B-Signalübertragungskaskade zu entzündungs- und schmerzhemmenden Effekten führen könnte. Tatsächlich bietet die Aktivierungskaskade viele verschiedene Angriffspunkte für einen pharmakologischen Eingriff. So hemmen viele bekannte Analgetika und Antiphlogistika, wie z.B. Glukokortikoide und verschiedene NSAIDs die Aktivität von NF- κ B. NSAIDs werden als sogenannte „*first-choice*“ Medikamente in der Behandlung von Entzündungen und Entzündungsschmerzen eingesetzt. Der Hauptwirkmechanismus von NSAIDs basiert auf der Inhibition von Cyclooxygenasen, die Acharachidonsäure in Prostaglandine umwandeln. Vor allem die COX-2 Isoform wird durch inflammatorische Stimuli induziert und ist verantwortlich für die Produktion von PGE₂ (Ballou et al. 2000), welches bei der Entstehung von Entzündungsschmerz und Hyperalgesie eine entscheidende Rolle spielt (England et al. 1996). Für Aspirin und Salicylate konnte bei hohen Konzentrationen jedoch auch eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden, indem sie als kompetitive Inhibitoren der ATP-Bindungsstelle von IKK β agieren (Pierce et al. 1996; Yin et al. 1998). Ebenso zeigten R-Flurbiprofen, der optische Antipode des nicht-selektiven COX-Inhibitors S-Flurbiprofen, sowie die COX-2-selektiven NSAIDs Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib und Lumiracoxib eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung (Geisslinger et al. 1994; Niederberger et al. 2001; Tegeder et al. 2001; Niederberger et al. 2003; Niederberger et al. 2006). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass all diese Medikamente eventuell einen Teil ihrer antiphlogistischen und analgetischen Wirkung über die Regulation von NF- κ B vermitteln. Weitere potenzielle Zielproteine für analgetisch und antiphlogistisch wirkende Medikamente in der NF- κ B-Kaskade stellen z.B. Zytokinrezeptoren, Toll-like-Rezeptoren, das 26S-Proteasom oder die Ubiquitinligase dar. Der Nachteil dieser Angriffspunkte liegt allerdings darin, dass sie auch in anderen Signalübertragungsketten essentielle Rollen spielen und somit bei einer Hemmung eines dieser Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Reihe von unerwünschten Wirkungen hervorgerufen wird. Eine spezifische Hemmung könnte durch direkte NF- κ B-Beeinflussung z.B. durch siRNA oder Antisense-Oligonukleotide erzielt werden, wobei hier immer noch das Problem der schlechten Zellgängigkeit und Gewebespezifität besteht (Niederberger and Geisslinger 2008).

Zurzeit werden I κ B-Kinasen als hoffnungsvollste Ziele für niedermolekulare Inhibitoren bei Entzündungen diskutiert und es wurde bereits eine große Anzahl an Hemmstoffen entwickelt. Da I κ B-Kinasen relativ spezifisch für die Aktivierung von NF- κ B sind und vor allem der klassische Komplex hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen aktiviert wird, scheint es hier möglich, spezifisch die entzündungs-induzierte Aktivierung von NF- κ B zu hemmen, ohne eine Vielzahl an Nebenwirkungen hervorzurufen (Karin et al. 2004; Niederberger and Geisslinger 2008). Dabei konzentrierten sich die Anstrengungen hauptsächlich auf Inhibitoren der β -Untereinheit des klassischen IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplexes. Im Moment gibt es zwei IKK β -Inhibitoren, die sich in klinischen Phase II Studien befinden. Für SPC839 und BMS345541 konnten antiinflammatorische Effekte in Arthritis-Modellen nachgewiesen werden, ohne dass ernstzunehmende Nebenwirkungen auftraten (Karin et al. 2004). Ein weiterer IKK β -Hemmstoff, S1627, führte unter anderem in unserem Labor in verschiedenen Schmerz- und Entzündungsmodellen in Nagern zu antiphlogistischen und analgetischen Effekten (Tegeder et al. 2004; Ebersberger et al. 2006). Für IKK α ist derzeit kein potenter Inhibitor bekannt (Niederberger and Geisslinger 2008). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse gibt es nach neueren Erkenntnissen mittlerweile Einschränkungen. Neuere Studien belegen, dass I κ B-Kinasen auch Proteine phosphorylieren, die an anderen Signalwegen beteiligt sind (Perkins 2007). Außerdem ist für IKK β bekannt, dass es in einigen Zellen für die Expression anti-apoptotischer Proteine notwendig ist (Karin et al. 2004; Frelin et al. 2005). Zusätzlich ist ein genetischer Knockout von IKK α und IKK β bei Mäusen letal. IKK α ^{-/-}-Mäuse sterben kurz nach der Geburt und zeigen Abnormalitäten in ihrer Entwicklung (Hu et al. 1999; Li et al. 1999a; Takeda et al. 1999). IKK β ^{-/-}-Mäuse sterben zwischen Embryonaltag 12,5-14,5 durch massive Leberdegeneration aufgrund TNF-induzierter Apoptose der Hepatozyten (Li et al. 1999b; Tanaka et al. 1999) und zeigen somit einen ähnlichen Phenotyp wie p65^{-/-}-Mäuse (Beg et al. 1995). Allerdings sind IKK β ^{-/-}-Mäuse unter einem TNF α -R^{-/-}-Background lebensfähig, sterben jedoch an opportunistischen Infektionen innerhalb von drei Wochen (Senftleben et al. 2001b). Dementsprechend muss man der Hypothese von I κ B-Kinasen als optimalen Angriffspunkten in der NF- κ B-Kaskade mit Vorsicht begegnen.

Die Rolle der relativ neuen IKK ϵ als Zielprotein für entzündungshemmende Medikamente bei Schmerzen wurde bisher allerdings noch nicht überdacht, obwohl Hinweise auf eine Beteiligung von IKK ϵ an chronischen Entzündungen vorliegen. IKK ϵ wird in der Zellkultur

mit Makrophagen und embryonalen Fibroblasten der Maus (mouse embryonic fibroblasts (MEFs)) nach der proinflammatorischen Stimulation mit LPS induziert (Shimada et al. 1999). Die Expression von IKK ϵ ist auch für die Regulation verschiedener proinflammatorischer Proteine nach LPS-Stimulation notwendig (Kravchenko et al. 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IKK ϵ , neben IKK α und β , in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose exprimiert wird (Aupperle et al. 2001; Sweeney et al. 2005). Ein Vorteil in der Inhibierung von IKK ϵ könnte darin bestehen, dass IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse lebensfähig und fertil sind (Hemmi et al. 2004) und somit bei einer Hemmung dieses Enzyms keine lebensbedrohlichen Nebenwirkungen zu erwarten sind.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der relativ neuen I κ B-Kinase IKK ϵ bei der Entstehung und Verarbeitung von Entzündungsschmerzen. Um die Eignung von IKK ϵ als Zielmolekül für die Schmerztherapie zu beurteilen, sollten außerdem die funktionellen Konsequenzen einer Hemmung von IKK ϵ in Entzündungsmodellen analysiert werden. Dabei sollte eine mögliche Funktion von IKK ϵ bei der NF- κ B-Aktivierung berücksichtigt werden.

Zunächst sollte die Lokalisation von IKK ϵ im peripheren und zentralen Nervensystem, speziell in den an der Schmerzweiterleitung beteiligten Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia (DRG's)) und im Rückenmark von Mäusen charakterisiert werden. Anschließend sollte in diesen Geweben die Regulation von IKK ϵ nach peripherer proinflammatorischer nozizeptiver Stimulation durch Injektion von Formalin und Zymosan in die Pfoten untersucht werden. Mit Hilfe von IKK ϵ -Knockout Mäusen sollte dann die funktionelle Relevanz von möglichen IKK ϵ -Regulationen in den inflammatorischen Schmerzmodellen des Formalintests und der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung charakterisiert werden. Um Hinweise auf eine Beteiligung von IKK ϵ an der Aktivierung von NF- κ B bei entzündlichen Schmerzen zu finden sollte im Anschluss an die Verhaltenstest geklärt werden, ob eventuelle Verhaltensänderungen mit einer veränderten Regulation der NF- κ B-abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS im Zusammenhang stehen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob es zu einer unterschiedlichen Aktivierung von NF- κ B in den Knockout-Mäusen im

Vergleich zu Wildtyp-Tieren kommt. Zur spezifischen pharmakologischen Hemmung von IKK ϵ sollte *in vitro* siRNA etabliert werden, um einerseits die molekularen Mechanismen der IKK ϵ in der Zellkultur näher zu beleuchten und andererseits, um die Expression von IKK ϵ lokal im Rückenmark zu reduzieren und die antinozizeptive Wirkung dieser lokalen Hemmung in inflammatorischen Schmerzmodellen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

1 kB Plus-DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Leiter	Peqlab, Erlangen
18S PDAR	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose, SeaKem [®] LE Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
BM-Purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Brilliant blue G250	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Denhardt's Solution (Lyophilized Powder)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
DIG Labeling Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
DNA herring sperm	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
DNAse Stock Solution	Qiagen GmbH, Hilden
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
FastRed	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

FastStart SYBR Green Master (Rox)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, AL
Formalin 5 %	Apotheke der Universitätsklinik, Frankfurt
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gefriermedium	Jung, Leica Microsystems, Bensheim
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
HNPP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isofluran	Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Levamisole	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Lipopolysaccharid von E.coli	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Maleinsäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Odyssey Blocking Puffer	Li-COR Odyssey, Bad Homburg

Opti-MEM I	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Pefabloc	Qbiogene-Alexis GmbH, Grünberg
Pen Strep	Invitrogen, Gibco [®] , Karlsruhe
Phenol „ultrapure“	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Phosphosafe [™] Extraction Reagent	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
PMSF	Perbio Science GmbH, Bonn
Polymerasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PonceauS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Precision Plus Protein [™] Dual Color Standard	BioRad Laboratories, Kalifornien
Primersequenzen	BioSpring, Frankfurt am Main
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RDD-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAse freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
RNAse Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAse ZAP	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RPMI 1640 + Glutamax [™]	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
siPORT [™] Amine Transfection Agent	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt
siRNA	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sudanschwarz B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Sulforhodamin B	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TritonX-100	Merck KGaA, Darmstadt

Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Trypton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Tween20	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Yeast tRNA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze

2.1.2 Geräte und Materialien

Elektrophoresesystem Mini-Protean [®] 3	Biorad, München
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf [®] Tube	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Gewebe-Handhomogenisator	neoLab, Heidelberg
HeraSafe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Hybridisierungsofen GFL 7601	GFL, Burgwedel
Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Kryotom CM 3050	Leica, Wetzlar
MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Microtiter [®] -Platte	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
MiniTrans-Blot [®] Blottingapparatur	Biorad, München
NanoDrop-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Odyssey [®] Infrared Scanner	LI-COR, Lincoln, USA
QuantityOne [®] -Software	Biorad, München
Schüttelapparat GFL-3005 [®]	GFL, Burgwedel
Schüttler Duomax [®] 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttler Titramax [®] 100	Heidolph, Schwabach
Spectrafluor Plus [®] -Instrument	Tecan, Crailsheim
SPSS 16.01	SPSS GmbH Software, München
Super-Frost-Plus Poly-L-Lysierte Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

Thermomixer compact [®]	Eppendorf, Hamburg
Überkopfmischer Reax [®] 2	Heidolph, Schwabach
UV-Meter Gel Doc [®] Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
X-Fluor [®] -Software	Tecan, Crailsheim

2.1.3 Kits

Qiagen [®] One Step RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
REDExtract-N-Amp [™] Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNeasy [®] Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Super Script [™] III First-Strand Synthesis	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
TransAM [™] IRF-3 (Mouse)	Active Motif, Rixensart, Belgien
TransAM [™] NFκB p65	Active Motif, Rixensart, Belgien

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Western Blot

Primärantikörper

β-Actin	monoclonal-mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ERK-2	Monoclonal-mouse	Santa Cruz, Heidelberg
GAPDH	polyclonal-mouse	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt
IKKα	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
IKKβ	monoconal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
IKKε	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt
pNFκBp65 (Ser 536)	polyclonal-rabbit	New England Biolabs, Frankfurt

Sekundärantikörper

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

2.1.4.2 Immunhistochemie

Primärantikörper

GFAP	Rabbit-polyclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IB4-AF448		Invitrogen, Karlsruhe
NF200	Rabbit-polyclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sekundärantikörper

anti-rabbit AF488	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-mouse AF488	Molecular Probes, Oregon, USA

2.1.5 Primer

Primer	Sequenz	Temp [°C]	Größe [bp]
Expressionsanalyse / <i>in situ</i> Hybridisierung			
IKKe m Fw	5' - ACGGTCATCCACDTCTTTTC -3'	60	641
IKKe m Rv	5' - AGGCTCCTTTGGGGTTCTGT -3'		
Genotypisierung			
IKKi wild	5' - TGCTATTCTTCCTGAGGACCCGAGTGC -3	67	1000
IKKi extra	5' - AAGAAACCGGAAATGAGAGCTGCCAGC -3'		
IKKi neo	5' - CTCCTCTTCGAAAACCACACTGCTCG -3		
TNFSense1	5' - AGATGGAGAAGGGCAGTTAG -3'	58	WT 800 KO 450
AntiS1	5' - ATACCAGGGTTTGAGCTCAG -3'		
AntiS2	5' - TACTTTGTTAAGAAGGGTGAGA -3'		
Realtime RT-PCR			
IKKe-Tq-Fw	5' - GTACAAGGCCCGAAACAAGA -3'	60	
IKKe-Tq-Rv	5' - TCCTCCACTGCGAATAGCTT -3		
COX-2 Tq Fw	5' - AGACACTCAGGTAGACATGATCTACCCT -3'	60	
COX-2 Tq Rv	5' - GGCACCAGACCAAAGACTTCC -3'		

MMP-9 Tq Fw	5` - GAAGCCAAACCCTGTGTGTT -3`	60
MMP-9 Tq Rv	5` - AGAGTACTGCTTGCCCAGGA -3`	
iNOS mFw Tq	5` - TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA -3`	60
iNOS mRv Tq	5` - CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG -3`	

2.2 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden murine RAW 264.7 Makrophagen (Ralph and Nakinz 1977) verwendet.

Bei der Kultivierung der Zellen war darauf zu achten, dass zum Schutz vor Kontaminationen der Kultur steril gearbeitet wurde. Alle Arbeiten wurden hierzu unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden entweder bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert oder es wurden sterile Einwegartikel verwendet. Selbst hergestellte Lösungen und Medien wurden sterilfiltriert.

2.2.1 Kultivierung von Zellen

RAW 264.7 Makrophagen wurden im Brutschrank bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Vollmedium in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen).

Vollmedium		RPMI 1640 + Glutamax [™] (Gibco, Invitrogen)
	10 %	fötales Kälberserum (FCS)
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin

2.2.2 Passagieren von Zellen

90 % konfluent gewachsene RAW 264.7 Makrophagen wurden zum Passagieren mit einem sterilen Spatel von der Zellkulturflaschenoberfläche abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und abzentrifugiert (3 min, 1200 rpm). Das Zellpellet wurde in Vollmedium durch pipettieren resuspendiert und nach

Bedarf in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Wenn eine bestimmte Zelldichte benötigt wurde, wurde diese mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden, nach dem Abschaben von der Zellkulturflaschenoberfläche in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (3 min, 1200 rpm). Das Zellpellet wurde in Zelleinfriermedium (20 % FCS, 70 % RPMI 1640 + Glutamax™, 10 % DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml in ein Cryo™-Einfrierröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und langsam bis -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen in dem Cryo™-Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Vollmedium aufgenommen und kultiviert.

2.2.4 Stimulation von Zellen

Für Stimulationsversuche wurden RAW 264.7 Makrophagen in Vollmedium in 6-Loch-Platten (Zellkonzentration 3×10^5 /Loch mit anschließender Transfektion siehe 2.2.5) oder 10 cm Zellkulturschalen (Zellkonzentration 5×10^6 /10 ml) kultiviert. Die Zellen wurden nach Transfektion oder nach Wachstum über Nacht mit $10 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend wurde Protein wie in 2.5.1.3 beschrieben extrahiert.

2.2.5 Transfektion von Zellen mit siRNA

Zur transienten Transfektion von RAW 264.7 Makrophagen wurde eine spezifische small interfering RNA (siRNA) gegen IKK ϵ mit der folgenden Sequenz verwendet:

Sense (5' - 3') GAUUCAUGAGGAUAACAAAtt

Antisense (5' - 3') UUUGUUAUCCUCAUGAAUCtg

Als Negativ-Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, die keine Sequenzhomologien mit murinen Genen aufwies (Silencer Negative Control #1 siRNA). Als Positiv-Kontrolle wurde eine siRNA gegen GAPDH verwendet (mouse, human, rat GAPDH siRNA). Die Zellen wurden mit siPORT™ Amine nach Angaben des Herstellers in einer 6-Loch-Platte transfiziert

(reverses Protokoll). Nach Optimierung des Protokolls wurden pro Ansatz lediglich 2 μl Transfektionsreagenz und 2 μl der 50 μM siRNA (Endkonzentration pro Loch entsprach 50 nM) eingesetzt. Des Weiteren wurden 3×10^5 Zellen in einem Volumen von 2 ml verwendet. Die Zellen wurden anschließend über Nacht mit der Transfektionslösung unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 24 h erfolgte eine erneute Transfektion der Zellen, wobei zunächst ein Mediumwechsel stattfand. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurden die Zellen nach 48 h für 24 h mit LPS stimuliert (siehe 2.2.4) oder ein Zytotoxizitätsassay (siehe 2.2.6) durchführt. Aus den stimulierten Zellen wurde nach 72 h wie in 2.5.1.3 beschrieben Protein extrahiert.

2.2.6 Zytotoxizitätsassay

Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurde der SulforhodaminB-Assay eingesetzt. Zunächst wurde, 48 h nach Transfektion, das Medium aus der 6-Loch-Platte abgesaugt und mit 1x PBS vorsichtig gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 400 μl einer 50 %igen Trichloressigsäure (TCA) für 1 h bei 4 °C fixiert. Nach siebenmaligen waschen mit H₂O wurde die Platte 1-2 h bei 60 °C getrocknet. Zur Färbung der Zellen wurde mit 750 μl 0,4 %igen SulforhodaminB, gelöst in 1 %igen Essigsäure, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges SulforhodaminB wurde durch fünfmaliges Waschen mit 1 %igen Essigsäure entfernt und anschließend bei 60 °C für 1-2 h getrocknet. An das Zellprotein gebundenes SulforhodaminB wurde mit 3 ml 10 mM Tris/HCl (pH 10,5) 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln aus den Zellen gelöst und anschließend bei einer Extinktion von 540 nm photometrisch gemessen und ausgewertet (X-Fluor®-Software, Tecan, Crailsheim).

1x PBS	1,7 M	Natriumchlorid
	34 mM	Kaliumchlorid
	111 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	18,4 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen zur Regulation von IKK ϵ wurde an männlichen Wildtyp-Mäusen des Typs C57 Bl/6 (Harlan Winkelmann, Borcheln) durchgeführt.

Die Verhaltensexperimente und anschließende Expressionsanalysen wurden an TNF α -R-IKK ϵ -Knockout Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt (Zuchtpaar zur Verfügung gestellt von Shizuo Akira, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Japan). Die Zucht erfolgte bei mfd Diagnostics (Wendelsheim). Für die in 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Tiermodelle wurden Geschwistertiere mit dem Genotyp TNF α -R^{+/+}IKK ϵ ^{+/+} (Wildtyp), TNF α -R^{-/-}IKK ϵ ^{+/+} (TNF α ^{-/-}), TNF α -R^{+/+}IKK ϵ ^{-/-} (IKK ϵ ^{-/-}) und TNF α -R^{-/-}IKK ϵ ^{-/-} (TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}) verwendet. Zur Überprüfung des Genotyps wurden PCR-Analysen durchgeführt (siehe 2.3.2).

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22 ± 0,5 °C; Hell- /Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt.

2.3.2 Genotypisierung

Zur Überprüfung des Knockouts für TNF α -R und IKK ϵ wurden die verwendeten Versuchsmäuse genotypisiert. Hierfür wurde aus Schwanzbiopsien die DNA mit dem REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analyse mit spezifischen Primern (siehe 2.1.5).

Reaktionsansatz (20 μ l)	10 μ l	REDEExtract
	1,5 μ l	je 10 μ M Primer
	4 μ l	DNA-Extrakt
	ad 20 μ l	H ₂ O

Reaktionsbedingungen	Initialisierung	3 min	94 °C	
	Schmelzen	30 sec	94 °C	
	Primer-Anlagerung	1 min	58-67 °C	35 Zyklen
	Polymerase-Reaktion	1 min	72 °C	
	Finale Extension	10 min	72 °C	

2.3.3 Untersuchungen zur IKK ϵ -Expression

Zur Untersuchung der Regulation von IKK ϵ wurde männlichen Wildtyp-Mäusen des Typs C57 Bl/6 entweder eine verdünnte Formaldehyd-Lösung (Formalin) oder eine Zymosanlösung subkutan in beide Hinterpfoten injiziert.

Formaldehyd-Lösung (Formalin): Zur nozizeptiven Stimulation wurden 20 μ l einer 5 %igen Formaldehyd-Lösung subkutan auf der Dorsalseite der linken und rechten Hinterpfote injiziert. Die Tiere wurden 30 min, 2 h, 8 h, 16 h und 24 h post Formalininjektion getötet und das Gewebe wie unter 2.3.6 beschrieben entnommen. Dabei wurde das Gewebe sowohl frisch für Expressionsanalysen auf Protein und mRNA Ebene, als auch fixiert für die Herstellung von Gefrierschnitten für die anschließende Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung verwendet.

Zymosanlösung: Zur nozizeptiven Stimulation wurden 20 μ l einer 10 mg/ml Zymosanlösung subkutan in die Plantarseite der linken und rechten Hinterpfote injiziert. Die Tiere wurden 5 h, 16 h, 24 h und 48 h post Zymosaninjektion getötet und das Gewebe wie unter 2.3.6 beschrieben entnommen. Dabei wurde das Gewebe sowohl für Expressionsanalysen auf Protein und mRNA Ebene, als auch fixiert für die Herstellung von Gefrierschnitten für die anschließende Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung verwendet.

2.3.4 Verhaltenstests

Zunächst wurden die Knockout-Mäuse in ausgewählten Verhaltenstests auf Schädigungen in der Motorik und dem nozizeptiven Verhalten hin getestet. Für die Verhaltenstests wurden Wildtyp, TNF α ^{-/-}, IKK ϵ ^{-/-} und TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-} Wurfgeschwister verwendet. Die Tiere wurden verblinded für den Genotyp getestet.

2.3.4.1 Rotarod-Test

Testprinzip: Im Rotarod-Test wird das Versuchstier auf einen rotierenden Stab gesetzt und die Fähigkeit auf diesem zu balancieren protokolliert. In diesem Modell wird die motorische Koordination von Mäusen untersucht. Verhaltensänderungen (z.B. vorzeitiges Herunterfallen) lassen Schlüsse auf Schädigungen der basalen Ganglien oder des Cerebellums zu.

Durchführung: Acht Mäuse je Genotyp wurden mit einer Rotarod-Tretmühle für Mäuse (Ugo Basile, Comerio, Italien) bei einer konstanten Geschwindigkeit von 32 rpm auf ihre motorische Koordination untersucht. Einen Tag vor dem Experiment durchliefen alle Mäuse eine Trainingseinheit. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurde die Zeit gemessen, bis das Tier von dem rotierenden Stab herunterfiel, dabei waren 90 sec als Maximum festgelegt. Unmittelbar nach dem Herunterfallen wurde die Maus erneut auf den rotierenden Stab gesetzt, maximal jedoch viermal. Konnte das Tier sich 90 sec auf dem rotierenden Stab halten war das Versuchsziel erreicht und das Tier wurde von dem rotierenden Stab weggehoben.

2.3.4.2 Hot-Plate-Test

Testprinzip: Im Hot-Plate-Test wird das Versuchstier auf eine $52 \pm 0,2$ °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zum Auftreten einer definierten Verhaltensänderung (z.B. Pfotenlecken, Hochspringen) gemessen (Eddy and Leimbach 1953). In dem gewählten Temperaturbereich reagieren Mäuse sehr empfindlich, es werden jedoch keine Gewebeschäden hervorgerufen. Der Hot-Plate-Test kann als Modell für eine akute thermische Nozizeption verwendet werden. Für die Auslösung der Verhaltensänderungen sind vor allem supraspinale Mechanismen notwendig (Le Bars et al. 2001).

Durchführung: Acht Mäuse je Genotyp wurden in einem Zylinder aus Plexiglas auf eine $52 \pm 0,2$ °C warme Platte (Hot Plate FMI, Föhr Medical Instruments, Seeheim) gesetzt. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurde die Zeit gemessen, bis das Tier sich an einer Pfote leckte oder nach oben sprang (Latenzzeit). Unmittelbar nach einer solchen Verhaltensänderung, spätestens jedoch nach 30 sec, wurde das Tier von der Platte weggehoben. Der Versuch wurde mit jedem Tier dreimal durchgeführt, wobei zwischen den Versuchen mindestens 30 min gewartet wurde.

2.3.4.3 Dynamic-plantar-Test

Testprinzip: Im Dynamic-plantar-Test wird die mechanische Sensitivität der Mäuse gegenüber eines definierten Drucks mit einer automatisierten von Frey Test-Einheit (Dynamic Plantar Aesthesiometer, Ugo Basile, Comerio, Italien) gemessen. Ein Stahlstab wird dabei mit steigendem Druck gegen die Plantarseite der Hinterpfote gedrückt und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote infolge der Druckausübung gemessen.

Durchführung: Acht Mäuse je Genotyp wurden in einen Käfig gesetzt, dessen Boden aus einem engmaschigen Draht besteht. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Mäuse zur Gewöhnung 2 h in den Käfig gesetzt und das Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italien) testweise eingesetzt. Am Versuchstag wurden die Mäuse 1 h an den Käfig gewöhnt. Anschließend wurde mit dem Stahlstab des Dynamic Plantar Aesthesiometer mit ansteigendem Druck gegen die Plantarseite der linken und rechten Hinterpfote gedrückt und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote infolge der Druckausübung gemessen. Die Druckstärke wurde über 10 sec von 0-5 g gesteigert und anschließend weitere 10 sec konstant bei 5 g gehalten (cut-off Zeit waren 20 sec). Die Latenzzeit des Pfotenwegziehens wurde als Mittelwert aus vier aufeinander folgenden Messwerten berechnet.

2.3.5 Nozizeptive Tiermodelle

Schmerzen sind mit subjektiven Erlebnissen und Erfahrungen verbunden. Diese subjektive Komponente bedingt, dass Schmerzen im Tiermodell nur indirekt erfasst werden können, meist durch Beobachtung von zuvor definierten Verhaltensänderungen des Versuchstieres (z.B. Zurückziehen oder Lecken einer Pfote). Das Ausmaß dieser Verhaltensänderungen dient als Maß für die nozizeptive Antwort. Zu den etablierten nozizeptiven Tiermodellen zählen unter anderem der Formalintest und die mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion.

2.3.5.1 Formalin-Test

Testprinzip: Bei dem von Dubuisson und Dennis 1977 eingeführten Formalintest wird dem Versuchstier eine verdünnte Formaldehyd-Lösung (Formalin) subkutan in eine Hinterpfote injiziert, wodurch eine nozizeptive Antwort in Form von Zucken („Flinchen“), Lecken, Beißen oder Anheben der betreffenden Pfote hervorgerufen wird (Dubuisson and Dennis 1977). Man beobachtet zwei Phasen der nozizeptiven Antwort: Die 1. Phase beginnt unmittelbar nach der Formalininjektion und dauert ca. 10 min an. Es folgt eine etwa 5-10 minütige Ruhephase mit einer geringen Aktivität. 15-20 min nach der Formalininjektion startet die 2. Phase. Die Mechanismen für das Auslösen der nozizeptiven Antwort sind für beide Phasen verschieden: Die 1. Phase kann auf eine direkte Stimulation der Nozizeptoren, insbesondere von A δ -Fasern, zurückgeführt werden. An der Entstehung der 2. Phase sind neben der Nozizeptoren-Stimulation sowohl eine Entzündung der Pfote als auch zentrale Veränderungen beteiligt, woraus eine anhaltende Aktivierung von C-Fasern resultiert

(Coderre et al. 1990; Tjolsen et al. 1992). Insbesondere die Veränderungen im Rahmen der 2. Phase machen den Formalintest zu einem Tiermodell für die Simulation anhaltender, tonischer Schmerzen.

Durchführung: Neun Mäuse je Genotyp wurden in einen Zylinder aus Plexiglas gesetzt. Nach einer Gewöhnungszeit von 30 min wurde zur nozizeptiven Stimulation 20 µl einer 5 %igen Formaldehyd-Lösung subkutan auf der Dorsalseite der linken Hinterpfote injiziert. Unmittelbar nach der Formalininjektion wurde das Versuchstier über einen Zeitraum von 45 min beobachtet. Als nozizeptive Antwort wurden die Zeit gewertet, die das Tier mit dem Lecken der linken Hinterpfote verbrachte (Leckzeit). Die Leckzeit wurde in einminütigen Intervallen erfasst, die Auswertung erfolgte durch Bildung des Mittelwertes aus jeweils 5 min Beobachtungszeit (Hunskar et al. 1985). 2 h nach dem Formalintest wurden die Versuchstiere getötet und die Gewebe zur Analyse der COX-2, MMP-9 und iNOS Expression wie unter 2.3.6.1 beschrieben entnommen.

2.3.5.2 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion

Testprinzip: Durch Injektion einer Zymosanlösung in eine Hinterpfote wird dort eine Entzündung induziert. Dies führt unter anderem zu einer Überempfindlichkeit (Hyperalgesie) der Hinterpfote gegenüber mechanischen Stimuli. Zur Quantifizierung der Hyperalgesie wird das Dynamic Plantar Aesthesiometer verwendet. Als nozizeptive Reaktion des Tieres gilt das Anheben der Hinterpfote infolge der Druckausübung.

Durchführung: Acht Mäuse je Genotyp wurden in einen Käfig gesetzt, dessen Boden von einem engmaschigen Draht gebildet wird. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Mäuse zur Gewöhnung 2 h in den Käfig gesetzt und das Dynamic Plantar Aesthesiometer testweise eingesetzt. Am Versuchstag wurde die Mäuse 1 h an den Käfig gewöhnt. Anschließend wurde mit dem Stahlstab des Dynamic Plantar Aesthesiometer mit steigendem Druck gegen die Plantarseite der linken und rechten Hinterpfote gedrückt und die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote infolge der Druckausübung gemessen. Die Druckstärke wurde über 10 sec von 0-5 g gesteigert und anschließend weitere 10 sec konstant bei 5 g gehalten (cut-off Zeit waren 20 sec). Die Latenzzeit des Pfotenwegziehens wurde als Mittelwert aus vier aufeinander folgenden Messwerten und der Differenz zwischen der linken und rechten Pfote berechnet. Diese Werte dienten als Basislinie. Nach Ermittlung der Basislinie wurde jedem Versuchstier 20 µl einer 10 mg/ml Zymosanlösung subkutan in die Plantarseite der linken Hinterpfote injiziert, wodurch dort eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde.

Anschließend wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach der Zymosaninjektion (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 24 h und 48 h) erneut ein Test durchgeführt. Nach der letzten Messung wurden die Versuchstiere getötet.

2.3.6 Gewebeentnahme

2.3.6.1 Für Expressionsanalysen und ELISAs

Die Versuchstiere wurden mit CO₂ getötet und mittels kardialer Punktion entblutet. Unmittelbar danach wurden die Tiere in Bauchlage gebracht und der Rücken mit einem Skalpell aufgeschnitten. Anschließend wurde die Haut über der Wirbelsäule entfernt. Nach Inzision der Faszie wurde die Wirbelsäule freipräpariert und in Höhe des Zervikalmarkes quer durchschnitten. Vom Bereich des Querschnittes aus wurden die seitlichen Wirbelbögen nach kaudal fortschreitend vorsichtig durchtrennt und so das Rückenmark freigelegt. Schließlich wurden der lumbale Bereich des Rückenmarks und DRG's (L4-L6) entnommen. Für die Entnahme der Gehirnteile wurde der Schädel mittig aufgeschnitten und das Cerebrum und Cerebellum herauspräpariert. Bei der Pfote wurde das Weichgewebe der Plantarseite der Hinterpfote herausgeschnitten. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.6.2 Für Gefrierschnitte

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran tief narkotisiert und, um das Blut auszuspülen, zunächst mit isotonischer NaCl-Lösung über den linken Herzventrikel perfundiert. Anschließend wurde das Gewebe mit 4 %iger PFA-Lösung durch Perfusion fixiert. Zur besseren Fixierung wurden die Mäuse 1 h in Eis gekühlt. Es folgte die Gewebeentnahme für Rückenmark und DRG's wie in 2.3.6.1 beschrieben. Die Gewebe wurden in eine 6-Loch-Platte überführt und für 1 h weiter in 4 %igen PFA bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe für 1 h mit 10 %iger Saccharoselösung und über Nacht mit 30 %iger Saccharoselösung bei 4 °C dehydriert. Das Gewebe wurde abschließend in Gefriermedium eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei -80 °C gelagert.

2.3.7 Herstellung von Gefrierschnitten

Die in Gefriermedium eingebetteten murinen Rückenmarks- oder DRG-Proben wurden am Kryotom unter konstanten Temperaturbedingungen (Objekt: -19 °C; Umgebung: -20 °C) geschnitten. Es wurden 16 µm dicke Gefrierschnitte erstellt und auf Super-Frost-Plus Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträgern blockweise aufgenommen. Die Schnitte wurden 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

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

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

Zur Messung wurde 1 µl der Nukleinsäurelösung am NanoDrop-Spektrophotometer gemessen.

2.4.2 Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation)

Die Minipräparation diene entweder als Screening-Verfahren, mit dem die für eine Maxipräparation interessanten Klone identifiziert werden sollten oder zur Herstellung von kleineren Mengen Plasmid-DNA. 5 ml LB-selektiv-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) wurden mit einer einzelnen TOP10 *E.coli*-Kolonie von einer frischen selektiven Agarplatte beimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert (37 °C, 117 rpm). Für eine spätere Maxipräparation (siehe 2.4.3) wurden 350 µl der Übernachtskultur mit 350 µl Glycerol in Cryo™-Einfrieröhrchen bei -80 °C eingefroren (Kryostock). Die restliche Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 4000 rpm) und das Bakteriensediment mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Plasmid-DNA

wurde mit H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1) Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Wurde die Minipräparation zum Screening verwendet wurde die Plasmid-DNA anschließend einem analytischen Restriktionsendonukleaseverdau unterzogen (siehe 2.4.8.5) und danach zur Sequenzierung geschickt (Agowa, Berlin).

2.4.3 Präparative Plasmidisolierung (Maxipräparation)

5 ml LB-selektiv-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) wurden mit einer einzelnen TOP10 *E.coli*-Kolonie von einer frischen selektiven Agarplatte oder einem Kryostock beimpft und 8 h unter Schütteln als Vorkultur inkubiert (37 °C, 117 rpm). 400 ml LB-selektiv-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) wurden mit 800 µl (1:500) der Vorkultur beimpft und 12-16 h unter Schütteln inkubiert (37 °C, 117 rpm). Die Bakterienkultur wurde anschließend in Zentrifugenbecher überführt und im Sorvall GSA Rotor sedimentiert (15 min, 6000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit dem Qiafilter Maxi Plasmid Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1). Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.4.4 RNA-Isolierung

2.4.4.1 RNA-Isolierung aus murinem DRG- und Pforten-Gewebe

Die RNA aus DRG- und Pforten-Proben wurde nach der Chomczynski-Methode mit Tri-Reagenz und Chloroform (Chomczynski and Sacchi 1987; Chomczynski 1993) extrahiert. Im Tri-Reagenz sind Guanidiniumthiocyanat und saures Phenol enthalten. Nach Zugabe von Chloroform entsteht ein 3-Phasen-System, in dem die RNA in der oberen, wässrigen Phase angereichert ist, während sich Proteine und DNA in der Phenol- und der Interphase befinden. Die RNA kann so leicht abpipettiert und mit Alkohol gefällt werden. Die Gewebe-Proben wurden mit 200 µl Tri-Reagenz versetzt und mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 800 µl Tri-Reagenz bei Pfortengewebe bzw. 200 µl für DRG's wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 200 µl (80 µl für DRG's) Chloroform zupipettiert, gut gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4 °C). Nach

der Zentrifugation war eine Phasentrennung zu beobachten. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl (200 µl für DRG's) reinem Isopropylalkohol, zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (8 min, 14000 rpm, 4 °C). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl (250 µl für DRG's) 75 %igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in einer Vakuumzentrifuge 5 min bei 30 °C getrocknet. Das RNA-enhaltende Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen. Zur Entfernung von mitextrahierten DNA-Anteilen wurden die Proben anschließend mit dem RNeasy® Mini Kit unter Durchführung des optionalen DNaseI Verdaus, entsprechend den Herstellerangaben, gereinigt. Die RNA wurde mit RNase-freiem H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

TRI-Reagenz	800 mM	Guanidiniumthiocyanat
	400 mM	Ammoniumthiocyanat
	0,1 mM	Natriumacetat
	5 %	Glycerol
	ad 1 l	H ₂ O
	1 kg	geschmolzenes Phenol
	ad 2,6 l	H ₂ O

2.4.4.2 RNA-Isolierung aus murinem Rückenmarks- und Gehirn-Gewebe

Die RNA aus Rückenmarks- und Gehirn-Proben wurde mit dem Rneasy® Lipid Tissue Mini Kit entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Die Proben wurden mit 200 µl Qiazol®-Reagenz versetzt und mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit Qiazol®-Reagenz auf 1 ml aufgefüllt und entsprechend der Herstellerangaben fortgefahren. Um mitextrahierte DNA-Anteile zu entfernen wurde der optionale DNaseI Verdaus wie beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase-freiem H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

2.4.4.3 RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen

Die RNA aus eukaryontischen Zellen wurde mit dem Rneasy® Mini Kit entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale im Medium mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, 3000 rpm, 4 °C) und das Pellet mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation (3 min, 3000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet entsprechend der Herstellerangaben weiterverarbeitet. Um mitextrahierte DNA-Anteile zu entfernen wurde der optionale DNaseI Verdau wie beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase-freiem H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.4.1). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.5.1 One-Step-RT-PCR

Bei der One-Step-RT-PCR erfolgt die reverse Transkription und anschließende PCR in einem Reaktionsgefäß. Zur Analyse der Expression von IKK ϵ in murinem Gehirn-, Rückenmark-, DRG- und Pfoten-Gewebe, sowie zur Herstellung von IKK ϵ -RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung (siehe 2.4.8) wurde mit der isolierten RNA eine One-Step-RT-PCR unter Verwendung des Qiagen[®] OneStep RT-PCR Kit durchgeführt. Dafür wurden die in 2.1.5 aufgeführten spezifischen Primer verwendet.

Reaktionsansatz (25 μ l)	5 μ l	5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer
	1 μ l	10 mM dNTP Mix
	1,5 μ l	10 μ M Fw Primer
	1,5 μ l	10 μ M Rv Primer
	200 ng	RNA
	1 μ l	Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix
	ad 25 μ l	RNase freies H ₂ O

Reaktionsbedingungen	Reverse Transkription	30 min	50 °C	
	Initialisierung	15 min	94 °C	
	Schmelzen	1 min	94 °C	
	Primer-Anlagerung	1 min	50-65 °C	25-35 Zyklen
	Polymerase-Reaktion	1 min	72 °C	
	Finale Extension	10 min	72 °C	

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.4.6) und deren Größe durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard ermittelt. Für die Herstellung der RNA-Sonden wurde der Gesamtansatz aufgetragen und die entsprechende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten (siehe 2.4.7). Die isolierten DNA-Fragmente wurden anschließend zur Klonierung eingesetzt (siehe 2.4.8.1).

2.4.5.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, schreibt RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) um. Für die reverse Transkription der isolierten RNA wurde das Super Script™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR nach Herstellerangaben verwendet. Als Primer wurden Random-Hexamere verwendet, mit denen die gesamte RNA (mRNA, tRNA und rRNA) in cDNA umgeschrieben wurde.

Reaktionsansatz (10 µl)	200 ng 1 µl 1 µl ad 10 µl	RNA 10 mM dNTP Mix Random-Hexamere (50 ng/µl) RNase freies H ₂ O
----------------------------	------------------------------------	--

Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 10 µl cDNA-Synthese-Mix hinzugegeben und unter den nachfolgenden Reaktionsbedingungen inkubiert.

cDNA-Synthese-Mix (10 µl)	2 µl	10x RT-Puffer	
	4 µl	25 mM Magnesiumchlorid	
	2 µl	0,1 mM DTT	
	1 µl	RNase out	
	1 µl	SuperScript™ III RT (200 U/µl)	
Reaktionsbedingungen	Reverse Transkription	10 min	25 °C
	cDNA Synthese	50 min	50 °C
	Termination	5 min	85 °C

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

2.4.5.3 Quantitative Realtime RT-PCR

Zur Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten wurde die quantitative Realtime PCR verwendet, bei welcher die Erfassung der PCR-Produkte direkt während der Bildung ermöglicht wird. Zunächst wurde die isolierte RNA (200 ng) in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.5.2). Die Quantifizierung der Expression von IKKε, COX-2, MMP-9 und iNOS erfolgte anschließend am ABI 7500 Fast Realtime-PCR System unter Einsatz spezifischer Primer (siehe 2.1.5). Die Messung erfolgte in einer Triplet-Bestimmung. 18S-rRNA diente bei der Quantifizierung als interner Standard. Die Messungen wurden mit speziellen, kommerziell erhältlichen, FastStart Universal Master Mix Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die IKKε-, COX-2-, MMP-9-, und iNOS-Expressionsanalyse diente als Fluoreszenzfarbstoff

SYBR Green, der in dem Mix enthalten war (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)). Für die quantitative Analyse der 18S-rRNA wurde ein predeveloped assay reagent (PDAR) verwendet, der als Fluoreszenzfarbstoff VIC enthalten hatte (FastStart Universal Probe Master (ROX)).

Reaktionsansatz (10 µl)	5 µl	2x FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)
(IKKε; COX-2; MMP-9; iNOS)	1 µl	10 µM Fw Primer
	1 µl	10 µM Rv Primer
	1 µl	cDNA
	ad 10 µl	HPLC grade H ₂ O

Reaktionsansatz (10 µl)	5 µl	2x FastStart Universal Probe Master (ROX)
(18S-rRNA)	0,5 µl	18S PDAR
	1 µl	cDNA
	ad 10 µl	HPLC grade H ₂ O

Reaktionsbedingungen	Initialisierung	10 min	95 °C	
	Amplifikation und	10 sec	95 °C	40 Zyklen
	Real-Time Analyse	30 sec	60 °C	

Die Berechnung der relativen mRNA-Menge erfolgte nach der komparativen C_T-Methode. Dabei wird ein Schwellenwert festgelegt (C_T-Wert), bei dem die DNA-Amplifikation sich in der exponentiellen Phase befindet. Der Amplifizierungszyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert erreicht, ist proportional zur Anzahl der mRNA-Kopien zu Beginn des Experiments und diente somit als Grundlage für die Berechnung der relativen mRNA-Mengen. Der C_T-Wert für IKKε, COX-2, MMP-9 oder iNOS wurde mit dem 18S-rRNA C_T-Wert aus der gleichen Probe korreliert, um Schwankungen in der eingesetzten DNA-Ausgangskonzentration auszugleichen (Bildung der Differenz ΔC_T aus C_T-Werten für IKKε, COX-2, MMP-9 oder iNOS und 18S-rRNA). Der Gehalt an spezifischer mRNA in den behandelten Tieren wurde anschließend auf den Gehalt in unbehandelten Kontrolltieren bezogen (Differenz aus Einzelwerten und Kontrolle). Die erhaltenen ΔΔC_T-Werte wurden pro Gruppe gemittelt und die relative Konzentration näherungsweise über den folgenden mathematischen Zusammenhang berechnet: relative Expression = 2^{-ΔΔC_T}. Zur Herleitung der Formel und zur genauen Erklärung der komparativen C_T-Methode sei auf das Handbuch von ABI 7500Fast Real-Time PCR System verwiesen.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Fragmente, Restriktionsendonuklease-verdaute DNA oder RNA wurden durch Agarose-Gelelektrophorese mit einem Sub-Cell[®] GT Agarose-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele sowie als Laufpuffer diente 1x TBE. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2 %ige Gele (w/v Agarose in 1x TBE) hergestellt, die zur Visualisierung der Nukleinsäuren 500 ng/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V, bis die Bromphenolblau-Bande 3/4 der maximalen Laufstrecke auf der Gelfläche erreicht hatte. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-Leiter oder 1 kB DNA-Marker verwendet. Mit Hilfe des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids konnte die DNA durch Anregung bei einer Wellenlänge im UV-Bereich sichtbar gemacht und die Intensität der Produkte mit der Software Quantity One[®] densitometrisch ausgewertet werden.

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

2.4.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.8 Sondenherstellung für die *in situ* Hybridisierung

2.4.8.1 PCR

Zur Herstellung von IKK ϵ -RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung (siehe 2.4.9) wurde mit der, aus Makrophagen isolierten, RNA (siehe 2.4.4.3) eine One-Step-RT-PCR (siehe

2.4.5.1) unter Verwendung des Qiagen[®] OneStep RT-PCR Kit durchgeführt. Dafür wurden die in 2.1.5 aufgeführte spezifische Primer für IKK ϵ verwendet. Der gesamte PCR-Ansatz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.6) aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (siehe 2.4.7).

2.4.8.2 Klonierung

Das isolierte PCR-Produkt wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing in den pCR[®]4-TOPO Vektor inkloniert. Der pCR[®]4-TOPO Vektor wurde speziell für die schnelle Klonierung von Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten entwickelt. Er enthält zudem eine Bindungsstelle für T7- und eine für T3-Polymerase, welche für die spätere *in vitro* Transkription unerlässlich sind. Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt:

Klonierungsansatz	1 μ l	Salzlösung
(6 μ l)	1 μ l	PCR-Produkt
	1 μ l	pCR [®] 4-TOPO Vektor
	ad 6 μ l	steriles H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur nachfolgenden Transformation auf Eis gelagert.

2.4.8.3 Transformation

Die Transformation in One Shot[®] TOP10 chemisch kompetente *E.coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte nach einem Kurzprotokoll, welches im Falle einer Selektion nach Ampicillinresistenz angewendet werden kann. Hierfür wurden für Ampicillin-Agarplatten (0,1 mg/ml Ampicillin) bei 37 °C vorgewärmt. Die TOP10 wurden auf Eis langsam aufgetaut. 4 μ l des Klonierungsansatzes (siehe 2.4.8.2) wurden zu den aufgetauten TOP10 gegeben, vorsichtig miteinander vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l und 10 μ l des Transformationsansatzes auf die vorgewärmten Ampicillin selektiven Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.8.4 Klon-Analyse

Für das Screening nach positiven Klonen wurde eine Plasmidisolierung (Minipräparation) (siehe 2.4.2) von sechs TOP10 Kolonien durchgeführt. Zu analytischen Zwecken wurde anschließend 1 μ g Plasmid-DNA mit 1 U *Eco*RI verdaut (siehe 2.4.8.5), wodurch das

einklonierte Insert wieder ausgeschnitten und eine Größenanalyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.6) durchgeführt werden konnte. Plasmide, welche das Insert mit der richtigen Größe trugen, wurden zur Sequenzierung zu Agowa (Berlin) eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte mit bei Agowa kommerziell erhältlichen Primern. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Chromas Software ausgewertet und die Orientierung des Inserts bestimmt.

2.4.8.5 Restriktionsendonukleaseverdau

Der Restriktionsendonukleaseverdau wurde zum einen zur Linearisierung der Plasmid-DNA (Restriktionsendonuklease: *NotI* und *PmeI*) und für die Klonanalyse (siehe 2.4.8.4) (Restriktionsendonuklease: *EcoRI*) angewendet. Die Linearisierung der Plasmid-DNA ist für die anschließende *in vitro* Transkription unabdingbar, da dort ansonsten beliebig lange Transkripte gebildet werden würden.

Reaktionsansatz	3 μ l	10x Puffer (entsprechend dem Enzym)
(30 μ l)	3 μ l	10x BSA (wenn benötigt)
	3-10 μ g	Plasmid-DNA
	1 U/ μ g DNA	Restriktionsendonuklease
	ad 30 μ l	steriles H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Linearisierte Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.4.8.6 Markierung der RNA-Sonde durch *in vitro* Transkription

Die Digoxigenin (DIG)-markierten IKK ϵ -RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription aus den klonierten DNA-Fragmenten hergestellt. Der Klonierungsvektor pCR[®]4-TOPO enthält eine Promotorbindungsstelle für T7- und eine für T3-RNA-Polymerase, wodurch IKK ϵ -RNA-Proben gegensätzlicher Orientierung („sense“ und „antisense“) hergestellt werden konnten. Dabei musste vermieden werden, dass RNA-Proben erzeugt wurden, die den gesamten Vektor umlaufen, weshalb der Vektor stromabwärts der zu amplifizierenden Sequenz linearisiert wurde (siehe 2.4.8.5). Hierdurch wurde sichergestellt, dass keine Vektorsequenzen, sondern nur die gewünschte klonierte Sequenz markiert wurde. Die *in vitro* Transkription wurde mit Enzymen und Labeling-Mix von Roche (Heidelberg) durchgeführt.

Reaktionssansatz	2 μ l	10x Puffer
(20 μ l)	2 μ l	10x DIG Labeling-Mix
	1 μ l	RNase Inhibitor
	1-2 μ g	linearisierte Plasmid-DNA
	2 μ l	RNA-Polymerase (T3 oder T7)
	ad 20 μ l	RNase freies H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach der *in vitro* Transkription mussten die RNA-Sonden von nicht eingebauten DIG-markierten Nukleotiden gereinigt werden. Der Reaktionsansatz wurde hierfür mit 80 μ l RNase freien H₂O auf ein Volumen von 100 μ l gebracht. Die Aufreinigung erfolgte dann mit dem RNeasy® Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben. Zur Entfernung der linearisierten DNA wurde der optionale DNaseI Verdau durchgeführt. Die RNA-Sonde wurde mit RNase-freiem H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.9 *In situ* Hybridisierung

Gefrierschnitte von DRG- und Rückenmarks-Proben wurden zunächst kurz bei 37 °C getrocknet und die Gewebe auf dem Objektträger anschließend mit einem Fettstift umrandet. Verwendete Glasschalen wurden mit RNase Zap ausgewischt und alle verwendeten Puffer und Lösungen mit RNase-freiem H₂O hergestellt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Waschschrte auf einem Schüttelapparat.

Die Gefrierschnitte wurden 3x für 5 min mit 1x PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 0,25 μ g/ μ l ProteinaseK in 1x PBS für 5 min, um die Gewebe permeabler für das Eindringen der Sonde zu machen. Nach dem abstoppen des ProteinaseK-Verdaus durch zweimaliges Waschen mit 2 mg/ml Glycin in 1x PBS wurden die Gefrierschnitte 20 min in 4%igen PFA in 1x PBS refixiert. Danach wurde erneut 3x für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Die Gefrierschnitte wurden anschließend in eine Hybridisierungskammer überführt, die mit 1x PBS feucht gehalten wurde. Die Schnitte wurden für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen mit 200 μ l Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 2 μ l der digoxigenin-markierten IKK ϵ -antisense- bzw. IKK ϵ -sense-Sonde (Kapitel 2.4.8) mit 1 ml Hybridisierungslösung verdünnt (Endkonzentration: 0,5-2 μ g/ μ l) und 10 min bei 80 °C denaturiert. 200 μ l Sonde wurden auf die Schnitte pipettiert und anschließend in der nochmals mit 1x PBS angefeuchteten, geschlossenen Hybridisierungskammer bei 65 °C über Nacht im Hybridisierungssofen hybridisiert. Die hybridisierten Gewebe wurden am nächsten Tag mit 0,2x SSC in 1x PBS für 1,5 h bei 65 °C und 10 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Abschließend wurde für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen des, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, anti-digoxigenin Fab-Fragment Antikörpers (Roche, Heidelberg) zu blockieren wurde 2 h mit 300 µl Blockinglösung inkubiert. Der anti-digoxigenin Fab-Fragment Antikörper wurde 1:1000 in Blockinglösung verdünnt und 300 µl über Nacht bei 4 °C auf den Gefrierschnitten inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen wurde 3x 15 min mit 1x PBS und abschließend 15 min mit 1x PBST gewaschen.

Hybridisierungslösung	50 % 5x 5x 500 µg/ml 250 µg/ml	Formamid SSC (20x) Denhardts-Solution (50x; Sigma) herring sperm DNA (10 mg/ml) yeast tRNA (10 mg/ml)
20x SSC (pH 7,0)	3 M 300 mM	Natriumchlorid Trinatrium-Citrat 2H ₂ O
Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	120 mM 150 mM	Maleinsäure Natriumchlorid
Blockinglösung	1 %	Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer
1x PBST	1,7 M 34 mM 111 mM 18,4 mM 0,1 %	Natriumchlorid Kaliumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Tween [®] 20

2.4.9.1 Färbung mit BM-Purple

Die Gefrierschnitte wurden hiernach 2x 15 min mit Alkalischer-Phosphatase-Puffer für die anschließende Entwicklung äquilibriert. Entwickelt wurde mit 300 µl BM-Purple-AP Substrat bei Raumtemperatur, wobei die Färbung immer wieder unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. War die gewünscht Intensität erreicht, wurde die Färbereaktion durch 2x 10 min Waschen mit 1x PBST abgestoppt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Flouromount G eingedeckelt und unter Verwendung von Phasen-Kontrast-Durchlicht Mikroskopie fotografiert.

Alkalische- Phosphatase-Puffer	100 mM 100 mM 50 mM 1,2 mg/ml 0,2 %	Tris-HCl-Puffer (1 M; pH 9,5) Natriumchlorid Magnesiumchlorid Levamisole Tween-20
-----------------------------------	---	---

2.4.9.2 Färbung mit HNPP

Wie bei der BM-Purple-Färbung wurde nach Antikörperbindung zunächst 2x 15 min mit einem Alkalischen Phosphatasepuffer äquilibriert und dann mit einer FastRed/HNPP-Lösung für 30 min - 1h eine Farbreaktion entwickelt. Die Färbung wurde durch 2x 10 min Waschen mit 1x PBST abgestoppt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Fluoromount G überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Färbung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) analysiert.

FastRed/HNPP	1ml	Alkalische-Phosphatase-Puffer
(vor Verwendung durch	10 µl	FastRed (1 mg in 40 µl H ₂ O)
0,2 µm Nylonmembran	10 µl	HNPP (10 mg/ml)
filtriert)		

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

2.5.1.1 Proteinextraktion aus murinen Geweben

Die Extraktion der Proteine aus murinem Gewebe erfolgte in PhosphoSafe™-Extraktionspuffer, der zuvor mit Pefabloc® SC (1 mM) als Proteinaseinhibitor versetzt wurde. Die Rückenmarks-Proben wurden hierfür in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl PhosphoSafe™ versetzt und mit einem konischen Gewebe-Handhomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 100 µl Phosphosafe™ wurden die Proben zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile zentrifugiert (20 min, 14000 rpm, 4 °C). Anschließend wurde der, das Proteinlysat enthaltende, Überstand abpipettiert und bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.5.1.2 Kernextraktion aus murinen Gewebe

Die Extraktion von Zellkernen aus murinem Rückenmark erfolgte mit Hilfe des Nuclear Extract Kit nach Herstellerangaben. Der Kernextrakt wurde bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.5.1.3 Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung der Proteine aus eukaryontischen Zellen erfolgte in PhosphoSafe™-Extraktionspuffer, der zuvor mit Pefabloc® SC (1 mM) als Proteinaseinhibitor versetzt wurde. Die Zellen wurden auf der 6-Loch Platte oder Zellkulturschale im Medium mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, 3000 rpm, 4 °C) und das Pellet mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 3000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet, entsprechend seiner Größe, in 20-300 µl PhosphoSafe™-Extraktionspuffer resuspendiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile wurden die Proben erneut zentrifugiert (20 min, 14.000 rpm, 4 °C). Anschließend wurde der, das Proteinlysate enthaltende, Überstand abpipettiert und bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Proteinproben wurden mit H₂O 1:10 verdünnt. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden diente eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (5, 4, 3, 2, 1 und 0 mg/ml). Auf einer 96-well Microtiter®-Platte wurden jeweils 200 µl des Bradford-Reagenz mit 10 µl der verdünnten Proteinlösungen bzw. der Standards vermischt. Nach 2 min erfolgte die photometrische Auswertung bei 595 nm mittels Spectrafluor Plus®-Instrument und X-Fluor®-Software.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli, bei welcher die Proteine in Gegenwart von SDS aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt werden. Die Arbeiten wurden mit dem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3 durchgeführt. Die 1 mm dicken Gele bestanden aus einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem 10 %igen feinporigen Trenngel (pH 8,8). Die Proteinproben (25-40 µg) wurden im Verhältnis 4:1 mit 4fach Lämmli-puffer versetzt und 5 min bei 95 °C in einem Thermomixer denaturiert. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Precision Plus

Protein Dual Color). Die Elektrophorese wurde innerhalb der ersten 10 min bei 80 V, danach mit einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt.

Trenngel	10 %	Acrylamidlösung
	0,375 M	Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8)
	0,1 %	SDS (10 %)
	0,05 %	APS (10 %)
	0,05 %	TEMED
Sammelgel	3 %	Acrylamidlösung
	0,125 M	Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
	0,1 %	SDS (10 %)
	0,05 %	APS (10 %)
	0,05 %	TEMED
Laufpuffer	25mM	Tris-Base
	0,2 M	Glycin
	0,1 %	SDS
Lämmli-puffer (4fach)	0,2 M	Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
	10 %	SDS
	40 %	Glycerol
	0,004%	Bromphenolblau
	20%	β-Mercaptoethanol (jeweils frisch zugeben)

2.5.4 Western Blot

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Filtermembran übertragen und anschließend mittels Antikörper spezifisch angefärbt.

2.5.4.1 Elektroblothing

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden im Wet-Blot-Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace[®] NT, Pall, Dreieich) überführt (Towbin et al. 1979). Die für das Blotting-Sandwich benötigten Schwämme, Filterpapier und Membran, sowie das Gel wurden kurz in Transferpuffer äquilibriert. Das Blotting-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut: Kathode, Kunststoffgitter, Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm, Kunststoffgitter, Anode. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten MiniTrans-Blot[®] Blottingapparatur bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h. Unmittelbar danach wurde der Proteintransfer durch Färbung mit Ponceau-Lösung

kontrolliert (Salinovich and Montelaro 1986) und mittels Fotokopie dokumentiert. Anschließend wurde die Ponceau-Färbung durch Waschen in 1x PBS entfärbt (5 min).

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

2.5.4.2 Antikörper-Inkubation

Die Membran wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert. Zur Identifizierung des gesuchten Proteins wurde die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper, der in Antikörperpuffer aufgenommen wurde, auf einem Überkopfmischer entsprechend der Angaben inkubiert.

β -Actin	1:1200	1 h bei Raumtemperatur
IKK α	1:250	über Nacht bei 4 °C
IKK β	1:250	über Nacht bei 4 °C
IKK ϵ	1:250	über Nacht bei 4 °C
pNF κ B p65 (Ser536)	1:250	über Nacht bei 4 °C

Im Anschluss wurde die Membran 3x für 10 min in 1x PBST gewaschen. Zum Nachweis des Primärantikörpers wurde die Membran 1 h mit, an einen Infrarot-Farbstoff gekoppeltem, Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000) auf einem Überkopfmischer inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten drei weitere Waschschrte in 1x PBST und ein abschließender Waschschrte in PBS für jeweils 10 min. Die Detektion des entsprechenden Proteins erfolgte durch Scannen des Blots mit einem Odyssey[®] Infrared Scanner.

Blockpuffer	50 %	Odyssey [®] Puffer in 1x PBS
Antikörperpuffer	50 %	Odyssey [®] Puffer in 1x PBST

2.5.5 Immunfluoreszenz an *in situ* hybridisiertem Gewebe

Zur Untersuchung des neuronalen Zelltyps der IKK ϵ -positiven Zellen wurde im Anschluss an die *in situ* Hybridisierung (siehe 2.4.9.2) eine Immunhistochemie mit Antikörpern gegen die

entsprechenden neuronalen Marker durchgeführt. Nach Abstoppen der HNPP-Färbung wurden die Primärantikörper in 1x PBST verdünnt, auf die Schnitte pipettiert und wie unten angegeben inkubiert.

GFAP	1:200	über Nacht bei 4 °C
IB4-AF448	1:50	2 h bei Raumtemperatur
NF200	1:1000	über Nacht bei 4 °C

Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS für je 5 min entfernt. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in PBST verdünnt und für 2-3 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

anti-rabbit AF488	1:800	2-3 h bei Raumtemperatur
anti-mouse AF488	1:800	2-3 h bei Raumtemperatur

Im Anschluss wurde ebenfalls 3x 5 min mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Fluoromount G überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Färbung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) analysiert.

2.5.6 Transkriptionsfaktor-ELISA

Zur Überprüfung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ Bp65 und IRF-3 wurde die Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors an eine Konsensus-DNA-Sequenz analysiert. Hierfür wurden Kernextrakte (siehe 2.5.1.2) in TransAM™ ELISAs für NF- κ Bp65 und IRF-3 nach Herstellerangaben verwendet.

2.6 Statistik

Allgemeine Anmerkungen: Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel® 2004 und SPSS® for Windows 16.01. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

Western Blots: Die densitometrische Analyse der Bandenstärken erfolgte mit der Software QuantityOne® (Biorad, München). Die Bandenstärke des Zielproteins wurde durch die Bandenstärke der Ladungskontrolle dividiert und das Ergebnis zu dem Quotienten des

unbehandelten Kontrolltiers ausgedrückt. Die so ermittelten Werte wurden mit einer univariaten Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) und Dunnett T3 für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) auf Signifikanz getestet.

Realtime-PCR: Die Bestimmung der relativen mRNA-Menge in jeder Probe / Maus-Gruppe erfolgte mit der in 2.4.5.3 beschriebenen Methode. Die so ermittelten Zahlenwerte wurden im Verhältnis zu unbehandelten Kontrolltieren umgerechnet und einer univariaten One-Way-ANOVA mit Dunnett T3 für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) unterzogen.

Verhaltentest: Die Latenzzeiten der jeweiligen Knockout- bzw. Wildtyp-Gruppe wurden in einer univariaten One-Way-ANOVA mit Dunnett T3 für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) verglichen.

Formalintest: Die Leckzeiten jeder Maus nach Formalininjektion wurde in fünfminütigen Intervallen summiert und der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Knockout- bzw. Wildtyp-Gruppe gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Zum Vergleich der nozizeptiven Antwort der verschiedenen Gruppen wurde die Leckzeit über einen Zeitraum von 45 min summiert und außerdem in die Beiden Phasen des Tests untergliedert (Phase I: 0 – 10 min; Phase II: 11 – 45 min). Die so ermittelten Werte wurden in einer univariaten One-Way-ANOVA mit Dunnett T3 für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) verglichen.

Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion: Die mechanischen Schwellen nach Zymosaninjektion wurden im Verhältnis zur mechanischen Schwelle vor Zymosaninjektion (Leerwert) umgerechnet und die resultierenden Mittelwerte \pm SEM der jeweiligen Knockout- bzw. Wildtyp-Gruppe gegen die Zeit dargestellt. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde die Einzel-AUC zweier benachbarter Messpunkte mit der Formel:

$$\text{Einzel-AUC} = (y_1 + y_2) / 2 * (x_2 - x_1)$$

und die Gesamt-AUC als Summe der Einzel-AUC berechnet. Die Gesamt-AUC der verschiedenen Gruppen wurden in einer univariaten One-Way-ANOVA mit Dunnett T3 für multiple Vergleiche ($\alpha = 0,05$) verglichen.

Transkriptionsfaktor-ELISA: Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren naiv und zwei Stunden nach Formalininjektion wurden in der Knockout- und Wildtyp-Gruppe mittels T-Test nach Student miteinander verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von IKK ϵ in schmerzrelevanten murinen Geweben

3.1.1 Untersuchung der IKK ϵ mRNA-Expression mittels RT-PCR

Als erstes wurde untersucht, ob IKK ϵ in Geweben, welche an der Schmerzübertragung beteiligt sind, exprimiert wird. Dafür wurden RT-PCR Analysen vom Cerebrum (Großhirn), Cerebellum (Kleinhirn), dem Rückenmark, den Hinterwurzelganglien (DRG's) und der Pfote der Maus durchgeführt. Konstitutive mRNA-Expression von IKK ϵ konnte in allen Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 3-1).

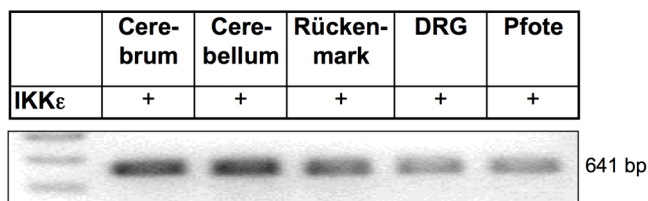


Abbildung 3-1: RT-PCR von IKK ϵ in verschiedenen murinen Geweben.

Da Regulationen in DRG's und Rückenmark eine zentrale Rolle bei der Schmerzweiterleitung und -verarbeitung zukommt, wurde in weiteren Versuchen auf diese Gewebe fokussiert.

3.1.2 Untersuchung der mRNA-Lokalisation von IKK ϵ im Lumbalmark

Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung wurde die grundsätzliche Lokalisation von IKK ϵ im Rückenmark untersucht. Anschließende Immunhistochemie sollte dann klären, in welchen Zelltypen IKK ϵ -mRNA im Lumbalmark exprimiert wird. Wie die Übersicht des Rückenmarks in der *in situ* Hybridisierung mit spezifischer IKK ϵ -Sonde zeigt, ist IKK ϵ -mRNA über das gesamte Rückenmark verteilt nachweisbar, vor allem aber in der grauen Substanz des Dorsalhorns (Abbildung 3-2). Kolokalisation mit dem Laminae II Marker IB4 zeigt IKK ϵ -positive Zellen im Bereich von Laminae II (Abbildung 3-2 A). Auch im darüber liegenden Bereich der Laminae I sind IKK ϵ -positive Zellen erkennen. In Laminae I und II werden nozizeptive Afferenzen aus der Peripherie auf zentrale Bahnen

umgeschaltet. Die Expression von IKK ϵ in diesen Laminae deutet darauf hin, dass IKK ϵ an der spinalen nozizeptiven Verarbeitung beteiligt sein könnte. Bei gleichzeitiger Färbung von IKK ϵ mit NF200, einem Marker für myelinisierte, nicht schmerzrelevante Neurone, konnte beobachtet werden, dass IKK ϵ auch in den gleichen Regionen lokalisiert ist wie diese Neurone. Im Dorsalhorn konnte jedoch keine Kolo-kalisation detektiert werden, da in den dort befindlichen kleinen, nozizeptiven Neuronen NF200 nicht exprimiert wird (Abbildung 3-2 B). Des Weiteren wurde keine IKK ϵ -mRNA in GFAP-positiven Astrozyten nachgewiesen (Abbildung 3-2 C).

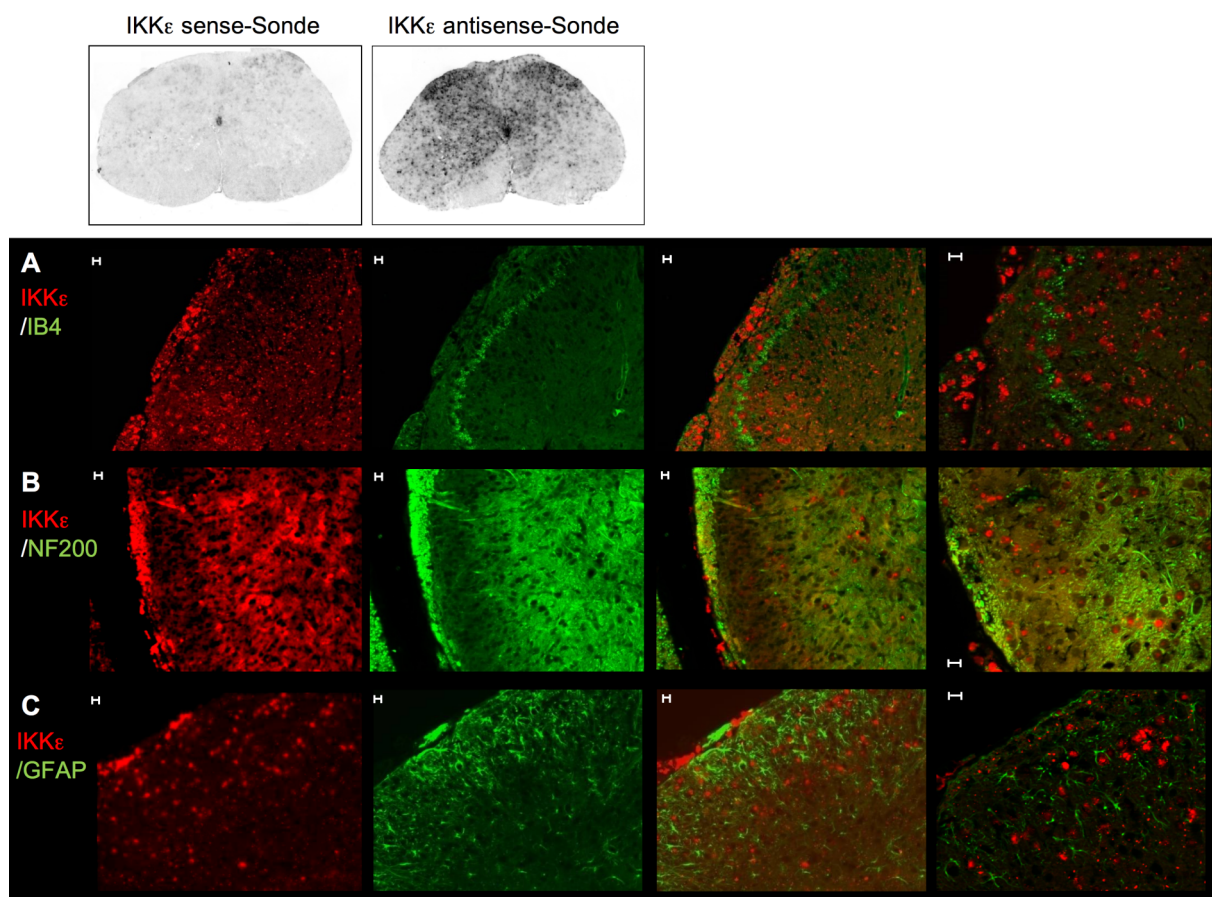


Abbildung 3-2: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ mit anschließender Immunhistochemie mit neuronalen Zellmarkern in Schnitten des Lumbalmarks von naiven C57/Bl6 Mäusen. In schwarz-weiß dargestellt ist eine Übersicht der *in situ* Hybridisierung mit IKK ϵ -sense-Sonde als Negativkontrolle und spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde. (A-C) Von links nach rechts: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ (rot); Immunhistochemie mit neuronalen Zellmarkern (grün); Übereinanderlagerung der *in situ*- und Immunfärbung; Detailaufnahme der Übereinanderlagerung. Scale Bar: 10 μ m.

3.1.3 Untersuchung der mRNA-Lokalisation von IKK ϵ in DRG's

Wie für das Lumbalmark sollte auch für die DRG's geklärt werden, in welchen neuronalen Zelltypen IKK ϵ -mRNA lokalisiert ist. Wie die Übersicht der *in situ* Hybridisierung in den DRG's zeigt, wird IKK ϵ in allen DRG-Neuronen exprimiert (Abbildung 3-3). Kolo-kalisationen mit IB4- und NF200-Färbungen bestätigen diese Beobachtung, da IKK ϵ sowohl in kleinen, IB4-positiven, schmerzrelevanten Neuronen (Abbildung 3-3 A) als auch in großen, NF200-positiven, nicht schmerzrelevanten Neuronen exprimiert wird (Abbildung 3-3 B).

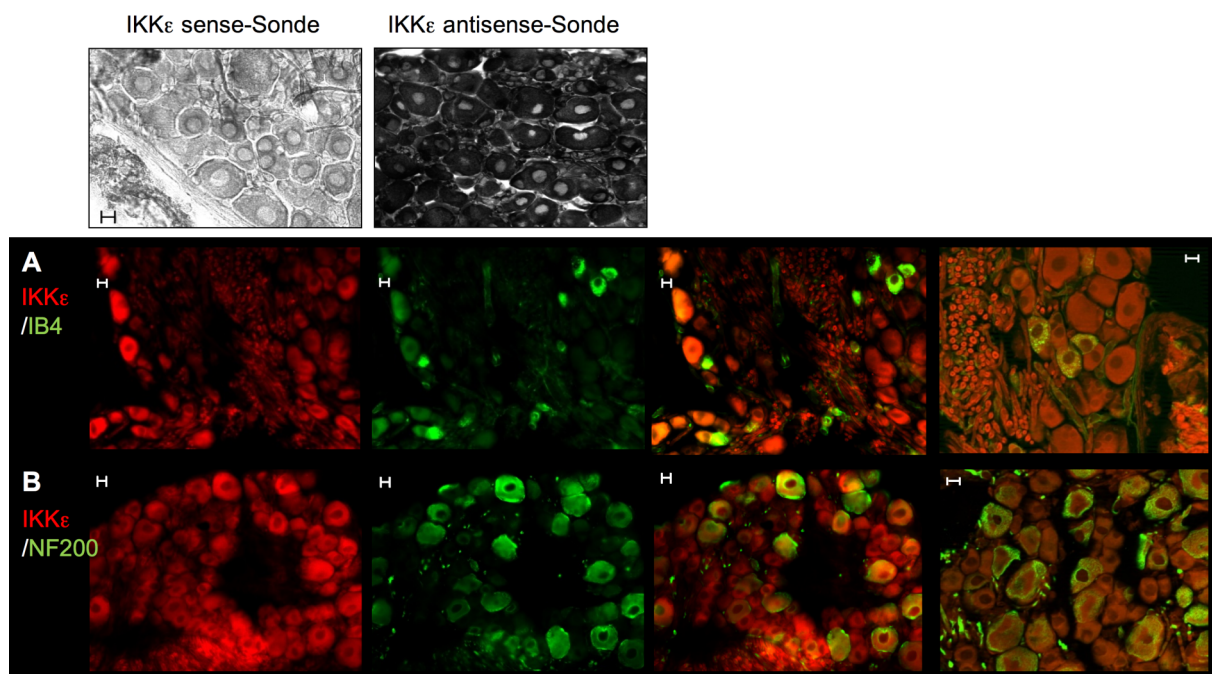


Abbildung 3-3: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ mit anschließender Immunhistochemie mit neuronalen Zellmarkern in DRG-Schnitten von naiven C57/Bl6 Mäusen. In schwarz-weiß dargestellt ist eine Übersicht der *in situ* Hybridisierung mit IKK ϵ -sense-Sonde als Negativkontrolle und spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde. (A-B) Von links nach rechts: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ (rot); Immunhistochemie mit neuronalen Zellmarkern (grün); Übereinanderlagerung der *in situ*- und Immunfärbung; Detailaufnahme der Übereinanderlagerung. Scale Bar: 10 μ m.

3.2 Expression von IKK ϵ in Lumbalmark und DRG's nach nozizeptiver Stimulation

3.2.1 mRNA-Expression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin

3.2.1.1 Quantitative Realtime RT-PCR (Taqman)

Im nächsten Schritt wurde geklärt, ob und wie IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation reguliert wird. Dafür wurde die Expression von IKK ϵ -mRNA mittels quantitativer Realtime RT-PCR nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten der Maus untersucht (Abbildung 3-4). Im Lumbalmark (Abbildung 3-4 A) konnte eine signifikante Zunahme der IKK ϵ -mRNA sowohl zwei als auch acht Stunden nach der Injektion beobachtet werden. In den DRG's (Abbildung 3-4 B) konnte zwei Stunden nach Injektion eine signifikante Zunahme der Expression von IKK ϵ -mRNA detektiert werden.

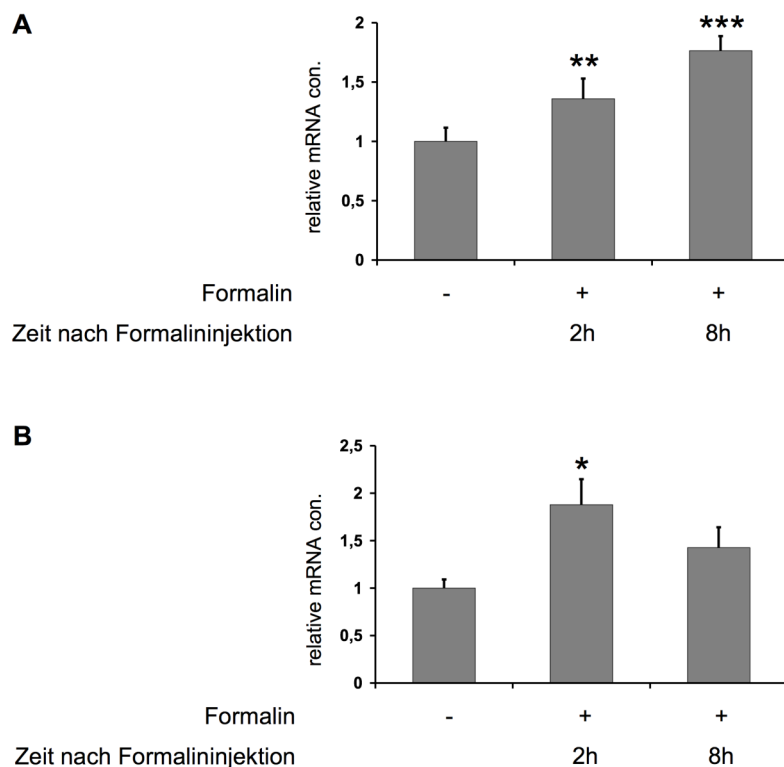


Abbildung 3-4: Relative Konzentration der IKK ϵ -mRNA in Lumbalmark (A) und DRG's (B) von C57/Bl6 Mäusen nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Gewebe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung erfolgte mit quantitativer Realtime RT-PCR, bei der IKK ϵ und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Die relative mRNA-Menge von unbehandelten Kontrolltieren wurde unter Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode gleich eins gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.1.2 *In situ* Hybridisierung vom Lumbalmark

Die in Abbildung 3-4 beobachtete Hochregulation der IKK ϵ -mRNA Expression im Lumbalmark konnte auch mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden (Abbildung 3-5). In Folge des durch die Formalininjektion ausgelösten Entzündungsschmerzes kommt es acht Stunden nach der Injektion mit Formalin (Abbildung 3-5 C) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3-5 B) zu einer Intensivierung der Färbung von IKK ϵ -mRNA. Die damit verbundene Zunahme der IKK ϵ -mRNA Expression ist vor allem im Bereich der Dorsalhörner und dort speziell in den schmerzrelevanten Laminae I und II zu beobachten, was ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von IKK ϵ in der Schmerzverarbeitung ist.

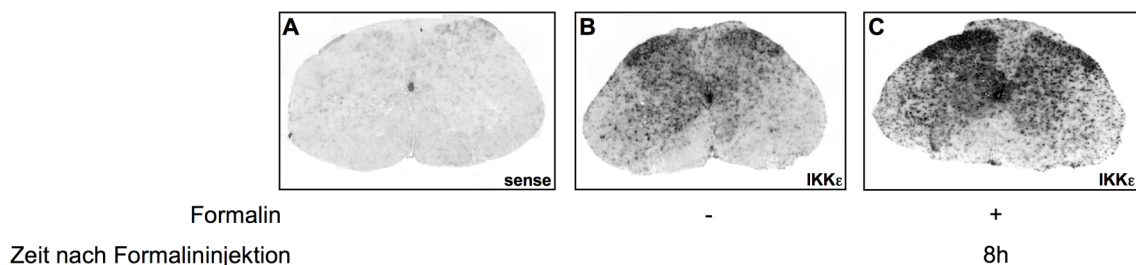


Abbildung 3-5: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ in Schnitten des Lumbalmarks von C57/Bl6 Mäusen. (A) Kontrollfärbung mit IKK ϵ -sense-Sonde (Negativkontrolle). (B) Färbung mit spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde; Rückenmarksquerschnitt eines unbehandelten Kontrolltieres. (C) Färbung mit spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde; Rückenmarksquerschnitt eines Tieres 8 h nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.2.2 Proteinexpression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin

Um herauszufinden, ob die nach Formalininjektion beobachteten Veränderungen der IKK ϵ -mRNA Expression auch mit einem veränderten Proteingehalt einher geht, wurde die Proteinexpression von IKK ϵ im Lumbalmark und den DRG's mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3-6). Die Injektion von Formalin in die Hinterpfoten von C57/Bl6 Mäusen bewirkte eine rasche Zunahme der IKK ϵ -Proteinexpression im Lumbalmark (Abbildung 3-6 A) und den DRG's (Abbildung 3-6 B). Diese Zunahme war im Lumbalmark zwei Stunden nach Injektion statistisch signifikant, in den DRG's nach acht Stunden.

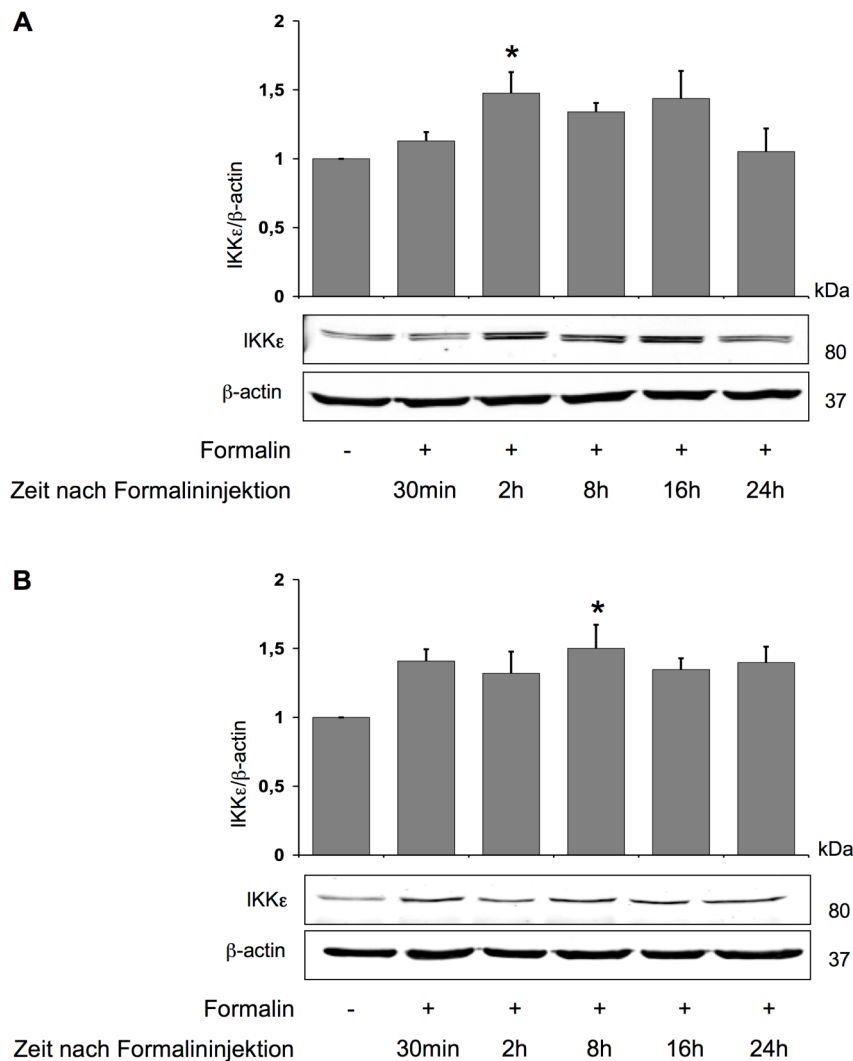


Abbildung 3-6: Proteinexpression von IKK ϵ in Lumbalmark (A) und DRG's (B) von C57/Bl6 Mäusen nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Gewebe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Formalininjektion entnommen. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals auf dem Western Blot im Verhältnis zur Ladekontrolle β -actin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -actin des unbehandelten Kontrolltieres gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.3 mRNA-Expression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Zymosan

Im Folgenden wurde untersucht, ob die oben gezeigte Effekte spezifisch für die Formalin-induzierte Entzündung sind oder eher ein genereller Mechanismus bei Entzündungsreaktionen. Dafür wurden in einem zweiten Schmerzmodell, der Zymosan-

induzierten Pfotenentzündung, die gleichen Versuche durchgeführt. Es galt zu klären, ob auch in diesem Modell ähnliche Regulationen der IKK ϵ -Expression auf mRNA- und Protein-Ebene zu beobachten sind.

3.2.3.1 Quantitative Realtime RT-PCR (Taqman)

Wie zuvor wurde die Expression von IKK ϵ -mRNA im Lumbalmark und DRG's mittels quantitativer Realtime RT-PCR nach Zymosaninjektion in beide Hinterpfoten untersucht (Abbildung 3-7). Im Lumbalmark (Abbildung 3-7 A) konnte eine signifikante Zunahme der IKK ϵ -mRNA sowohl fünf als auch 16 Stunden nach der Injektion beobachtet werden. In den DRG's (Abbildung 3-7 B) war die Zunahme nach 16 Stunden signifikant.

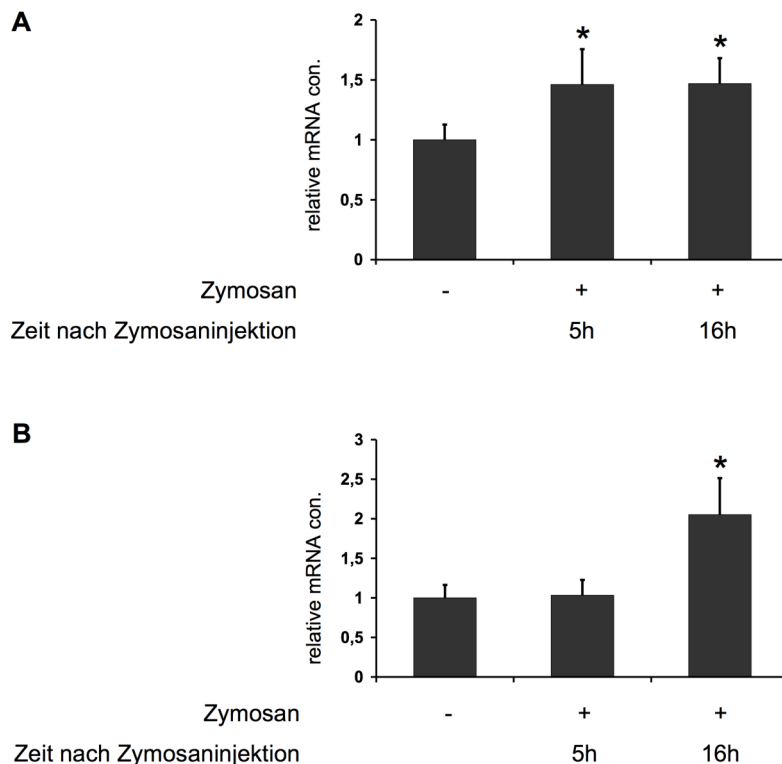


Abbildung 3-7: Relative Konzentration der IKK ϵ -mRNA in Lumbalmark (A) und DRG's (B) von C57/Bl6 Mäusen nach Zymosaninjektion in beide Hinterpfoten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Gewebe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung erfolgte mit quantitativer Realtime RT-PCR, bei der IKK ϵ und als interner Standard 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Die relative mRNA-Menge von unbehandelten Kontrolltieren wurde unter Verwendung der $2^{-\text{ddCt}}$ -Methode gleich eins gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.3.2 *In situ* Hybridisierung vom Lumbalmark

Die in Abbildung 3-7 beobachtete Hochregulation der IKK ϵ -mRNA Expression im Lumbalmark konnte, wie auch im Formalin-Modell, mittels *in situ* Hybridisierung bestätigt werden (Abbildung 3-8). 16 Stunden nach der Injektion mit Zymosan kam es zu einer Intensivierung der Färbung von IKK ϵ -mRNA (Abbildung 3-8 C) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3-8 B). Die damit verbundene Zunahme der IKK ϵ -mRNA Expression ist, wie auch nach Formalininjektion, vor allem im Bereich der Dorsalhörner und dort speziell in den schmerzrelevanten Laminae I und II zu sehen. Diese Beobachtung erhärtet die Annahme, dass IKK ϵ an der Verarbeitung verschiedener entzündlicher Schmerzen beteiligt sein könnte.

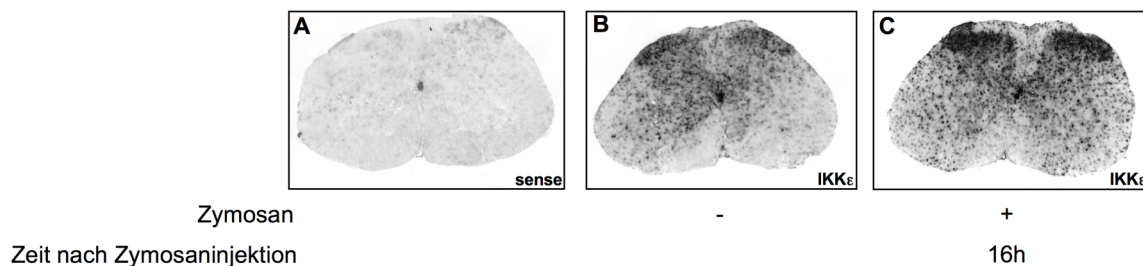


Abbildung 3-8: *In situ* Hybridisierung von IKK ϵ in Schnitten des Lumbalmarks von C57/Bl6 Mäusen. (A) Kontrollfärbung mit IKK ϵ -sense-Sonde (Negativkontrolle). (B) Färbung mit spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde; Rückenmarksquerschnitt eines unbehandelten Kontrolltieres. (C) Färbung mit spezifischer IKK ϵ -antisense-Sonde; Rückenmarksquerschnitt eines Tieres 16 h nach Zymosaninjektion in beide Hinterpfoten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.2.4 Proteinexpression von IKK ϵ nach nozizeptiver Stimulation mit Zymosan

Um herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen der IKK ϵ -mRNA Expression nach Injektion mit Zymosan ebenfalls mit einer Veränderung des Proteingehalts verbunden waren, wurde die Proteinexpression von IKK ϵ im Lumbalmark und den DRG's mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3-9). Wie erwartet, bewirkte auch die Zymosaninjektion eine rasche Zunahme der IKK ϵ -Proteinexpression im Lumbalmark (Abbildung 3-9 A) und den DRG's (Abbildung 3-9 B). Diese Zunahme war im Lumbalmark sowohl fünf als auch 16 Stunden nach Injektion statistisch signifikant. In den DRG's konnte die größte Zunahme im Proteingehalt nach 24 Stunden festgestellt werden.

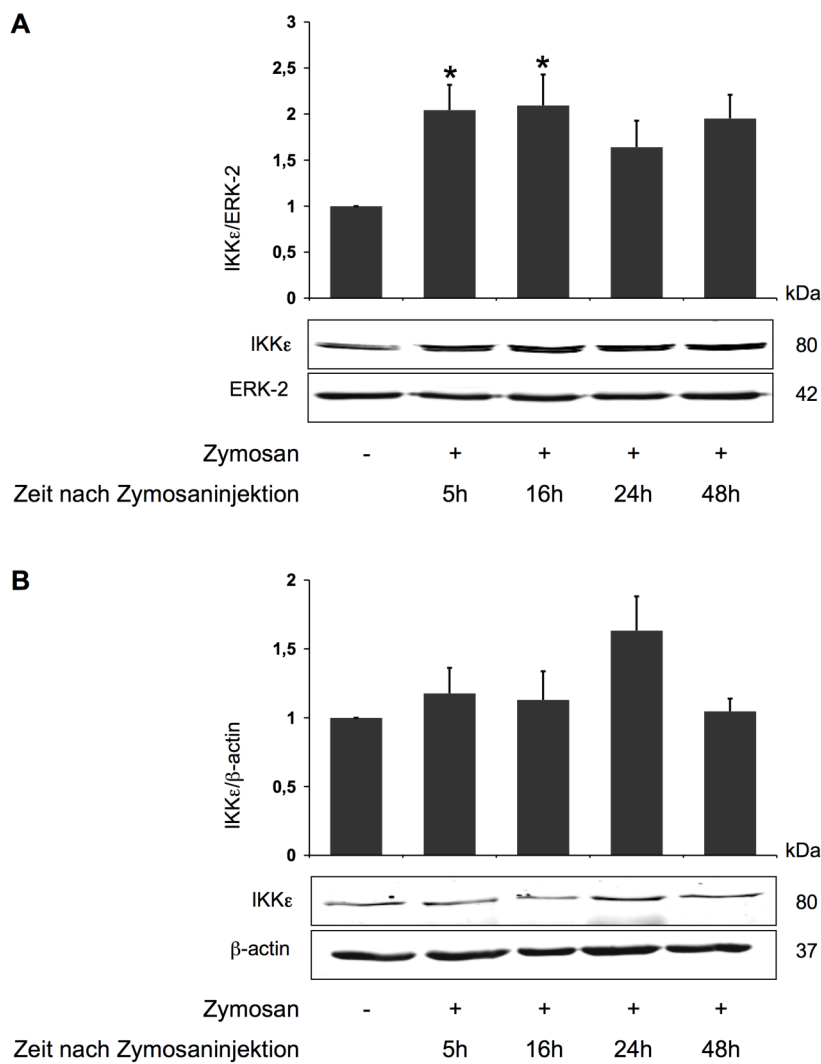


Abbildung 3-9: Proteinexpression von IKK ϵ in Lumbalmark (A) und DRG's (B) von C57/B16 Mäusen nach Zymosaninjektion in beide Hinterpfoten. Die Gewebe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zymosaninjektion entnommen. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle ERK-2 bzw. β -actin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ /ERK-2 bzw. IKK ϵ / β -actin des unbehandelten Kontrolltieres gleich eins gesetzt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit $*p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Nozizeptives Verhalten von IKK ϵ -Knockout Mäusen

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der quantitativen Realtime RT-PCR Analysen, *in situ* Hybridisierungen und Western Blot Analysen auf eine Beteiligung von IKK ϵ an der Übertragung inflammatorischer nozizeptiver Signale im Lumbalmark und den DRG's hin. Um die funktionelle Relevanz dieser Beobachtungen zu klären, wurden nozizeptive Verhaltenstests mit IKK ϵ -Knockout Mäusen durchgeführt. Für diese Tests wurden Mäuse mit dem Genotyp TNF α -R^{+/+}IKK ϵ ^{+/+} (Wildtyp), TNF α -R^{-/-}IKK ϵ ^{+/+} (TNF α ^{-/-}), TNF α -R^{+/+}IKK ϵ ^{-/-} (IKK ϵ ^{-/-}) und TNF α -R^{-/-}IKK ϵ ^{-/-} (TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}) verwendet. Mäuse mit einem IKK ϵ -Knockout hinter einem TNF α -R^{-/-}-Background wurden in die Verhaltenstests mit einbezogen, da die Zucht der IKK ϵ -Einzel Knockouts, obwohl die Tiere lebensfähig und fertil sind, sich schwierig und sehr langsam gestaltete und zunächst nicht klar war, ob die erforderliche Tierzahl für statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden konnte. Dabei wurden die Wildtyp-Mäuse als Kontrolle für Veränderungen bei den TNF α ^{-/-}- und IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen herangezogen. Die TNF α ^{-/-}-Mäuse wurden als Kontrollgruppe für die TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse verwendet. Das jeweilige Prinzip der angewendeten Tests ist in 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben.

3.3.1 Untersuchung von Veränderungen in der Motorik und im akuten nozizeptiven Verhalten

Zunächst wurden die Mäuse in ausgewählten Verhaltenstests auf Schädigungen in der Motorik und auf die akute Nozizeption getestet (Abbildung 3-10). Da die meisten Schmerztests auf motorischen Reaktionen basieren, ist eine intakte Motorik der verschiedenen Knockout-Mäuse eine Grundvoraussetzung für die spätere Beurteilung des Schmerzverhaltens der Tiere. Die akute Nozizeption ist zudem ein wichtiger physiologischer Schutz- und Warnmechanismus des Organismus. Daher ist es wünschenswert, dass die Knockout-Tiere ein dem Wildtyp entsprechendes normales akutes nozizeptives Verhalten aufweisen. Zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten wurden die Tiere im Rotarod-Test verglichen (Abbildung 3-10 A). Alle Tiere der Wildtyp-, TNF α ^{-/-}-, IKK ϵ ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Gruppe konnten ohne Probleme 90 Sekunden auf dem rotierenden Stab balancieren. Eine Einschränkung der motorischen Fähigkeiten der Knockout-Mäuse konnte somit ausgeschlossen werden. Um Veränderungen im akuten nozizeptiven Verhalten erkennen zu können, wurden der Hot Plate (Abbildung 3-10 B) und der Dynamic Plantar Test

(Abbildung 3-10 C) durchgeführt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Die akute thermische und mechanische Nozizeption ist in den Knockout-Mäusen somit ebenfalls nicht verändert.

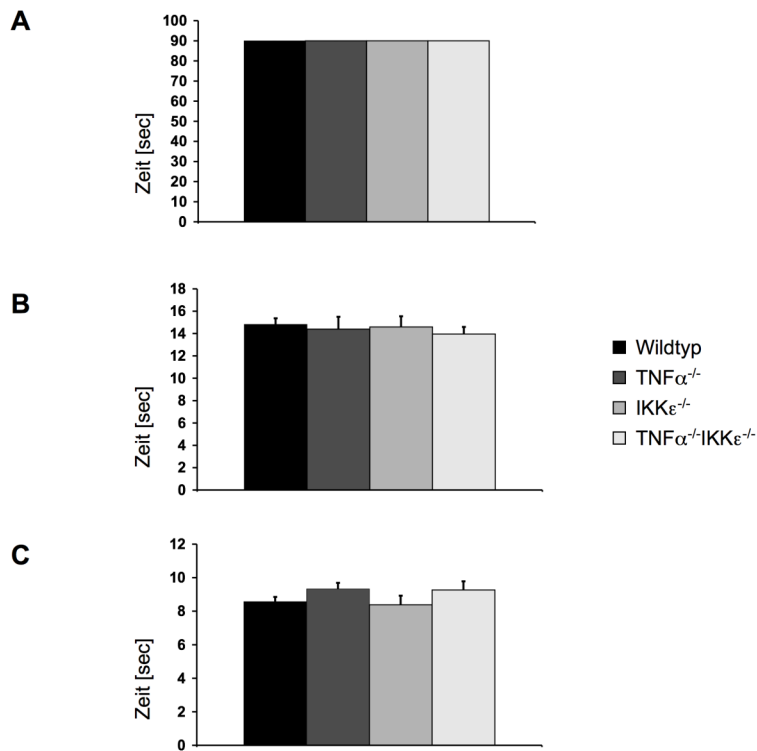


Abbildung 3-10: Verhalten von Wildtyp-, $TNF\alpha^{-/-}$, $IKK\epsilon^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen in Modellen für Motorik und akuten Schmerz. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 8 Tieren. (A) Rotarod-Test. Die Mäuse wurden auf einen rotierenden Stab gesetzt und die Zeit bis zum Herunterfallen der Mäuse gemessen, höchstens jedoch 90 Sekunden. (B) Hot Plate Test. Die Mäuse wurden auf eine $52 \pm 0,2$ °C heiße Platte gesetzt und die Zeit bis zu einer nozizeptiven Reaktion gemessen, höchstens jedoch 30 Sekunden. (C) Dynamic Plantar Test. Die mechanische Sensitivität der Mäuse wird mit Hilfe eines Stahlstabs, der mit steigendem Druck gegen die Plantarseite der Hinterpfote gedrückt wird, analysiert. Gemessen wird die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote infolge der Druckausübung, höchstens jedoch 20 Sekunden.

3.3.2 Formalintest

Um herauszufinden, in welcher Weise $IKK\epsilon$ an der Übertragung inflammatorischer Schmerzen beteiligt ist, wurde mit Wildtyp-, $TNF\alpha^{-/-}$, $IKK\epsilon^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen zunächst der Formalintest durchgeführt (Abbildung 3-11). Dieser ist ein Modell für die Simulation anhaltender, tonischer Schmerzen. Die Injektion von Formalin in eine Hinterpfote

der Wildtyp-Mäuse führte zu dem typischen biphasischen nozizeptivem Lecken der Pfote im Zeitverlauf des Formalintests (Abbildung 3-11 A). Dabei zeigten Wildtyp- und $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäuse ein ähnliches Verhalten, während bei $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäusen ein verringertes Leckverhalten beobachtet werden konnte. Die statistische Auswertung des Formalintests zeigte eine verringerte Gesamtleckzeit bei $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp- bzw. $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung 3-11 B). Bei einer Aufteilung in die zwei Phasen des Formalintests wurde deutlich, dass diese Reduktion lediglich in der

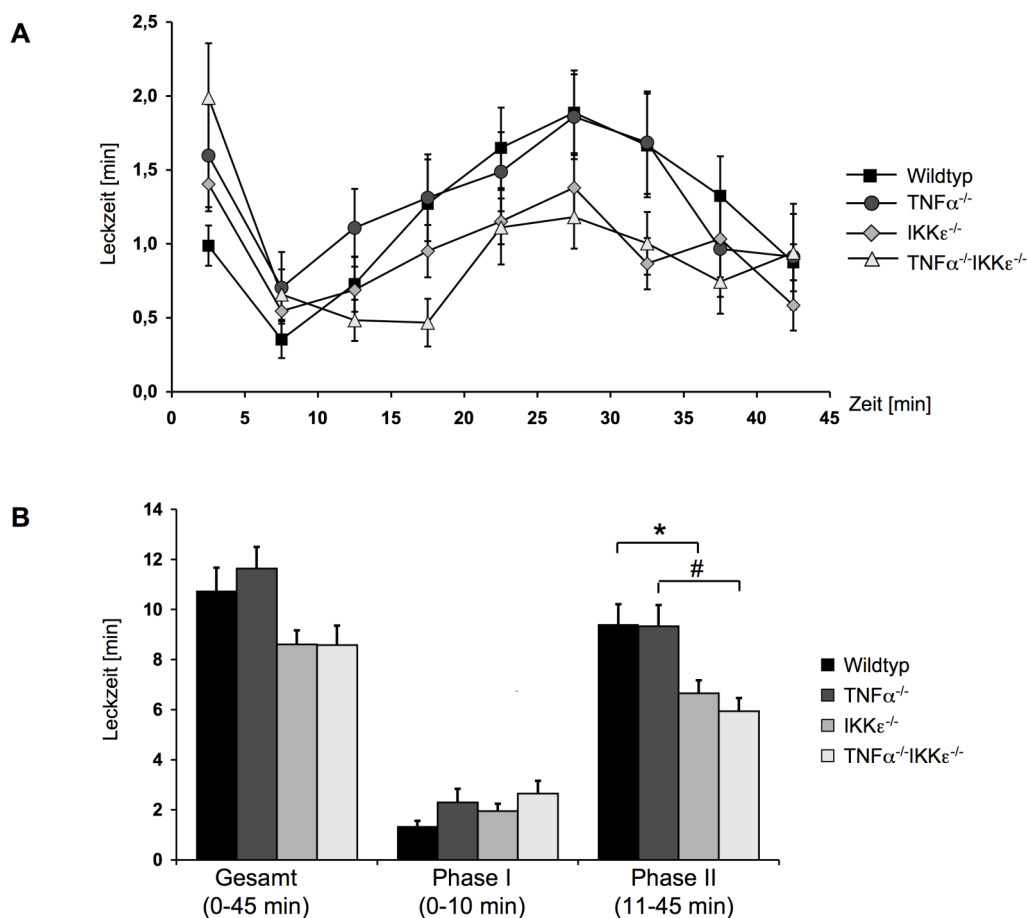


Abbildung 3-11: Formalintest mit Wildtyp-, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -, $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäusen. (A) Zeitverlauf des Leckverhaltens der $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtyp- und $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäusen. Nach Formalininjektion in eine Hinterpfote wurde die Leckdauer in fünfminütigen Intervallen über 45 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 9 Tieren. (B) Statistischer Vergleich. Die Gesamtleckzeit, die Leckzeit der ersten Phase (0-10 min) und der zweiten Phase (11-45 min) wurde ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 9 Tieren. * $p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäusen. # $p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und $\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ -Mäusen.

zweiten Phase stattfand und für den jeweiligen Knockout im Vergleich zur Wildtyp- (*p < 0,05) bzw. TNF α ^{-/-}-Kontrolle (#p < 0,05) statistisch signifikant war. In der zweiten Phase des Formalintests kommt es neben der Stimulation von Nozizeptoren aufgrund der Entzündung auch zu einer Veränderung in den schmerzverarbeitenden Neuronen des Rückenmarks (Coderre et al. 1994). Die Reduktion des Leckverhaltens in dieser Phase deutet also darauf hin, dass IKK ϵ eine Rolle bei dieser zentralen Schmerzübertragung zu spielen scheint.

3.3.3 Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion

Zum Erhalt weiterer Hinweise auf eine Beteiligung von IKK ϵ bei der zentralen Schmerzverarbeitung, wurden die IKK ϵ -Knockout Tiere in einem weiteren inflammatorischen Schmerzmodell untersucht (Abbildung 3-12). In dem zweiten Modell für inflammatorischen Schmerz wurde durch Injektion einer Zymosanlösung in eine Hinterpfote von Wildtyp-, TNF α ^{-/-}-, IKK ϵ ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen eine lokale Entzündung induziert, die mit einer starken Schwellung und Rötung der Pfote einhergeht. Dies führt zu einer Hyperalgesie der Pfote z.B. gegenüber mechanischen Stimuli. Die Latenzzeit des Pfotenwegziehens auf einen mechanischen Stimulus hin und die Differenz zwischen der linken und rechten Pfote wurde im Zeitverlauf (0-48 h) bestimmt. Die Wildtyp-Mäuse zeigten eine starke Verringerung der Latenzzeit, welche bis zum Ende der Messung nach 48 Stunden anhielt. Dieser Effekt war bei TNF α ^{-/-}-, IKK ϵ ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen weniger stark ausgeprägt, was besonders deutlich nach 24 und 48 Stunden zu erkennen war und auf eine verminderte Hyperalgesie bei den Knockout-Tieren hindeutet (Abbildung 3-12 A). Mit der Berechnung der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve (AUC)) konnte gezeigt werden, dass die verringerte nozizeptive Antwort sowohl bei den TNF α ^{-/-}-Mäusen als auch bei den IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren (*p < 0,05) statistisch signifikant war. TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse zeigten zwar die größte Reduktion der mechanischen Reizschwelle, jedoch war dieser Unterschied im Vergleich mit der TNF α ^{-/-}-Kontrolle nicht signifikant (Abbildung 3-12 B). Als Parameter für das Ausmaß der Entzündung wurde zusätzlich das Gewicht der entzündeten Pfoten ermittelt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen, d.h. die verringerte nozizeptive Antwort korrelierte nicht mit einem verringerten Pfotenödem bei den Knockout-Mäusen (Abbildung 3-12 C).

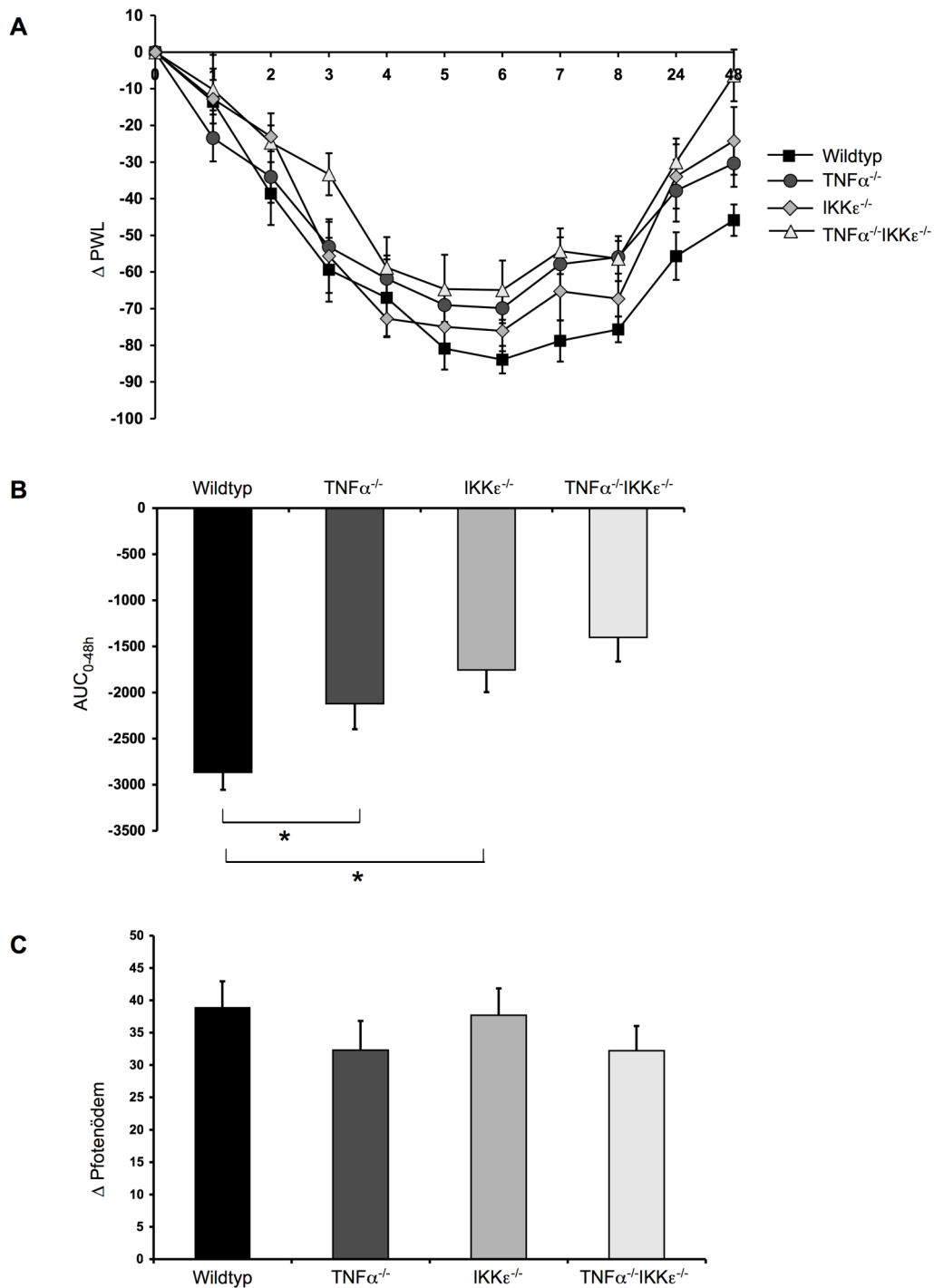


Abbildung 3-12: Mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote bei Wildtyp-, $TNF\alpha^{-/-}$, $IKK\epsilon^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen. (A) Zeitverlauf der Latenzzeit des Pfotenwegziehens. Berechnet wurde die Differenz zwischen der linken und rechten Pfote. Nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote wurde stündlich bis acht Stunden als auch nach 24 und 48 Stunden die mechanische Schwelle gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. (B) Statistischer Vergleich durch Bestimmung der Area under the curve (AUC). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 8 Tieren. * $p < 0,05$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und $TNF\alpha^{-/-}$ bzw. $IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen. (C) Messung des Pfotenödems. Dargestellt ist das Pfotengewicht nach 48 h aus der Differenz zwischen der linken und rechten Pfote von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu $TNF\alpha^{-/-}$, $IKK\epsilon^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}IKK\epsilon^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 5 Tieren.

3.4 Regulation NF- κ B-abhängiger Gene nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin

Im Folgenden sollten Hinweise gesammelt werden, ob und welche Rolle IKK ϵ bei der Aktivierung von NF- κ B während inflammatorischer Schmerzen spielt. Hierfür wurde mittels quantitativer Realtime RT-PCR die mRNA-Expression der NF- κ B-abhängigen Zielgene COX-2, MMP-9 und iNOS untersucht. Für diese Gene ist bekannt, dass sie an der Regulation von Entzündungsschmerzen beteiligt sind (Guhring et al. 2000; Vanegas and Schaible 2001; St-Pierre et al. 2004). Ausgangsmaterial war das Lumbalmark und DRG's von Wildtyp-, TNF $\alpha^{-/-}$ -, IKK $\epsilon^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in eine Hinterpfote (Abbildung 3-13).

Erwartungsgemäß konnte zwei Stunden nach Formalininjektion eine starke Hochregulation der NF- κ B-abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS im Lumbalmark der Wildtyp-Mäuse beobachtet werden (Abbildung 3-13 A). Auch in den TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen konnte eine Hochregulation dieser Gene gezeigt werden. Diese war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren schwächer, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Im Lumbalmark der IKK $\epsilon^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäuse konnte nach Formalininjektion keine Hochregulation der COX-2, MMP-9 und iNOS detektiert werden. In den IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren blieben die Gene konstant auf dem Ausgangslevel exprimiert, während in den TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäusen sogar eine leichte Hemmung der Genexpression im Vergleich zum Ausgangslevel zu erkennen war. Für COX-2 und MMP-9 war dieser Unterschied zwischen IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren und der Wildtyp-Kontrolle (**p < 0,001) und auch zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren und der TNF $\alpha^{-/-}$ -Kontrolle (###p < 0,001) statistisch signifikant. Bei der Untersuchung von iNOS konnte für die verschiedenen Knockouts eine ähnliche Tendenz beobachtet werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Auch in den DRG's konnte zwei Stunden nach Formalininjektion für COX-2, MMP-9 und iNOS eine ähnliche Hochregulation in den Wildtyp- und den TNF $\alpha^{-/-}$ -Mäusen beobachtet werden (Abbildung 3-13 B). In den DRG's der IKK $\epsilon^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäuse konnte keine Hochregulation der COX-2, MMP-9 und iNOS detektiert werden, sondern in beiden Knockouts gleichermaßen eine Hemmung der Genexpression im Vergleich zum Ausgangslevel. Für COX-2 und MMP-9 war dieser Unterschied sowohl zwischen IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren und der Wildtyp-Kontrolle (**p < 0,01) als auch zwischen TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren und der TNF $\alpha^{-/-}$ -Kontrolle statistisch signifikant (COX-2

#p < 0,05; MMP-9 ##p < 0,01). Für iNOS konnte auch in den DRG's für die verschiedenen Knockouts eine ähnliche Tendenz beobachtet werden, allerdings wiederum ohne statistische Signifikanz.

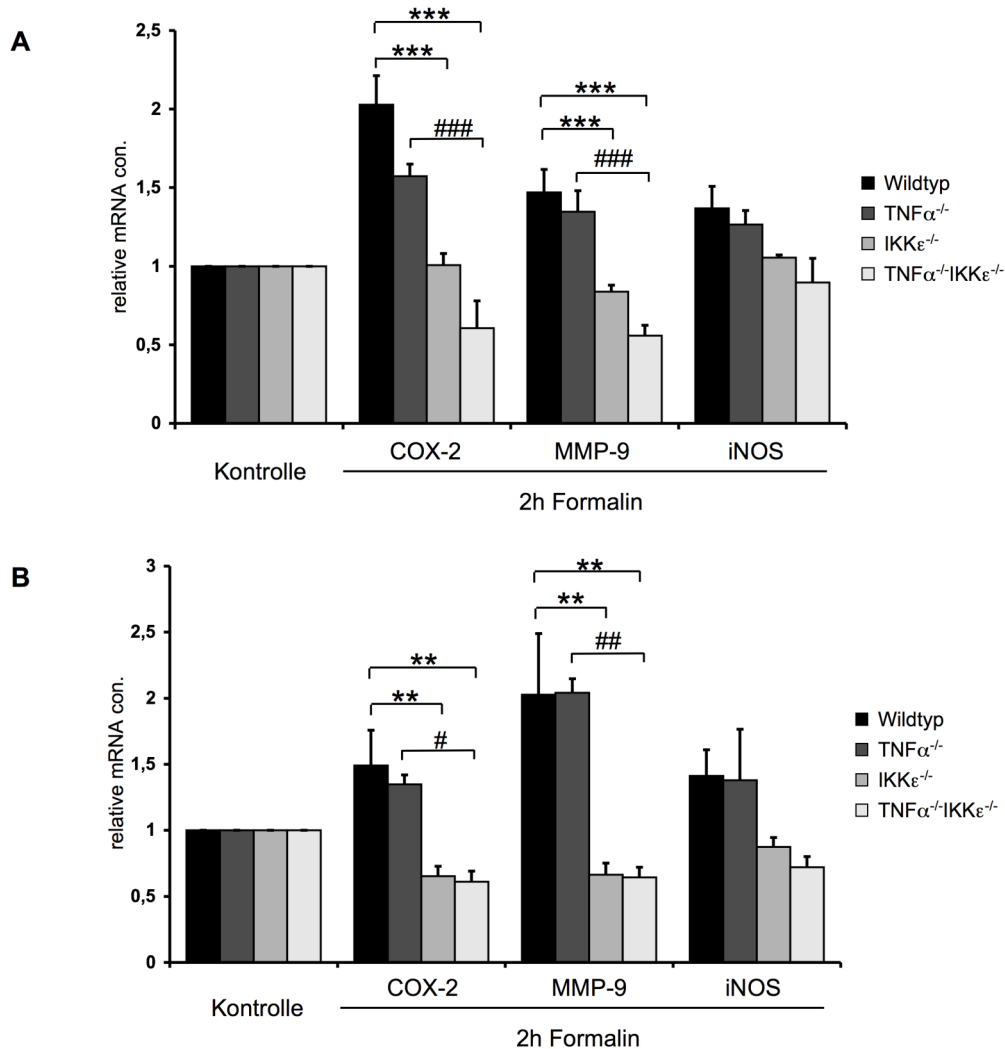


Abbildung 3-13: Relative Konzentration der COX-2-, MMP-9- und iNOS-mRNA im Lumbalmark (A) und DRG's (B) von Wildtyp-, TNF $\alpha^{-/-}$ -, IKK $\epsilon^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Mäusen zwei Stunden nach Formalininjektion in eine Hinterpfote. Die Bestimmung erfolgte mit quantitativer Realtime RT-PCR, bei der COX-2, MMP-9 bzw. iNOS und, als interner Standard, 18sRNA gleichzeitig amplifiziert wurden. Die relative mRNA-Menge von unbehandelten Kontrolltieren wurde unter Verwendung der 2^{-ddCt} -Methode gleich eins gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede von Wildtyp- und IKK $\epsilon^{-/-}$ - bzw. TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren mit **p < 0,01 und ***p < 0,001. Die Rauten kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede von TNF $\alpha^{-/-}$ - und TNF $\alpha^{-/-}$ IKK $\epsilon^{-/-}$ -Tieren mit #p < 0,05, ##p < 0,01 und ###p < 0,001.

3.5 Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ Bp65 und IRF-3 im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin

Neben der Regulation NF- κ B-abhängiger Gene wurde auch direkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ Bp65 im Rückenmark von IKK ϵ ^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen zwei Stunden nach Injektion von Formalin in beide Hinterpfote untersucht. Dadurch sollte die Rolle von IKK ϵ bei der Aktivierung von NF- κ B während inflammatorischer Schmerzen weiter beleuchtet werden. Gleichzeitig sollte auch überprüft werden, ob es durch den proinflammatorischen Stimulus in Form von Formalin zu einer Aktivierung von IRF-3 in Wildtyp-Mäusen kommt, da IKK ϵ bei der Aktivierung von IRF-3 eine wichtige Rolle spielt (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003; McWhirter et al. 2004), (Abbildung 3-14).

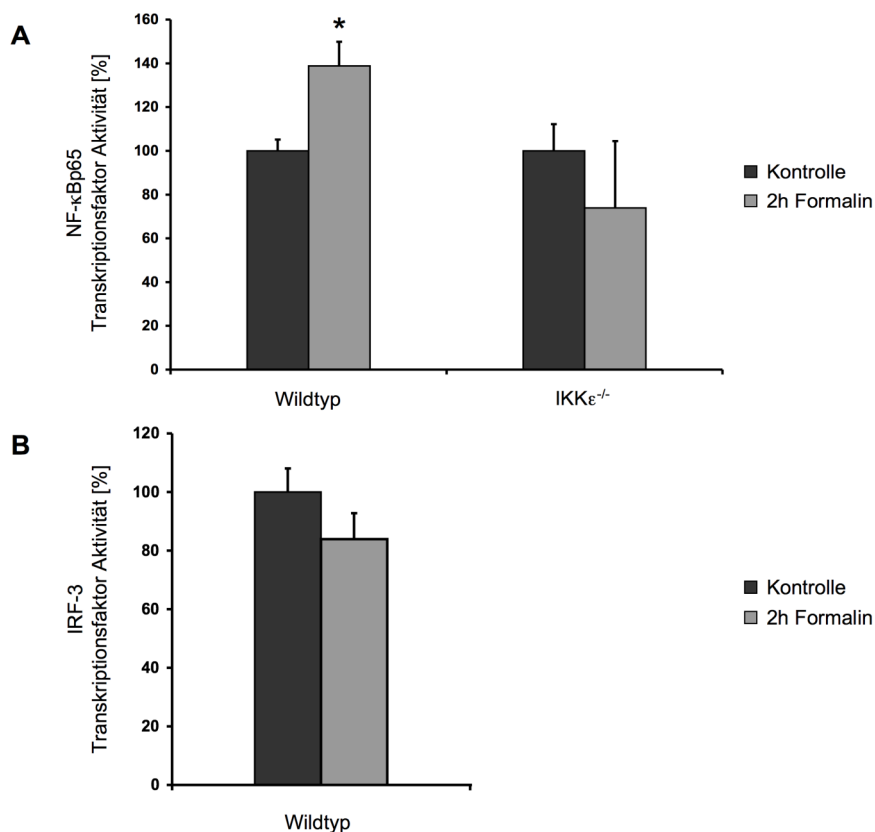


Abbildung 3-14: Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ Bp65 (A) und IRF-3 (B) im Lumbalmark von Wildtyp- und IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen (A) bzw. Wildtyp-Mäusen (B) zwei Stunden nach Formalininjektion in beide Hinterpfoten. Die Bestimmung erfolgte mittels TransAM[™] ELISA. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die unbehandelten Tiere wurden gleich 100 % gesetzt. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen Kontrolle und 2 h nach Formalininjektion mit * $p < 0,05$.

Wie erwartet kam es in den Wildtyp-Mäusen zwei Stunden nach Injektion mit Formalin zu einem signifikanten Anstieg in der NF- κ Bp65-Aktivität (Abbildung 3-14 A). In den IKK ϵ ^{-/-}-Tieren konnte dieser Anstieg in der NF- κ Bp65-Aktivität nicht beobachtet werden, wodurch IKK ϵ eindeutig mit der Aktivierung von NF- κ Bp65 in Verbindung gebracht werden konnte. In Wildtyp-Mäusen konnte des Weiteren keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 nach Formalininjektion beobachtet werden (Abbildung 3-14 B). Die Aktivierung des TypI Interferon-Signalwegs scheint also bei der proinflammatorischen und -nozizeptiven Stimulation durch Formalin keine Rolle zu spielen.

3.6 Spezifischer Knockdown von IKK ϵ durch siRNA

Im Dorsalhorn des Lumbalmarks findet die Umschaltung von Schmerzreizen aus der Peripherie auf das zentrale Nervensystem statt. Aufgrund der oben gezeigten Daten könnte ein pharmakologischer Eingriff in die IKK ϵ -Signalübertragungskaskade an dieser Stelle zu einer spezifischen Hemmung der Reizübertragung führen und so die nozizeptive Reaktion unterdrücken. Da bisher keine spezifischen Inhibitoren für IKK ϵ verfügbar sind, sollte die Hemmung der konstitutiven IKK ϵ -Expression im Rückenmark mittels spezifischer siRNA erfolgen. Die Funktionsfähigkeit der IKK ϵ -siRNA wurde vor dem Einsatz im Tier zunächst in der Zellkultur getestet (Abbildung 3-15). Als Modell dienten RAW 264.7 Makrophagen, in denen eine Entzündungsreaktion durch Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) simuliert werden kann. Dabei kommt es auch zur Aktivierung von NF- κ B, wodurch zusätzlich die Rolle von IKK ϵ im NF- κ B-Signalweg untersucht werden konnte (Abbildung 3-16).

3.6.1 Transfektion spezifischer siRNA gegen IKK ϵ

Zunächst sollte die Spezifität und Funktionsfähigkeit der IKK ϵ -siRNA untersucht werden. Dafür wurden RAW 264.7 Makrophagen für 72 Stunden mit spezifischer IKK ϵ -siRNA transfiziert und anschließend der IKK ϵ -Proteingehalt mittels Western Blot analysiert.

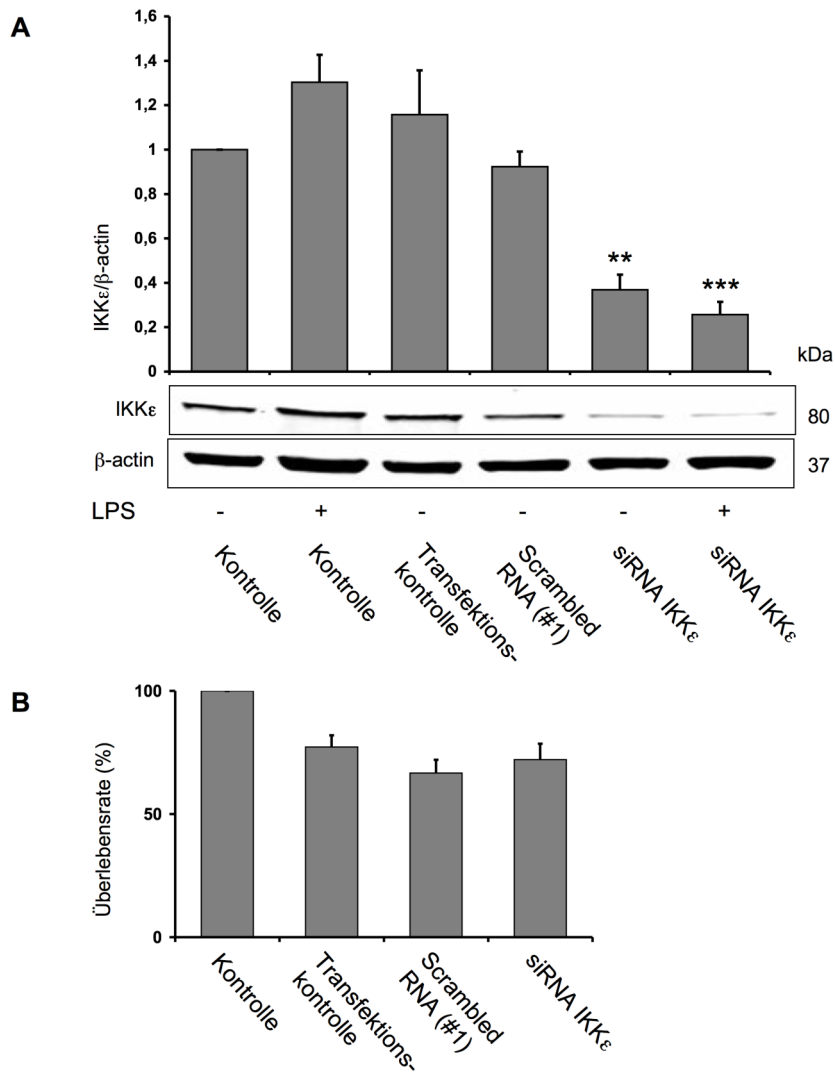


Abbildung 3-15: Transfektion von RAW 264.7 Makophagen mit 50 nM siRNA. Bei den Kontrollen handelt es sich um untransfizierte Zellen. Die Transfektionskontrolle wurde nur mit dem Transfektionreagenz siPORT™ Amine transfiziert, um mögliche unspezifische Transfektionseffekte aufzudecken. Die scrambled RNA (#1) diente als interne siRNA-Negativkontrolle, um mögliche unspezifische Effekte durch siRNAs aufzudecken. (A) Western Blot zur Bestimmung des Proteingehalts von IKK ϵ . Gezeigt werden unstimulierte und mit LPS stimulierte Zellen ohne oder nach Transfektion von siRNA. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des IKK ϵ -Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β -actin, wobei die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKK ϵ / β -actin der unstimulierten Kontrolle gleich eins gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. (B) SulforhodaminB-Zytoxizitätsassay zur Bestimmung des Effekts der Transfektion auf die Überlebensrate von RAW 264.7 Makrophagen. Das Diagramm zeigt die kolorimetrische Auswertung der Überlebensrate der Zellen in Prozent, wobei die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Die unstimulierten Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

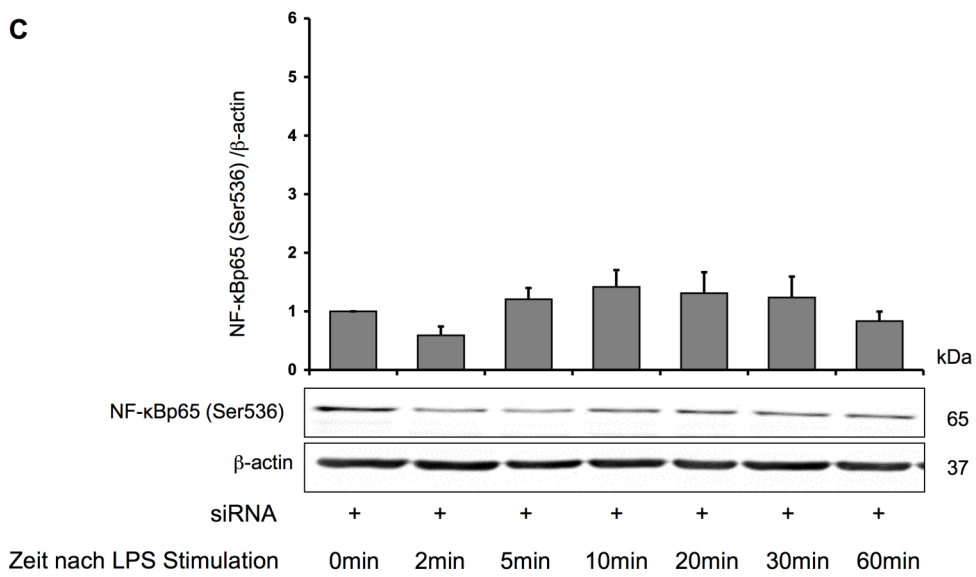
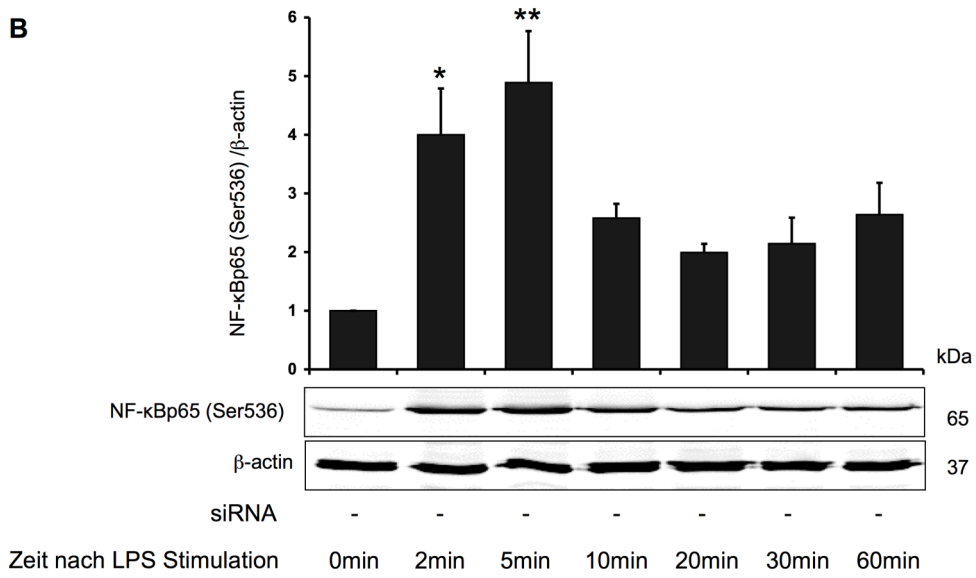
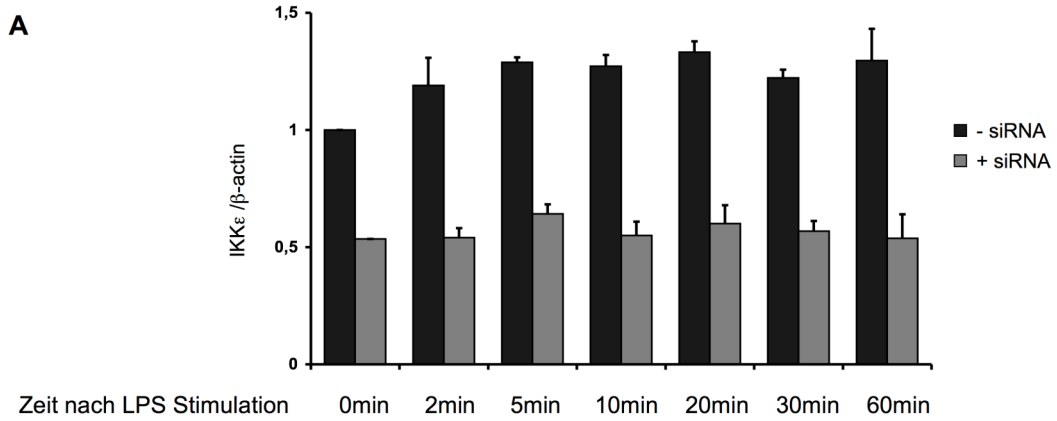
Um festzustellen, ob die Stimulation mit LPS einen Einfluss auf die Wirkung der IKK ϵ -siRNA hat, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich 48 Stunden nach Transfektion mit LPS stimuliert. Die LPS-Stimulation bewirkte in Kontrollzellen eine Zunahme der Expression von IKK ϵ , die aus Literaturdaten bereits bekannt war (Shimada et al. 1999). Nach siRNA-Behandlung konnte eine signifikante Hemmung der IKK ϵ -Proteinexpression, mit und ohne LPS Stimulation, im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle detektiert werden. Gleichzeitig konnte keine signifikante Veränderung des IKK ϵ -Proteingehalts bei der Transfektionskontrolle und der Negativkontrolle mit scrambled siRNA #1 festgestellt werden (Abbildung 3-15 A). Da die Zellen durch die Transfektion geschädigt werden und NF- κ B als potenzielles Zielprotein von IKK ϵ häufig Effekte auf Zellapoptose zeigt, wurde zusätzlich untersucht, ob die Transfektion von IKK ϵ -siRNA zu zytotoxischen Effekten führt. Mittels SulforhodaminB-Assay wurde das Protein der überlebenden Zellen kolorimetrisch detektiert und unbehandelte Kontrollzellen dann mit Zellen nach verschiedenen Behandlungen verglichen (Abbildung 3-15 B). Das Ergebnis zeigte, dass es durch den Einsatz des Transfektionsreagenzes zu einer Verringerung der Zellzahl in der Kultur kam, was darauf hindeutet, dass einige Zellen in Folge der Transfektion abstarben. Dieser Effekt wurde allerdings durch den Einsatz von siRNA oder scrambled RNA nicht zusätzlich verstärkt, d.h. die RNA hatte per se keinen Einfluss auf die Zellproliferation, was eine wichtige Grundvoraussetzung für die weiteren Versuche war. IKK ϵ besitzt eine 30 %ige Sequenzhomologie zu den Untereinheiten IKK α und β des klassischen IKK-Komplexes (Kishore et al. 2002). Es wurde daher nach Transfektion mit IKK ϵ -siRNA der Proteingehalt der beiden Untereinheiten analysiert, um einen Effekt auf den IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplex auszuschließen. Sowohl für IKK α als auch für IKK β konnte keine Regulation auf Proteinebene detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es konnten somit unspezifische Effekte der Transfektion, von siRNA im Allgemeinen und auch der IKK ϵ -siRNA ausgeschlossen und die gewählte siRNA für IKK ϵ als spezifisch betrachtet werden.

Um den pharmakologischen Nutzen der siRNA bei der Behandlung von Schmerzen zu untersuchen, war geplant, die IKK ϵ -siRNA intrathekal in Mäuse zu injizieren und diese dann in inflammatorischen Schmerzmodellen auf Veränderungen in der Nozizeption hin zu testen. Leider konnte in einem Vorversuch, bei dem die siRNA direkt ins Lumbalmark injiziert wurde, keine Hemmung der IKK ϵ -Expression beobachtet werden. Der Western Blot zeigte tendenziell eher einen Anstieg, was vermutlich auf die lokale Entzündungsreaktion durch die

Injektion zurückzuführen war. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Entwicklung eines lentiviralen Systems in Angriff genommen, das eine verbesserte Transfektion von Rückenmarkszellen gewährleisten soll. Die Entwicklung dieses Systems ist zurzeit noch in Bearbeitung. Der Knockdown von IKK ϵ ausschließlich im Rückenmark von Mäusen und die Verhaltenstests waren daher im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

3.6.2 Phosphorylierung von NF- κ Bp65 am Serinrest 536 durch IKK ϵ

IKK ϵ kann NF- κ Bp65 direkt am Serinrest 536 phosphorylieren, was für die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern und die Transkription NF- κ B-abhängiger Proteine unbedingt erforderlich ist (Buss et al. 2004; Adli and Baldwin 2006; Mattioli et al. 2006). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss eine verringerte Proteinexpression von IKK ϵ auf den Phosphorylierungsstatus von NF- κ Bp65(Ser536) nach Stimulation mit LPS hat (Abbildung 3-16). Zunächst wurde überprüft, ob der Knockdown von IKK ϵ für die Dauer der LPS-Stimulation stabil bleibt, was eine Grundvoraussetzung für die Bewertung des Phosphorylierungsstatus von NF- κ Bp65(Ser536) ist. Die IKK ϵ -Expression blieb während der kompletten Versuchsreihe im Vergleich zu den naiven Zellen vermindert (Abbildung 3-16 A). In untransfizierten Zellen kam es zwei und fünf Minuten nach Stimulation mit LPS zu einer statistisch signifikanten Zunahme der NF- κ Bp65(536)-Phosphorylierung. Nach 10 Minuten nahm der Phosphorylierungsgrad wieder ab, um sich auf einem leicht erhöhten Level einzupendeln (Abbildung 3-16 B). Nach Transfektion der Zellen mit IKK ϵ -siRNA und anschließender Stimulation mit LPS konnte keine wesentliche Regulation der NF- κ Bp65(536)-Phosphorylierung beobachtet werden (Abbildung 3-16 C). Im direkten Vergleich der untransfizierten mit den IKK ϵ -siRNA transfizierten Zellen wurde dieser Unterschied noch deutlicher und war zwei und fünf Minuten nach LPS-Stimulation statistisch signifikant (Abbildung 3-16 D). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass IKK ϵ einen wesentlichen Anteil an der Phosphorylierung des Serinrestes 536 und somit auch an der Aktivierung von NF- κ B hat.



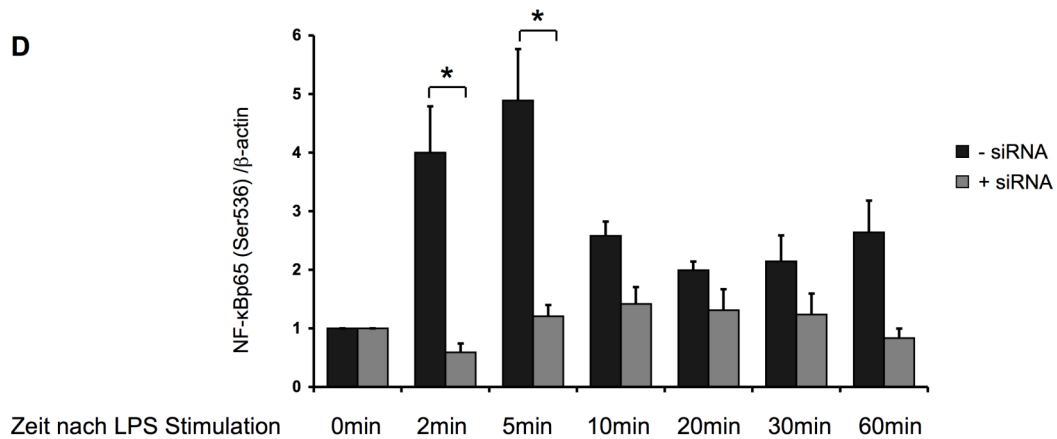


Abbildung 3-16: Phosphorylierung von NF-κBp65 am Serinrest 536 durch IKKε in RAW 264.7 Makrophagen nach Stimulation mit LPS. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Diagramme zeigen die densitometrische Auswertung des IKKε- bzw. NF-κBp65(536)-Signals im Verhältnis zur Ladekontrolle β-actin, wobei die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Quotient von IKKε/β-actin bzw. NF-κBp65(536)/β-actin der jeweiligen unstimulierten Kontrolle gleich eins gesetzt. (A) Proteinexpression von IKKε. Im Vergleich untransfizierte und mit IKKε-siRNA transfizierte Zellen. (B) Phosphorylierung von NF-κBp65(536) ohne siRNA-Transfektion. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. (C) Phosphorylierung von NF-κBp65(536) nach Transfektion von 50 nM IKKε-siRNA. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. (D) Direkter Vergleich des Phosphorylierungsgrades zwischen untransfizierten und mit IKKε-siRNA transfizierten Zellen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$ zwischen untransfizierten und mit IKKε-siRNA transfizierten Zellen.

4 Diskussion

Neben der Regulation der Immunantwort, des Zellzyklus und der Induktion von Apoptose ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B auch an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt (Ghosh et al. 1998; Li and Verma 2002; Ghosh and Hayden 2008). Verschiedene *in vivo* Studien haben außerdem gezeigt, dass NF- κ B bei entzündlichen und neuropathischen Schmerzen eine Rolle spielt. In Tiermodellen für Neuropathie und Entzündungsschmerz konnte im Rückenmark und in den DRG's, die beide an der Schmerzentstehung und -verarbeitung beteiligt sind, die Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden (Ma and Bisby 1998; Chan et al. 2000). Damit übereinstimmend kam es bei einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zur Reduktion der nozizeptiven Reaktion (Lee et al. 2004; Tegeder et al. 2004; Ledebor et al. 2005). Des Weiteren zeigten p50^{-/-}-Mäuse ebenfalls ein verringertes nozizeptives Verhalten in inflammatorischen Schmerzmodellen (Niederberger et al. 2007). Es deutet demnach vieles darauf hin, dass eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität zu schmerz- und entzündungshemmenden Effekten führen kann. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass NF- κ B in einer Vielzahl physiologischer Prozesse essentielle Funktionen übernimmt und eine komplette Hemmung daher zu schweren Nebenwirkungen führen könnte. Daher wird nach wie vor nach pharmakologischen Angriffspunkten in den NF- κ B-Signalwegen gesucht, die spezifisch für die NF- κ B-Aktivierung bei pathophysiologischen Prozessen sind. Bisher wurde vor allem der klassische IKK-Komplex, bestehend aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO), intensiv als neues pharmakologisches Ziel untersucht, da man davon ausging, dass er spezifisch bei entzündlichen Vorgängen aktiviert wird und ausschließlich Substrate in der NF- κ B-Kaskade phosphoryliert (Karin et al. 2004). Es wurden verschiedene IKK-Inhibitoren entwickelt, die vor allem gegen die β -Untereinheit des Komplexes gerichtet sind und in Tiermodellen für Entzündung und Schmerz bereits hoffnungsvolle Ergebnisse geliefert haben (Karin et al. 2004; Tegeder et al. 2004; Ebersberger et al. 2006; Bain et al. 2007). Die Tatsache, dass zwischenzeitlich neue Zielproteine für die Kinasen des klassischen Komplexes identifiziert wurden, die mit Entzündung nichts zu tun haben und dass Mäuse mit einem Knockout für IKK α , β oder γ entweder embryonal oder perinatal sterben (Li et al. 1999a; Li et al. 1999b; Tanaka et al. 1999; Rudolph et al. 2000), deutet allerdings darauf hin, dass eine komplette Hemmung dieser Untereinheiten im klinischen Gebrauch ebenfalls zu beträchtlichen Nebenwirkungen führen könnte. Da für den neu entdeckten IKK ϵ -Komplex

ebenfalls eine Beteiligung bei schmerzhaften Entzündungserkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, gezeigt werden konnte (Aupperle et al. 2001; Sweeney et al. 2005) und IKK ϵ -Knockout Tiere lebensfähig und fertil sind (Hemmi et al. 2004), könnte diese Kinase eventuell das vielversprechendere Zielprotein für die Entwicklung neuer antiphlogistischer und analgetischer Medikamente darstellen. Bislang wurde die Rolle von IKK ϵ an der Entstehung und Verarbeitung entzündlichen Schmerzen nicht näher untersucht, was in dieser Arbeit jedoch in den Fokus gerückt wurde.

4.1 Lokalisation und Regulation von IKK ϵ im zentralen Nervensystem

Obwohl IKK ϵ ursprünglich als induzierbare Kinase beschrieben wurde (Shimada et al. 1999; Peters et al. 2000), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass IKK ϵ -mRNA in schmerzrelevanten Geweben des peripheren und zentralen Nervensystems konstitutiv exprimiert wird. Im Rückenmark war die Kolo-kalisation von IKK ϵ -positiven Zellen mit neuronalen Zellmarkern vor allem im Bereich von Laminae I und II nachweisbar. In Laminae I findet man ausschließlich nozizeptiv-spezifische Neurone, in Laminae II darüber hinaus auch Neurone, die auf nicht-noxische Reize reagieren. Prinzipiell werden jedoch in diesen spinalen Bereichen nozizeptive Afferenzen aus der Peripherie auf zentrale Bahnen umgeschaltet (Iadarola and Caudle 1997; Messlinger 2002; Schmidtko et al. 2009), was darauf hindeutet, dass IKK ϵ an der Schmerzentstehung und -verarbeitung beteiligt ist. Interessanterweise konnte in Astrozyten keine IKK ϵ -mRNA detektiert werden, obwohl in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass NF- κ B nicht nur in Neuronen, sondern auch in Astrozyten eine Schlüsselrolle während Entzündungs- und Verletzungsvorgängen, sowie bei Schmerzentstehung und -verarbeitung spielt (O'Neill and Kaltschmidt 1997; Brambilla et al. 2005; Fu et al. 2007). Um auszuschließen, dass die Expression eventuell nur niedrig und daher durch die Methode der *in situ* Hybridisierung nicht detektierbar ist, wurden erste *in vitro* Versuche mit spinalen Astrozyten-Kulturen durchgeführt. In diesen konnte tatsächlich eine kaum detektierbare Proteinexpression von IKK ϵ in naiven Astrozyten gezeigt werden, die jedoch nach Stimulation mit LPS stark anstieg (Daten nicht gezeigt). Daher ist es wahrscheinlich, dass IKK ϵ in spinalen Astrozyten von unbehandelten Kontrollmäusen nicht nachweisbar ist und erst nach Stimulation in Astrozyten hochreguliert wird. Nach

nozizeptiver Stimulation mit Formalin bzw. Zymosan wurde im Gesamtextrakt vom Rückenmark sowohl IKK ϵ -mRNA als auch IKK ϵ -Protein signifikant hochreguliert. Mittels *in situ* Hybridisierung war die vermehrte Expression von IKK ϵ vor allem in den, bei der synaptischen Übertragung von Schmerzreizen wichtigen, Laminae I und II erkennbar. Die unterschiedlichen Zeitpunkte nach Formalin- und Zymosan-Injektion wurden aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika der beiden Schmerzmodelle gewählt. Während Formalin sowohl zu akuter als auch schnell einsetzender tonisch-inflammatorischer Nozizeption führt, setzt bei Zymosan die noxische Wirkung erst später ein und hält länger an (Dubuisson and Dennis 1977; Meller and Gebhart 1997), was sich auch in den unterschiedlichen Regulationsmustern von IKK ϵ widerspiegelt. In den DRG's konnte durch *in situ* Hybridisierung ebenfalls die konstitutive Expression von IKK ϵ visuell dargestellt werden. Die Kolo-kalisation mit neuronalen Zellmarkern zeigte, dass IKK ϵ sowohl in großen, nicht schmerzrelevanten als auch in kleinen, schmerzrelevanten Neuronen transkribiert wird. Die Expression von IKK ϵ in kleinen nozizeptiv-spezifischen Neuronen liefert einen direkten Hinweis auf die mögliche Beteiligung von IKK ϵ bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung im peripheren Nervensystem. Der Nachweis von IKK ϵ in den großen Neuronen der DRG's lässt eine neuroprotektive Rolle von IKK ϵ in sensorischen Neurone möglich erscheinen. IKK ϵ könnte unter anderem für eine adäquate Transduktion des Schmerzsignals in das zentrale Nervensystem verantwortlich sein, bei der kleine Neurone, große Neurone und Gliazellen durch ihre aufeinander abgestimmten synaptischen und metabolischen Aktivitäten zusammenarbeiten (Meffert et al. 2003; Mattson and Meffert 2006; Ren and Dubner 2008). Wie auch im Rückenmark kommt es in den DRG's durch die peripheren proinflammatorischen und -nozizeptiven Stimuli in Form von Formalin oder Zymosan zu einer signifikanten Hochregulation von sowohl IKK ϵ -mRNA als auch IKK ϵ -Protein.

Die sowohl im Rückenmark als auch in den DRG's nachgewiesene konstitutive Expression von IKK ϵ kann gut in Einklang mit der konstitutiven Expression von NF- κ B in exzitatorischen Neuronen gebracht werden (Mattson and Camandola 2001) und liefert möglicherweise einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von IKK ϵ an der Aktivierung von NF- κ B (Buss et al. 2004; Adli and Baldwin 2006; Mattioli et al. 2006). Durch die konstitutive Expression von IKK ϵ könnte zum einen eine schnelle Anpassung der Neurone auf noxische Reize gewährleistet und zum anderen die rasche Hochregulation nach peripherer nozizeptiver Stimulation begünstigt werden (Woolf and Costigan 1999). Zusammenfassend deuten die im

Rahmen dieser Arbeit gezeigten Expressionsmuster für IKK ϵ im Lumbalmark und den DRG's sowie die Regulation nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Formalin oder Zymosan auf eine Beteiligung von IKK ϵ an Entzündungs- und Schmerzprozessen im peripheren und zentralen Nervensystem hin.

4.2 Reduziertes nozizeptives Verhalten in IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der IKK ϵ -Expression und -regulation wurden in zwei Entzündungsmodellen Verhaltenstests mit IKK ϵ -Knockout Mäusen durchgeführt. Hierfür wurde untersucht, wie sich das nozizeptive Verhalten von IKK ϵ ^{-/-} bzw. TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ihren entsprechenden Kontrollen (Wildtyp- bzw. TNF α ^{-/-}-Mäuse) verhält. In dieser Arbeit wurden dafür der Formalintest und die mechanische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion als Modelle für inflammatorischen Schmerz gewählt. In beiden Modellen kommt es zur Induktion einer Vielzahl von Signalübertragungskaskaden, die an der Schmerzentstehung und -verarbeitung beteiligt sind (Coderre et al. 1994; Niederberger et al. 2003; Kunz et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass IKK ϵ ^{-/-}, TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-} und TNF α ^{-/-}-Mäuse die gleichen motorischen Fähigkeiten aufwiesen wie Wildtyp-Mäuse und dass keine Veränderungen bei der akuten thermischen und mechanischen Nozizeption bei den genetisch veränderten Mäusen vorliegen.

Beim durch Formalin-Injektion hervorgerufenen Entzündungsschmerz zeigten IKK ϵ ^{-/-} und TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse in der zweiten Phase des Formalintests ein signifikant verringertes nozizeptives Leckverhalten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp- bzw. TNF α ^{-/-}-Kontrollen. In der zweiten Phase kommt es neben der Stimulation von Nozizeptoren auch zu einer Sensibilisierung der schmerzverarbeitenden Neuronen des Rückenmarks (Coderre et al. 1994), was auf eine Beteiligung von IKK ϵ an der zentralen Schmerzverarbeitung bei Entzündungen hinweist. Interessanterweise konnte kein verändertes nozizeptives Verhalten zwischen TNF α ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, was gut mit dem Ergebnis zusammenpasst, dass auch TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse kein wesentlich geringeres nozizeptives Verhalten als die reinen IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse zeigten. Diese Beobachtung

deutet darauf hin, dass der Effekt hauptsächlich auf die IKK ϵ -Deletion zurückzuführen ist. Allerdings war dies auch ein unerwartetes Resultat, da TNF α ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist und somit bei einem Knockout der Rezeptoren antiinflammatorische und -nozizeptive Effekte wahrscheinlich sind (Cuhna 1992; Watkins 1995; Vogel 2006; Cuhna 2005). Bisher gibt es allerdings noch keine Untersuchungen, die Effekte in TNF α ^{-/-}-Mäusen zu einem so frühen Zeitpunkt wie beim Formalintest zeigen. In Studien mit Ratten konnte erst drei Stunden nach Injektion von complete Freund's adjuvant (CFA) in die Pfote ein Anstieg von TNF α im Entzündungsgebiet beobachtet werden (Woolf et al. 1997). Eventuell entfaltet TNF α also seine proinflammatorische und -nozizeptive Wirkung erst zu späteren Zeitpunkten und das Zeitfenster von 45 Minuten im Formalintest ist zu kurz, um Effekte des TNF α R-Knockouts feststellen zu können. Für diese Theorie sprechen auch weitere Ergebnisse dieser Arbeit. So konnte mittels quantitativer Realtime RT-PCR zwei Stunden nach Injektion von Formalin die erwartete verringerte Hochregulation der NF- κ B abhängigen Gene COX-2, MMP-9 und iNOS bei TNF α ^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte bei der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung eine reduzierte mechanische Hyperalgesie der TNF α ^{-/-}-Mäuse beobachtet werden, die erst fünf Stunden nach Zymosan Injektion einsetzte und bis zum Ende des Tests nach 48 Stunden anhielt.

Die Zymosan-induzierte Pfotenentzündung liefert zum einem verlässliche Informationen über länger anhaltende Schmerzen in Form einer mechanischen Hyperalgesie, zum anderem entsteht in der injizierten Pfote ein Ödem, welches ein stabiler und messbarer Parameter für den Grad der Entzündung darstellt (Meller and Gebhart 1997). In diesem Modell war über 48 Stunden bei IKK ϵ ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}-Mäusen eine ähnlich verringerte mechanische Hyperalgesie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu erkennen. Dagegen war der Unterschied im nozizeptiven Verhalten zwischen TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-, TNF α ^{-/-}- und reinen IKK ϵ ^{-/-}-Mäuse nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass TNF α - und IKK ϵ -vermittelte Effekte eventuell über den gleichen Signalübertragungsweg ablaufen. Dass TNF α bei der Entstehung und Verarbeitung entzündlicher Schmerzen, vor allem in Form der Hyperalgesie, eine entscheidende Rolle spielt, konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Woolf et al. 1997; Cunha et al. 2005). Interessanterweise wird TNF α auch bei rheumatoider Arthritis in der synovialen Flüssigkeit hochreguliert (Shafer et al. 1994) und die Behandlung mit Antikörpern gegen TNF α führte zu einer Verbesserung der Symptome inklusive der Schmerzen (Elliott et

al. 1994). Auch für IKK ϵ konnte eine Beteiligung bei rheumatoider Arthritis gezeigt werden (Aupperle et al. 2001; Sweeney et al. 2005), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass IKK ϵ neben TNF α eine wichtige Rolle bei der Schmerzentstehung spielt. Häufig wird antinozizeptives Verhalten in inflammatorischen Schmerzmodellen auf eine verringerte Entzündung zurückgeführt. Um festzustellen, ob dies bei den Knockout-Tieren zutrifft, wurde die Größe des Pfotenödems bei Wildtyp- im Vergleich zu den verschiedenen Knockout-Mäusen ermittelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der antinozizeptive Effekt in den Knockout-Mäusen kann somit nicht ausschließlich auf eine verringerte periphere Entzündung in der Pfote zurückgeführt werden. Es lässt sich daher annehmen, dass die verringerte Nozizeption zumindest teilweise durch Veränderungen in der Signaltransduktion im zentralen Nervensystem hervorgerufen wird.

4.3 Regulation NF- κ B-abhängiger Gene und NF- κ Bp65-Aktivität in IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen

Bisherige *in vitro* Versuche haben gezeigt, dass IKK ϵ I κ B- α phosphorylieren kann, was zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (Peters et al. 2000). Des Weiteren konnte bereits mehrfach eine direkte Phosphorylierung von NF- κ Bp65 an den Serinresten 536 und 468 durch IKK ϵ nachgewiesen (Buss et al. 2004; Adli and Baldwin 2006; Mattioli et al. 2006) und somit eine Beteiligung an der Transaktivierung von NF- κ B gezeigt werden (Wietek et al. 2006). Daher war eine Hypothese dieser Arbeit, dass der antinozizeptive Effekt des Knockouts von IKK ϵ durch eine verringerte Aktivierung von NF- κ B im zentralen Nervensystem zustande kommt, was zu einer geringeren Expression NF- κ B-abhängiger Gene führen müsste. Diese Hypothese stützend konnte mittels NF- κ Bp65 Transkriptionsfaktor-ELISA keine Aktivierung von NF- κ B zwei Stunden nach Formalininjektion in IKK ϵ ^{-/-}- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Eine Regulation von NF- κ B-abhängigen Genen wurde bereits in *in vivo* Versuchen mit S1627, einem Inhibitor des klassischen IKK-Komplexes, beobachtet, der in verschiedenen Schmerz- und Entzündungsmodellen neben den antiphlogistischen und analgetischen Effekten auch eine verringerte Expression von NF- κ B-abhängigen Genen zeigte (Tegeder et al. 2004; Ebersberger et al. 2006). Bei entzündlichen Schmerzen kommt es im zentralen Nervensystem zu einer durch

NF- κ B-induzierten Hochregulation der Expression von COX-2 und iNOS, denen bei den zentralen Sensibilisierungsprozessen eine wichtige Rolle zugesprochen wird (Ferreira 1993; Guhring et al. 2000; Madrigal et al. 2001; Vanegas and Schaible 2001; Kaltschmidt et al. 2002; Lee et al. 2004; Kim et al. 2005; Schmidtko et al. 2009). Auch NF- κ B-abhängige Matrixmetalloproteasen, insbesondere MMP-9 spielen bei chronischen entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis eine wichtige Rolle (St-Pierre et al. 2004). Ein Zusammenhang zwischen IKK ϵ und der Aktivierung der Expression von Matrixmetalloproteasen wurde bereits auch in anderen Studien gezeigt (Sweeney et al. 2005; Corr et al. 2009). Die Expression der schmerzrelevanten COX-2, iNOS und MMP-9 wurden daher als Marker für das Maß der NF- κ B-Aktivierung herangezogen. Ihre Expression wurde zwei Stunden nach Formalininjektion in die Pfote im Lumbalmark und den DRG's in den Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels quantitativer Realtime RT-PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl im Rückenmark als auch in den DRG's eine signifikant verringerte Expression von COX-2 und MMP-9 in IKK ϵ ^{-/-}- bzw. TNF α ^{-/-}IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp- bzw. TNF α ^{-/-}-Mäusen zu beobachten war. Auch die Expression von iNOS war von der Tendenz her verringert, jedoch nicht signifikant. Von besonderem Interesse ist, dass IKK ϵ anscheinend eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Expression von COX-2 spielt. Die Expression von COX-2 im Rückenmark wurde eindeutig mit einer Aktivierung von spinalem NF- κ B in Verbindung gebracht (Lee et al. 2004) und ist der Hauptverursacher für den Anstieg von PGE₂ im Rückenmark, welches für die Prozessierung von nozizeptiven Stimuli nach peripherer Entzündung verantwortlich ist (Vanegas and Schaible 2001). Der Knockout von IKK ϵ scheint demnach seine antinozizeptive Wirkung über die fehlende Aktivierung von NF- κ B zu entfalten, was wiederum dazu führt, dass Gene, die für die Entstehung und Verarbeitung von Schmerz im zentralen Nervensystem entscheidend sind, nicht oder nur geringfügig exprimiert werden.

4.4 IKK ϵ bei der Regulation von Typ1 Interferon

Neben der Beteiligung an der Aktivierung von NF- κ B spielt IKK ϵ , neben TBK1, auch eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Interferon (IFN)- β und IFN-induzierbaren Genen (Pomerantz and Baltimore 1999; Kravchenko et al. 2003; Takeuchi et al. 2004; Civas et al. 2006). Beide Kinasen sind für die Aktivierung der IFN-regulierten Transkriptionsfaktoren

(IRF)-3 und IRF-7 notwendig, die bei der viralen Verteidigung und angeborenen Immunität eine wichtige Rolle spielen (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003; McWhirter et al. 2004). Da der Interferon-Signalweg durch ähnliche Stimuli aktiviert wird wie NF- κ B, bleibt die Frage, ob die beobachteten antinozizeptiven Effekte in IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen eventuell zusätzlich durch Gene hervorgerufen wurden, die durch den IFN-Signalweg reguliert werden. Bisher wurde jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen TypI Interferonen und Schmerz beschrieben und auch der in dieser Arbeit durchgeführte IRF-3 Transkriptionsfaktor-ELISA zeigte keine Regulation von IRF-3 nach Formalininjektion in den Wildtyp-Kontrollen. Somit kommt es durch proinflammatorische und -nozizeptive Stimuli wahrscheinlich nicht zu einer Aktivierung von IRF-3 und damit auch nicht zu einer Interaktion mit dem IFN-Signalweg. Dieses Ergebnis ist vor allem hinsichtlich des pharmakologischen Nutzens einer lokalen Hemmung von IKK ϵ bei entzündlichen Schmerzen nicht unerheblich. Zusätzlich konnte in Studien mit IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass die Tiere mit einer normalen Aktivierung von IRF-3 auf Stimulation mit LPS oder doppelsträngiger RNA reagierten (Hemmi et al. 2004; Takeuchi et al. 2004). Vermutlich übernimmt TBK1 in diesem Fall die Aufgaben von IKK ϵ . Bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung scheint TBK1 jedoch keine funktionelle Redundanz zu haben, da IKK ϵ in der vorliegenden Arbeit eindeutig mit der Schmerzentstehung und -verarbeitung in Verbindung gebracht werden konnte. Welche Rolle TBK1 bei der Prozessierung von Schmerzen spielt, muss allerdings in weiteren Untersuchungen genauer geklärt werden. Dies würde am Besten durch Verhaltenstests mit TBK1-defizienten Mäusen in inflammatorischen Schmerzmodellen geprüft werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass dies unter einem TNF α ^{-/-}-Background geschehen muss, da TBK1^{-/-}-Mäuse embryonal letal sind (Bonnard et al. 2000; Gerondakis et al. 2006).

4.5 Pharmakologische Ansätze zur IKK ϵ -Hemmung

Um mögliche Nebeneffekte einer systemischen Ausschaltung von IKK ϵ zu verhindern, z.B. bei der antiviralen Abwehr und Reaktionen des Immunsystems (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003), zielte ein weiterer Ansatz in dieser Arbeit auf die lokale Hemmung der IKK ϵ -Expression im Rückenmark. Da bisher keine spezifischen Inhibitoren für IKK ϵ vorliegen, sollte die Hemmung der konstitutiven IKK ϵ -Expression im Rückenmark durch RNA Interferenz mittels spezifischer siRNA erfolgen. Diese Methode wurde als

bestmögliche gewählt, da erste Silencing-Versuche in schmerzrelevanten Neuronen und *in vivo* Schmerzmodellen vielversprechend aussahen (Dorn et al. 2004; Kurreck 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte die Spezifität der IKK ϵ -siRNA in *in vitro* Versuchen in murinen RAW 264.7 Makrophagen gezeigt werden. Um den pharmakologischen Nutzen der siRNA bei der Behandlung von Schmerzen zu untersuchen, sollte die IKK ϵ -siRNA intrathekal in Mäuse injiziert und diese dann in inflammatorischen Schmerzmodellen auf Veränderungen in der Nozizeption hin getestet werden. Leider waren Vorversuche, bei denen die siRNA direkt ins Lumbalmark injiziert wurde, nicht erfolgreich, da keine verringerte Expression auf Proteinebene nachweisbar war, sondern vielmehr eine Hochregulation, die aber auch bei Kontroll-siRNA auftrat und somit vermutlich mit der lokalen Entzündung durch die Injektion im Zusammenhang steht. Daraufhin wurde die Entwicklung eines lentiviralen Systems in Angriff genommen, welches bis zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht fertig gestellt war. Allerdings konnte in dem *in vitro* Modell ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von IKK ϵ an der Aktivierung von NF- κ B gefunden und somit die Rolle dieser Kinase an der Schmerzentstehung und -verarbeitung weiter untermauert werden. In den mit IKK ϵ -siRNA transfizierten RAW 264.7 Makrophagen fand keine Phosphorylierung von NF- κ Bp65 am Serinrest 536 nach Stimulation mit LPS statt. Diese Phosphorylierung ist für die Translokation von NF- κ Bp65 in den Zellkern und für die Transkription NF- κ B-abhängiger Proteine allerdings essentiell (Buss et al. 2004; Adli and Baldwin 2006; Mattioli et al. 2006). Interessanterweise wurde die Phosphorylierung auch nicht durch den klassischen IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplex übernommen, der durch die siRNA Transfektion nicht gehemmt wurde. Diese fehlende Phosphorylierung könnte auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuchen an IKK ϵ ^{-/-}-Mäusen der Schlüssel für das verringerte nozizeptive Verhalten nach peripherer proinflammatorischer und -nozizeptiver Stimulation und die Hemmung der Hochregulation der NF- κ B-abhängigen Proteine COX-2, MMP-9 und iNOS sein.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten, Apoptose und Entzündungen sowie bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen. Ein pharmakologischer Eingriff in die NF- κ B-Aktivierungskaskade könnte daher eine Schmerzhemmung bewirken und so Ansätze für die Entwicklung neuer Therapien für pathophysiologische Schmerzen liefern. Die NF- κ B-Signalübertragungskaskade bietet verschiedene Angriffspunkte für Pharmaka, wobei zurzeit I κ B-Kinasen (IKK) als hoffnungsvolle Zielmoleküle im Fokus der Untersuchungen stehen. Verschiedene IKKs regulieren die Aktivität von NF- κ B über die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B oder über die direkte Phosphorylierung von NF- κ B. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der neu entdeckten IKK ϵ bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung sowie deren Eignung als neues Zielmolekül für die Schmerztherapie näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IKK ϵ konstitutiv in Geweben der Maus, welche an der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen beteiligt sind, exprimiert ist. Im Rückenmark konnte die Lokalisation von IKK ϵ in den schmerzrelevanten Laminae I und II des Dorsalhorns nachgewiesen werden und auch in den Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia (DRG's)) war IKK ϵ in kleinen, nozizeptiven Neuronen exprimiert. Nach peripherer entzündlich-nozizeptiver Stimulation mit Formalin oder Zymosan kam es im Lumbalmark und den DRG's zu einem signifikanten Anstieg der IKK ϵ -Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Diese Beobachtungen machten eine Beteiligung von IKK ϵ an der Prozessierung von Schmerz sehr wahrscheinlich. Um die Rolle von IKK ϵ während der Schmerzentstehung und -verarbeitung besser beurteilen zu können wurde das Verhalten von IKK ϵ defizienten Mäusen in akuten und inflammatorischen Schmerzmodellen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockout von IKK ϵ zu einem signifikant verringerten nozizeptiven Verhalten im Formalintest und einer Hemmung der mechanischen Hyperalgesie nach Zymosaninjektion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führte. Gleichzeitig konnte kein Unterschied im akut nozizeptiven Verhalten festgestellt werden. Der Knockout von IKK ϵ hatte demnach keine Auswirkung auf den akuten physiologischen Nozizeptorschmerz, zeigte jedoch eine Verbesserung bei pathophysiologischen Schmerzen. Das verringerte nozizeptive Verhalten der IKK ϵ defizienten Mäuse im Formalintest ging mit einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung im Rückenmark einher. Auch konnte eine verringerte mRNA-Expression der NF- κ B-abhängigen Gene Cyclooxygenase-2 (COX-2), Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9)

und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die an der Regulation von Entzündungsschmerzen beteiligt sind, im Rückenmark und den DRG's nachgewiesen werden. Da IKK ϵ bisher hauptsächlich mit der Aktivierung des TypI Interferon-Signalweges in Zusammenhang gebracht wurde, wurde außerdem geprüft, ob es nach Injektion mit Formalin zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Interferon-regulierender Faktor (IRF)-3 in Wildtyp-Mäusen kommt, was nicht beobachtet werden konnte. Der Knockout von IKK ϵ scheint demnach seine antinozizeptive Wirkung direkt über eine fehlende Aktivierung von NF- κ B zu entfalten, wonach IKK ϵ eine bedeutendere Rolle als bisher angenommen bei der Aktivierung von NF- κ B spielt. Dies konnte durch *in vitro* Daten untermauert werden. Der Knockdown von IKK ϵ in Makrophagen-Zellkultur mit spezifischer siRNA verhinderte die Phosphorylierung von NF- κ Bp65 am Serinrest 536 nach Stimulation mit LPS.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich also schlussfolgern, dass IKK ϵ an der Schmerzentstehung und -verarbeitung bei Entzündungen beteiligt zu sein scheint. Eine Hemmung dieser Kinase könnte demnach ein neues, lohnendes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente für die Schmerztherapie sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ad	auf
AF	Alexa Fluor
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BAFF	<i>B-cell-activating-factor</i>
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	<i>copy</i> DNA
CGRP	<i>Calcitonin-Gene-Related Peptide</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
C _T	Zyklus-Schwellenwert (<i>Cycle threshold</i>)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRG	Hinterwurzelganglien (<i>Dorsal Root Ganglia</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ERK-2	<i>Extracellular-signal-regulated protein kinase 2</i>
FCS	Fötales Kälberserum
Fw	<i>Forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
H ₂ O	<i>Aqua purificata</i>
HCl	Salzsäure

HNPP	2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide Phosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>
IB4	Isolektin B4
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IKK	<i>Inhibitor of κB Kinase</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF	Interferon-regulierenden Faktor
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L4-L6	Lumbalmarksegmente 4-6
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LZ	Leuzin-Zipper
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEF	embryonalen Fibroblasten der Maus (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger-RNA
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBD	NEMO-bindende Domäne
NEMO	NF- κ B <i>essential modulator</i>
NF	Neurofilament
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm

NK1	Neurokinin 1
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxid</i>)
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika (<i>non steroidal anti inflammatory drug</i>)
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDAR	<i>predeveloped assay reagent</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	pH-Wert
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
RHD	Rel-Homologie Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale-RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Rv	<i>reverse</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPSS	Statistical Product and Service Solution
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK	<i>TANK binding kinase</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin

TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF α	Tumornekrosisfaktor α
TNF α -R	Tumornekrosisfaktor α -Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WDR	<i>wide-dynamic-range</i>
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
%	Prozent
$^{\circ}$ C	Grad Celcius

7 Literaturverzeichnis

- Adli, M. and Baldwin, A.S. 2006. IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **281**(37): 26976-26984.
- Aupperle, K.R., Yamanishi, Y., Bennett, B.L., Mercurio, F., Boyle, D.L., and Firestein, G.S. 2001. Expression and regulation of inducible IkappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol* **214**(1): 54-59.
- Baba, H., Kohno, T., Moore, K.A., and Woolf, C.J. 2001. Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci* **21**(5): 1750-1756.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**(4878): 540-546.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**(3): 297-315.
- Ballou, L.R., Botting, R.M., Goorha, S., Zhang, J., and Vane, J.R. 2000. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(18): 10272-10276.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., and Baltimore, D. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**(6536): 167-170.
- Beiche, F., Klein, T., Nusing, R., Neuhuber, W., and Goppelt-Struebe, M. 1998. Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunol* **89**(1-2): 26-34.
- Beiche, F., Scheuerer, S., Brune, K., Geisslinger, G., and Goppelt-Struebe, M. 1996. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* **390**(2): 165-169.
- Bian, K., Ke, Y., Kamisaki, Y., and Murad, F. 2006. Proteomic modification by nitric oxide. *J Pharmacol Sci* **101**(4): 271-279.
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**(6407): 31-39.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W.J., Elia, A.J., Shillinglaw, W., Mak, T.W., Cao, Z., and Yeh, W.C. 2000. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *Embo J* **19**(18): 4976-4985.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.

- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., and Bethea, J.R. 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of experimental medicine* **202**(1): 145-156.
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M.L., Hoffmann, E., Resch, K., and Kracht, M. 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of biological chemistry* **279**(53): 55633-55643.
- Chan, C.F., Sun, W.Z., Lin, J.K., and Lin-Shiau, S.Y. 2000. Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **402**(1-2): 61-68.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**(3): 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**(1): 156-159.
- Civas, A., Genin, P., Morin, P., Lin, R., and Hiscott, J. 2006. Promoter organization of the interferon-A genes differentially affects virus-induced expression and responsiveness to TBK1 and IKKepsilon. *The Journal of biological chemistry* **281**(8): 4856-4866.
- Coderre, T.J. and Melzack, R. 1992. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* **12**(9): 3665-3670.
- Coderre, T.J., Vaccarino, A.L., and Melzack, R. 1990. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain research* **535**(1): 155-158.
- Coderre, T.J., Yashpal, K., and Henry, J.L. 1994. Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test. *Neuroreport* **5**(11): 1337-1340.
- Corr, M., Boyle, D.L., Ronacher, L., Flores, N., and Firestein, G.S. 2009. Synergistic benefit in inflammatory arthritis by targeting I kappaB kinase epsilon and interferon beta. *Annals of the rheumatic diseases* **68**(2): 257-263.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(5): 1755-1760.
- D'Mello, R. and Dickenson, A.H. 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* **101**(1): 8-16.

- Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczak, M., Barclay, J., Natt, F.J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., Wishart, W., and Hall, J. 2004. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic acids research* **32**(5): e49.
- Dubuisson, D. and Dennis, S.G. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4**(2): 161-174.
- Ebersberger, A., Buchmann, M., Ritzeler, O., Michaelis, M., and Schaible, H.G. 2006. The role of spinal nuclear factor-kappa B in spinal hyperexcitability. *Neuroreport* **17**(15): 1615-1618.
- Eddy, N.B. and Leimbach, D. 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **107**(3): 385-393.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Kalden, J.R., Antoni, C., Smolen, J.S., Leeb, B., Breedveld, F.C., Macfarlane, J.D., Bijl, H., and et al. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**(8930): 1105-1110.
- England, S., Bevan, S., and Docherty, R.J. 1996. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol* **495** (Pt 2): 429-440.
- Ferreira, S.H. 1993. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs* **46 Suppl 1**: 1-9.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**(5): 491-496.
- Fournier, R., Weber, A., and Gamulin, Z. 2005. Intrathecal sufentanil is more potent than intravenous for postoperative analgesia after total-hip replacement. *Reg Anesth Pain Med* **30**(3): 249-254.
- Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Peyron, A.C., Rochet, N., Philip, P., Dageville, C., Sirvent, A., Hummelsberger, M., Berard, E., Dreano, M., Sirvent, N., and Peyron, J.F. 2005. Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* **105**(2): 804-811.
- Fu, E.S., Zhang, Y.P., Sagen, J., Yang, Z.Q., and Bethea, J.R. 2007. Transgenic glial nuclear factor-kappa B inhibition decreases formalin pain in mice. *Neuroreport* **18**(7): 713-717.
- Gabriel, S.E., Jaakkimainen, L., and Bombardier, C. 1991. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med* **115**(10): 787-796.
- Geisslinger, G., Ferreira, S.H., Menzel, S., Schlott, D., and Brune, K. 1994. Antinociceptive actions of R(-)-flurbiprofen--a non-cyclooxygenase inhibiting 2-arylpropionic acid--in rats. *Life Sci* **54**(10): PL173-177.

- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., and Banerjee, A. 2006. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* **25**(51): 6781-6799.
- Ghosh, S. and Hayden, M.S. 2008. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**(11): 837-848.
- Ghosh, S. and Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**: S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.
- Guhring, H., Gorig, M., Ates, M., Coste, O., Zeilhofer, H.U., Pahl, A., Rehse, K., and Brune, K. 2000. Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci* **20**(17): 6714-6720.
- Hacker, H. and Karin, M. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**(357): re13.
- Harris, J., Olierie, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., and Grandvaux, N. 2006. Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *J Immunol* **177**(4): 2527-2535.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**(18): 2195-2224.
- Hayden, M.S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**(3): 344-362.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. 2004. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *The Journal of experimental medicine* **199**(12): 1641-1650.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* **284**(5412): 316-320.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B., and Hole, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of neuroscience methods* **14**(1): 69-76.
- Huynh, Q.K., Kishore, N., Mathialagan, S., Donnelly, A.M., and Tripp, C.S. 2002. Kinetic mechanisms of IkappaB-related kinases (IKK) inducible IKK and TBK-1 differ from IKK-1/IKK-2 heterodimer. *The Journal of biological chemistry* **277**(15): 12550-12558.
- Iadarola, J.M. and Caudle, R.M. 1997. Good pain, bad pain. *Science* **278**(5336): 239-240.
- Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., and Sandkuhler, J. 2003. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* **299**(5610): 1237-1240.
- Israel, A. 2000. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* **10**(4): 129-133.

- Kaltschmidt, B., Linker, R.A., Deng, J., and Kaltschmidt, C. 2002. Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC Mol Biol* **3**: 16.
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Wellmann, H., Volk, B., and Kaltschmidt, C. 1999. Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(16): 9409-9414.
- Kaltschmidt, B., Widera, D., and Kaltschmidt, C. 2005. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1745**(3): 287-299.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663.
- Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q.M. 2004. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **3**(1): 17-26.
- Kim, J.M., Oh, Y.K., Lee, J.H., Im, D.Y., Kim, Y.J., Youn, J., Lee, C.H., Son, H., Lee, Y.S., Park, J.Y., and Choi, I.H. 2005. Induction of proinflammatory mediators requires activation of the TRAF, NIK, IKK and NF-kappaB signal transduction pathway in astrocytes infected with Escherichia coli. *Clin Exp Immunol* **140**(3): 450-460.
- Kishore, N., Huynh, Q.K., Mathialagan, S., Hall, T., Rouw, S., Creely, D., Lange, G., Caroll, J., Reitz, B., Donnelly, A., Boddupalli, H., Combs, R.G., Kretzmer, K., and Tripp, C.S. 2002. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *The Journal of biological chemistry* **277**(16): 13840-13847.
- Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Schwamborn, K., Mercurio, F., and Ulevitch, R.J. 2003. IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 26612-26619.
- Kunz, S., Tegeder, I., Coste, O., Marian, C., Pfenninger, A., Corvey, C., Karas, M., Geisslinger, G., and Niederberger, E. 2005. Comparative proteomic analysis of the rat spinal cord in inflammatory and neuropathic pain models. *Neuroscience letters* **381**(3): 289-293.
- Kurreck, J. 2004. Antisense and RNA interference approaches to target validation in pain research. *Current opinion in drug discovery & development* **7**(2): 179-187.
- Langman, M.J., Weil, J., Wainwright, P., Lawson, D.H., Rawlins, M.D., Logan, R.F., Murphy, M., Vessey, M.P., and Colin-Jones, D.G. 1994. Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* **343**(8905): 1075-1078.
- Le Bars, D., Gozariu, M., and Cadden, S.W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews* **53**(4): 597-652.
- Ledeboer, A., Gamanos, M., Lai, W., Martin, D., Maier, S.F., Watkins, L.R., and Quan, N. 2005. Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *The European journal of neuroscience* **22**(8): 1977-1986.

-
- Lee, K.M., Kang, B.S., Lee, H.L., Son, S.J., Hwang, S.H., Kim, D.S., Park, J.S., and Cho, H.J. 2004. Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *The European journal of neuroscience* **19**(12): 3375-3381.
- Leung, T.H., Hoffmann, A., and Baltimore, D. 2004. One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* **118**(4): 453-464.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izipisua-Belmonte, J.C., and Verma, I.M. 1999a. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* **13**(10): 1322-1328.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., and Verma, I.M. 1999b. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* **284**(5412): 321-325.
- Li, Q. and Verma, I.M. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**(10): 725-734.
- Lilienbaum, A. and Israel, A. 2003. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2680-2698.
- Lopshire, J.C. and Nicol, G.D. 1998. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* **18**(16): 6081-6092.
- Luo, Z.D. and Cizkova, D. 2000. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain* **4**(6): 459-466.
- Ma, W. and Bisby, M.A. 1998. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain research* **797**(2): 243-254.
- Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L., and Leza, J.C. 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* **76**(2): 532-538.
- Martin, T.J., Zhang, Y., Buechler, N., Conklin, D.R., and Eisenach, J.C. 2005. Intrathecal morphine and ketorolac analgesia after surgery: comparison of spontaneous and elicited responses in rats. *Pain* **113**(3): 376-385.
- Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M., and Schmitz, M.L. 2006. Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *The Journal of biological chemistry* **281**(10): 6175-6183.
- Mattson, M.P. and Camandola, S. 2001. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* **107**(3): 247-254.
- Mattson, M.P. and Meffert, M.K. 2006. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell death and differentiation* **13**(5): 852-860.

- McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Dambach, D.M., Pattoli, M.A., Lu, P., Zhou, X.D., Qiu, Y., Zusi, F.C., and Burke, J.R. 2003. A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* **48**(9): 2652-2659.
- McMahon, S. and Koltzenburg, M. 2006. *Textbook of pain*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- McWhirter, S.M., Fitzgerald, K.A., Rosains, J., Rowe, D.C., Golenbock, D.T., and Maniatis, T. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(1): 233-238.
- Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., and Baltimore, D. 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* **6**(10): 1072-1078.
- Meller, S.T. and Gebhart, G.F. 1997. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *European journal of pain (London, England)* **1**(1): 43-52.
- Messlinger, K. 1997. Was ist ein Nozizeptor? *Anaesthesist* **46**(2): 142-153.
- Messlinger, K. 2002. Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentscheidung. *Manuelle Medizin* **40**(1): 13-21.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P., and Schäfer-Korting, M. 2008. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Niederberger, E. and Geisslinger, G. 2008. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *Faseb J* **22**(10): 3432-3442.
- Niederberger, E., Manderscheid, C., and Geisslinger, G. 2006. Different COX-independent effects of the COX-2 inhibitors etoricoxib and lumiracoxib. *Biochem Biophys Res Commun* **342**(3): 940-948.
- Niederberger, E., Schmidtko, A., Gao, W., Kuhlein, H., Ehnert, C., and Geisslinger, G. 2007. Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol* **559**(1): 55-60.
- Niederberger, E., Tegeder, I., Schafer, C., Seegel, M., Grosch, S., and Geisslinger, G. 2003. Opposite effects of rofecoxib on nuclear factor-kappaB and activating protein-1 activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **304**(3): 1153-1160.
- Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C., Brautigam, L., Grosch, S., and Geisslinger, G. 2001. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *Faseb J* **15**(9): 1622-1624.
- O'Neill, L.A. and Kaltschmidt, C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **20**(6): 252-258.

- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**(49): 6853-6866.
- Park, Y.H., Shin, C.Y., Lee, T.S., Huh, I.H., and Sohn, U.D. 2000. The role of nitric oxide and prostaglandin E2 on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. *J Pharm Pharmacol* **52**(4): 431-436.
- Perkins, N.D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 49-62.
- Peters, R.T., Liao, S.M., and Maniatis, T. 2000. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* **5**(3): 513-522.
- Peters, R.T. and Maniatis, T. 2001. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* **1471**(2): M57-62.
- Pierce, J.W., Read, M.A., Ding, H., Luscinskas, F.W., and Collins, T. 1996. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* **156**(10): 3961-3969.
- Podolin, P.L., Callahan, J.F., Bolognese, B.J., Li, Y.H., Carlson, K., Davis, T.G., Mellor, G.W., Evans, C., and Roshak, A.K. 2005. Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of IkappaB Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **312**(1): 373-381.
- Pollock, G., Pennypacker, K.R., Memet, S., Israel, A., and Saporta, S. 2005. Activation of NF-kappaB in the mouse spinal cord following sciatic nerve transection. *Exp Brain Res* **165**(4): 470-477.
- Pomerantz, J.L. and Baltimore, D. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* **18**(23): 6694-6704.
- Ralph, P. and Nakoinz, I. 1977. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J Immunol* **119**(3): 950-954.
- Ren, K. and Dubner, R. 2008. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Current opinion in anaesthesiology* **21**(5): 570-579.
- Reuter, U., Chiarugi, A., Bolay, H., and Moskowitz, M.A. 2002. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol* **51**(4): 507-516.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J., and Mak, T.W. 2000. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* **14**(7): 854-862.

- Salinovich, O. and Montelaro, R.C. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **156**(2): 341-347.
- Sarchielli, P., Floridi, A., Mancini, M.L., Rossi, C., Coppola, F., Baldi, A., Pini, L.A., and Calabresi, P. 2006. NF-kappaB activity and iNOS expression in monocytes from internal jugular blood of migraine without aura patients during attacks. *Cephalalgia* **26**(9): 1071-1079.
- Schaible, H.G., Ebersberger, A., and Von Banchet, G.S. 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann NY Acad Sci* **966**: 343-354.
- Schaible, H.G. and Richter, F. 2004. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg* **389**(4): 237-243.
- Schmidtke, A., Tegeder, I., and Geisslinger, G. 2009. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci* **32**(6): 339-346.
- Scholz, J. and Woolf, C.J. 2002. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* **5 Suppl**: 1062-1067.
- Sen, R. and Baltimore, D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**(6): 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., and Karin, M. 2001a. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**(5534): 1495-1499.
- Senftleben, U., Li, Z.W., Baud, V., and Karin, M. 2001b. IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* **14**(3): 217-230.
- Shafer, D.M., Assael, L., White, L.B., and Rossomando, E.F. 1994. Tumor necrosis factor-alpha as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg* **52**(8): 786-791; discussion 791-782.
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R., and Hiscott, J. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**(5622): 1148-1151.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., and Akira, S. 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**(8): 1357-1362.
- Singh, G. 1998. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med* **105**(1B): 31S-38S.
- Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H., and Stark, G.R. 2002. Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* **277**(6): 3863-3869.

- St-Pierre, Y., Couillard, J., and Van Themsche, C. 2004. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* **8**(5): 473-489.
- Svensson, C.I. and Yaksh, T.L. 2002. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 553-583.
- Sweeney, S.E., Hammaker, D., Boyle, D.L., and Firestein, G.S. 2005. Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* **174**(10): 6424-6430.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., and Akira, S. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* **284**(5412): 313-316.
- Takeuchi, O., Hemmi, H., and Akira, S. 2004. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *Journal of endotoxin research* **10**(4): 252-256.
- Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L., and Goeddel, D.V. 1999. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* **10**(4): 421-429.
- Tao, F., Tao, Y.X., Mao, P., Zhao, C., Li, D., Liaw, W.J., Raja, S.N., and Johns, R.A. 2003. Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience* **120**(3): 847-854.
- Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Guhring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., Grosch, S., and Geisslinger, G. 2001. Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *Faseb J* **15**(1): 2-4.
- Tegeder, I., Niederberger, E., Schmidt, R., Kunz, S., Guhring, H., Ritzeler, O., Michaelis, M., and Geisslinger, G. 2004. Specific Inhibition of IkappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J Neurosci* **24**(7): 1637-1645.
- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., and Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**(1): 5-17.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., and Nakanishi, M. 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**(6779): 778-782.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(9): 4350-4354.
- Vanegas, H. and Schaible, H.G. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cycloxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol* **64**(4): 327-363.
- Vasquez, E., Bar, K.J., Ebersberger, A., Klein, B., Vanegas, H., and Schaible, H.G. 2001. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci* **21**(22): 9001-9008.

-
- Weng, M.W., Hsiao, Y.M., Chen, C.J., Wang, J.P., Chen, W.C., and Ko, J.L. 2004. Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF-kappaB in rat astrocytes. *Toxicol Lett* **151**(2): 345-355.
- Wietek, C., Cleaver, C.S., Ludbrook, V., Wilde, J., White, J., Bell, D.J., Lee, M., Dickson, M., Ray, K.P., and O'Neill, L.A. 2006. IkappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *The Journal of biological chemistry* **281**(46): 34973-34981.
- Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., and Singh, G. 1999. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* **340**(24): 1888-1899.
- Woolf, C.J. 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* **306**(5944): 686-688.
- Woolf, C.J. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* **140**(6): 441-451.
- Woolf, C.J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., and Poole, S. 1997. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *British journal of pharmacology* **121**(3): 417-424.
- Woolf, C.J. and Costigan, M. 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(14): 7723-7730.
- Woolf, C.J. and Mannion, R.J. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **353**(9168): 1959-1964.
- Yaksh, T.L., Hua, X.Y., Kalcheva, I., Nozaki-Taguchi, N., and Marsala, M. 1999. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(14): 7680-7686.
- Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* **29**(2): 72-79.
- Yin, M.J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**(6706): 77-80.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Gerd Geißlinger für die Unterstützung meiner Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Dieter Steinhilber bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Ellen Niederberger für die uneingeschränkte Unterstützung und engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für deine Hilfe, dein unermüdliches Dranbleiben und vor allem für deinen Zeitplan. Ich freue mich schon, mit Dir weiter zusammen arbeiten zu dürfen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, den ständigen Austausch neuer Ideen, die produktive Arbeitsatmosphäre und vor allem für die große Hilfsbereitschaft. Danke für alles, was wir während und außerhalb der Arbeit zusammen erlebt haben. Hervorheben möchte ich Frau Katharina Kynast, die mir bei meiner Arbeit eine unersetzliche Hilfe war.

Ein großes Dankeschön auch meiner ganzen Familie und Schwiegerfamilie, die mich in den vergangenen Jahren stets unterstützt hat. Vielen Dank vor allem in jüngster Zeit für Euren Einsatz bei der Betreuung von Leonhard.

Aus tiefsten Herzen möchte ich mich bei meinem geliebten Mann Michael für die Geduld, Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich bedanken. Danke für Deine uneingeschränkte Liebe. Das Schlusswort gilt unserem Sohn Leonhard, der unser Leben auf unermessliche Weise bereichert und mir gezeigt hat, dass nicht alles perfekt sein muss, um gut zu sein.

8.2 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen

Christine Möser, Katharina Kynast, Katharina Baatz, Otto Quintus Russe, Achim Schmidtko, Irmgard Tegeder, Gerd Geisslinger, Ellen Niederberger. (2010) I- κ B Kinase epsilon is involved in inflammatory hyperalgesia by modulation of NF- κ B. (submitted)

Hilmar Kühlein, Irmgard Tegeder, Christine Möser, Annett Häussler, Ingo Jennes, Rolf Marschalek, Tobias Beckhaus, Michael Karas, Corina Ehnert, Gerd Geisslinger, Ellen Niederberger. (2009) Proteomic identification of novel participants in the molecular mechanisms of neuropathic pain (submitted)

Zulauf L, Coste O, Marian C, Möser C, Brenneis C, Niederberger E. (2009) Cofilin phosphorylation is involved in nitric oxide/cGMP-mediated nociception. Biochem Biophys Res Commun. Dec 25; 390 (4):1408-13

Tagungsbeiträge

C. Möser, I. Tegeder, L. Popp, G. Geisslinger and E. Niederberger. (2008) I-kappaB kinases as novel targets for the pharmacotherapy of pain
(Keystone Symposium: NF-kappaB, Banff/Kanada, Februar 12.-17. 2008)

C. Möser, I. Tegeder, L. Popp, G. Geisslinger and E. Niederberger. (2008) I-kappaB kinases as novel targets for the pharmacotherapy of pain
(49. Frühjahrstagung der DGPT, März 11.-13. 2008)

C. Möser, K. Kynast, S. Kupis, A. Häussler, I. Tegeder, G. Geisslinger and E. Niederberger. (2009) I-kappaB kinases as novel targets for the pharmacotherapy of pain and inflammation.
(50. Frühjahrstagung der DGPT, März 10.-12. 2009)

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Christine Verena Möser geb. Meyer

verheiratet, ein Kind

geboren am 06.04.1979 in Offenbach am Main

Rügener Weg 1

63110 Rodgau

Schulbildung

1985-1989	Friedrich-Fröbel-Schule, Obertshausen
1898-1995	Hermann-Hesse-Schule, Obertshausen
1995-1998	Claus-von-Stauffenberg-Schule, Dudenhofen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,4

Hochschulbildung

1998 – 2005	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt Abschluss: Diplom-Biologin; Gesamturteil: sehr gut
2001	Auslandssemester an der University of Port Elizabeth, Südafrika
2003	Praktikum an der University of Pennsylvania in Philadelphia, USA
2005 - 2010	Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie (<i>pharmazentrum frankfurt/ZAFES</i>) der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Geißlinger und PD Dr. Niederberger im Rahmen des GRK 1172 (<i>Biologicals</i>)

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Frankfurt am Main, den 19.05.2010



Christine Möser