

**Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat Signalling  
für die Verarbeitung nozizeptiver Information  
im Rückenmark**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Bona Linke**

aus Wiesbaden

Frankfurt am Main (2010)

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Holger Stark

Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger

Datum der Disputation: 15.12.2010

*Jede letzte Tatsache ist nur die erste einer neuen Reihe.*  
Ralph Waldo Emerson

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Nozizeption .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Schmerzarten .....	1
1.1.2	Mechanismen der Schmerzsensibilisierung.....	2
1.1.2.1	Periphere Sensibilisierung am Nozizeptor .....	2
1.1.2.2	Zentrale Sensibilisierung .....	3
<b>1.2</b>	<b>Sphingosin-1-Phosphat .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	Die Synthese von Sphingosin-1-Phosphat.....	6
1.2.1.1	Sphingosin-Kinasen.....	8
1.2.2	Signaltransduktionsmechanismen von S1P .....	10
1.2.3	S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.....	12
1.2.4	Regulation neuronaler Funktionen durch S1P .....	15
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellkulturmedien und Zusätze .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Tiermodelle .....</b>	<b>22</b>
2.7.1	Versuchstiere.....	22
2.7.2	Hot-Plate Test.....	22
2.7.3	Zymosan-induzierte thermale Hyperalgesie .....	22
2.7.4	Implantation lumbarer intrathekalen Katheter.....	23
2.7.5	Periphere nozizeptive Stimulation mit Zymosan .....	23
<b>2.8</b>	<b>Genotypisierung.....</b>	<b>23</b>
2.8.1	Isolierung genomischer DNA.....	23
2.8.2	PCR .....	23
2.8.3	Gelelektrophorese mit Agarosegelen .....	24
<b>2.9</b>	<b>Real-Time-PCR.....</b>	<b>25</b>
<b>2.10</b>	<b>Bestimmung der Leukozyten-Anzahl im Blut .....</b>	<b>26</b>
<b>2.11</b>	<b>Immunochemische Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.11.1	Gewebepräparation und Herstellung von Gefrierschnitten.....	27
2.11.2	Immunohistochemie.....	27
2.11.3	Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK) .....	27
<b>2.12</b>	<b>In situ Hybridisierung .....</b>	<b>28</b>
2.12.1	Isolierung von RNA aus Gewebe .....	28

2.12.2	Erststrang cDNA-Synthese.....	29
2.12.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	29
2.12.4	Ligation .....	31
2.12.5	Transformation mittels Hitzeschock .....	31
2.12.6	Herstellung von Dauerkulturen.....	31
2.12.7	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	31
2.12.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	31
2.12.9	Phenol-Aufreinigung .....	32
2.12.10	Herstellung Digoxigenin-markierter ISH-Sonden mittels in vitro Transkription.....	32
2.12.11	Dot Blot-Verfahren.....	32
2.12.12	In situ Hybridisierung (ISH).....	33
<b>2.13</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.13.1	Herstellung von akuten Rückenmarksschnitten.....	34
2.13.2	Gewinnung primärer Neurone aus Dorsalwurzelganglien adulter Mäuse .....	34
2.13.3	Isolierung primär embryonaler Rückenmarkskulturen (Glia und Neurone).....	35
2.13.4	Herstellung von Neuronenkulturen aus embryonalem Rückenmark.....	35
2.13.5	Herstellung von Astrozytenkulturen aus embryonalem Rückenmark .....	36
2.13.6	Kultivierung von HeLa-Zellen .....	36
2.13.7	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) .....	37
2.13.8	Vollbluttest.....	38
<b>2.14</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.14.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford .....	38
2.14.2	Extraktion von Gesamtproteinen aus Zellen.....	38
2.14.3	Isolierung von Membranproteinen aus Gewebe .....	38
2.14.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.14.5	Western Blot.....	39
2.14.6	ELISA zur Bestimmung von PGE <sub>2</sub> und cAMP .....	40
2.14.7	Flüssigchromatographie/Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) zur Bestimmung von Prostanoiden und Sphingolipiden .....	40
2.14.8	Glutamatbestimmung.....	41
2.14.9	Fluorimetrischer S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstest .....	41
2.14.10	GTPγS <sup>35</sup> Bindungsstudien.....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur antinozizeptiven Rolle von S1P in der spinalen Schmerzverarbeitung.....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Expression der S1P-Rezeptoren S1P <sub>1-5</sub> im zentralen Nervensystem .....	43
3.1.2	Untersuchung der S1P regulierten neuronalen cAMP Synthese mittels FRET basiertem cAMP Imaging .....	44
3.1.3	Charakterisierung der S1P-sensitiven Rückenmarksneurone .....	46
3.1.4	dihydro-S1P verhindert die Formalin-induzierte und cAMP-abhängige Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren im Rückenmark .....	49
<b>3.2</b>	<b>Regulation der S1P-Konzentration im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation.....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Regulation der S1P-Synthese in akuten Rückenmarksschnitten und kultivierten Rückenmarkszellen.....	51
3.2.2	Beteiligung S1P-katabolisierender Enzyme an der Reduktion der S1P- Konzentration nach nozizeptiver Stimulation .....	53
3.2.3	Beteiligung der Sphingosin-Kinasen 1 und -2 an der Regulation des S1P-Gehalts in akuten Rückenmarksschnitten .....	54
3.2.3.1	Sphingosin-Kinase-1 und -2-defiziente Mäuse.....	54
3.2.3.2	Expression der SPHK-1 und -2 im zentralen Nervensystem .....	55
3.2.3.3	Sphingolipidkonzentrationen im Rückenmark von Sphingosin-Kinase-1 und -2 defizienten Mäusen .....	56
3.2.3.4	Sphingolipidkonzentrationen in stimulierten akuten Rückenmarksschnitten .....	58
3.2.3.5	Beteiligung der SPHKs an der negativen Rückkopplung.....	60
3.2.4	Regulation des spinalen S1P-Gehalts durch Sphingosin-Kinasen <i>in vivo</i> .....	63

3.2.4.1	Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.....	63
3.2.4.2	Auswirkung des SPHK-1-Inhibitors SK1-III auf die Sphingolipidsynthese im Dorsalhorn nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.....	65
3.2.4.3	Auswirkung des SPHK-1-Inhibitors SK1-II auf die Zymosan induzierte thermale Hyperalgesie .....	66
3.2.4.4	Wirkung von FTY720-P auf die Sphingolipidkonzentrationen im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation .....	67
3.2.4.5	Besonderheiten in der nozizeptiven Verarbeitung SPHK-1 und -2-defizienter Mäuse.....	68
3.2.4.6	Negative Rückkopplung in nicht-neuronalen Zelllinien .....	71
<b>3.3</b>	<b>Nicht-Rezeptorvermittelte Effekte von FTY720 und dessen Analoga .....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Wirkung von FTY720 auf Eicosanoidplasmakonzentrationen .....	72
3.3.2	Charakterisierung der Wirkung von FTY720-Analoga auf die Eicosanoidsynthese.....	74
3.3.3	Rezeptoraktivierung potentieller S1P-Rezeptor-Agonisten.....	76
3.3.4	S1P-Rezeptoraktivierung potentieller Agonisten.....	77
3.3.5	Rezeptoraktivierung durch potentielle S1P-Rezeptor-Antagonisten.....	78
3.3.6	Wirkung der FTY720-Analoga auf die cAMP-Synthese primärer embryonaler Rückenmarkszellen	80
3.3.7	Effekte der FTY720-Analoga auf die Eicosanoidsynthese <i>in vitro</i> .....	82
3.3.7.1	Einfluss von FTY720 auf die Prostaglandin E <sub>2</sub> Synthese .....	82
3.3.7.2	Wirkung der FTY720-Analoga auf die Prostaglandin E <sub>2</sub> Synthese im Vollbluttest .....	83
3.3.8	Effekte der FTY720-Analoga <i>in vivo</i> .....	85
3.3.8.1	Effekte der FTY720-Analoga auf die Lymphozytenzahl.....	85
3.3.8.2	Einfluss der FTY720-Analoga auf die Prostaglandin E <sub>2</sub> -Plasmakonzentrationen .....	86
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Die antinozizeptive Rolle von S1P bei der spinalen Schmerzverarbeitung.....</b>	<b>89</b>
4.1.1	Spinale Expression der S1P-Rezeptoren und Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktionswege der S1P-vermittelten antinozizeptiven Wirkung.....	89
4.1.2	Beteiligung verschiedener Enzymsysteme an der Regulation der spinalen S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation .....	92
4.1.3	Regulation der spinalen S1P-Konzentrationen durch Sphingosin- Kinasen.....	93
4.1.4	Negative Rückkopplung durch S1P im Rückenmark.....	95
4.1.5	Charakterisierung der an der Hemmung der Sphingosin-Kinasen beteiligten S1P-Rezeptoren.....	97
4.1.6	Regulation der spinalen S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulierung .....	99
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>125</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>126</b>
10.1	Veröffentlichungen .....	126
10.2	Poster-Präsentationen.....	127
10.3	Danksagung .....	128

---

<b>10.4</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>129</b>
-------------	------------------------	------------

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Nozizeption

Der Begriff Nozizeption bezieht sich auf den Erhalt und die Verarbeitung von Signalen im zentralen Nervensystem (ZNS), die von freien sensorischen Nervenendigungen primärer afferenter C- und A $\delta$ - Nervenfasern (Nozizeptoren) hervorgerufen werden und Informationen über Gewebeschäden vermitteln. Kommt es in der Peripherie zu einer noxischen Reizung, die chemischer, thermischer oder mechanischer Natur sein kann, so wird eine Signalkaskade ausgelöst, beginnend mit der Aktivierung eines Nozizeptors (Rezeptorpotential). Überschreitet dieses einen bestimmten Schwellenwert, entsteht ein Aktionspotential, das zu den zentralen Enden der primär afferenten Nervenfasern geleitet wird. Die primär afferenten Fasern sind im Rückenmark mit spezifischen Projektionsneuronen über Synapsen in den äußeren dorsalen Schichten des Rückenmarks (Lamina I und II) verschaltet, die den Reiz dann weiterleiten. Von dort aus gelangen die Signale entlang des Rückenmarks über verschiedene aufsteigende Trakte (spinothalamischer Trakt, spinoreticularer Trakt, spinomesencephalischer Trakt) zu höheren Zentren im Gehirn. Hier sind der Thalamus, der primäre und der sekundäre somatosensorische Cortex, sowie das limbische System an der zentralen Schmerzverarbeitung beteiligt. In bestimmten Bereichen des somatosensorischen Cortex führt die Integration von sensorisch-diskriminativen und emotional-cognitiven Signalen schließlich zu einer bewussten Schmerzwahrnehmung.

### 1.1.1 Schmerzarten

Schmerz ist nach der Definition der IASP (International Association for the Study of Pain) "ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird".

Neben dem akuten physiologischen Nozizeptorschmerz, der entsteht, wenn noxische Reize auf gesundes Gewebe treffen, existieren zwei weitere Schmerztypen, die mit einer Reizung verletzten Gewebes einhergehen. Der pathophysiologische Nozizeptorschmerz entsteht bei Schädigung und Entzündung nicht neuronalen Gewebes, während der

neuropathische Schmerz durch eine Verletzung oder Dysfunktion im peripheren oder zentralen Nervensystem initiiert oder hervorgerufen wird [1]. Die Neuropathie manifestiert sich durch sensorische Symptome und Zeichen [2]. Zu den Ursachen zählen u.a. Infektionen, Traumata, Operationen, Tumorinfiltrationen, sowie metabolische Abnormalitäten. Typisch für diese anhaltenden Schmerzzustände sind Antworten auf einen normalerweise nicht noxischen Stimulus (Allodynie) und das gesteigerte Schmerzempfinden auf noxische Reize (Hyperalgesie). Die zugrunde liegenden Phänomene werden als periphere und zentrale Sensibilisierung definiert.

## **1.1.2 Mechanismen der Schmerzsensibilisierung**

### **1.1.2.1 Periphere Sensibilisierung am Nozizeptor**

Gewebsverletzungen können zu einer erhöhten Erregbarkeit der primär afferenten Nervenendigungen führen, einem Zustand, den man als periphere Sensibilisierung bezeichnet.

Periphere Ausläufer (Nozizeptoren) myelinisierter A $\delta$ - oder unmyelinisierter C-Fasern besitzen eine Vielzahl von Ionenkanälen und Rezeptoren, mit deren Hilfe sie auf chemische, thermische oder mechanische Reizung reagieren können. Bei Aktivierung solcher Rezeptoren kommt es zu einem verstärkten Calcium- oder Natriumeinstrom und somit zur Generierung eines Aktionspotentials am Nozizeptor. Ein Beispiel für solche Rezeptoren ist die Familie der Transient Receptor Potential-(TRP) Ionenkanäle, welche selektiv in peripheren Neuronensubtypen exprimiert werden [3]. Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie werden durch verschiedene noxische Reize aktiviert. Beispielsweise reagieren TRPA1-Kanäle auf mechanische Reizung und Inhaltsstoffe des Senfs. TRPV1-Kanäle reagieren auf Hitze, Capsaicin (Inhaltsstoff von Chili) und Protonen, wohingegen TRPM8-Kanäle sensitiv auf Kältereize und Menthol ansprechen. Eine Sensibilisierung dieser Rezeptoren erfolgt meist durch Phosphorylierung. Die Phosphorylierung des Vanilloid-Rezeptor-1 (TRPV1)-Rezeptors beispielsweise wird durch während der Entzündung freigesetzte Prostaglandine (z.B. PGE<sub>2</sub>) oder Sphingolipide (z.B. Sphingosin-1-Phosphat) und deren nachgeschaltete Signalwege vermittelt [4].

Eine Entzündung wird durch die Einwanderung von Immunzellen, wie T- und B-Zellen, Granulozyten und mononuklearen Phagozyten, aus dem Blut in das Zielgewebe



charakterisiert [5]. Neutrophile spielen eine wichtige Rolle in der frühen entzündlichen Antwort und sind die ersten Zellen, die zur Entzündungsstelle rekrutiert werden. Wenn aktiviert, besitzen sie phagozytische Fähigkeiten, generieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und setzen Schmerzmediatoren (z.B. Nerve Growth Factor (NGF), Bradykinin, Histamin, Leukotriene) und proinflammatorische Cytokine (z.B.  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF-}\alpha$ ) frei [6].  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  induzieren in Makrophagen u.a. die Expression der therapeutisch wichtigen Cyclooxygenase-2 (COX-2) [7]. Diese katalysiert die Umwandlung von durch Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) freigesetzten Arachidonsäure in  $\text{PGH}_2$ , welches dann über PGE-Synthasen zu  $\text{PGE}_2$  metabolisiert wird.  $\text{PGE}_2$  aktiviert die am Nozizeptor exprimierten G-Protein-gekoppelten EP-Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung der Adenylatzyklase, dem Enzym, welches die intrazelluläre cAMP-Konzentration reguliert (Abbildung 1.1). Die vermehrte Bildung von cAMP führt zu einer verstärkten Stimulierung der Proteinkinase A (PKA) und somit u.a. zur Phosphorylierung von (TRPV-1) Kanälen. Deren Aktivierungsschwelle wird durch die Phosphorylierung herabgesetzt, was einen erleichterten Einstrom von Calcium und Natrium bedingt und die Erregbarkeit des Nozizeptors erhöht [8]. Diese gesenkte Erregungsschwelle steigert die Feuerungsrate und induziert die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren, Substanz P, Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) und Stickoxid.

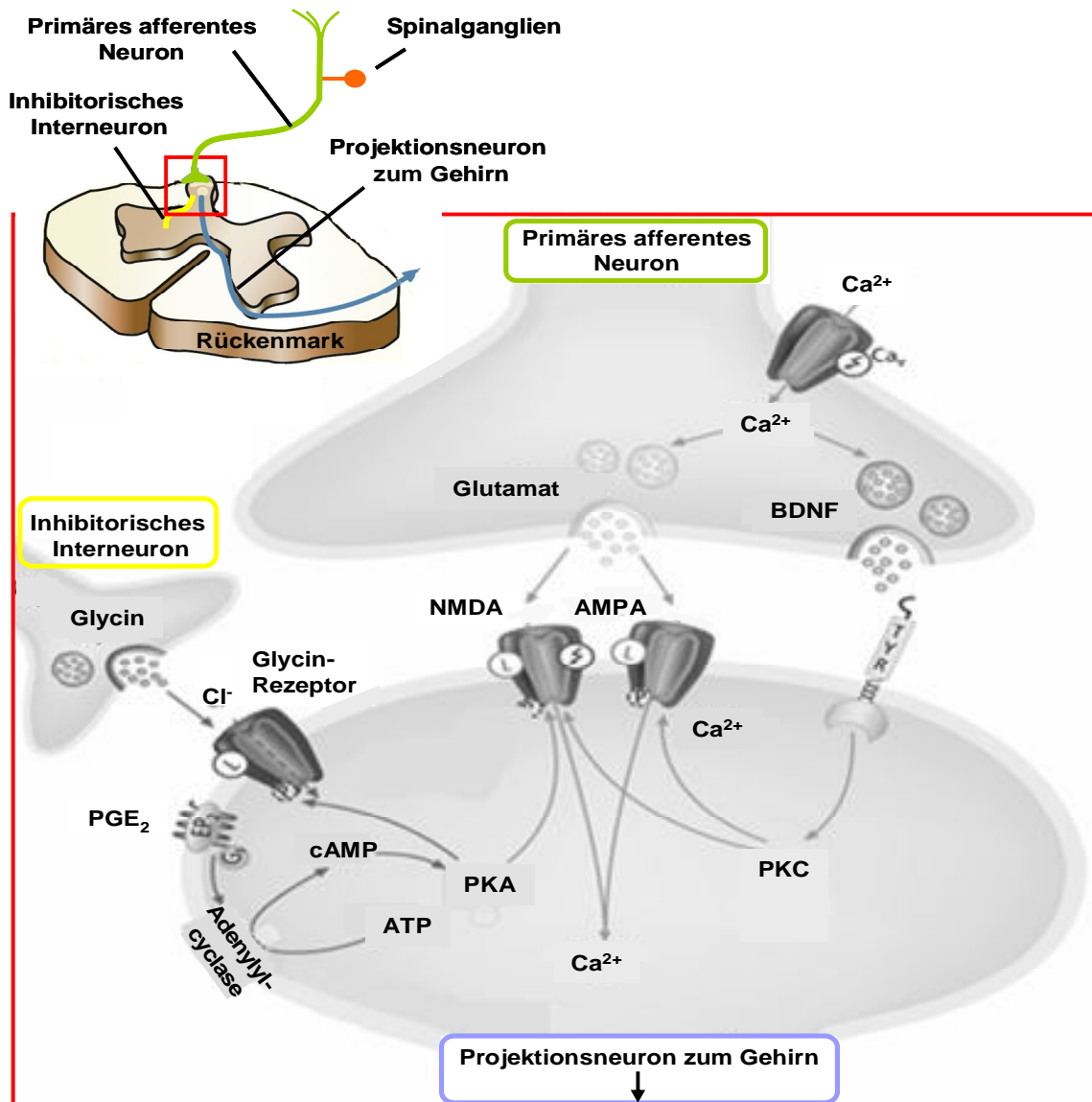
### **1.1.2.2 Zentrale Sensibilisierung**

Wiederholte Reizung von zentralen Neuronen durch periphere sensorische Neurone führt zu funktionellen Änderungen in Rückenmarksneuronen, die eine erhöhte Erregbarkeit bedingen (zentrale Sensibilisierung).

Man unterscheidet im Rückenmark zehn Regionen (Laminae), von denen die ersten sechs das Hinterhorn bilden, in das die peripheren  $\text{A}\delta$ - und C-Nervenfasern projizieren. In Laminae I und II werden die primär afferenten Nervenfasern mit den zentralen Neuronen verschaltet. Die peripheren Neurone setzen Glutamat und andere exzitatorische Aminosäuren, Neuropeptide wie Substanz P und Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Adenosintriphosphat (ATP), das Gas Stickstoffmonoxid (NO) und Neurotrophine (Wachstumsfaktoren) frei, was zu einer Aktivierung der Projektionsneurone führt [9].

Nach wiederholter Stimulation setzen die nozizeptiven primären Afferenzen vermehrt Glutamat zusammen mit Neuropeptiden und Neurotrophinen frei und aktivieren unter anderem ionotrophe und metabotrophe Glutamat-Rezeptoren (Abbildung 1.1). Das Zusammenspiel der Rezeptormechanismen von Glutamat, Neuropeptiden und Neurotrophinen, wie dem Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), bedingt einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in postsynaptische Rückenmarksneurone und die Entwicklung einer Langzeitpotenzierung (LZP). Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isioxazole-Propionat-Rezeptoren [10] und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren sind an der Induktion spinaler LZPs entscheidend beteiligt [11]. Beide Rezeptortypen sind in einer hohen Dichte im Dorsalhorn des Rückenmarks zu finden. NMDA-Rezeptoren werden im Ruhezustand durch Magnesiumionen blockiert, wobei bei starker Depolarisation der Membran der spannungsabhängige Magnesiumblock aufgehoben wird. Glutamat kann anschließend einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursachen [12]. Die Entstehung von LZPs wird darüber hinaus durch die PKA vermittelte Phosphorylierung metabotropher Glutamat-Rezeptoren (mGluRs) unterstützt, was deren Kopplung an GTP-Bindeproteine inhibiert und zu einer langanhaltenden verstärkten Transmission an glutamatergen Synapsen führt [13].

Die Projektionsneurone können neben der Aktivierung (Depolarisation) durch Schmerzfasern auch durch Signale inhibitorischer Neurone hyperpolarisiert werden. Schnelle inhibitorische Neurotransmission im Säugetier ZNS wird durch zwei Aminosäuren Glycin und Gamma-Aminobuttersäure vermittelt [14, 15]. Im Rückenmark werden GABAerge Interneurone in der grauen Substanz verstärkt in Laminae I-III gefunden. Ein Neuron wird als GABAerg bezeichnet, wenn es ein oder beide Glutamat Decarboxylase (GAD)-Synthaseenzyme (GAD65, GAD67) beinhaltet. Weitere inhibitorische Neurotransmitter sind Serotonin und Noradrenalin. Auch Effekte an solchen inhibitorischen Neuronen können die neuronale Erregbarkeit und die Schmerzverarbeitung erhöhen. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von Glycin-Rezeptoren der inhibitorischen Interneuronen, zum Verlust ihrer erregungshemmenden Wirkung (Abbildung 1.1) [16].



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der nozizeptiven Übertragung im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Stimulierung primär afferenter Neurone (grün) führt zur Sekretion von Glutamat in den synaptischen Spalt. Dieses aktiviert die in den Membranen von Projektionsneuronen sitzenden N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionat-Rezeptoren. Das Zusammenspiel der Rezeptormechanismen von Glutamat und Neurotrophinen, wie dem Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), bedingt einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in postsynaptischen Rückenmarksneuronen und die Entwicklung von Aktionspotentialen. Der Schmerzmediator  $\text{PGE}_2$  aktiviert EP-Rezeptoren, die u.a. zur Aktivierung der Adenylatzyklase, dem Enzym welches die Bildung von cAMP katalysiert, führen. cAMP stimuliert die Proteinkinase A (PKA) und vermittelt dadurch Phosphorylierungen der NMDA-Rezeptoren (Aktivierung) und Glycin-Rezeptoren der inhibitorischen Interneurone (gelb), welche dadurch ihre erregungshemmende Wirkung einbüßen. Modifizierte Abbildung nach Mutschler et al. [17].

## 1.2 Sphingosin-1-Phosphat

### 1.2.1 Die Synthese von Sphingosin-1-Phosphat

Sphingolipide wurden erstmals 1884 isoliert und auf Grund ihrer rätselhaften Eigenschaften nach der Sphinx benannt [18]. Sie sind in allen eukaryotischen Zellen hoch konserviert und weisen in der Plasmamembran eine irreguläre Verteilung auf. Neben der Funktion, die Plasmamembran mechanisch zu stabilisieren, agieren einige Sphingolipide als bioaktive Lipidmoleküle, darunter auch Sphingosin-1-Phosphat [19]. S1P besteht aus drei Komponenten, einer polaren Kopfgruppe, einem langkettigen basischen C18-Sphingosin-Rückgrad und einer Fettsäure, die über eine Amidbindung an die Base gekoppelt ist (Abbildung 1.2). S1P kann von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli, wie Wachstumsfaktoren (z.B. NGF, VEGF) oder TNF- $\alpha$ , gebildet werden und spielt in nahezu allen Organen und Systemen eine Rolle. S1P, bzw. dessen Vorläufer Ceramid, kann *de novo* synthetisiert oder mittels Sphingomyelinasen aus Sphingomyelin, dem Grundbaustein der Plasmamembran, freigesetzt werden [20]. Die *de novo* Synthese von Ceramid beginnt mit der Palmitoyl-CoA-Serin-Transferase-vermittelten Kondensation von Palmitoyl-CoA und Serin zu 3-Keto-2S-Sphinganin, welches mittels 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Sphinganin umgesetzt wird [21]. Dieses kann entweder über Sphingosin-Kinasen (SPHKs) zu Sphinganin-1-Phosphat (dihydro-S1P) phosphoryliert werden, oder über Acylierung und anschließender Bildung einer Doppelbindung durch die Sphinganin-Desaturase zu Ceramid umgewandelt werden. Die enzymatische Neubildung von Ceramid wird u.a. durch Stressfaktoren, wie Hitze, UV-Strahlung oder Cytokine, stimuliert. Das entstandene Ceramid kann anschließend durch Ceramidasen zu Sphingosin metabolisiert werden. Dieser Vorgang kann durch die Aktivität von Ceramid Synthasen in umgekehrter Richtung verlaufen. Der letzte Schritt zur Bildung von S1P, die Phosphorylierung von Sphingosin, wird durch die SPHKs, vermittelt (Kapitel 1.2.1.1).

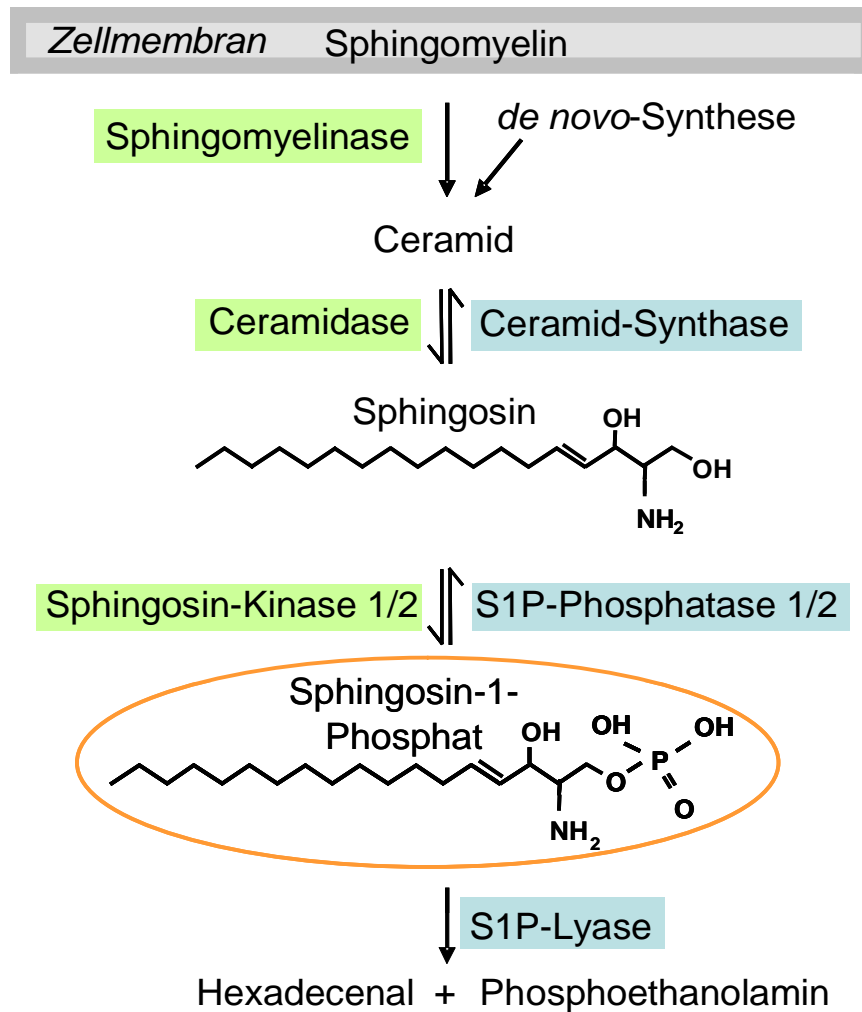
Die intrazelluläre S1P-Konzentration wird durch ein Gleichgewicht zwischen S1P-synthetisierenden und S1P-abbauenden Enzymen reguliert, wobei in den meisten Zellen die Aktivität abbauender Enzyme höher ist und damit die S1P-Konzentration auf niedrigem Niveau gehalten wird [19]. Am Abbau von S1P sind Mitglieder mehrerer Enzymklassen beteiligt (Abbildung 1.2). Zum einen dephosphorylieren S1P-Phosphatasen (SPP1/-2) S1P, was die Rückbildung von Sphingosin zur Folge hat [22]. Zum anderen

---

kann S1P durch S1P-Lyasen (SPL) an der C2-C3-Bindung geschnitten und irreversibel zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin, beides Glycerophospholipid-Vorläufer, abgebaut werden [23]. Bei diesen Abbauenzymen handelt es sich um im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte integrale Membranproteine, deren Expression u.a. im Gehirn nachgewiesen wurde [24, 25]. Die Regulation der S1P-katabolisierenden Enzyme erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene, im Falle der SPL z.B. durch Phosphorylierung oder Nitrosylierung [24]. Die Expression von SPP2 kann durch LPS und TNF- $\alpha$  stimuliert werden [26].

Es wird vermutet, dass auch andere Enzyme der Lipidphosphat-Phosphatase (LPP)-Familie am Abbau von S1P beteiligt sein könnten [27], welche, anders als die SPPs, nicht strikt substratspezifisch agieren, sondern eine Vielzahl phosphorylierter Substanzen erkennen können. Es sind drei LPP Familienmitglieder in Säugetieren bekannt (LPP1, LPP2 und LPP3) die sämtlich primär an der Plasmamembran lokalisiert sind. Ihre aktiven Zentren sind zum extrazellulären Raum ausgerichtet, sodass sie die Möglichkeit besitzen, extrazelluläres S1P zu degradieren.

Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen S1P, Sphingosin und Ceramid ist von entscheidender Bedeutung für das Zellschicksal. Beispielsweise führt die stressbedingte Überexpression von S1P-Phosphatasen zu einem Anstieg der Ceramid-Konzentration, was eine erhöhte Apoptose-Rate zur Folge hat [25]. Eine Anreicherung von S1P im Gewebe, ausgelöst durch die Hemmung der S1P-Lyase, kann eine Immunsuppression nach sich ziehen [28].



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Sphingosin-1-Phosphat-Synthesekaskade. Die grün dargestellten Enzyme sind an der S1P-Synthese und die blau dargestellten Enzyme am S1P-Abbau beteiligt. Der Vorläufer von S1P, Ceramid, kann *de novo* synthetisiert, oder mittels Sphingomyelinasen aus Sphingomyelin freigesetzt werden.

### 1.2.1.1 Sphingosin-Kinasen

Sphingosin-Kinasen (SPHKs) phosphorylieren Sphingosin zu S1P. Sie bestehen aus einer katalytischen Domäne mit ATP-Bindestelle und fünf konservierten Domänen (C1-C5), welche eine Rolle in der Substraterkennung spielen. Derzeit sind zwei SPHK-Isoenzyme in Säugetieren bekannt, die durch die Gene *SPHK-1* und *SPHK-2* kodiert werden [29]. Diese Gene werden differentiell in mehreren transkriptionellen Varianten exprimiert. Auf Protein-Ebene ist die SPHK-1 hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und wird bei Aktivierung zur Plasmamembran transloziert [19]. SPHK-2 besitzt vier

Transmembrandomänen und ist daher hauptsächlich in internen Membranen, wie dem Nukleus zu finden. Beide SPHKs können Erythro-Sphingosin, Sphinganin (dihydro-Sphingosin) und Phytosphingosin phosphorylieren. SPHK-2 besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, FTY720 (Fingolimod) zu FTY720-P, einem S1P Rezeptor-Agonisten, zu phosphorylieren. Stimuliert werden SPHKs durch eine Vielzahl von Rezeptor-Agonisten, einschließlich Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (z.B. Acetylcholin, LPA oder S1P). Darüber hinaus werden die SPHKs durch Agonisten von Rezeptor Tyrosin-Kinasen, wie z.B. epidermal growth factor (EGF), PDGF oder nerve growth factor (NGF) aktiviert [30]. Die Stimulation der SPHKs durch ihr eigenes Produkt S1P (positive Rückkopplung) erfolgt in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) über die Aktivierung eines G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptors [31]. Viele Stimuli verursachen eine schnelle und flüchtige Aktivierung der SPHKs, vermittelt auf posttranskriptioneller Ebene durch Phosphorylierung, Protein-Protein Interaktionen oder Veränderung der subzellulären Lokalisation. So induziert beispielsweise das pro-entzündliche Cytokin TNF $\alpha$  über seinen Rezeptor eine ERK1/2-Aktivierung und damit die Phosphorylierung und anschließende Translokation der SPHK-1 an die Plasmamembran [19]. Andere Substanzen verursachen eine zweiphasige Aktivierung, zusammengesetzt aus einem zunächst schnellen Anstieg der enzymatischen Aktivität, gefolgt von einer lang anhaltenden Regulation auf transkriptioneller Ebene. Eine solche transkriptionelle Hochregulation von SPHK-1 wird, u.a. durch Histamin, über die PKC und die ERK Signalkaskade stimuliert [32].

SPHKs sind beteiligt an Proliferation, Apoptose, Migration, Regulation der Calciumhomöostase, Entwicklung und Regulation des kardiovaskulären- und Nervensystems, Entzündung, Immunabwehr und Krebswachstum [33]. Aus der Literatur ist bekannt, dass SPHKs kompensatorische, überlappende oder unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben können, abhängig von den Zellen oder dem Gewebe in dem sie exprimiert werden [34]. Ein Beispiel für die gegensätzliche Funktion ist die Beeinflussung der Apoptose. SPHK-2 verstärkt Apoptose, wohingegen SPHK-1 eine anti-apoptotische Wirkung aufweist [35]. Es wird angenommen, dass die zelluläre Lokalisation von SPHK-1 und SPHK-2 und demnach die Produktionsstelle von S1P, die gegensätzlichen Effekte der Isoformen bedingen [36].

Trotz der unterschiedlichen Funktionen der SPHKs weisen SPHK-1- und 2-Knockout Mäuse keine Abnormalitäten auf, was auf den kompensatorischen Effekt zurückzuführen

ist [37]. Der Knockout beider Isoformen ist aufgrund einer fehlerhaften Entwicklung des vaskulären Systems embryonal lethal [38].

**Tabelle 1.1: Eigenschaften der Sphingosin-Kinasen-1 und -2**

<b>Eigenschaften</b>	<b>SPHK-1</b>	<b>SPHK-2</b>
<b>Lokalisation im menschlichen Genom</b>	<b>17q25.2</b>	<b>19q13.2</b>
<b>Splicevarianten (human)</b>	<b>384 As, 399 As, 470 As</b>	<b>618 As, 654 As [19, 39].</b>
<b>Stärkste Genexpression</b>	<b>Lunge, Niere, Blut und Niere</b>	<b>Leber, Niere, Gehirn und Herz</b>
<b>Proteinlokalisierung</b>	<b>Cytosol, Plasmamembran</b>	<b>Cytosol, Nukleus und andere Membranen</b>
<b>Substratspezifität</b>	<b>Phytosphingosin, D-erythro-Sphingosin und D-erythro-Dihydrosphingosin</b>	<b>Phytosphingosin, D-erythro-Sphingosin und D-erythro-Dihydrosphingosin (DHS) und FTY720</b>
<b>Inhibitoren</b>	<b>DL-threo-DHS, NN-Dimethylsphingosin (DMS), hohe Salzkonzentrationen, BML-258 [40] SK1-II; 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazol</b>	<b>DL-threo-DHS, NN-Dimethylsphingosin (DMS), Triton-X 100 [41]</b>

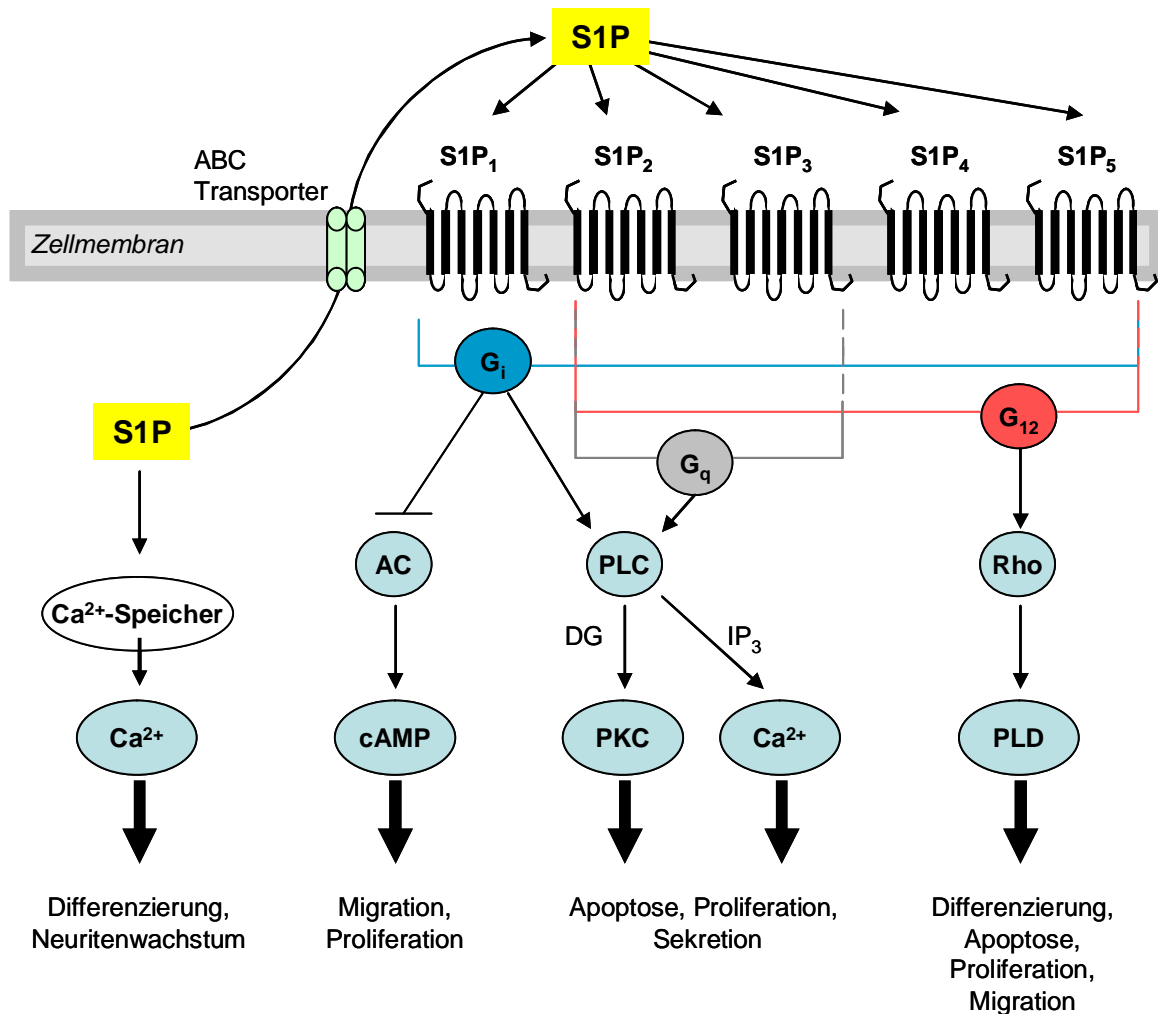
### 1.2.2 Signaltransduktionsmechanismen von S1P

Es ist bekannt, dass S1P an der Regulation einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt ist, wobei S1P intrazellulär als second messenger und extrazellulär über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren fungiert. Intrazellulär beeinflusst S1P unter anderem  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern, DNA-Synthese und Apoptose [42]. S1P kann von den meisten Zelltypen effizient über Transporter exportiert werden. Der Stimuli-abhängige Transport verläuft über ATB-binding cassette (ABC)-Transporter und benötigt ATP als Energiequelle [43]. Darüber hinaus scheint es einen weiteren Calcium-



abhängigen Transporter zu geben [44]. Im extrazellulären Raum agiert S1P als extrazelluläres Signalmolekül, indem es an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bindet. Es wurden fünf hoch affine G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für S1P (S1P<sub>1-5</sub>, früher bekannt als Endothelial Differentiation Gene-Rezeptoren (EDG-1, EDG-5, EDG-3, EDG-6 und EDG-8) charakterisiert [24, 45]. Darüber hinaus existiert eine Gruppe von Orphan G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche die Mitglieder GPR3, GPR6, GPR12 und GPR63 umschließen, die eine mäßige Affinität zu S1P und dihydro-S1P aufweisen [46, 47]. Diese Rezeptorfamilie ist am stärksten im Gehirn exprimiert und koppelt an die G<sub>as</sub> und G<sub>ai/0</sub>. Der Rezeptor GPR3 (Originalname Human Adenylate Cyclase Constitutive Activator (hACCA) vermittelt beispielsweise in verschiedenen Säugetierzellen via G<sub>as</sub> die Bildung von cAMP.

S1P<sub>1-5</sub> weisen eine hohe Sequenzhomologie zueinander auf und binden S1P und dihydro-S1P mit einer hohen Affinität, die sich meist im nanomolaren Bereich befindet [48]. Die Expression dieser Zelloberflächenrezeptoren wurde in verschiedenen Zelltypen des ZNS nachgewiesen. Oligodendrozyten exprimieren vorwiegend S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>5</sub>, Neurone und Astrozyten hingegen verstärkt S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> und in geringem Maße S1P<sub>2</sub> [49]. Die S1P-Rezeptoren sind an Mitglieder dreier G-Proteinfamilien gekoppelt, G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>12</sub> (Abbildung 1.3) [50, 51, 52]. Diese heterotrimeren G-Proteine dissoziieren bei Aktivierung in ihre Untereinheiten und leiten die Signale an nachgeschaltete Wege weiter [19]. S1P<sub>1</sub> interagiert beispielsweise ausschließlich mit G<sub>i</sub> [53], wobei S1P<sub>4</sub> und <sub>5</sub> sowohl mit G<sub>i</sub> als auch mit G<sub>12</sub> interagieren. Zu den nachgeschalteten Signalwegen gehören unter anderem der Phospholipase C (PLC)-, Proteinkinase C (PKC)-, ERK-, Rho- und Adenylylzyclase-Weg. Letzterer kann durch Aktivierung der S1P-Rezeptoren, welche an G<sub>i</sub> koppelt, inhibiert werden [51].



**Abbildung 1.3: Signalwege von S1P.** S1P kann entweder intrazellulär als Second Messenger die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern bedingen oder über ABC Transporter aus der Zelle freigesetzt werden. Extrazellulär kann S1P an fünf verschiedene G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren (S1P<sub>1-5</sub>) anbinden. Die S1P-Rezeptoren sind an G<sub>i</sub>-gekoppelt, alle außer S1P<sub>1</sub> koppeln an G<sub>12</sub> und S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> koppeln an G<sub>q</sub>. Die S1P-Rezeptoren regulieren u.a. Phospholipase C (PLC), Adenylatzyklase (AC), Phospholipase D (PLD) und Protein Kinase C (PKC) [49].

### 1.2.3 S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Mittlerweile wurden verschiedene S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten entwickelt. Der bekannteste und wohl am besten untersuchte S1P Agonist ist FTY720. Bei FTY720 (Fingolimod, 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl] propane-1,3-diol) handelt es sich um eine immunsuppressive Substanz, welche sich von dem Sphingosin-ähnlichen Pilzmetabolit Myriocin ableitet [54]. FTY720 stellt ein strukturelles Analogon zu S1P dar [55, 56] und kann aus diesem Grund *in vivo* durch die SPHK-2 zu FTY720-P

phosphoryliert werden. Dieser Phosphatestermetabolit von FTY720 ist ein hochaffiner Ligand der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> [18] (Tabelle 1.2). Die immunosuppressiven Eigenschaften von FTY720 basieren auf dessen Fähigkeit, den Wiederaustritt von Lymphozyten aus sekundären lymphoiden Organen durch Herunterregulation von S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf Lymphozyten zu verhindern [57]. Ursprünglich wurde FTY720 zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin entwickelt [58]. In einer klinischen Phase-III-Studie konnte FTY720 keine Besserung bei der Abstoßung der Nierentransplantate hervorrufen und darüber hinaus wurde eine erhöhte Bildung makularer Ödeme beobachtet, so dass die Forschungen mit FTY720 auf diesem Gebiet zunächst eingestellt wurden [59]. Mittlerweile gibt es neue Erkenntnisse, dass die durch FTY720 hervorgerufenen makularen Ödeme nach Transplantationen reversibel sind [60]. FTY720 ist darüber hinaus effektiv bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose [61].

Neben FTY720-P, bei dem es sich um einen nicht-selektiven S1P-Rezeptor-Agonisten handelt, existieren Agonisten, die selektiv einzelne S1P-Rezeptoren aktivieren können. Ein Beispiel für einen solchen selektiven Agonisten ist der S1P<sub>1</sub>-Agonist SEW2871. Diese Substanz besitzt einen EC<sub>50</sub> von 10-20 nM [62]. Wie endogenes S1P aktiviert SEW2871 den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor und kann dadurch dessen Internalisierung und Recycling verursachen. Letzteres ist der Unterschied zu FTY720-P, das Internalisierung verursacht aber zur Degradation des Rezeptors führt.

Darüber hinaus sind auch mehrere Antagonisten beschrieben worden. Zu den am meisten verwendeten S1P-Rezeptor-Antagonisten gehört der S1P<sub>2</sub> Antagonist JTE-013. Es wurde nachgewiesen, dass JTE-013 die Bindung radioaktiv markierten S1Ps an Zellmembranen, welche den humanen S1P<sub>2</sub>-Rezeptor exprimieren, mit einem IC<sub>50</sub> von 17±6 nmol/l inhibiert [63]. Die Wirkung des S1P<sub>2</sub> selektiven Antagonisten wurde bereits in Krankheitsmodellen getestet. So fördert beispielsweise die simultane Gabe von S1P und JTE-013 den Wundheilungsprozess bei diabetischen Mäusen [64]. Weitere selektive S1P-Rezeptor-Antagonisten sind der S1P<sub>1</sub> Antagonist W123, mit unbekannter Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren [65], und der S1P<sub>3</sub> selektive Antagonist CAY10444, der bei einer Konzentration von 10 µM den Calciumanstieg in HeLa Zellen um 40 % herabsenkt (Datasheet Cayman).

Tabelle 1.2: S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Eigenschaften	Name	Details
S1P-Rezeptor-Agonisten	<p align="center"><b>FTY720-P</b> (2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl] propane-1,3-diol-phosphat)</p>	<p align="center">S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> Agonist, partieller S1P<sub>3</sub> Agonist EC<sub>50</sub> = 210 pM, 4,9 nM, 4,3 nM, und 1 nM für S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> [66]</p>
	<p align="center"><b>SEW2871</b> (5-(4-phenyl-5-trifluoromethylthiophen-2-yl)-3-(3-trifluoromethylphenyl)-(1,2,4)-oxadiazol)</p>	<p align="center">S1P<sub>1</sub> selektiver Agonist EC<sub>50</sub> = 10-20 nM [62]</p>
	<p align="center"><b>VPC23153</b> (R)-Phosphorsäure mono-[2-amino-2-(6-octyl-1H-benzoimidazol-2-yl) ethyl] ester</p>	<p align="center">S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> Agonist [67] kein EC<sub>50</sub> vorhanden</p>
S1P-Rezeptor-Antagonisten	<p align="center"><b>CAY10444</b></p>	<p align="center">S1P<sub>3</sub> selektiver Antagonist kein IC<sub>50</sub> vorhanden</p>
	<p align="center"><b>JTE-013</b> (1-[1,3-Dimethyl-4-(2-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-4-(3,5-dichloro-4-pyridinyl)-semicarbazid)</p>	<p align="center">S1P<sub>2</sub> selektiver Antagonist IC<sub>50</sub>=0,017 µM [68]</p>
	<p align="center"><b>W123</b> (3-{{3-hexyl-phenylcarbonyl}-methyl}-amino)-propionat)</p>	<p align="center">S1P<sub>1</sub> Antagonist K<sub>i</sub>=0,69 µM auf SEW2871-induzierte Aktivierung von S1P<sub>1</sub> [65]</p>

### 1.2.4 Regulation neuronaler Funktionen durch S1P

Im zentralen Nervensystem konnte die Expression der Rezeptoren S1P<sub>1-3</sub> bereits während der embryonalen Entwicklung im Gehirn nachgewiesen werden [69]. Auch im adulten Gehirn und Rückenmark werden alle fünf S1P-Rezeptoren exprimiert [70]. Es ist erwiesen, dass Oligodendrozyten S1P<sub>5</sub> exprimieren und dieser an der Modulation des Zellüberlebens beteiligt ist [71]. S1P wirkt darüber hinaus anti-apoptotisch in Neuronen und Astrozyten und vermittelt den NGF-stimulierten Neuritenwachstum [51, 72].

Über eine mögliche Funktion von S1P bei der Regulation synaptischer Funktionen ist wenig bekannt. Studien mit S1P<sub>1</sub><sup>-/-</sup> Mäusen bezüglich neuronaler Funktionen liegen zurzeit nicht vor, da der Verlust des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors aufgrund kardiovaskulärer Fehlbildungen lethal ist. S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse wiesen eine Hypererregbarkeit von pyramidalen Neurone im Neocortex auf, die sich in epileptischen Anfällen äußerten. Dies lässt auf einen inhibitorischen Effekt von S1P<sub>2</sub> auf die neuronale Erregbarkeit schließen [73].

Vorarbeiten zur Aufklärung der neuronalen Funktion von S1P zeigten, dass Änderungen der spinalen S1P-Konzentration die spinale nozizeptive Schmerzverarbeitung beeinflusst. Es konnte eine signifikante Abnahme der S1P-Konzentration in der cerebrospinalen Flüssigkeit adulter Ratten nach peripherer nozizeptiver Stimulation festgestellt werden, während die Sphingosin- und Ceramidkonzentrationen nahezu unverändert blieben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass erhöhte spinale Konzentrationen von S1P eine Antinozizeption bewirkten, während eine Verringerung der spinalen S1P-Konzentrationen eine Reduktion der Schmerzschwellen zur Folge hat [70]. Die Auffassung, dass S1P-Rezeptor Aktivierung im Rückenmark einen antinozizeptiven Effekt bedingt, wurde durch weitere Vorarbeiten unterstützt, die belegten, dass die intrathekale Applikation von dihydro-S1P und FTY720-P das Schmerzverhalten von Tieren in verschiedenen Schmerzmodellen reduzierte [74]. Zusätzlich wurde ein inhibitorischer Effekt von FTY720 auf die Sekretion von Eicosanoiden im Blutplasma von Ratten nachgewiesen. Die intraperitoneale (i.p.) Injektion von FTY720 führte zu einer signifikanten Abnahme der Plasmakonzentrationen von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Die Generierung von Eicosanoidmetaboliten spielt in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Ereignissen eine wichtige Rolle, inklusive der Schmerzsignaltransduktion. Es ist bekannt, dass eine Hemmung der Prostaglandinsynthese im Rückenmark antinozizeptiv wirkt [75].

In der Literatur ist beschrieben, dass FTY720 unabhängig von seinem Phosphorylierungsgrad und S1P-Rezeptor Aktivierung zu einer Senkung der Freisetzung von PGD<sub>2</sub> aus Mastzellen und von PGE<sub>2</sub> aus RAW264.7 Makrophagen führt [42]. FTY720 vermittelt diese Wirkung über direkte Bindung an die Gruppe IVA cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>α), dem initialen konzentrationslimitierenden Enzym der Eicosanoid Biosynthesekaskade. Die cytosolische PLA<sub>2</sub> setzt die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (AA) frei, welche von Cyclooxygenasen (COX) zu PGH<sub>2</sub> umgesetzt wird, das entweder nicht-enzymatisch oder durch verschiedene terminale Prostaglandin Synthesen zu Prostaglandinen, Prostacyclin oder Thromboxan reduziert wird [76]. Diese Befunde brachten die Möglichkeit auf, dass die antinozizeptive Wirkung von FTY720 auf einer Reduktion der Prostaglandinsynthese durch direkte Inhibierung der cPLA<sub>2</sub>α basiert. Demnach besitzt FTY720 den Prostaglandin-inhibierenden Effekt der nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), welche mit den Opioid-Analgetika zu den weltweit am häufigsten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzten Arzneimitteln zählen [77]. Die Reduktion der Hyperalgesie durch Opioide wird mit deren cAMP-reduzierenden Wirkung in Verbindung gesetzt [78, 79]. Auch von FTY720 ist bekannt, dass es die intrazelluläre cAMP Akkumulation herabsenken kann [55]. Es vereint demnach den cAMP-reduzierenden Effekt der Opioide und den Prostaglandin-inhibierenden Effekt der NSAIDs und ist daher ein viel versprechendes ‚Tool‘ zur Behandlung von Schmerzen.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente sollte, aufbauend auf den bisherigen Erfahrungen, die Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat für die nozizeptive Signalverarbeitung und -weiterleitung im Rückenmark geklärt werden. Die Arbeitshypothese war, dass S1P ein wichtiger Modulator der spinalen nozizeptiven Transmission ist und somit sowohl Enzymsysteme, welche die spinale S1P-Konzentration regulieren als auch spezifische S1P-Rezeptoren und deren Aktivatoren und Inhibitoren potentielle Targets für eine suffiziente Schmerztherapie sein könnten.

Es sollte zunächst die Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub> im Zentralen Nervensystem untersucht werden. Des Weiteren sollten den S1P-Rezeptoren nachgeschaltete Signalwege pharmakologisch und zellbiologisch charakterisiert werden, die an der Vermittlung der antinozizeptiven Effekte von S1P beteiligt sind. Zur Aufklärung der

---

Regulation der S1P-Konzentration im Rückenmark nach peripherer nozizeptiver Stimulation sollte die Aktivität der S1P-metabolisierender Enzyme näher betrachtet werden. Es sollte die spinale Expression der SPHKs untersucht und mit Hilfe von Knockout-Mäusen die Regulation der SPHK-Isoenzyme nach spinaler nozizeptiver Stimulation charakterisiert werden. Weiterhin sollten die Folgen einer SPHK-1-Hemmung im Rückenmark auf die Sphingolipidsynthese und das Verhalten von Mäusen in einem inflammatorischen Schmerzmodell charakterisiert werden.

Die Untersuchung von neu synthetisierten FTY720-Analoga sollten weitere Grundlagen für eine neuartige, pharmakologische Schmerztherapie liefern. Hierzu sollten zunächst die Fähigkeiten der neu synthetisierten Substanzen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und speziell S1P-Rezeptoren zu aktivieren oder zu inhibieren, aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der neu synthetisierten Substanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration und die Prostaglandinsynthese näher analysiert werden. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Experimente sollte es möglich sein zu beurteilen, wie sich die Gabe von FTY720-Analoga auf den Eicosanoidmetabolismus auswirkt und ob eine Eignung für die Schmerztherapie besteht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

<b>Substanz:</b>	<b>Hersteller:</b>
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Borax	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Calcimycin A23187	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
CAY10444	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Cytosine-β-D-arabin-furanosid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DAPI	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Deoxyribonukleinsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dichlormethan	Carl Roth, Karlsruhe
Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Dihydro-Sphingosin-1-Phosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DNase (RNase frei)	Promega, Madison, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	JT Baker Deventer, Holland
Ethanol 70%	Apotheke, Universitätsklinik Frankfurt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Forskolin aus Coleus	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
FTY720	Witega, Berlin
Gentamycinsulfat	BioWittaker, USA
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco, Paisley, Schottland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe
JTE-013	EMD Chemicals, NJ, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagenase Type CLS VI	Biochrom AG, Berlin



Lipopolysacharid (E-coli)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Methanol 100%	JT Baker Deventer, Holland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NBD-Sphingosin	Avanti Polarlipids, AL, USA
NBD-Sphingosin-1-Phosphat	Avanti Polarlipids, AL, USA
NGF 7S	AppliChem, Darmstadt
NMDA	Tocris, Ellisville, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin G/Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Sawady ‚Hot‘ Taq-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen
SDS	AppliChem, Darmstadt
SEW2871	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Sphingosin-Kinase Inhibitor (SK1-II)	EMD Chemicals (Calbiochem), NJ, USA
Sphingosin-1-Phosphat	Tocris Bioscience, MO, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TNF $\alpha$ [56]	PeproTech, Hamburg
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
tRNA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Uridin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
VPC23153	Avanti Polarlipids, AL, USA
W123	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

## 2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

B27	Gibco, Paisley, Schottland
Fötales Kälberserum	Gibco, Paisley, Schottland
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Schottland
Neurobasal™	Gibco, Paisley, Schottland
RPMI 1640 + GlutaMAX	Gibco, Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Schottland

## 2.3 Puffer und Lösungen

<b>Ponceau Färbelösung</b> 0.5% w/v Ponceau S 3 % Eissessig	<b>TN Puffer</b> 50 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl
<b>Laemmlli-Puffer 4 x</b> 100 mM Tris pH 7,8 5% SDS 40% Glycerol 0,06% Bromphenolblau 5% Mercaptoethanol	<b>Phospholämmli</b> ¼ Endvolumen 4x Lämmli 5 mM NaPyrophosphat 10 mM NaF 5 mM aktiviertes Na-ortho-Vanadat 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 mM EDTA
<b>SDS PAGE Laufpuffer</b> 25 mM Tris pH 8.3 200 mM Glyzin 0.1% (w/v) SDS	<b>SDS PAGE Transferpuffer</b> 50 mM Tris pH 8.3 190 mM Glyzin 20% (v/v) Methanol
<b>Extrazelluläre Lösung (pH 7,2)</b> 136 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM HEPES 10 mM Glukose	<b>Hybridisierungspuffer</b> 50% Formamid 0.6 M NaCl PE 10x 10% BSA 20% SDS 5% Heparin 10 mg/ml tRNA (aus Bäckerhefe)
<b>NTMT</b> 100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 50 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1% Tween-20	<b>Na-ortho-Vanadat (aktiviert)</b> 200 mM Na-ortho-Vanadat (pH 10) mehrfach aufkochen bis die Flüssigkeit klar bleibt
<b>Boratpuffer (pH 8,5)</b> 50 mM Borsäure 23,6 mM Borax	<b>PE 10x</b> 100 mM PIPES (pH 6,8) 10 mM EDTA (pH 8,0)
<b>Tris/Glycinpuffer</b> 100 mM Tris 100 mM Glycin	<b>SSC 20x (pH 7,0)</b> 3 M NaCl 300 mM Na-Citrat
<b>NTE</b> 500 mM NaCl 10 mM Tris/HCl (pH 7,0) 5 mM EDTA (pH 8,0)	<b>TNT Puffer</b> 50 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl 0.1% Tween 20
<b>Puffer B (pH 7,4)</b> 50 mM Tris/HCl	<b>MABT</b> MAB + 0,1% Tween-20
<b>MAB (pH 7,5)</b> 100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl	<b>Puffer A (pH 7,4)</b> 10 mM Tris/HCL 290 mM Saccharose
<b>TBS 10x (pH 7,5)</b> 100 mM Tris 150 mM NaCl	<b>2x Freezing Medium</b> 65% Glycerol 100 mM Formamid

<b>1x Denhardts Lösung</b> 0,02% BSA 0,02% Ficoll 0,02% Polyvinylpyrrolidon	<b>4% PFA (pH 7,4)</b> 40 g Paraformaldehyd ad. 1000 ml PBS
--	---

## 2.4 Antikörper

Antigen	Verdünnung			Hersteller	Peptidsequenz
	IF	WB	MELK		
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragment	1:1000			Roche, Mannheim, D	
ATP-Synthase			4 µg/ml	Upstate-Millipore, Eschborn, D	
7AAD			1:200	BD Pharmingen, San Jose, CA	
CD56	1:100		20 µg/ml	BD Pharmingen, San Jose, CA	
CD146				Chemicon, Temecula, CA	
FITC-IB-4	1:100	1:2000	1:100	Sigma, St.Louis, MO	
FITC-Phalloidin			1:10	Sigma, St.Louis, MO	
GAD67			1:50	Chemicon, Temecula, CA	
GFAP			1:50	Chemicon, Temecula, CA	
HSP-90		1:1000		BD Biosciences, Heidelberg	
IBA-1			1:50	Wako, Richmond, VA	
Neu-N			1:300	Chemicon, Temecula, CA	
phospho897-NR1				Upstate-Millipore, Eschborn, D	
phosphoT286 CamKII				Promega, Madison, WI	
S1P-1		1:750	1:50		CRLTFRKNISKASRS
S1P-2		1:750	1:50		ETLDMGETPSRKVAC
S1P-3		1:750	1:50		CLAGRLRDPPEGSTL
S1P-4		1:750	1:50		CLRPRDSFRTSRSL
S1P-5		1:750	1:50		CNARRLRAGPGSRA
SPHK-1 (M-13)		1:200		Santa Cruz, CA, USA	
SPHK-2 (P-19)		1:200		Santa Cruz, CA, USA	
VGLUT1/VGLUT2	1:100		1:50	Synaptic Systems, Göttingen, D	

## 2.5 Versuchstiere

Tiere	Hersteller
Sprague Dawley Ratten C578BL/6 Mäuse	Janvier, Frankreich oder Harlan, Niederlande
SPHK-1 und -2 KO und SPHK-2-WT (Balb/c)	Novartis, Schweiz

## 2.6 Statistische Auswertung

Alle nachfolgenden Versuche wurden mittels des ungepaarten t-Tests ausgewertet. Dieser dient zum Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen kontinuierlicher Variablen, wenn diese annähernd normal verteilt sind. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern nichts anderes angegeben.

## 2.7 Tiermodelle

### 2.7.1 Versuchstiere

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur  $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt. Bei der Beurteilung des Verhaltens war der Beobachter unwissend über Genotyp oder Behandlung. Als Wildtypkontrolle wurden Tiere gleichen Geschlechts, etwa dem gleichen Alter und dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet.

### 2.7.2 Hot-Plate Test

Zur Analyse der akuten thermalen Nozizeption wurde der Hot-Plate Test wie in Tegeder et al. beschrieben durchgeführt [80].

### 2.7.3 Zymosan-induzierte thermale Hyperalgesie

Der Zymosan Test wurde von Herrn Dong Dong Zhang wie in Hofacker et al. beschrieben durchgeführt [81]. Es wurden 20  $\mu\text{l}$  einer 3 mg/ml Zymosan A-Lösung intraplantar injiziert. Die Auswertung erfolgte durch eigene Arbeit.

### **2.7.4 Implantation lumbarer intrathekaler Katheter**

Die Implantation intrathekaler Katheter in das Rückenmark adulter Mäuse wurde von Herrn Dong Dong Zhang wie in Hofacker et al. beschrieben durchgeführt [81]. Die Präparation der lumbalen Bereiche L4-L5 des Rückenmarks und die statistische Auswertung der LC/MS-MS-Daten erfolgte durch eigene Arbeit.

### **2.7.5 Periphere nozizeptive Stimulation mit Zymosan**

Herr Dong Dong Zhang injizierte 20 µl einer 12,5 mg/ml Zymosan A-Lösung intraplantar in eine oder beide Hinterpfoten der Mäuse. Nach ein- bzw. zweistündiger Inkubation mit Zymosan A wurden die lumbalen Bereiche (L4-L5) des Rückenmarks entnommen, das Dorsalhorn präpariert und die Sphingolipidkonzentrationen mittels LC/MS-MS bestimmt.

## **2.8 Genotypisierung**

### **2.8.1 Isolierung genomischer DNA**

Die genomische DNA wurde mit dem REDEExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue PCR Kit (Sigma, St Louis, MO, USA) aus Mäuseschwänzen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die PCR erfolgte in den Eppendorf Mastercyclern personal bzw. gradient (Eppendorf, Hamburg, D). Die Größen der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.7.3) überprüft.

### **2.8.2 PCR**

Genotypisierung der SPHK-1- bzw. 2-/- Mäuse:

#### **1x PCR Ansatz:**

4 µl DNA Mix

10 µl REDEExtract-N-Amp PCR Reaction Mix

je 0,4 µl 10 µM forward-Primer

je 0,8 µl 10 µM reverse-Primer

je 0,4 µl 10 µM Neo-Primer

add. 20 µl dest. H<sub>2</sub>O

**PCR Programm:**

95°C 5 Minuten  
 95°C 30 Sekunden  
 60°C 30 Sekunden  
 72°C 30 Sekunden  
 72°C 5 Minuten

} 35x

**Fragmentgrößen:**

SPHK-1: WT: 534 bp

KO: 735 bp

SPHK-2: WT: 511 bp

KO: 733 bp

Genotypisierung der SPHK-1 bzw. 2-/- Mäuse:

Primername	Sequenz
SPHK-1 Cont12 rev	5'GCG AAG TGC CCA ACA CCA GC
SPHK--1 Ex6fw	5'ATG TGA AGC TGT GCA GGG CC
SPHK-1- Neo1 fw	5'TGA TAT TGT TGA AGA GCT TGG CGG C
SPHK-2 Ex7 fw	5'AGG CAT TGT CAC TGT GTC TGG
SPHK-2-Neo6	5'GGC CGG AGA ACC TGC
SPHK-2 Ex5 rev	5'AGG TCA ACA CCG ACA ACC TGC TC

**2.8.3 Gelelektrophorese mit Agarosegelen**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels 0,8-1%igen Agarosegelen in Gelelektrophoresekammern (Thermo Fisher, NY, USA) unter Verwendung eines Elektrophorese Powersupply (Labortechnik Fröbel, Lindau, D) bei 80-120 V. Als Laufpuffer wurde 1x TBS und als Molekulargewichtsstandard wurde der PeqGold Proteinmarker (Peqlab, Erlangen, D) eingesetzt. Durch fünfminütige Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) wurden die Agarosegele angefärbt, 10 Minuten in dest. H<sub>2</sub>O gewässert und mit Hilfe eines GeneGenius Gel-Imagine-Systems (Syngene, England) ausgewertet und dokumentiert.

## 2.9 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenz Messungen ermöglicht. Die Aufreinigung der hierzu benötigten RNA aus dem Rückenmark adulter Mäuse erfolgte wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben. Anschließend wurde die isolierte RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Kapitel 2.11.2). Für die Real-Time-PCR des SPHK-1-Gens wurde der ABsolute™Blue QPCR SYBR® Green ROX Mix von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D) verwendet. Dieser Puffer enthält alle notwendigen Substanzen außer den Primern und der zu untersuchenden cDNA. Die Negativ-Kontrolle erfolgte ohne Zusatz von cDNA. Für die Real-Time-PCR der 18S rRNA Kontrolle wurde der ABsolute™Blue QPCR ROX Mix von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D) verwendet. Als Primer wurde 18S-RNA der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, D) eingesetzt. Die PCR wurde in 10 µl-Ansätzen durchgeführt, wobei für die Proben Dreifach- und für die Wasser Kontrollen jeweils Einfachansätze amplifiziert wurden. Die Messung erfolgte in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt, D).

### **Ansatz für SPHK-1-Gen oder das Referenz-Gen Aktin:**

5 µl ABsolute™Blue QPCR SYBR® Green ROX Mix  
1 µl 10 µM forward-Primer  
1 µl 10 µM reverse-Primer  
0,5 µl cDNA (1:25 für Aktin)  
2,5 µl dest. H<sub>2</sub>O

### **Ansatz für die 18S rRNA Kontrolle:**

5 µl ABsolute™Blue QPCR ROX Mix  
0,52 µl PNAR-Primer  
0,5 µl cDNA (1:25)  
3,98 µl dest. H<sub>2</sub>O

**PCR Programm:**

50°C 5 Minuten

95°C 15 Minuten

95°C 15 Sekunden } 45x

60°C 1 Minute }

**Fragmentgrößen:**

SK1: 188 bp (Exon 5-6)

Aktin: 170 bp

***Real-Time-PCR Primer***

Primername	Sequenz
SK1 m fw	5'TCC AGA AAC CCC TGT GTA GC
SK1 m rev	5'GAG CCG CAG CCC AGA AGC AG
Aktin fw	5'TCC ATC ATG AAG TGT GAC GT
Aktin rev	5'GAG CAA TGA TCT TGA TCT TCA T

Die unterschiedliche Expression wurde als n-fache Expression mit Hilfe des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes angegeben. Der Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold*) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Ct-Werte werden voneinander abgezogen ( $\Delta\text{Ct}$ ), die beiden  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Gruppen voneinander abgezogen ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert) und in die Gleichung n-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  eingesetzt.

**2.10 Bestimmung der Leukozyten-Anzahl im Blut**

Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub> getötet und 250 µl Blut durch Herzpunktion entnommen. Die frisch heparinisierten Blutzellen wurden unter Verwendung eines Cell Dyne cytometer (Abbott Diagnostics, Wiesbaden) nach Angaben des Herstellers gezählt.



## **2.11 Immunochemische Methoden**

### **2.11.1 Gewebepräparation und Herstellung von Gefrierschnitten**

Zur Gewinnung des Rückenmarkgewebes wurden die Mäuse nach Tötung durch CO<sub>2</sub> unter Verwendung von 4% PFA/PBS (pH 7,4) perfundiert. Der lumbale Bereich L4-L5 des fixierten Rückenmarks wurde herauspräpariert, 45 Minuten in 4% PFA/PBS (pH 7,4) und anschließend in 30% Saccharose über Nacht inkubiert. Zum Einbetten des Gewebes wurde Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Instruments, Nussloch) verwendet. Die unter Einsatz eines Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) angefertigten Gefrierschnitte wurden auf Objektträgern (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, getrocknet und bis zur Durchführung immunohistochemischer Analysen oder in situ Hybridisierungen bei -80°C gelagert.

### **2.11.2 Immunohistochemie**

Die wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben hergestellten Gefrierschnitte wurden zunächst aufgetaut, getrocknet und mit 0,1% Triton X-100/PBS 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Blockierung der Schnitte bei RT in 3% BSA/PBS. Der Erstantikörper wurde in 3% BSA/PBS verdünnt auf die Schnitte gegeben und diese bei 4 °C über Nacht gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit den Fluoreszenzmarker gekoppelten Sekundärantikörpern in 3% BSA/PBS für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit einer DAPI-PBS-Lösung (1-2 µg/ml) überschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Einbettung mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) unter einem Deckglas (Marienfeld, Lauda Königshofen). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer Kappa DX20H Kamera (Kappa, Gleichen) an einem Nikon Eclipse® E600 Mikroskop (Objektiv 20x) (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

### **2.11.3 Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK)**

Zur Färbung von primären embryonalen Rückenmarkszellen mit dem MELK-Roboter wurden diese auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert (Kapitel 2.12.4) und nach FRET-Analyse (Kapitel 2.12.7) mit 4% PFA/PBS fixiert. Um die Fluoreszenz

auszubleichen, die von den in die Zellen transfizierten Konstrukten pCDNA-CAT-CFP und pCDNA-RII-L20-YFP ausging, wurden die Zellen für 10 Minuten mit 6 M Guanidinium-HCL inkubiert und anschließend erneut mit 4 % PFA/PBS fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 10 Minuten in 0,2% Triton X 100/ PBS und die Blockierung für eine Stunde in 10% Ziegen Serum/PBS. Anschließend wurden die Zellen unter einem invertierten Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRE2; x63 Öllinse NA 1.32) platziert. Durch einen automatisierten Prozess wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten in 1% BSA/PBS mit FITC-markierten Antikörpern (hergestellt nach Schubert et al.[82]) inkubiert und anschließend mit Waschpuffer ab gespült. Phasenkontrast und Fluoreszenzsignale wurden mittels einer Kamera (Apogee KX4; Apogee Instruments, Roseville, CA) abgebildet. Um das spezifische Signal eines zugegebenen Markers zu entfernen, wurden die Zellen durch Lichteinwirkung mit der Anregungswellenlänge gebleicht bevor der Zyklus mit einem neuen Antikörper wiederholt wurde. Drei Gesichtsfelder wurden während jedem MELK-Lauf gleichzeitig aufgezeichnet. Die verwendete Software wurde von der Firma MelTec (Magdeburg) generiert. Unter Verwendung der korrespondierenden Phasenkontrastbilder wurden die von jedem Fluoreszenzmarker produzierten Fluoreszenzabbildungen bildpunktweise abgeglichen. Die Abgleiche erreichten eine Auflösung von +/- 1 Bildpunkten. Die Abbildungen wurden für Beleuchtungsfehler korrigiert und Artefakte wurden mittels eines Maskierungsprozesses ausgeschlossen.

## **2.12 In situ Hybridisierung**

### **2.12.1 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Die Aufreinigung von RNA aus dem Rückenmark adulter Mäuse erfolgte unter Verwendung des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

Die Entfernung genomischer DNA aus der isolierten Rückenmarks-RNA erfolgte durch einen DNase I Verdau. Hierzu wurden 50 µl RNA mit 1x DNase I-Puffer, 1x TE, 2,5 U RNase-Inhibitor und 3,3 U DNase I versetzt, mit H<sub>2</sub>O dest. auf 200 µl aufgefüllt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte nach dem RNA-Cleanup Protokoll aus dem RNeasy Mini Kit nach Angaben des Herstellers.

### 2.12.2 Erststrang cDNA-Synthese

Bei der Erststrang-cDNA-Synthese wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu werden 2 µg RNA (add. 10 µl dest. H<sub>2</sub>O) 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Während diesem Schritt erfolge die Zugabe des cDNA-Synthese-Mix (siehe unten) Die Erststrang-Synthese erfolgte bei 37°C. Anschließend folgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch 10 minütige Inkubation bei 94°C.

#### cDNA-Synthese-Mix:

- 1 mM dNTP-Mix (Promega, USA)
- 1x Puffer (Invitrogen, USA)
- 6,25 µM Oligo(dt)<sub>16</sub>-Primer
- 1,7 µl RNasin (MBI Fermentas, USA)
- 7,5 U/µl MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen, USA)

### 2.12.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Durch Reverse Transkriptase-PCR wurde die S1P-Rezeptorspezifischen cDNA Abschnitte amplifiziert und deren Größe mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.7.3) überprüft.

#### **1x PCR Ansatz:**

- 1 µl cDNA
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 5 µl 10x Reaktionspuffer S (Peqlab, Erlangen)
- 10 µl 5x Enhancer Solution (Peqlab, Erlangen)
- 0,25 µl Sawady ,Hot'Taq-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen)
- je 2 µl 10 µM forward-Primer
- je 2 µl 10 µM reverse-Primer
- add. 50 µl dest. H<sub>2</sub>O

**Gradienten-PCR Programm:**

95°C 5 Minuten

95°C 30 Sekunden	}	35x
60± 10°C 30 Sekunden		
72°C 30 Sekunden		

72°C 5 Minuten

**Fragmentgrößen:**S1P<sub>1</sub>: 420 bpS1P<sub>2</sub>: 383 bpS1P<sub>3</sub>: 510 bpS1P<sub>4</sub>: 446 bpS1P<sub>5</sub>: 389 bpPCR zur Herstellung der S1P-Rezeptor-Genamplifikate:

Primername	Sequenz
S1P <sub>1</sub> fw	5' TGTCTGGAGAAGTACCACCCC
S1P <sub>1</sub> r ev	5' ATACTTCCTTCCC GCAGAAAC
S1P <sub>2</sub> fw	5' TTGCTCCACTGCTGCC
S1P <sub>2</sub> rev	5' CACAGCAGGGGCCTCAGTA
S1P <sub>3</sub> fw	5' TCAGGGAGGGCAGTATGTTC
S1P <sub>3</sub> rev	5' CTGACTCTTGAAGAGGATGG
S1P <sub>4</sub> fw	5' TGCTGTCAGGAACTCGCA
S1P <sub>4</sub> rev	5' CACGGTGTTGAGTAGCCTGC
S1P <sub>5</sub> fw	5' TGTGCGCTCTATGCAAGG
S1P <sub>5</sub> rev	5' TGCAAAC TGTGGAGGAGTCT

#### **2.12.4 Ligation**

Die Ligation der S1P-Rezeptorspezifischen cDNA-Sequenzen in den pCR®II-TOPO®-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben über Nacht bei RT.

#### **2.12.5 Transformation mittels Hitzeschock**

50 µl kompetente TOP-10 Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2-4 µl Ligationsansatz versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden in einem 42°C heißen Wasserbad (Neolab, Heidelberg, D). Das Gemisch wurde anschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Von diesem Transformationsansatz wurden 50-100 µl auf LB<sub>AMP</sub>-Selektionsplatten (100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml X-Gal, 48 µg/ml IPTG) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

#### **2.12.6 Herstellung von Dauerkulturen**

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl 2x Freezing Medium in Kryoröhrchen (Starlab, Ahrensburg, D) vermischt und bei -80 °C eingefroren.

#### **2.12.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte unter Verwendung des Miniprep Kits (Peqlab, Erlangen, D) nach Herstellerangaben.

#### **2.12.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von DNA durch Endonukleasen wurde gemäß den Herstellerangaben (New England Biolabs, Ipswich, GB) durchgeführt. Dabei variierte die Enzymmenge je nach Aktivität der Endonuklease, der Qualität und der Menge der zu restringierenden DNA.

### **2.12.9 Phenol-Aufreinigung**

Die Nukleinsäureprobe wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth, Karlsruhe, D) vermischt und 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die obere DNA-haltige Phase wurde überführt, mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Roth, Karlsruhe, D) vermischt und erneut 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wurde einer Ethanol-Fällung unterzogen. Hierzu wurden die Nukleinsäureproben mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Vol. 100% Ethanol versetzt und nach mischen durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm gefällt. Das entstandene Pellet wurde durch Zugabe von 250 µl 70% Ethanol und 10 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm in der Eppendorf Zentrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg, D) gewaschen, vakuumzentrifugiert (Heto-Holten, DK) und in einem geeigneten Volumen dest. H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.12.10 Herstellung Digoxygenin-markierter ISH-Sonden mittels *in vitro* Transkription**

Die linearisierten Proben wurden als Zielsequenzen in die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die Digoxygenin-Markierung erfolgt während der Sondensynthese mittels des Riboprobe®Kombinationssystems SP6/T7 (Promega, Madison, USA), wobei der Marker in Form von markierten UTP (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut wurde.

### **2.12.11 Dot Blot-Verfahren**

Im Anschluss an die *in vitro* Transkription erfolgte die Denaturierung der Sonden und eine Überprüfung der Digoxygenin-Markierung durch das Dot Blot-Verfahren. Hierzu wurde 1 µg der markierten Probe auf eine zuvor mit TNT-Puffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran (Protran) (Whatman, Brentford, UK) aufgetropft und angetrocknet. Die Membran wurde anschließend für 5 Minuten in TNT-Puffer gewaschen und 30 Minuten in TN-Puffer inklusive 5% Magermilchpulver blockiert. Die Inkubation mit dem Anti-Digoxygenin, Fab Fragment erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Detektion erfolgte mittels des ECL-Systems. Die Membran wurde nach 3 maligem Waschen in TNT Puffer für eine Minute mit der nach Herstellerangaben frisch angesetzten ECL-Lösung

inkubiert und die Luminiszenz mit einem Röntgenfilm (Pierce, Rockford, USA) detektiert.

### **2.12.12 In situ Hybridisierung (ISH)**

#### **Tag 1**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gefrierschnitte (Herstellung siehe Kapitel 2.10.1) wurden zunächst aufgetaut und 3 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 45 Minuten mittels 4% PFA/PBS (pH 7,4) bei  $4^{\circ}\text{C}$  fixiert, in PBS gewaschen und erneut für 30 Minuten in PFA inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen PFA mit PBS wurden die Objektträger 10 Minuten in einem frisch angesetzten Gemisch aus 1,2% Essigsäureanhydrid, 0,6% konzentrierter Essigsäure und 5,2% Triethanolamin gebadet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 10 Minuten erfolgte zunächst eine zweimalige 5 minütige Inkubation in 2x SSC Puffer und anschließend eine 30 minütige Inkubation in Tris-Glycin Puffer bei RT. Zur Prähybridisierung der Schnitte wurde eine 1x Denhardt-Lösung mit 500  $\mu\text{g/ml}$  hitzedenaturierten Heringssperma und 250  $\mu\text{g/ml}$  t-RNA aus Bäckerhefe versetzt und auf die Schnitte gegeben. Die Objektträger wurden mit Parafilm bedeckt, in eine feuchte Kammer gelegt und bei  $60^{\circ}\text{C}$  vorhybridisiert. Zur Hybridisierung wurden die Digoxigenin markierten ISH-Sonden in Hybridisierungslösung verdünnt (200-300 ng/ml) und bei  $80^{\circ}\text{C}$  denaturiert. 100  $\mu\text{l}$  der eisgekühlten Sonden wurden auf die Objektträger verteilt, welche daraufhin mit Parafilm bedeckt und in eine feuchte Kammer gelegt wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $60^{\circ}\text{C}$ .

#### **Tag 2**

Die Objektträger wurden von Parafilm befreit und 3x 20 Minuten in 5x SSC Puffer gebadet. Im Anschluss wurden die Schnitte bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 40 Minuten in 0,5x SSC Puffer/20% Formamid inkubiert. Nach Inkubation in NTE Puffer für 15 Minuten bzw. 30 Minuten wurden die Objektträger erneut bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten 0,5x SSC Puffer/20% Formamid getaucht. Darauf folgte eine Inkubation in 2x SSC für 30 Minuten bei RT und eine einstündige Behandlung mit einer 2%igen Blockierungslösung, verdünnt mit MABT Puffer und 3% BSA bei RT. Die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin, Fab Fragment (Roche, Mannheim) erfolgte in Blockierungslösung (1:1000) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Tag 3**

Zur Entfernung des überschüssigen Erstantikörpers wurden die Objektträger eine Stunde in 1x TBS Puffer gewaschen, wobei die Lösung alle 10 Minuten erneuert wurde. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in NTMT Puffer für 10 Minuten. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt bevor eine Färbelösung, bestehend aus NTMT Puffer, Levamisol und 0,002% NBT/BCIP Stocklösung (Fa. Roche, Mannheim), auf die Schnitte gegeben wurde. Die Färbung erfolgte bei RT für mehrere Stunden unter gelegentlicher Erneuerung der Färbelösung.

**2.13 Zellbiologische Methoden****2.13.1 Herstellung von akuten Rückenmarksschnitten**

Adulten Mäusen wurde das Rückenmarksgewebe entnommen und in eiskaltem Hepes-gepuffertem Ringer (136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes und 1 µM Glycin, pH 7,2) überführt. Die Anfertigung organotypischer Rückenmarksschnitte erfolgte unter Verwendung eines VIBRATOME<sup>®</sup> 1000 PLUS-TISSUE SECTIONING SYSTEM (Intracel LTD, UK). Die 300 µm dicken Schnitte wurden für 30 Minuten in Carbogen-gesättigtem Puffer unter Zugabe verschiedener Substanzen, wie 40 mM KCl, 100 µM NMDA, 1 mM Glutamat oder 50 ng/ml TNF α inkubiert. Zur Bestimmung der Sphingolipide mittels LC/MS-MS oder der Glutamatkonzentrationen wurde das Medium abgenommen, die Schnitte homogenisiert und bei -80°C gelagert

**2.13.2 Gewinnung primärer Neurone aus Dorsalwurzelganglien adulter****Mäuse**

Die Dorsalwurzelganglien adulter Mäuse wurden direkt nach der Entnahme in eiskaltem HBSS Puffer überführt und anschließend für 2 Stunden mit Kollagenase (5 mg/ml, Biochrom AG, D) und Dispase (1 mg/ml, Roche, IN, USA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Ganglien 8 Minuten in 5 ml HBSS, 12,5 µl Trypsin-EDTA und 10 µl DNase (Bioline, USA) inkubiert. Die Zellen wurden mechanisch separiert, in Neurobasal Vollmedium mit B-27 Supplementen, 1 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin and 2 mM



L-Glutamin aufgenommen und auf Poly-L-Lysin-beschichteten 48 well Schalen ausplattiert. Nach Anheftung der Neurone an den Schalenboden, wurden sie in serumfreiem Neurobasal-Vollmedium inkubiert

### **2.13.3 Isolierung primär embryonaler Rückenmarkskulturen (Glia und Neurone)**

Zur Zellgewinnung wurde das Rückenmark von Rattenembryonen 16 Tage post coitus präpariert und in eiskaltes HBSS (Sigma, St. Louis, USA) mit  $MgCl_2$ - transferiert. Das Gewebe wurde für 25 Minuten in Trypsin/EDTA (Sigma, St. Louis, USA) und für 30 Minuten in Kollagenase/Medium (500 U/ml, Biochrom AG) bei 37°C und 5%  $CO_2$  (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) inkubiert. Es folgte eine mechanische Separierung der Zellen, welche daraufhin durch Zentrifugation (300x g; 5 Minuten; RT) sedimentiert wurden. Nach Wiederaufnahme in Neurobasal Vollmedium mit B-27 Supplementen, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin and 2 mM L-Glutamin wurde die Zellsuspension auf sterilen Kulturschalen oder Deckgläschen ausplattiert, welche am Vortag mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma, St. Louis, USA), gelöst in Boratpuffer, überschichtet wurden. Das Anheften der Zellen erfolgte in einem Zeitraum von 2-4 Stunden nach Ausplattierung bei 37°C und 5%  $CO_2$  (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau). Danach wurden die Zellen mit serumfreiem Neurobasal-Vollmedium überschichtet und unter Zugabe von 0,01 µg/ml murinem Nervenwachstumsfaktor (NGF, Invitrogen, Carlsbad, USA) 24 Stunden inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte in NGF-freiem Medium.

### **2.13.4 Herstellung von Neuronenkulturen aus embryonalem Rückenmark**

Die wie in Kapitel 2.12.3 beschrieben isolierten embryonalen Rückenmarkszellen wurden zur Gewinnung einer neuronengereicherten Kultur am zweiten Tag nach der Aussaat mit serumfreiem Neurobasalmedium überschichtet, welches mit 10 µM Uridin, 1 µM Cytosin-β-D-Arabino-Furanosid und 10 µM 5-Fluro-3-Desoxyuridin (Sigma, St. Louis, MO) versetzt wurde. Die Zellen wurden in diesem Medium für bis zu drei Tagen inkubiert, um die Teilung von Astrozyten und Mikroglia zu minimieren. Die Stimulierung

erfolgte in serumfreiem Neurobasalmedium mit B-27 Supplementen, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

### **2.13.5 Herstellung von Astrozytenkulturen aus embryonalem Rückenmark**

Die wie in Kapitel 2.12.3 beschriebenen isolierten embryonalen Rückenmarkszellen wurden zur Gewinnung einer Astrozytenkultur auf unbeschichteten 10 cm Schalen ausplattiert und für 2 Stunden in Neurobasal Vollmedium mit B-27 Supplementen, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) inkubiert. Nach dem Anhaften der Zellen wurde das Neurobasalmedium gegen RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) ausgetauscht. Um zu gewährleisten, dass die Kultur nahezu keine Neurone enthält, wurden die Zellen 2-3mal passagiert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte in serumfreiem RPMI 1640 Medium.

Zum Einfrieren von primären embryonalen Astrozyten wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, durch Trypsinisierung geerntet und durch Zentrifugation (300x g; 5 Minuten; RT) sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium, bestehend aus RPMI 1640; 50% FCS und 20% DMSO, suspendiert und in Kryogefäße überführt. Das Einfrieren erfolgte zunächst durch langsames Abkühlen der Zellen in einer Isopropanolumgebung bei -80°C. Die dauerhafte Lagerung der Kryogefäße erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C kurz angewärmt, die Zellsuspension in Standardmedium aufgenommen und auf Zellkulturschalen ausplattiert.

### **2.13.6 Kultivierung von HeLa-Zellen**

Die HeLa-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (+ L-Glutamin) mit 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Kulturschalen variabler Größe kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS/EDTA (1 mM) in Suspension gebracht, abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und auf ausplattiert. Die HeLa-Zellen wurden wie in Kapitel 2.12.5 beschrieben eingefroren und aufgetaut.

### 2.13.7 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Primäre embryonale Rückenmarkszellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten, photogeätzten Deckgläschen (Dunn Labortechnik, Asbach) kultiviert (Kapitel 2.12.3). Nach 24-72 Stunden wurde die Transfektion der Konstrukte pCDNA-CAT-CFP und pCDNA-RII-L20-YFP [83] mittels des Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Monheim) durchgeführt. Die Analyse der Zellen durch die Methode des FRET wurde 24-48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Hierzu wurden die mit den Zellen bewachsenen Deckgläschen in eine Perfusionskammer (ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) auf einem Mikroskopstativ Axioskop 2 FS plus (Carl Zeiss Göttingen) überführt und mit HEPES-gepuffertem Ringer (136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,33 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_4$ , 10 mM Glucose, 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , und 10 mM HEPES, pH 7.2) umspült. Diese extrazelluläre Lösung wurde von 50 ml-Spritzen (Dispomed, Gelnhausen) über einen Infusomat (Braun, Kronberg) mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa einem Tropfen/Sekunde in die Kammer geleitet und am anderen Ende abgesaugt. Zur Stimulierung wurde ein Gemisch aus 50  $\mu\text{M}$  3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und 25  $\mu\text{M}$  Forskolin mit oder ohne Zusatz von 3  $\mu\text{M}$  S1P als Badapplikation auf die gemessenen Zellen appliziert. Die Anregung der Zellen erfolgte mit abwechselnd 430 nm und 510 nm von einem Polychrom IV Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing) und wurde mit der Software Tillvision (Till Photonics, Gräfelfing) gesteuert. Die Emission wurde bei Betrachtung durch ein 63x Achroplan Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) mit einer Imago CCD Kamera, einem Polychrom IV Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing) und einem Strahlentrenner (Multispec Microimager, Optical Insights) aufgenommen. Die Kamera machte alle 2 Sekunden eine Aufnahme der Emission nach 480 nm und 545 nm Anregung. Zur Auswertung der Änderungen im FRET wurden mit der Software Tillvision (Till Photonics, Gräfelfing) einzelne Zellen ausgewählt, mit Microsoft Excel der Quotient der Emission der Anregungen 480 nm/545 nm errechnet und als Funktion über die Zeit dargestellt, wobei R den Quotienten zum Zeitpunkt t und  $R_0$  den Quotienten zum Zeitpunkt t=0 Sekunden darstellt.

FRET Signale wurden über einen Zeitraum von 20 Sekunden ermittelt und die Wertekalkulation wurde mittels Sigma Plot 8.0 durchgeführt. Phasenkontrastbilder und die Identifikationsnummer der Quadrate, auf denen sich die gemessenen Zellen befanden,

wurde protokolliert um diese Zellen für die weitere Versuchsdurchführung im MELK-System wieder finden zu können.

### **2.13.8 Vollbluttest**

Zur Bestimmung der Sekretion von PGE<sub>2</sub> aus Blutzellen wurden jeweils 250 µl frisch heparinisiertes Blut adulter Mäuse in 48-Well Platten überführt und mit 100 µg/ml LPS und Zusatz verschiedener Substanzen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Eppendorfgefäße überführt und für 5 Minuten bei 10000x g zentrifugiert. Die Detektion der im Plasma enthaltenen PGE<sub>2</sub>-Konzentration erfolgte mit Hilfe des PGE<sub>2</sub> Enzym-Immunoassay Kits (Assay Design, MI, USA) nach Angaben des Herstellers.

## **2.14 Biochemische Methoden**

### **2.14.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford**

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Zur genauen Beschreibung der Methode siehe Bradford et al. [84].

### **2.14.2 Extraktion von Gesamtproteinen aus Zellen**

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, unter Zugabe von heißem 1x Lämmli-puffer mittels eines Schabers vom Boden der Kulturschale abgelöst und anschließend für 5 Minuten bei 100°C inkubiert.

### **2.14.3 Isolierung von Membranproteinen aus Gewebe**

Für die GTPγS<sup>35</sup> Bindungsstudien (Kapitel 2.13.10) wurden die Membranproteine aus Gehirngewebe adulter Mäuse isoliert. Hierzu wurde das Gewebe zunächst in eiskaltem Puffer A (10 mM Tris-HCL, 290 mM Saccharose, pH 7,4) aufgenommen und mittels eines Polytron PT 1200 (Kinematica AG, CH) auf Eis homogenisiert. Die Membransuspension wurde bei 4°C und 1000 g für 15 Minuten zentrifugiert, der entstandene Überstand abgenommen und bei 4°C und 50000 g für 30 Minuten ultrazentrifugiert (Optima<sup>TM</sup>TLX Ultrazentrifuge) (Beckman Coulter, CO, USA). Das

entstandene Pellet wurde in eiskaltem Puffer B (50 mM Tris, pH 7,4) aufgenommen, homogenisiert, einer Proteinbestimmung unterzogen und in Teilmengen bei -80°C eingefroren.

#### **2.14.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS PAGE. Nach Gießen von Trenngel (7% bis 10% Acrylamid) und Sammelgel (4%) wurden 20-40 µg Protein pro Tasche und ein PeqGold Molekulargewichtsmarker (Peqlab, Erlangen) aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine bei 80-140 Volt ca. 90 Minuten in Laufpuffer in Mini-Protean® 3 cell Gelkammern (Bio-Rad, CA, USA) mittels Elektrophorese Powersupply EPS 301 (Amersham, Buckinghamshire, UK) getrennt.

#### **2.14.5 Western Blot**

Zur Detektion spezifischer Proteinbanden mit Hilfe von Antikörpern wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer in einer „Wet-Blotting“ Apparatur (BioRad, München) bei einer Spannung von 100 Volt für 80 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Protran) (Whatman, Brentford, UK) übertragen. Die Membran wurde anschließend für 10 Minuten in Ponceau Lösung gefärbt und mit H<sub>2</sub>O dest. entfärbt, bis ein Bandenmuster erkennbar war. Nun wurde die Membran zur parallelen Analyse verschiedener Proteine in mehrere Teile geschnitten und anschließend 1-2 Stunden in Blocklösung (5% Magermilchpulver oder 3% BSA in TN Puffer) bei RT inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Hybridisierung mit dem in TNT und Milchpulver oder BSA verdünnten Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung ungebundenen Erstantikörpers wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten mit TNT Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Merettich(HRP)-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:5000 in TNT + 1-5% Milchpulver oder 1-3% BSA) bei RT für 2 Stunden. Zur Entfernung des überschüssigen Zweitantikörpers wurde die Membran 5malig für jeweils 5 Minuten mit TNT Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels des ECL-Systems (Perkin Elmer, MA, USA). Die Membran wurde für 1 Minute mit der nach Herstellerangaben

frisch angesetzten ECL-Lösung inkubiert und die Luminiszenz mit einem Röntgenfilm (Pierce, Rockford, USA) dokumentiert.

#### **2.14.6 ELISA zur Bestimmung von PGE<sub>2</sub> und cAMP**

PGE<sub>2</sub> wurden mit den kommerziell erhältlichen Enzyme-Immunoassay Kits (Assay Designe, Ann Arbor, USA) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Messung von cAMP erfolgte unter Verwendung des Direct Cyclic AMP EIA Kit (Assay Designe, Ann Arbor, USA) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.14.7 Flüssigchromatographie/Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) zur Bestimmung von Prostanoiden und Sphingolipiden**

Die Extraktion und Instrumentalisierung der LC-MS/MS Analyse wurde von Herrn Carlo Angioni und Herrn Yannick Schreiber durchgeführt. Zur Bestimmung der Prostaglandine wurden die Zelllysate in 50 mM Tris (pH 7,4) homogenisiert und die Prostaglandine mit Etylacetat extrahiert. Es konnten die Prostaglandine 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> in ausreichenden Mengen detektiert werden. Zur genauen Beschreibung der Instrumentalisierung siehe Linke et al. [85]

Zur Bestimmung der Sphingolipide wurden akute Rückenmarksschnitte (Kapitel 2.11.1) zur Messung der Sphingolipidkonzentrationen nach Versuchsdurchführung in Hepes-gepufferter homogenisiert oder die Sphingolipide wurden direkt aus dem Medium unter Verwendung von 2x 600  $\mu$ L Chloroform: Methanol: HCl (83:15:2, v/v/v) extrahiert. Rückenmarksgewebe wurde wie oben beschrieben behandelt. Es wurden die Sphingolipide C-24-Sphinganin, Sphingosin-1-P Sphingosin, Sphinganin-1-P Sphinganin, C-14-Ceramid, C-16-Ceramid, C-18-Ceramid, C-18-Sphinganin, C-20-Ceramid, C-24-1-Ceramid, C-24-1-Sphinganin und C-24-Ceramid detektiert. Zur genauen Beschreibung der Instrumentalisierung siehe Schmidt et al.[86].

### 2.14.8 Glutamatbestimmung

Die Detektion von Glutamat in Medium akuter Rückenmarksschnitte (Kapitel 2.11.1) erfolgte unter Verwendung des Amplex® Red Glutamat/Glutamatoxidase Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers.

### 2.14.9 Fluorimetrischer S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstest

Primäre embryonale Rückenmarkszellen wurden wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben auf Poly-L-Lysin beschichteten 6-Well-Platten kultiviert und 6 Tage nach Ausplattierung einer 16 stündigen Behandlung mit LPS (1 µg/ml) unterzogen. Die Zellen wurden mittels eines Schabers in S1P-Lyase-Puffer (50 mM Hepes, 15 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0,005% Triton X-100, 10 mM KCl, pH 7,4) geerntet, homogenisiert und einer Proteinbestimmung unterzogen. Je 15 µg der Proteinlysate wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl unter Zusatz von 2,5 µM 15-NBD-Sphingosin-1-Phosphat (Avanti Polarlipids, USA) für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Kaliumphosphat-Puffer (pH 8,5) und 500 µl eines Gemisches aus 2 Teilen Chloroform und einem Teil Methanol gestoppt. Die Proben wurden gründlich durchmisch und anschließend zentrifugiert (15000x g; 30 Sekunden; 4°C) um eine Phasentrennung zu erreichen. 100 µl der oberen wässrigen Phase wurde in 96-Well Mikroplatten überführt und mit 100 µl Dimethylformamid versetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem Elisa Reader mit einer Anregung von 485 nm und einer Emission einer Wellenlänge von 535 nm gemessen.

Zur Gewinnung einer Standardkurve wurde 15-NBD-Sphingosin-1-Phosphat in Konzentrationen von 0 bis 5 µM in Puffer gelöst und wie die proteinhaltigen Proben behandelt. Konzentrationen wurden mittels Microsoft Excel aus den Fluoreszenzintensitätsdaten kalkuliert.

### 2.14.10 GTPγS<sup>35</sup> Bindungsstudien

Die GTPγS<sup>35</sup> Bindungsstudie ermöglicht die Messung der G-Proteinaktivierung. Grundlage dieses Verfahrens ist der Einsatz von verändertem und radioaktiv markiertem GTPγS<sup>35</sup>, welches irreversibel an die G-Proteine anbinden kann. Für die durchgeführten Versuche wurden Membranproteine aus adultem Mäusegehirn verwendet, die wie in

Kapitel 2.12.3 beschrieben aufbereitet wurden. Es wurden 20 µg pro 250 µl Assaypuffer (0,2 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM DTT, 12,5 µM GDP, pH 7,4) eingesetzt. Um die konzentrationsabhängige G-Proteinaktivierung durch S1P, FTY720, FTY720-P und den von Prof. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellten FTY720-Analoga ST-967-ST-973 zu bestimmen, wurden die Membranproteine unter Zugabe von 0,08 µl/ml GTPγS<sup>35</sup> (1250 Ci/mmol) (Perkin Elmer) in 96-Well Filterplatten (Millipore). für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter schütteln inkubiert. Um die S1P-Rezeptorspezifität der neu synthetisierten FTY720-Analoga ST-967 und ST-970 zu testen, wurden 20 µg der Membranproteine mit 30 µM des S1P<sub>3</sub> Antagonisten JTE-013 (Merck), 7 µM des Antagonist W123 und 30 µM des S1P<sub>2</sub> Antagonist Cay10444 (Cayman, MI, USA) für 15 min bei RT vorinkubiert, bevor die 30 minütige Reaktion mittels Zugabe von 10 µM S1P die G-Proteinaktivierung gestartet wurde. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit der potentiellen Antagonisten ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 getestet, die durch 3 µM S1P induzierte G-Protein Aktivierung zu inhibieren. Dazu präinkubierte man 20 µg Membranprotein 15 Minuten mit den einzelnen ,Antagonisten und bestimmte anschließend die verbleibende S1P vermittelte GTPγS<sup>35</sup> Anbindung. Die basale Bindung wurde in der Abwesenheit des Agonisten ermittelt. Die Trennung von Protein-gebundener und freier Radioaktivität erfolgte mittels Filtration. Zu diesem Zweck wurden die Membranfilter durch mehrmalige Spülung mit Waschpuffer (0,2 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) gewaschen, ausgestanzt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (QUICKSAFE A, Zinnser Analytic, Frankfurt) in Szintillationsröhrchen (Perkin Elmer, USA) überschichtet. Die Filter wurden 48 Stunden in der Szintillationsflüssigkeit inkubiert und die Radioaktivität als Zahl der Zerfallsakte pro Zeiteinheit (dpm = decays per minute) unter Verwendung eines Flüssigszintillationsspektrometers (Perkin Elmer, USA) gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel.



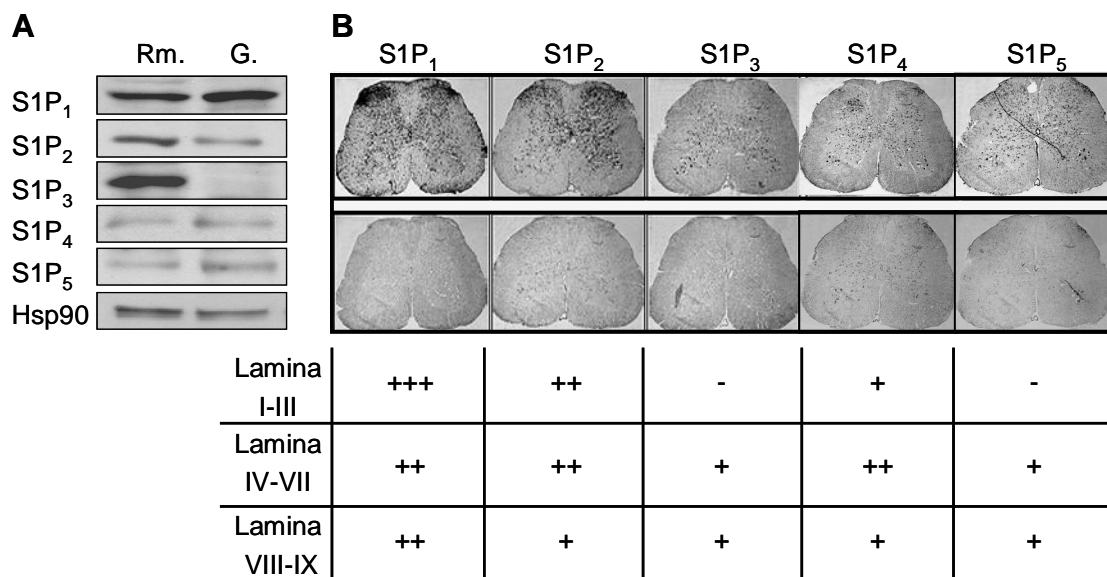
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zur antinozizeptiven Rolle von S1P in der spinalen Schmerzverarbeitung

#### 3.1.1 Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub> im zentralen Nervensystem

Vorarbeiten zeigten, dass erhöhte spinale Konzentrationen von S1P eine Antinozizeption bewirkten, während eine Verringerung der spinalen S1P-Konzentrationen eine Reduktion der Schmerzschwelle zur Folge hat [70]. Um die Mechanismen der S1P-induzierten spinalen Modulation der Nozizeption aufzuklären, wurde zunächst die Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub> im zentralen Nervensystem untersucht. Die mRNA aller fünf S1P-Rezeptoren wurde vorwiegend in der grauen Substanz des Rückenmarks adulter Mäuse mittels *in situ* Hybridisierung detektiert (Abbildung 3.1 B). Die mRNA des Rezeptors S1P<sub>5</sub> war darüber hinaus in Zellen der weißen Substanz nachweisbar, bei denen es sich vermutlich um Oligodendrozyten handelt [71]. S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> schienen am stärksten in den für die spinale Schmerzverarbeitung besonders wichtigen äußeren Laminae I-III des Dorsalhorns exprimiert zu sein. Die Expression der zugehörigen Proteine in Rückenmarksgewebe und Gehirn wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abbildung 3.1 A). *In situ* Hybridisierung der S1P-Rezeptoren, durchgeführt vom Allen Institute for Brain Science, Seattle (WA), bestätigen die starke Expression von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>5</sub> und die schwache Expression von S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>4</sub> in adultem und juvenilen Maus-Rückenmark, sowie im Gehirn. Eine Expressionsanalyse des Rezeptors S1P<sub>2</sub> wurde dort nicht durchgeführt (<http://www.brain-map.org>).

Die Untersuchung der Expression der S1P-Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub> zeigte, dass S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> stark in den für die spinale Schmerzverarbeitung besonders wichtigen äußeren Laminae I-III des Dorsalhorns exprimiert sind. Folglich besteht die Möglichkeit, dass beide Rezeptoren maßgeblich an der S1P-vermittelten Modulation der spinalen nozizeptiven Prozessierung beteiligt sind.



**Abbildung 3.1: Expression der S1P-Rezeptoren im ZNS.** A. Western blot Analyse der S1P-Rezeptoren in Rückenmark (Rm.) und Gehirn (G.) adulter Mäuse. B. In situ Hybridisierung der S1P-Rezeptoren in Rückenmark adulter Mäuse mit antisense- (obere Reihe) und sense- (untere Reihe) Konstrukten. Die Tabelle gibt die Stärke des Hybridisierungssignals in den verschiedenen Laminae wieder.

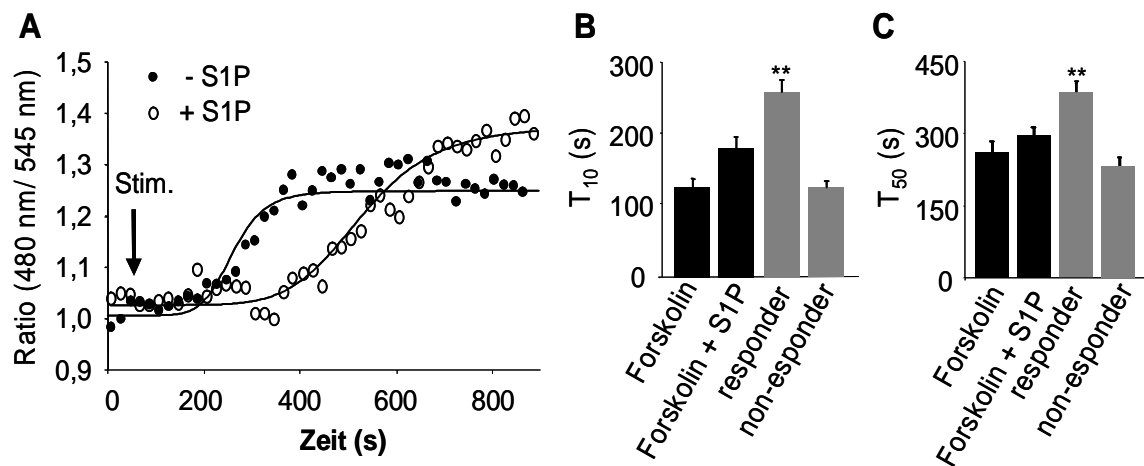
### 3.1.2 Untersuchung der S1P regulierten neuronalen cAMP Synthese mittels FRET basiertem cAMP Imaging

Es ist bekannt, dass alle S1P-Rezeptoren die Adenylatzyklase, das Enzym welches die Bildung von cAMP katalysiert, über die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine ( $G_i$ ) hemmen können. cAMP stellt einen wichtigen Modulator synaptischer Stärke während der Schmerzverarbeitung dar. Daher wurde analysiert, ob S1P die cAMP Synthese in Rückenmarkszellen hemmt. Sowohl in akut dissoziierten Rückenmarkszellen adulter Ratten als auch in aus embryonalen Ratten isolierten neuronalen Zellen und Gliakulturen konnte S1P die Isoproterenol und Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation in Konzentrationen ab 100 nM senken [70]. Um die Frage zu klären, ob S1P die cAMP Synthese in Neuronen, die bei der spinalen Schmerzverarbeitung beteiligt sind, hemmt, wurden cAMP-Messungen mittels der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Technik (FRET) mit einer immunocytochemischen Methode kombiniert (Kapitel 2.12.7). Zunächst wurde der Effekt von S1P auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Aufnahme von FRET-Änderungen bestimmt [10, 83]. Diese Methode basiert darauf, dass cAMP

seine Effekte unter Anderem über die Proteinkinase A (PKA) auswirkt. PKA ist aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten zusammengesetzt. Aus diesem Grund wurden primäre embryonale Rückenmarkskulturen mit zwei Konstrukten transfiziert, die die regulatorische Cyan Fluoreszenz Protein-(CFP)-RII $\beta$  Untereinheit und die katalytische Yellow Fluoreszenz Protein-(YFP)-PKAc Untereinheit der Proteinkinase A kodieren. Die beiden, an das Protein gekoppelten, Varianten des grünen Fluoreszenzproteins besitzen ihre eigenen charakteristischen Wellenlängen. Die Anregung von YFP erfolgt bei 545 nm und es emittiert eine Wellenlänge von 510 nm ab. CFP wird bei 480 nm angeregt, während es bei 430 nm abstrahlt. Ein FRET-Ereignis tritt auf, wenn sich die PKA in ihrer inaktiven holotetrametrischen Form befindet. Dies ist bei einer niedrigen intrazellulären cAMP-Konzentration der Fall. In diesem Stadium transferiert CFP seine Energie zu YFP, welches in seiner charakteristischen Wellenlänge bei 545 nm emittiert. Steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration an, dissoziieren die PKA-Untereinheiten voneinander und das FRET-Signal nimmt ab.

Die FRET-Änderungen wurden unter Zugabe von 50  $\mu$ M des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX und 25  $\mu$ M des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin gemessen. Die maximalen Stimulationswerte erreichten einen  $R/R_0$  von  $1,23 \pm 0,02$ . Auf Grund der Heterogenität der Zellpopulation variierten die FRET-Änderungen stark zwischen den einzelnen Zellen. Dies verursachte eine große Varianz in der Zeit bis zu Erreichen der halbmaximalen Antwort ( $T_{50}$ :  $260,8 \pm 83$  Sekunden; Tabelle 3.1). Im Gegensatz dazu waren die Abweichungen des Beginns der FRET-Änderung, definiert als Zeitpunkt bis zum Erreichen von 10% der maximalen Antwort, homogener ( $T_{10}$ :  $127,8 \pm 41$  Sekunden). Daher wurden die Zellen, die auf S1P reagierten, definiert als Zellen, die eine Verzögerung im  $T_{10}$  von 30% gegenüber S1P-unbehandelten Zellen aufwiesen (Abbildung 3.2 A). 40% der Zellen reagierten wie beschrieben auf S1P mit einer Verdopplung des  $T_{10}$ -Wertes (Abbildung 3.2 B). und einer 30%igen Verzögerung des  $T_{50}$ -Wertes (Abbildung 3.2 C). Die maximalen FRET-Änderungen unterschieden sich jedoch nicht signifikant.

Es konnte gezeigt werden, dass S1P zu einer Inhibition der cAMP Synthese in primären embryonalen Rückenmarksneuronen führt. Auf Grund dieser Beobachtungen entstand die Annahme, dass S1P seine antinozizeptiven Effekte u.a. über die Absenkung der cAMP-Konzentration im Rückenmark vermittelt.



**Abbildung 3.2: S1P verringert die cAMP-Akkumulation in Rückenmarksneuronen. A.** Repräsentative Kinetik der cAMP-Änderungen in Rückenmarksneuronen. Die mit CFP-R11 $\beta$  und YFP-PKA $\alpha$  transfizierten Neurone wurden mit 50  $\mu$ M IBMX und 25  $\mu$ M Forskolin in Anwesenheit (ungefüllte Kreise) oder in Abwesenheit (gefüllte Kreise) von 3  $\mu$ M S1P stimuliert. **B.** Zeit bis zum Erreichen von 10% der maximalen Antwort ( $T_{10}$ ) auf Forskolin. **C.** Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Antwort ( $T_{50}$ ). Gezeigt ist der Mittelwert von 15 (-S1P) und 24 (+S1P) unabhängigen Experimenten + SEM (schwarze Balken). Die grauen Balken stellen Responder (Zellen, die auf S1P mit einer verzögerten cAMP-Änderung reagieren, n=10) und non-responder (Zellen, die nicht auf S1P reagieren, n=14) dar. Einseitiger t-TEST \*\*  $P < 0,01$ .

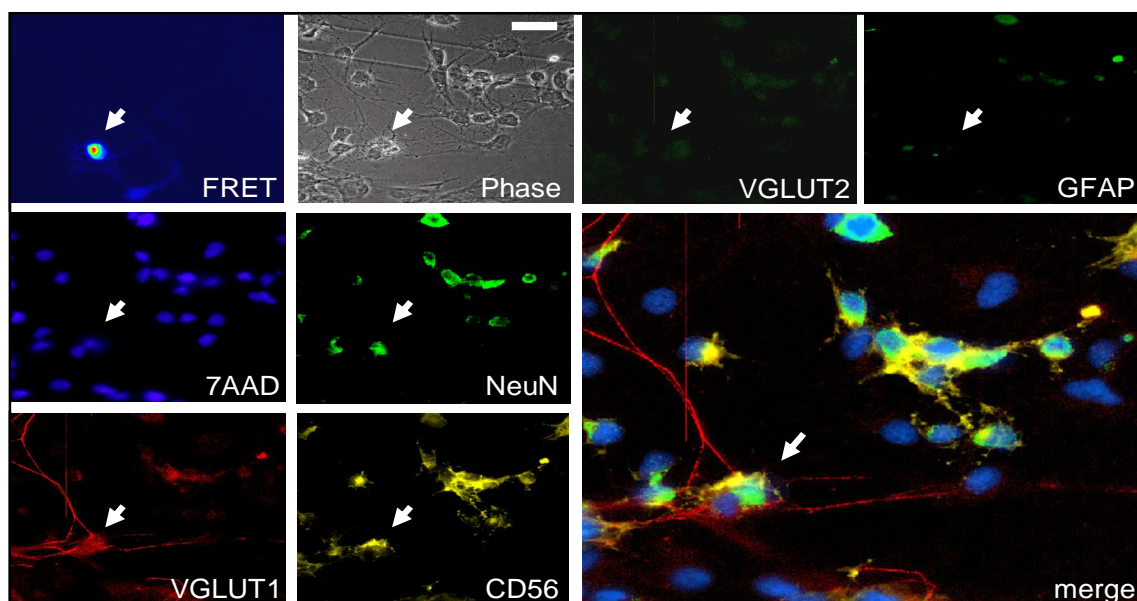
**Tabelle 3.1: FRET-Änderungen in Rückenmarksneuronen definiert als Zeitpunkte  $T_{10}$  und  $T_{50}$**

	$T_{10}$	$T_{50}$
<b>Kontrolle</b>	<b>127,8 <math>\pm</math> 41 s.</b>	<b>260,8 <math>\pm</math> 83 s.</b>
<b>S1P (gesamt)</b>	<b>183,1 <math>\pm</math> 81 s.</b>	<b>295,9 <math>\pm</math> 103 s.</b>
<b>S1P responder</b>	<b>261,8 <math>\pm</math> 54 s.</b>	<b>376,1 <math>\pm</math> 36 s.</b>
<b>S1P non-responder</b>	<b>126,9 <math>\pm</math> 36 s.</b>	<b>231,7 <math>\pm</math> 75 s.</b>

### 3.1.3 Charakterisierung der S1P-sensitiven Rückenmarksneurone

Zur näheren Charakterisierung der Rückenmarkszellen, die auf S1P mit einer verringerten cAMP-Synthese reagierten, wurde die FRET-Technik mit der Multi-Epitop-Ligand-Kartographie-Methode (MELK) kombiniert (Kapitel 2.10.3). MELK ist eine auf Fluoreszenzmikroskopie basierende Technik, die es erlaubt, bis zu hundert verschiedene Marker auf derselben Probe zu betrachten. Der Zugabe jeden Markers folgen ein Waschvorgang und die Aufnahme des Signals. Die Fluoreszenz des Markers wird durch

einen Bleichschritt eliminiert, bevor der nächste Marker auf die Probe gegeben wird [57, 82]. Zunächst wurde mittels FRET nachgewiesen, dass die gemessene Zelle auf S1P mit einer verringerten cAMP-Akkumulation reagiert (Abbildung 3.3). Dieselbe Zelle wurde daraufhin mit den Antikörpern für Astrozyten (GFAP), Mikroglia (IBA1), Endothelzellen (CD146), Neurone (NeuN, CD56) und inhibitorischen (GAD67), sowie exzitatorischen Neurone (VGLUT1 und -2) inkubiert. Zusätzlich wurde 7AAD als Kernmarker und Phalloidin oder der mitochondriale Marker ATP-Synthase eingesetzt. Die auf S1P reagierende Zelle wurde durch NeuN, CD56 und VGLUT1 markiert, was beweist, dass es sich bei den S1P-responsiven Zellen um exzitatorische Neurone handelt.

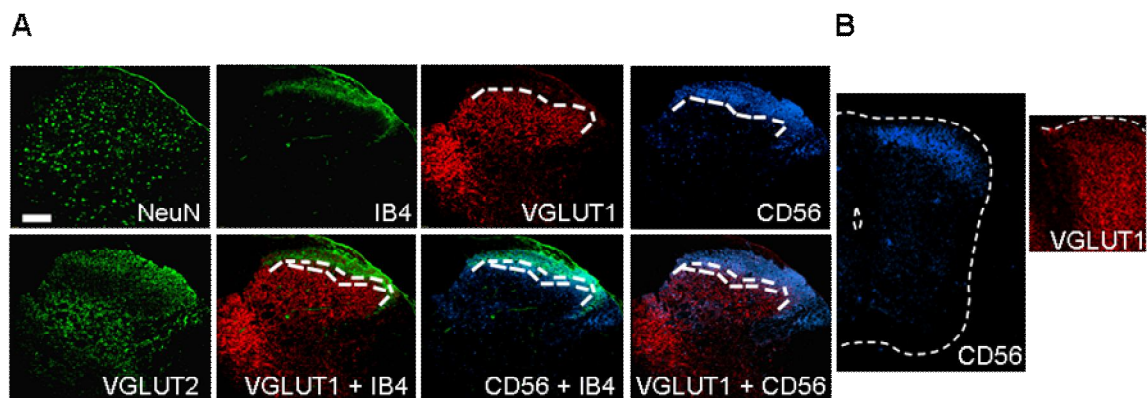


**Abbildung 3.3: S1P senkt die cAMP-Akkumulation in exzitatorischen Neuronen.** Oben links abgebildet ist eine 480/545 nm Emission eines mit CFP-RII und YFP-PKAc transfizierten Rückenmarkneurons. Für dieselbe Zelle sind Phasenkontrast- (Phase) und MELK-Aufnahmen gezeigt. Dargestellt sind die Marker VGLUT1 (rot) und VGLUT2 (grün) = exzitatorische Neurone, CD56 (gelb) und NeuN (hellgrün) = Neurone, 7AAD = Kernfärbung, GFAP (dunkelgrün) = Astrozyten, sowie ein überlagertes Bild (merge) von VGLUT1, CD56, NeuN und 7AAD. Weiße Pfeile markieren das auf S1P reagierende Neuron. Die Skalierung (weißer Balken) entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Um herauszufinden, wo CD56- und VGLUT1-positive Neurone im Rückenmark lokalisiert sind, wurde das Expressionsmuster von CD56 und VGLUT1 in Rückenmarksschnitten adulter Tiere (Abbildung 3.4 A) und Rattenembryonen (Abbildung 3.4 B) untersucht. CD56 zeigte eine Kolokalisation mit dem Lamina II-Marker IB4 und markiert darüber hinaus Laminae I und III. Die Expression von VGLUT1 beginnt in Lamina II und zieht sich in die tiefer gelegenen Laminae hinein. Sowohl im adulten als

auch im embryonalen Rückenmark sind CD56 und VGLUT1 demnach in Laminae II und III kolokalisiert. Aus diesem Grund ist es nahe liegend, dass das auf S1P reagierende exzitatorische Neuron in Laminae II oder III lokalisiert ist. Diese Laminae spielen bei der Schmerzverarbeitung eine wichtige Rolle, da primäre Afferente, sowie GABAerge Neurone in diesen Laminae terminieren und Dendriten exzitatorischer Neurone von dort aus in die übergeordneten Laminae eintreten [87, 88]. Eine Reduktion der cAMP-Synthese in dieser Region könnte daher für die antinozizeptive Wirkung von S1P verantwortlich sein.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass S1P zu einer Inhibition der cAMP-Synthese in exzitatorischen Neuronen führt. Diese S1P-sensitiven Neurone sind in den für die Schmerzverarbeitung wichtigen Laminae II und III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks lokalisiert. Eine Reduktion der cAMP-Synthese in dieser Region könnte maßgeblich daran beteiligt sein, die antinozizeptive Wirkung von S1P zu vermitteln.

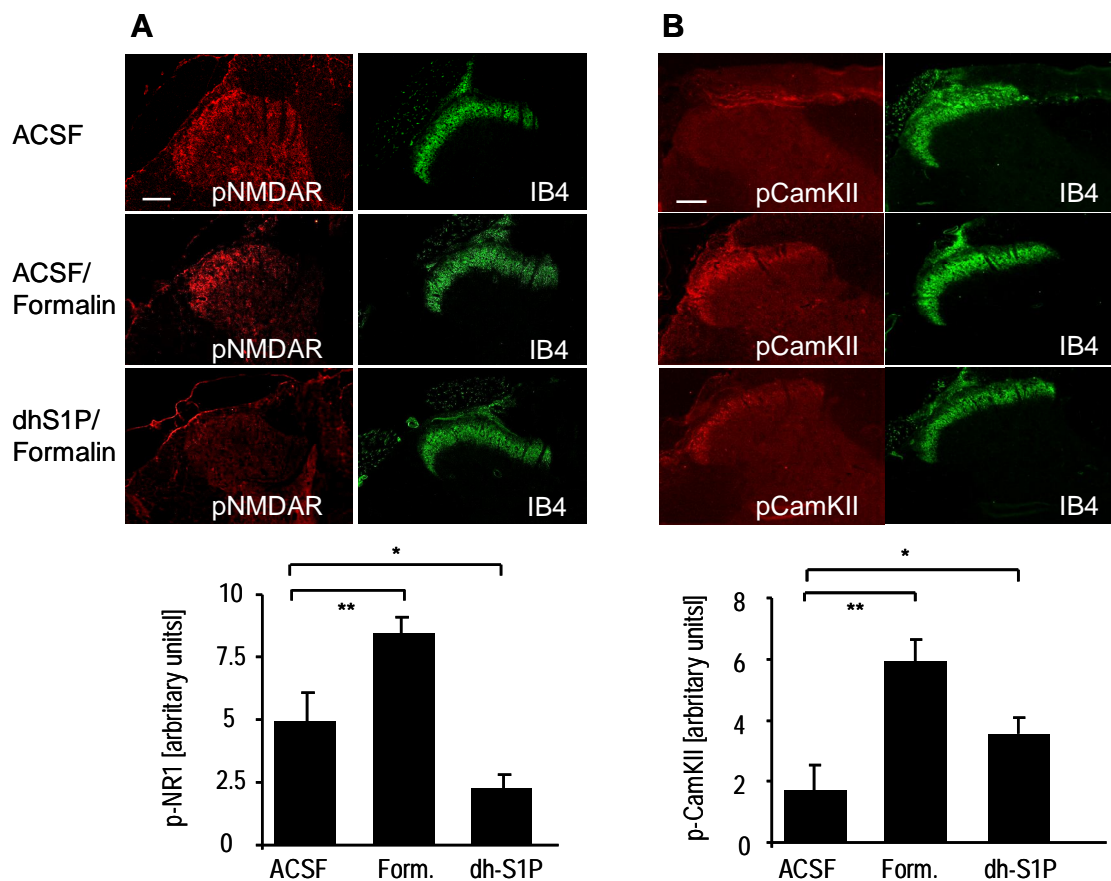


**Abbildung 3.4: Lokalisation der auf S1P reagierenden exzitatorischen Neurone im Rückenmark mittels Immunohistochemie. A. Adultes Rückenmark. B. Embryonales Rückenmark (E16). Pseudofarben dargestellt sind die Marker NeuN (grün) = Neurone, IB4 (grün) = Lamina II, VGLUT1 (rot) und VGLUT2 (grün) = erregbare Neurone, CD56 = Neurone, sowie überlagerte Bilder von VGLUT1 und IB4, CD56 und IB4, VGLUT1 und CD56. Die gestrichelten Linien begrenzen den Bereich der Laminae II und III des dorsalen Hinterhorns adulten Rückenmarks, in dem sich die Expressionsmuster von CD56 und VGLUT1 überschneiden. Die Skalierung (weißer Balken) entspricht 50 µm.**

### **3.1.4 dihydro-S1P verhindert die Formalin-induzierte und cAMP-abhängige Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren im Rückenmark**

Um aufzuklären, ob die Aktivierung von S1P-Rezeptoren die cAMP-abhängige Kaskade in den äußeren Laminae des Dorsalhorns beeinflusst, wurde der Effekt von intrathekal gegebenem dihydro-S1P auf die PKA-abhängige Phosphorylierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren an Serin 897 mittels Immunohistochemie analysiert. Es ist erwiesen, dass die Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren nach Behandlung mit Formalin ansteigt und zur Sensitivierung der Rezeptoren beiträgt [89, 90]. Intrathekal gegebenes dihydro-S1P reduzierte die Formalin-vermittelte Erhöhung der PKA-abhängigen NMDA-Phosphorylierung (Abbildung 3.5 A). Als Negativkontrolle wurde die Calcium-abhängige Phosphorylierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin regulierten Kinase II (CamKII) an Threonin 286 betrachtet. Formalin induzierte einen Anstieg der Calcium-abhängigen Phosphorylierung, der durch intrathekalen Applikation von dihydro-S1P nur teilweise verhindert wurde (Abbildung 3.5 B). Dies bestätigt die Annahme, dass S1P, vermittelt über die S1P-Rezeptoren, die Adenylatzyklase hemmt. Dies führt zu einer Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration, was zu einer verringerten Aktivierung der PKA und somit zu einer erniedrigten PKA-abhängigen NMDA-Phosphorylierung führt.

Der Befund, dass in den Laminae II und III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks lokalisierte exzitatorische Neurone auf S1P mit einer verringerten cAMP-Synthese reagieren, wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass intrathekal gegebenes dihydro-S1P die Formalin-induzierte und cAMP-abhängige Phosphorylierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in den äußeren Laminae reduzierte.



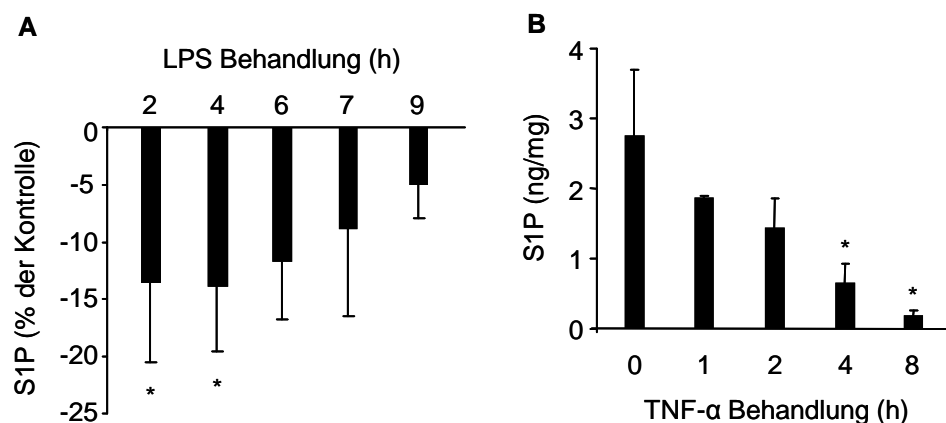
**Abbildung 3.5: Intrathekal verabreichtes dihydro-S1P verhindert die PKA-abhängige Phosphorylierung von NMDA-Rezeptoren.** A. Adulten Ratten wurden 15 Minuten vor einer Formalininjektion 10  $\mu$ l dihydro-S1P (80  $\mu$ M) oder Salzlösung intrathekal appliziert. Die lumbalen Abschnitte 4 und 5 des Rückenmarks wurden 30 Minuten nach der Formalininjektion entnommen. Gezeigt ist eine immunhistochemische Kofärbung von IB4 und für die Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren am Serin 897. Unterhalb ist die Quantifizierung der Phospho-NMDAR (Serin 897) Immunhistochemie gezeigt. B. Die lumbalen Sektionen wurden wie unter A. beschrieben vorbehandelt und einer immunhistochemischen Kofärbung für IB4 und für die PKA-unabhängige Phosphorylierung der CamKII am Threonin 286 unterzogen. Unterhalb ist die Quantifizierung der Phospho-CamKII (Threonin 286) Immunhistochemie gezeigt. Die Skalierung (weißer Balken) entspricht 50  $\mu$ M. Der Mittelwert von 4 Experimenten + SEM ist dargestellt. Einseitiger t-TEST; \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ .



## 3.2 Regulation der S1P-Konzentration im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation

### 3.2.1 Regulation der S1P-Synthese in akuten Rückenmarksschnitten und kultivierten Rückenmarkszellen

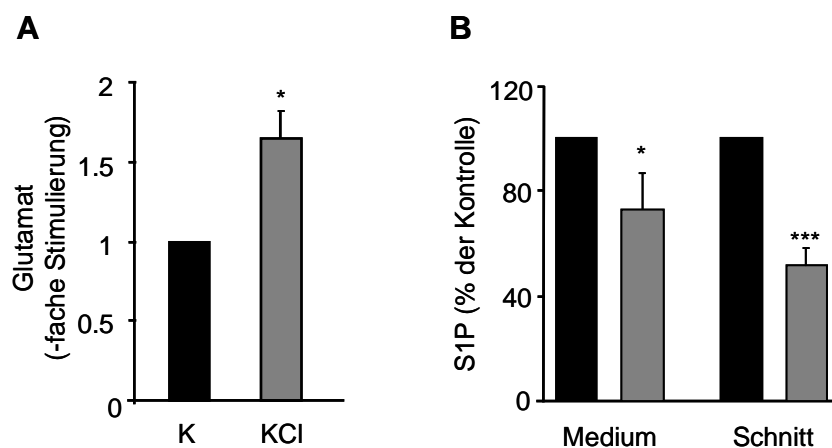
Vorarbeiten zeigten, dass die Konzentration von S1P im Liquor cerebrospinalis von adulten Ratten nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Formalin und Zymosan signifikant abnahm, während die Sphingosin- und Ceramidkonzentrationen unverändert blieben [70]. Auch primäre embryonale Rückenmarkszellen zeigten im Zellkulturmodell eine Abnahme der S1P-Freisetzung nach Stimulation mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid im Überstand (Abbildung 3.6 A). Diese Reduktion erreichte zwischen 2 und 4 Stunden ihren Höhepunkt und flachte mit zunehmender Zeit immer mehr ab. Nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF-α konnte in Zelllysaten von primären embryonalen Rückenmarkszellen ebenfalls eine Abnahme der S1P-Konzentration festgestellt werden, die nach vier Stunden eine Signifikanz erreichte (Abbildung 3.6 B).



**Abbildung 3.6: S1P-Konzentration in stimulierten primären embryonalen Rückenmarkszellen.** A. Rückenmarkskulturen wurden  $\pm$  1 µg/ml LPS inkubiert und der S1P-Gehalt im Medium zu den angegebenen Zeitpunkten mittels LC-MS/MS Analyse detektiert. Die Daten sind als % der Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 2-9 Messungen. B. Rückenmarkskulturen wurden mit 50 ng/ml TNF-α inkubiert und die S1P-Konzentration in Zelllysaten zu den angegebenen Zeitpunkten mittels LC-MS/MS Analyse gemessen. Exemplarisch dargestellt ist die Auswertung eines Versuchs. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ .

In einem weiteren Versuchsmodell wurde adulten Mäusen das Rückenmarksgewebe entnommen und mittels eines Vibratoms Akutschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in Carbogen-gesättigter Ringerlösung unter An- und Abwesenheit von 40 mM KCl inkubiert, um Glutamatfreisetzung und Sphingolipidkonzentrationen zu bestimmen. Die Stimulation der Rückenmarksschnitte mit KCl führte zu einer Depolarisation der Rückenmarksneurone und bedingte die erhöhte Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (Abbildung 3.7 A), was die Vitalität der Zellen innerhalb der Schnitte bestätigt. Mittels LC-MS/MS-Messungen konnten sowohl im Medium als auch in Schnittlysaten eine signifikant verringerte S1P-Konzentration nach Behandlung mit KCl festgestellt werden (Abbildung 3.7 B). Da die Reduktion des S1P-Gehalts nicht nur im Medium nachgewiesen wurde, hat die Reduktion der S1P-Konzentration eine veränderte Regulation des intrazellulären S1P Metabolismus als Ursprung.

Zusammenfassend wurden im Liquor cerebrospinalis von adulten Ratten, sowie in Rückenmarkszellkulturen und akuten Rückenmarksschnitten nach peripherer nozizeptiver Stimulation eine signifikante Abnahme des S1P-Gehalts beobachtet, deren Ursprung in einer veränderten Regulation des intrazellulären S1P Metabolismus liegt.



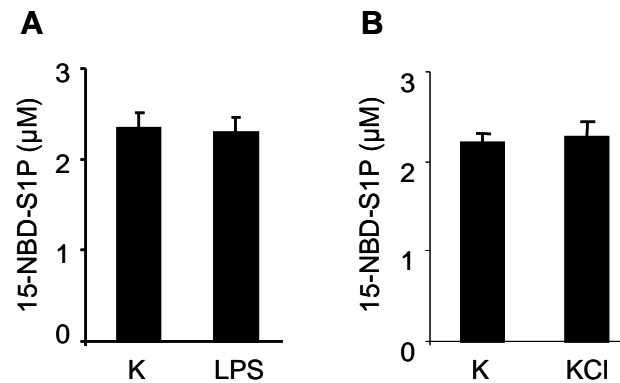
**Abbildung 3.7: Stimulation akuter Rückenmarksschnitte mit KCl.** A. Glutamatfreisetzung aus akuten Rückenmarksschnitten adulter Wildtyp Mäuse nach 30 minütiger Stimulation mit 40 mM KCl (graue Balken) versus unbehandelte Proben (schwarze Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 4 Messungen. B. Die S1P-Konzentrationen in Medium und Lysaten akuter Rückenmarksschnitte wurden mittels LC-MS/MS detektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3-5 Messungen. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ .

### **3.2.2 Beteiligung S1P-katabolisierender Enzyme an der Reduktion der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation**

Um die Frage zu klären, welche Enzyme für die Senkung der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation eine entscheidende Rolle spielen, wurde zunächst die Degradierung von S1P untersucht. Am Abbau von S1P sind Mitglieder mehrerer Enzymklassen beteiligt. Zum einen dephosphorylieren S1P-Phosphatasen (SPP1/-2) S1P, zum anderen kann S1P durch S1P-Lyasen (SPL) irreversibel abgebaut werden. Um die Aktivität dieser Enzyme zu analysieren, wurden primäre embryonale Rückenmarkszellen einer 16 stündigen Behandlung mit LPS (1 µg/ml) unterzogen, was nachweislich zu einer Abnahme der S1P-Freisetzung führt (Kapitel 3.2.1). Die Zellhomogenate wurden in einen fluorimetrischen S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstest zur Bestimmung der enzymatischen Degradierung fluoreszenzmarkierten 15-NBD-S1P eingesetzt. Die Funktionsfähigkeit des Tests wurde mittels Inkubation der Proteine mit alkalischer Phosphatase (1 U/µl) überprüft, welche während der halbstündigen Inkubation die Konzentration des eingesetzten 15-NBD-S1P um 10% herabsetzte. Im Vergleich zwischen unstimulierten und LPS-stimulierten Rückenmarkszelllysaten waren keine Veränderungen des 15-NBD-S1P-Abbaus durch S1P-Lyasen und S1P-Phosphatasen nachweisbar (Abbildung 3.8 A). Diese Ergebnisse wurden mittels eines S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstests unter Verwendung akuter Schnitte adulten Mäuserückenmarks bestätigt. Bei einer Stimulation der Schnitte mit 40 mM KCl waren auch in diesem Modell keine Veränderungen des 15-NBD-S1P Abbaus durch S1P-Lyasen und S1P-Phosphatasen nachweisbar (Abbildung 3.8 B). Demnach ist weder die signifikante Abnahme der S1P-Konzentration in Rückenmarkszellen nach LPS Behandlung noch die verringerte S1P-Konzentration in akuten Rückenmarksschnitten nach Stimulation mit KCl auf eine erhöhte Aktivität S1P-abbauender Enzyme zurückzuführen. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Aktivität der S1P-synthetisierenden Enzyme, der Sphingosin-Kinasen (SPHKs), für die Erniedrigung der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation verantwortlich ist.

Primäre embryonale Rückenmarkszellen zeigten im Zellkulturmodell eine Abnahme der S1P-Freisetzung nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und TNF- $\alpha$  (Abbildung 3.6). Darüber hinaus führte die Stimulation akuter Rückenmarksschnitte adulter Wildtyp-Mäuse ebenfalls zu einer Erniedrigung der S1P-Konzentration. Eine erhöhte Aktivität S1P

abbauender Enzyme (S1P-Phosphatasen 1/-2 und S1P-Lyasen) konnte als Grund für die Abnahme der S1P-Konzentration ausgeschlossen werden. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Aktivität der S1P-synthetisierenden Enzyme, der Sphingosin-Kinasen 1/-2, für die Erniedrigung der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation verantwortlich ist.



**Abbildung 3.8: Fluorimetrischer S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstest.** A. Primäre embryonale Rückenmarkszellen wurden einer 16 stündigen Behandlung mit LPS (1 µg/ml) unterzogen und die enzymatische Degradation fluoreszenzmarkierten 15-NBD-S1P in LPS-behandelten versus unbehandelten primären embryonalen Rückenmarkszellen gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 17 Messungen. B. Abgebildet ist die enzymatische Degradierung fluoreszenzmarkierten NBD-S1P in KCl-behandelten versus unbehandelten Rückenmarksschnitten. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils 3 Schnitten, präpariert aus 3 Rückenmärgern.

### 3.2.3 Beteiligung der Sphingosin-Kinasen 1 und -2 an der Regulation des S1P-Gehalts in akuten Rückenmarksschnitten

#### 3.2.3.1 Sphingosin-Kinase-1 und -2-defiziente Mäuse

Zur Analyse der Rolle von Sphingosin-Kinasen bei der Abnahme der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation wurden von der Firma Novartis SPHK-1 und -2 Knockout Mäuse zur Verfügung gestellt [91]. Zur Herstellung der *SPHK-1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden Exon 2 und ein Teil von Exon 6 des *SPHK-1* Gens in den Zielvektor pRAY2 einkloniert. Zur Generierung der *SPHK-2*<sup>-/-</sup> Mäuse wurde Exon 7 des *SPHK-2* Gens in den Vektor pRAY2 einkloniert. Dieser Zielvektor für die homologe Rekombination beinhaltete eine Neomycin-Expressionskassette, welche eine Selektion Neomycin-resistenter Klone nach Transformation in Balb/c embryonale Stammzellen ermöglichte. Die Neomycin-Insertion

---

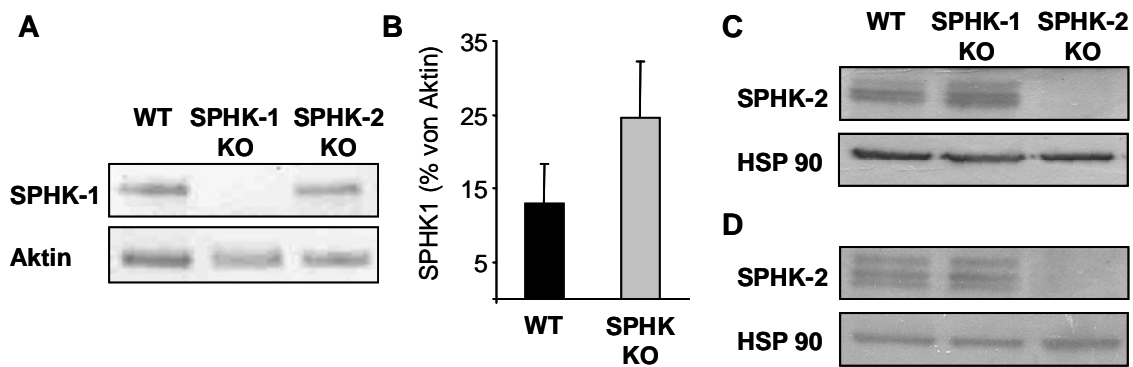
wurde in den Balb/c Auszuchtstamm gezüchtet und der Genotyp mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.3.2 Expression der SPHK-1 und -2 im zentralen Nervensystem**

Die Expression der Enzyme SPHK-1 und -2 wurde im zentralen Nervensystem adulter Mäuse untersucht. Western Blot Analysen ergaben, dass SPHK-2 in Gehirn und – Rückenmarksgewebe exprimiert ist (Abbildung 3.9 C+D). Eine Überexpression des Proteins SPHK-2 konnte sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark SPHK-1-defizienter Mäusen nicht festgestellt werden. Der Nachweis einer vollständigen Abwesenheit des Isoenzym SPHK-1 in Rückenmark SPHK-1-defizienter Mäuse konnte mittels Real-Time-PCR erbracht werden (Abbildung 3.9 A). Auf mRNA Ebene war keine Änderung der SPHK-1 Expression in SPHK-2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erkennbar (Abbildung 3.9. B).

In situ Hybridisierung der SPHKs, durchgeführt vom Allen Institute for Brain Science, Seattle (WA), bestätigen die Expression der SPHK-1 und SPHK-2 im adulten und juvenilen Maus-Rückenmark. Beide Isoformen konnten in cervikalen, thorakalen, lumbalen und sakralen Bereichen des adulten Maus-Rückenmarks nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die SPHK-2 auch im adulten Gehirn detektiert (<http://www.brain-map.org>).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl SPHK-1 als auch SPHK-2 im ZNS exprimiert sind. SPHK-1 Knockout Mäuse weisen keine veränderte Expression der SPHK-2 auf Proteinebene auf. In SPHK-2-defizienten Mäusen war keine Änderung des mRNA-Gehalts von SPHK-1 festzustellen.



**Abbildung 3.9: Expression von SPHKs im ZNS.** A. Expression der SPHK-1 im Rückenmark adulter Wildtyp-, SPHK-1- und SPHK-2-defizienter Mäuse. Gelelektrophorese der Real-Time-PCR Produkte von SPHK-1. Als Referenz wurde Aktin aufgetragen. B. Real-Time-PCR Analyse des SPHK-1 mRNA-Gehalts normalisiert gegen Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 3 Tieren. C. Western blot Analyse der SPHK-2 Expression im Gehirn adulter Balb/c Wildtyp-, SPHK-1- und SPHK-2-defizienter Mäuse. D. Western Blot Analyse der SPHK-2 Expression im Rückenmark adulter Wildtyp-, SPHK-1- und SPHK-2-defizienter Mäuse.

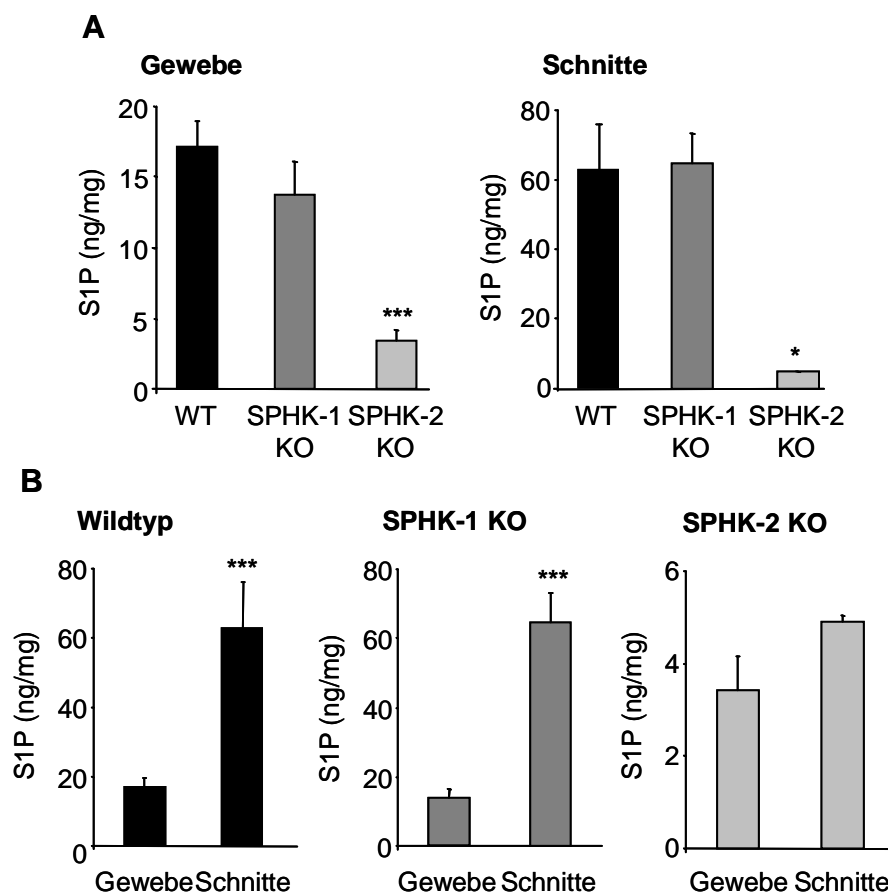
### 3.2.3.3 Sphingolipidkonzentrationen im Rückenmark von Sphingosin-Kinase-1 und -2 defizienten Mäusen

Da nichts auf eine Beteiligung von S1P-Lyasen und S1P-Phosphatasen an der Senkung der S1P-Konzentration während der Nozizeption hindeutet, ist es wahrscheinlich, dass die spinale S1P-Konzentration primär durch Aktivitätsänderungen der SPHKs reguliert wird. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden Messungen der Sphingolipidkonzentrationen im Rückenmark SPHK-1 und -2 defizienter Mäuse durchgeführt.

Bei einem Vergleich des S1P-Gehalts in Rückenmarksgewebe und Lysaten akuter Rückenmarksschnitte von SPHK-1 und -2-defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen, zeigten SPHK-1-defiziente Mäuse einen zum Wildtyp ähnlich hohen S1P-Gehalt (Abbildung 3.10 A). Dies lässt darauf schließen, dass SPHK-1 nur für einen geringen Teil der S1P-Synthese verantwortlich zu sein scheint. In SPHK-2-defizienten Rückenmarksproben konnte lediglich eine sehr geringe Menge von S1P nachgewiesen werden, d.h. SPHK-1 kann im Rückenmark SPHK-2-defizienter Mäuse keine ausreichende Menge an S1P bilden. Die Expression der SPHK-2 scheint demnach für die Synthese von S1P im Rückenmark von entscheidender Bedeutung zu sein.

Bei vergleichender Betrachtung der S1P-Konzentrationen in frisch entnommenem Gewebe und in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte fällt auf, dass der Grundgehalt an S1P in den Wildtyp Mäusen und SPHK-1-defizienten Mäusen in den Schnitten um ein

Vielfaches erhöht ist (Abbildung 3.10 B). In SPHK-2-defizienten Mäusen wurde kein signifikanter Unterschied des S1P-Gehalts zwischen Gewebe und Schnitt festgestellt. Diese Befunde lassen vermuten, dass die hohe S1P-Konzentration in den Schnittllysaten hauptsächlich von einer Aktivierung der SPHK-2 abhängig ist. Die tendentielle Erhöhung der S1P-Konzentration in Schnitten der SPHK-2-defizienten Mäuse deutet darauf hin, dass auch die SPHK-1 einen Beitrag zu dem gesteigerten S1P-Gehalt in den unstimulierten Rückenmarksschnitten leistet. Die Aktivierung beider Sphingosin-Kinasen kommt vermutlich auf Grund der Beschädigung des Gewebes durch den Schnittvorgang zustande.



**Abbildung 3.10: Basale S1P-Konzentration im Rückenmarksgewebe und akuten Rückenmarksschnitten.** A. Adulten Wildtyp Mäusen und SPHK-1- bzw. -2-defizienten Mäusen wurden die lumbalen Bereiche (L4-L5) des Rückenmarks entnommen und im Ganzen (Gewebe) oder als akute Rückenmarksschnitte (Schnitte) homogenisiert. Die Konzentration von S1P in den Lysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt und ist in ng/mg Protein dargestellt. B. Vergleich der S1P-Konzentration zwischen Gewebe und Lysaten akuter Rückenmarksschnitten innerhalb der einzelnen Tiergruppen. Gezeigt sind die Mittelwerte von 24-25 Wildtyp Mäusen, 13-19 SPHK-1-defizienten Mäusen und 6-12 SPHK-2-defizienten Mäusen + SEM. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ .

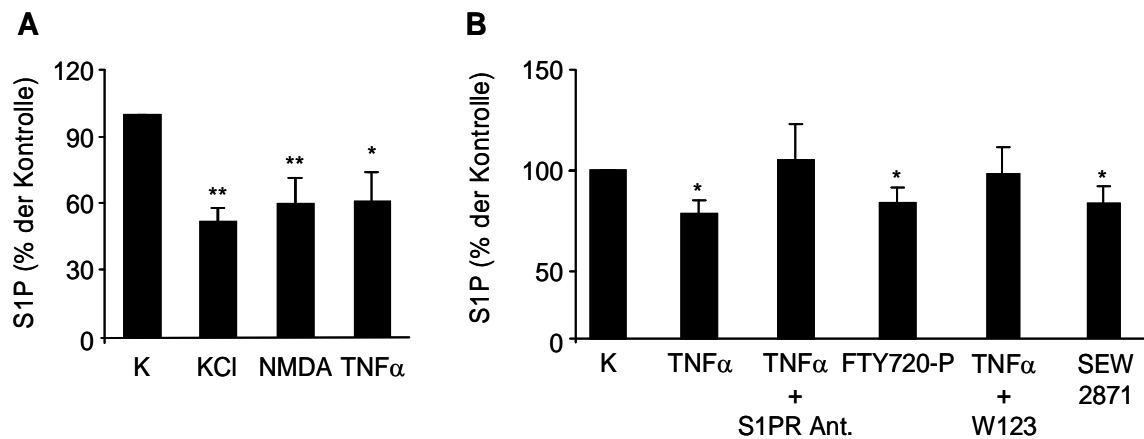
### 3.2.3.4 Sphingolipidkonzentrationen in stimulierten akuten Rückenmarksschnitten

Zur näheren Untersuchung der Rolle der SPHKs bei der Regulation von S1P nach nozizeptiver Stimulation im Rückenmark wurden Versuche an akuten Rückenmarksschnitten von Wildtyp Mäusen durchgeführt. Die S1P-Konzentrationen nahmen nach Stimulation mit KCl, NMDA und TNF- $\alpha$  signifikant ab (Abbildung 3.11 A), was auf eine Hemmung der SPHKs hindeutet.

Um die Frage zu klären, wie die Hemmung der SPHKs durch die unterschiedlichen Stimuli vermittelt wird, wurde unter anderem auch die Rolle von S1P und der S1P-Rezeptoren näher betrachtet. Hierzu wurden die S1P-Konzentrationen in akuten Rückenmarksschnitten durch 30 minütige Inkubation mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  um 26% herabgesenkt. Durch Vorinkubation der Schnitte mit einem S1P-Rezeptor-Antagonistengemisch, bestehend aus W123, einem S1P<sub>1</sub> Antagonisten mit unbekannter Selektivität gegenüber den anderen S1P-Rezeptoren, dem S1P<sub>2</sub> spezifischen Antagonisten JTE-013 und dem S1P<sub>3</sub> spezifischen Antagonisten Cay10444, konnte die TNF- $\alpha$ -vermittelte Konzentrationsabnahme von S1P in den Rückenmarksschnitten komplett blockiert werden (Abbildung 3.11 B). Dieses Ergebnis spricht für eine Rolle von extrazellulärem S1P und der S1P-Rezeptoren in der Kaskade, die zur Hemmung der SPHKs führt. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Inkubation akuter Rückenmarksschnitte mit dem S1P-Rezeptor-Agonisten FTY720-P. Diese Substanz kann alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von S1P<sub>2</sub> agonistisch stimulieren und führt dadurch in den Rückenmarksschnitten zu einer signifikanten Reduktion (<19,5%) der S1P-Konzentration.

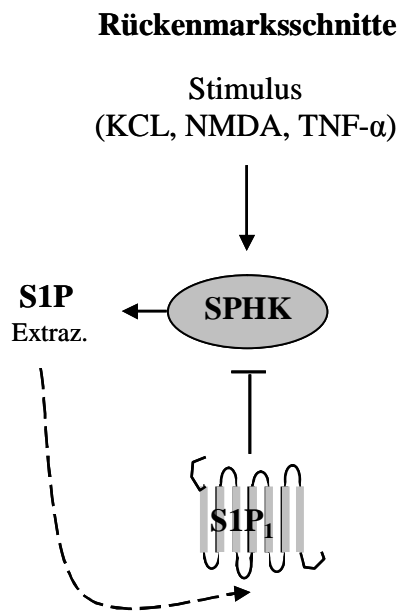
Darüber hinaus wurde untersucht, ob der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor für die TNF- $\alpha$ -vermittelte Konzentrationsabnahme von S1P in den Rückenmarksschnitten verantwortlich ist. Eine Inkubation der Schnitte mit dem S1P<sub>1</sub> spezifischen Rezeptor-Agonisten SEW2871 führte zu einer signifikanten Abnahme der S1P-Konzentration (Abbildung 3.11 B). Durch Vorinkubation der Schnitte mit dem S1P<sub>1</sub> Antagonisten W123 (die Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren ist nicht bekannt) konnte die TNF- $\alpha$ -vermittelte Konzentrationsabnahme von S1P in den Rückenmarksschnitten blockiert werden. Diese Ergebnisse belegen, dass S1P<sub>1</sub> an der Hemmung der SPHKs beteiligt ist.





**Abbildung 3.11. Stimulation akuter Rückenmarksschnitte.** A. S1P-Konzentrationen in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte von Wildtyp Mäusen nach 30-minütiger Stimulation mit 40 mM KCl, 100  $\mu$ M NMDA oder 50 ng/ml TNF- $\alpha$ . Die S1P-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3-11 Messungen + SEM. B. S1P-Konzentrationen in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte von Wildtyp Mäusen nach 30-minütiger Stimulation mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$   $\pm$  15-minütige Vorinkubation mit 30  $\mu$ M JTE-013, 7  $\mu$ M W123 und 30  $\mu$ M Cay10444, 1  $\mu$ M FTY720-P, TNF- $\alpha$   $\pm$  15-minütige Vorinkubation mit 7  $\mu$ M W123 und 1  $\mu$ M SEW2871. Die S1P-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von 5 Messungen + SEM. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

Zusammenfassend führt die nozizeptive Stimulation der akuten Rückenmarksschnitte zu einer Freisetzung von S1P, die anschließend eine Reduktion der S1P-Synthese durch Inhibierung der SPHKs bedingt (Abbildung 3.12). Diesen Effekt von S1P auf seine eigene Synthese kann man als negative Rückkopplung bezeichnen. An der Hemmung der SPHKs durch deren Produkt S1P ist der Zelloberflächenrezeptor S1P<sub>1</sub> beteiligt.



**Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P in akuten Rückenmarksschnitten nach nozizeptiver Stimulation.** Die Aktivierung der akuten Rückenmarksschnitte durch die verschiedenen Stimuli führt zur Bildung und anschließenden Freisetzung von S1P, wo es durch Anbindung an S1P<sub>1</sub> die Hemmung der SPHKs vermittelt.

### 3.2.3.5 Beteiligung der SPHKs an der negativen Rückkopplung

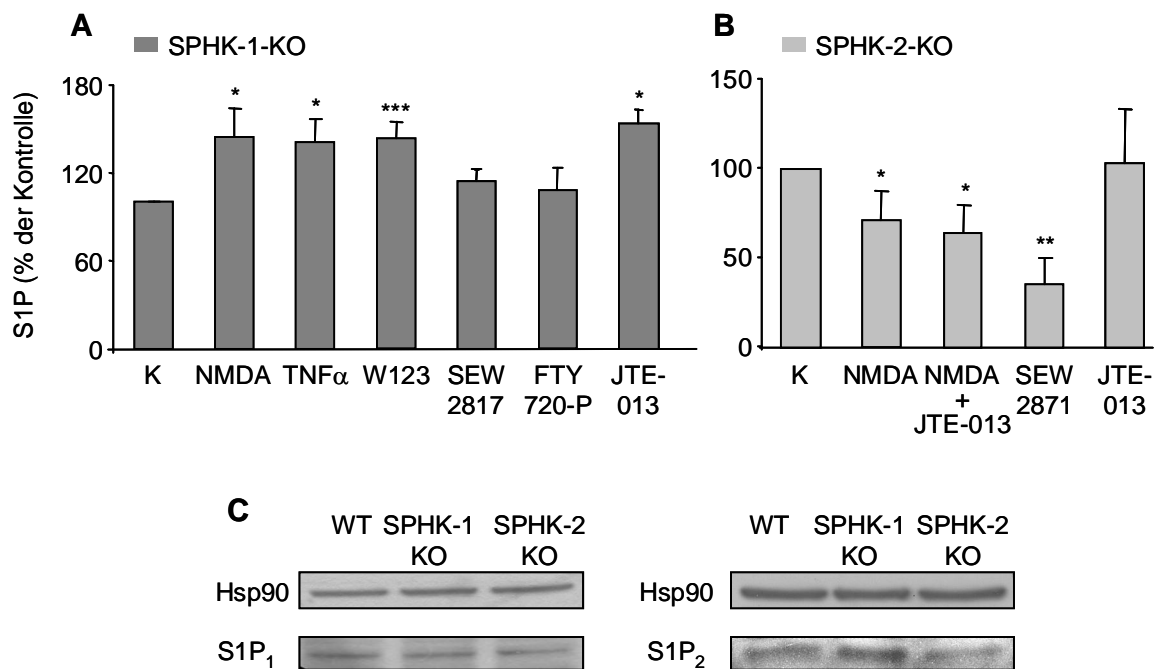
Geht man von einer negativen Rückkopplung durch S1P bei der Regulation der SPHK Aktivitäten aus, so stellen sich die Fragen, ob beide SPHK Isoenzyme S1P bilden können, welches inhibitorisch auf seine eigene Synthese wirkt, oder nur eine der beiden. Um diese Frage zu klären, wurden Versuche an akuten Rückenmarksschnitten von SPHK-1- und 2-defizienten Mäusen durchgeführt.

Während die S1P-Konzentration in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte von Wildtyp Mäusen nach Stimulation mit NMDA und TNF- $\alpha$  signifikant abnahm (Abbildung 3.11 A), konnte eine deutliche Steigerung der S1P-Konzentration in SPHK-1 Knockout Mäusen nach Behandlung mit den zwei Stimuli festgestellt werden (Abbildung 3.13 A). Dies zeigt, dass im Falle der Abwesenheit des SPHK-1 Isoenzym die negative Rückkopplung über S1P und somit die in den Wildtypen beobachtete Abnahme der S1P-Konzentration ausbleibt. Das durch SPHK-2 gebildete S1P übt demnach keinen inhibitorischen Effekt auf seine eigene Synthese aus und es kommt in den Rückenmarksschnitten SPHK-1-defizienter Mäuse zu einer Anhäufung des durch SPHK-2 gebildeten S1P.

Interessanterweise zeigte die Behandlung von akuten Rückenmarksschnitten SPHK-1-defizienter Mäuse mit dem S1P<sub>1</sub> spezifischen Agonisten SEW2871 und FTY720-P, einem Agonisten aller S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von S1P<sub>2</sub>, keine Beeinflussung der S1P-Konzentration (Abbildung 3.13 A). Der S1P<sub>1</sub> Antagonist W123 (die Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren ist nicht bekannt) und JTE-013, ein S1P<sub>2</sub> spezifischer Antagonist, steigerten den S1P-Gehalt in den Schnitten signifikant, was vermuten lässt, dass S1P<sub>2</sub> eine Hemmung der SPHK-2 vermittelt. Das für eine solche Hemmung verantwortliche S1P muss durch SPHK-1 gebildet werden, da in den SPHK-1-defizienten Mäusen lediglich gesteigerte Aktivitäten der SPHK-2 zu verzeichnen sind.

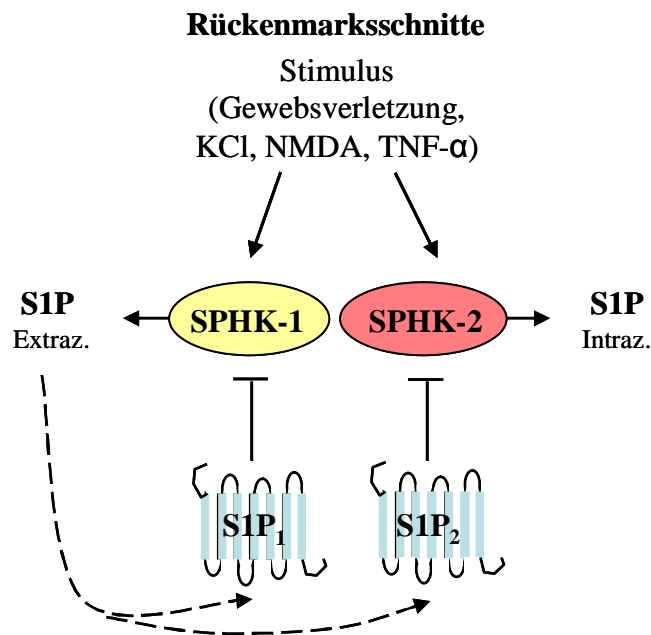
Die Behandlung von akuten Rückenmarksschnitten SPHK-2-defizienter Mäuse mit NMDA und dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischen Agonisten SEW2871 führte zu einer signifikanten Verringerung der S1P-Konzentration innerhalb der Schnittlysate (Abbildung 3.13 B). Wird der Rezeptor S1P<sub>1</sub> durch SEW2871 aktiviert, so kommt es demnach zu einer Hemmung der SPHK-2 und somit zu einer Reduktion der S1P-Konzentration. Der S1P<sub>2</sub> spezifische Antagonist JTE-013 hatte keinen Effekt auf die S1P-Konzentration. Sowohl der Rezeptor S1P<sub>1</sub> als auch der Rezeptor S1P<sub>2</sub> zeigten im Rückenmark von SPHK-defizienten Mäusen keine Änderungen in der Proteinexpression im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Abbildung 3.13. C).

Die in Wildtyp Mäusen und SPHK-2-defizienten Mäusen beobachtete Absenkung der S1P-Konzentration nach Stimulation ist somit vermutlich auf eine negative Rückkopplung, verursacht durch das von SPHK-1 gebildete S1P, zurückzuführen. An der Vermittlung dieses Effekts ist der Rezeptor S1P<sub>1</sub> beteiligt, dessen Aktivierung die Inhibierung der SPHK-1 bedingen kann.



**Abbildung 3.13: S1P-Konzentration in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte SPHK-defizienter Mäuse.** A. Akute Rückenmarksschnitte SPHK-1-defizienter Mäuse nach 30 minütiger Stimulation mit 100  $\mu$ M NMDA, 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 7  $\mu$ M W123, 1  $\mu$ M SEW2871, 1  $\mu$ M FTY720-P und 2,5  $\mu$ M JTE-013. Die S1P-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von 13 Messungen  $\pm$  SEM. B. Akute Rückenmarksschnitte SPHK-2-defizienter Mäuse nach 30 minütiger Stimulation mit 100  $\mu$ M NMDA  $\pm$  15 minütige Vorinkubation mit 2,5  $\mu$ M JTE-013, 1  $\mu$ M SEW2871 und 2,5  $\mu$ M JTE-013. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3-12 Messungen + SEM. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ . C. Western Blot Analyse der S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> Expression im Rückenmark adulter Balb/c Wildtyp-Mäuse, SPHK-1- und SPHK-2-defizienter Mäuse.

Die Stimulation der akuten Rückenmarksschnitte durch die verschiedenen nozizeptiven Mediatoren führt zu einer Freisetzung von S1P, die anschließend eine Hemmung der S1P-Synthese bedingt. Das durch SPHK-2 gebildete S1P übt keinen inhibitorischen Effekt auf seine eigene Synthese aus, wohingegen das durch SPHK-1 gebildete und anschließend freigesetzte S1P zu einer negativen Rückkopplung führt, indem es über den Rezeptor S1P<sub>1</sub> die SPHK-1 und über den Rezeptor S1P<sub>2</sub> die SPHK-2 hemmt und die Absenkung der intra- und extrazellulären S1P-Konzentrationen bedingt (Abbildung 3.14).



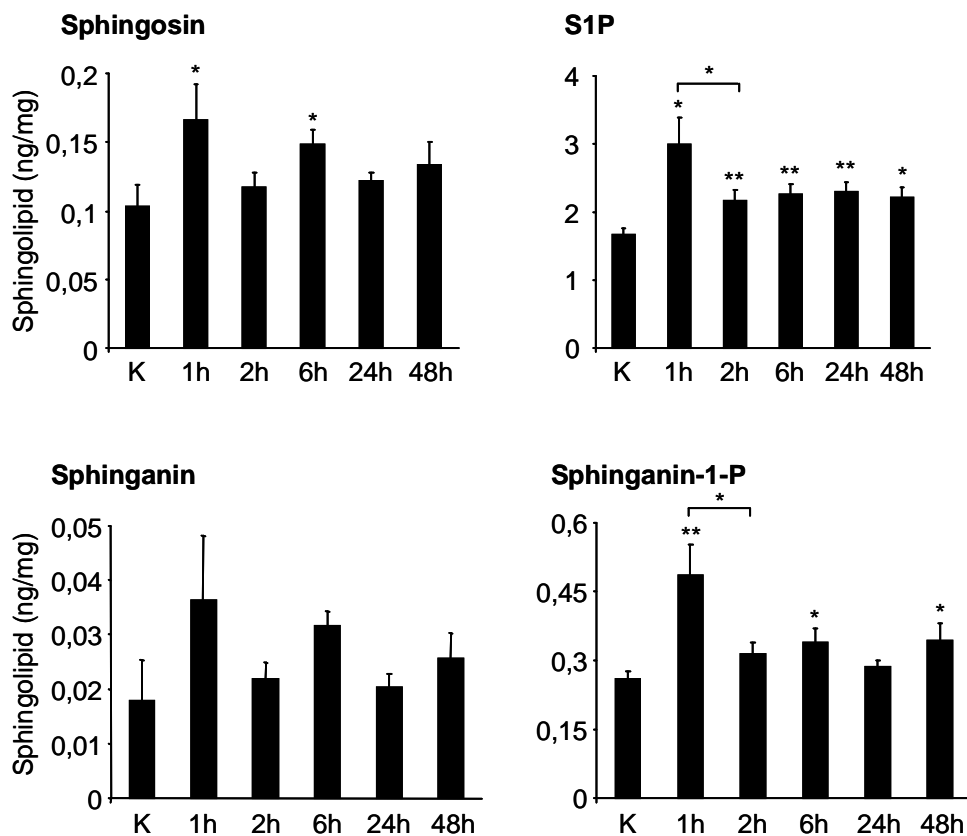
**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P in Rückenmarksschnitten nach Stimulation mit Schmerzmediatoren. Die Aktivierung der akuten Rückenmarksschnitten durch die verschiedenen Stimuli führt zur Bildung von S1P. Das durch SPHK-1 gebildete S1P gelangt in den extrazellulären Raum, wo es durch Anbindung an S1P<sub>1</sub> das Isoenzym SPHK-1 inhibiert und durch Aktivierung des S1P<sub>2</sub> die Hemmung von SPHK-2 vermittelt. Das durch SPHK-2 gebildete S1P verbleibt intrazellulär.

### 3.2.4 Regulation des spinalen S1P-Gehalts durch Sphingosin-Kinasen *in vivo*

#### 3.2.4.1 Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan

Um zu prüfen, ob die *in vitro* beobachtete negative Rückkopplung auch vor einem physiologischen Hintergrund auftritt, wurde die spinale S1P-Konzentration in einem häufig gebrauchten Model für entzündliche Schmerzen betrachtet. Über einen Zeitraum von zwei Tagen wurden nach intraplantarer (i.pl.) Injektion von Zymosan die Sphingolipidkonzentrationen im Dorsalhorn des Rückenmarks (L4-L5) überprüft. Die Konzentration von Sphingosin, S1P, Sphingalin und Sphingalin-1-P waren eine Stunde nach Zymosaningektion deutlich gesteigert, fielen nach zwei Stunden wieder ab und blieben über den Zeitraum von 48 Stunden in diesem Konzentrationsbereich (Abbildung 3.15) bestehen.

Die periphere nozizeptive Stimulation mit Zymosan A verursachte im Dorsalhorn des Rückenmarks von Wildtyp Mäusen eine kurzzeitige Erhöhung der S1P und Sphinganin-1-P-Konzentration. Bereits zwei Stunden nach i.pl. Injektion von Zymosan A ähnelten die Konzentrationen der phosphorylierten Sphingolipide wieder denen der unstimulierten Kontrolle. Die eine Stunde nach Zymosaninjektion auftretende Reduktion der S1P-Konzentration ist vermutlich auf die durch S1P vermittelte negative Rückkopplung zurückzuführen. Das durch SPHK-1 gebildete und anschließend sezernierte S1P vermittelt durch Anbindung an die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> die Hemmung beider SPHKs.

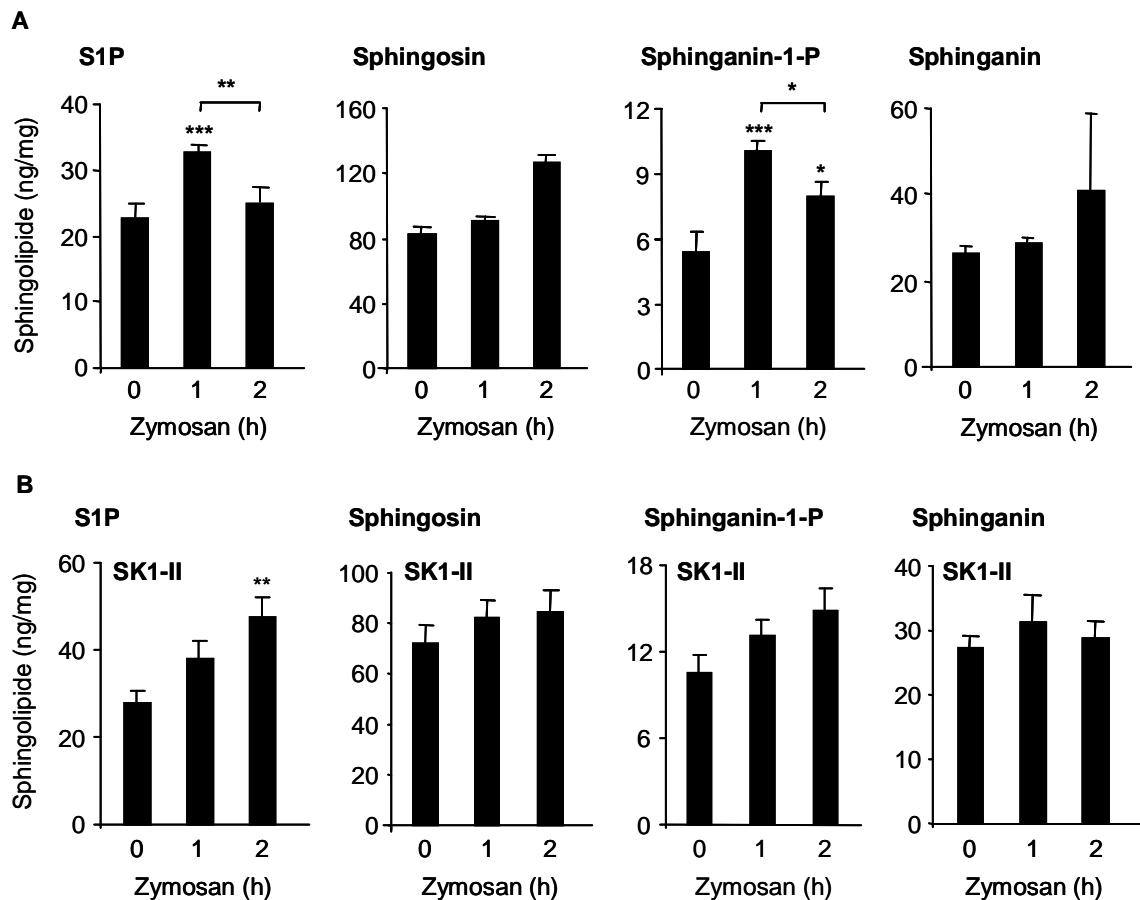


**Abbildung 3.15: Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.** Zymosan A (12,5 mg/ml) wurde adulten C57BL6-Wildtyp Mäusen intraplantar (i.pl.) in eine Hinterpfote injiziert, das Dorsalhorn zu den angegebenen Zeitpunkten aus dem Rückenmark präpariert und die Konzentrationen von Sphingosin, S1P, Sphinganin und Sphinganin-1-P mittels LC-MS/MS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 5 Messungen pro Zeitpunkt. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

### **3.2.4.2 Auswirkung des SPHK-1-Inhibitors SK1-II auf die Sphingolipidsynthese im Dorsalhorn nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan**

Um zu prüfen, welche SPHK für den 1 Stunde nach Injektion von Zymosan beobachteten Anstieg der S1P-Konzentration hauptverantwortlich ist, wurde die pharmakologische Hemmung des Isoenzym SPHK-1 in Anwesenheit beider SPHK Typen untersucht. Um den Effekt eines SPHK-1 spezifischen Inhibitors (SK1-II; 2-(*p*-Hydroxyanilino)-4-(*p*-chlorophenyl) thiazol) nach peripherer nozizeptiver Stimulation zu untersuchen, wurde 30 Minuten nach intrathekaler (i.th.) Gabe des SK1-II (4,27 µg/kg) Zymosan A (12,5 mg/ml) in beide Hinterpfoten von Wildtyp Mäusen intraplantar (i.pl.) injiziert. Nach ein- bzw. zweistündiger Inkubation mit Zymosan wurden die lumbalen Bereiche (L4-L5) des Rückenmarks entnommen, das Dorsalhorn separiert und die Sphingolipidkonzentrationen mittels LC-MS/MS bestimmt.

Der im Dorsalhorn des Rückenmarks von Wildtyp Mäusen eine Stunde nach intraplantarer Injektion von Zymosan A hervorgerufene Anstieg der S1P-Konzentration konnte durch SK1-II-Gabe gehemmt werden (Abbildung 3.16 B). Dies deutet darauf hin, dass der erhöhte S1P-Gehalt hauptsächlich durch die Aktivität der SPHK-1 zustande kommt. Die zwei Stunden nach Zymosan beobachtete Abnahme der S1P-Konzentration bleibt bei Hemmung der SPHK-1 aus, da das negativ rückkoppelnd wirkende S1P fehlt. Aus diesem Grund wird die Aktivität der SPHK-2 nach i.th. Injektion des SPHK-1 spezifischen Inhibitors zwei Stunden nach Zymosaninjektion nicht gehemmt und es kommt zu einer signifikanten Anhäufung des durch SPHK-2 gebildeten S1P (Abbildung 3.16 B).



**Abbildung 3.16:** Wirkung des SPHK-1 Inhibitors SK1-II auf die Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan. Mittels LC-MS/MS detektierte Konzentrationen von S1P, Sphingosin, Sphinganine-1-P und Sphinganine im Dorsalhorn (L4-L5) des Rückenmarks von adulten Balb/c Wildtyp Mäusen. A. Sphingolipidkonzentration eine bzw. zwei Stunden nach intraplantarer (i.pl.) Zymosaninjektion (12,5 mg/ml) in beide Hinterpfoten. B. SK1-II Inhibitor (4,27 µg/kg) oder ACSF wurden i.th. injiziert 30 Minuten vor i.pl. Zymosaninjektion (12,5 mg/ml) in beide Hinterpfoten. Sphingolipidkonzentration wurden eine bzw. zwei Stunden nach Zymosan gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 4-5 Tieren. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ .

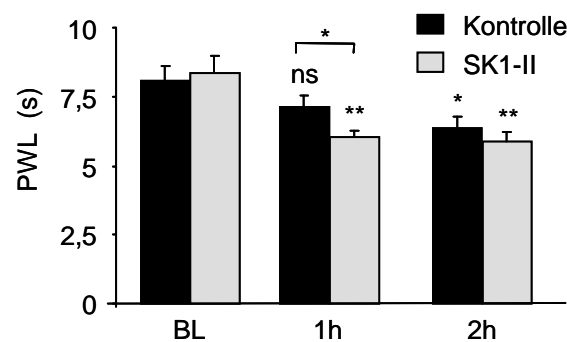
### 3.2.4.3 Auswirkung des SPHK-1-Inhibitors SK1-II auf die Zymosan induzierte thermale Hyperalgesie

Da die Hemmung der SPHK-1 durch intrathekale Injektion des SPHK-1-spezifischen Inhibitors SK1-II eine Akkumulation der S1P-Konzentration zwei Stunden nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan A bewirkt, stellte sich die Frage, ob das



durch SPHK-2 gebildete S1P einen Einfluss auf das nozizeptive Verhalten von Tieren ausübt. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der intrathekalen Injektion von SK1-II auf Balb/c Wildtyp Mäuse auf die Zymosan induzierte thermale Hyperalgesie untersucht. Eine intrathekale Applikation von SK1-II induzierte an der mit Zymosan behandelten Pfote nach einer Stunden eine deutliche Erhöhung des nozizeptiven Verhaltens im Vergleich zu Mäusen, die Vehikel als Kontrolle erhielten (Abbildung 3.17). Nach zwei-, drei- und vierständiger Zymosan Behandlung wurden keine Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt.

Dies bedeutet, dass das bei der Hemmung der SPHK-1 durch die Aktivität der SPHK-2 akkumulierte S1P keinen Einfluss auf das nozizeptive Verhalten der Mäuse hat.

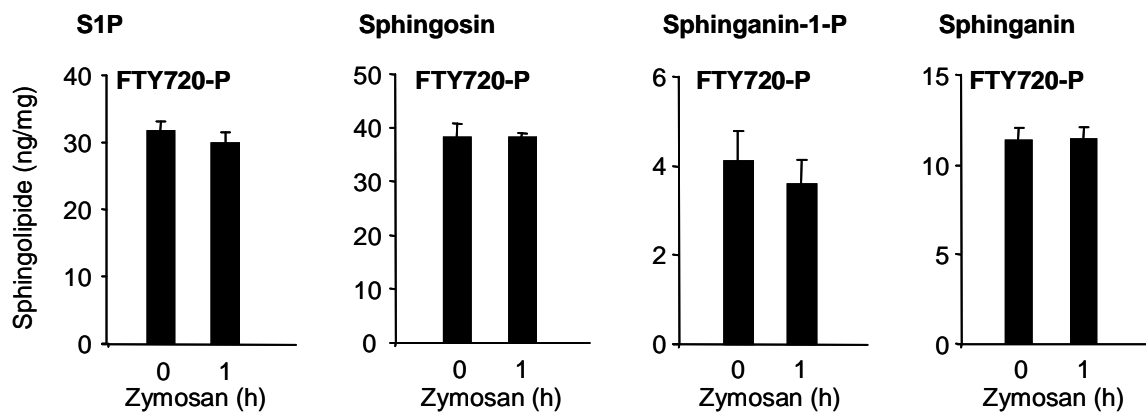


**Abbildung 3.17: Effekte der SPHK-1-Hemmung in der Zymosan induzierten, mechanischen Hyperalgesie.** Verhalten von Wildtyp Mäusen auf periphere nozizeptive Stimulation mit Zymosan. SK1-II Inhibitor (4,27 µg/kg) oder ACSF (Vehikel) wurden intrathekal (i.th.) injiziert 30 Minuten vor intraplantarer (i.pl.) Zymosanjektion von 20 µl Zymosan A (3 mg/ml) in eine Hinterpfote. Anschließend wurden die Unterseiten beider Hinterpfoten thermal stimuliert und die Schwelle bis zur nozizeptiven Reaktion bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote in Sekunden (PWL). Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 8 Tieren. Zweiseitiger t-TEST; \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  verglichen mit Kontrolltieren.

#### 3.2.4.4 Wirkung von FTY720-P auf die Sphingolipidkonzentrationen im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation

Vorarbeiten zeigten, dass intrathekal injiziertes FTY720 (3 µM) das nozizeptive Verhalten von Ratten im Formalin Test im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verringert [74]. Bei FTY720 handelt es sich um ein strukturelles Analogon zu S1P, welches *in vivo* zu FTY720-P phosphoryliert wird. FTY720-P ist ein hochaffiner Ligand der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> [18]. Um zu klären, ob FTY720-P

den Anstieg von S1P im Rückenmark eine Stunde nach nozizeptiver Stimulation hemmt, wurde 10 Minuten nach intrathekaler Gabe von FTY720-P (3  $\mu$ M) Zymosan A (12,5 mg/ml) in beide Hinterpfoten von Wildtyp-Mäusen intraplantar (i.pl.) injiziert. Nach einstündiger Inkubation mit Zymosan A wurden lumbale Bereiche (L4-L5) des Rückenmarks entnommen, das Dorsalhorn präpariert und die Sphingolipidkonzentrationen mittels LC/MS-MS bestimmt. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, kommt es nach i.th. Injektion von FTY720-P zu keiner Änderung des Sphingolipidgehalts nach nozizeptiver Stimulation mit Zymosan. FTY720-P hemmt demnach die durch SPHK-1 verursachte Erhöhung der S1P-Konzentration. Diese Hemmung der SPHK-1 wird vermutlich über die durch FTY720-P-vermittelte Aktivierung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors vermittelt, was nachweislich zu einer Hemmung der SPHK-1 führt (Kapitel 3.2.3.5).

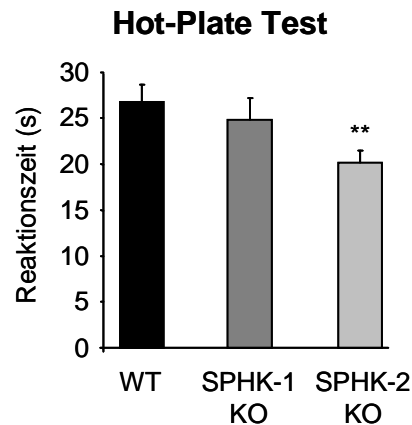


**Abbildung 3.18: Wirkung von FTY720-P auf die Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.** Mittels LC-MS/MS detektierte Konzentrationen von S1P, Sphingosin, Sphinganin-1-P und Sphinganin im Dorsalhorn (L4-L5) des Rückenmarks von adulten Balb/c Wildtyp Mäusen. FTY720-P (3  $\mu$ M) oder ACSF wurden i.th. injiziert 10 Minuten vor i.pl. Zymosanjektion (12,5 mg/ml) in beide Hinterpfoten. Sphingolipidkonzentration wurden eine Stunde nach Zymosanjektion gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte+ SEM von 4 Tieren.

### 3.2.4.5 Besonderheiten in der nozizeptiven Verarbeitung SPHK-1 und -2-defizienter Mäuse

Zur Detektion thermaler Akutschmerzen von SPHK-1 und -2 defizienten Mäusen wurde der Hot-Plate Test durchgeführt. Die Mäuse wurden auf eine 52 °C warme Platte gesetzt und es wurde die Zeit bis zum Einsetzen des Fluchtreflexes bestimmt. Der Hot-Plate Test zeigte keine Unterschiede zwischen SPHK-1-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren.

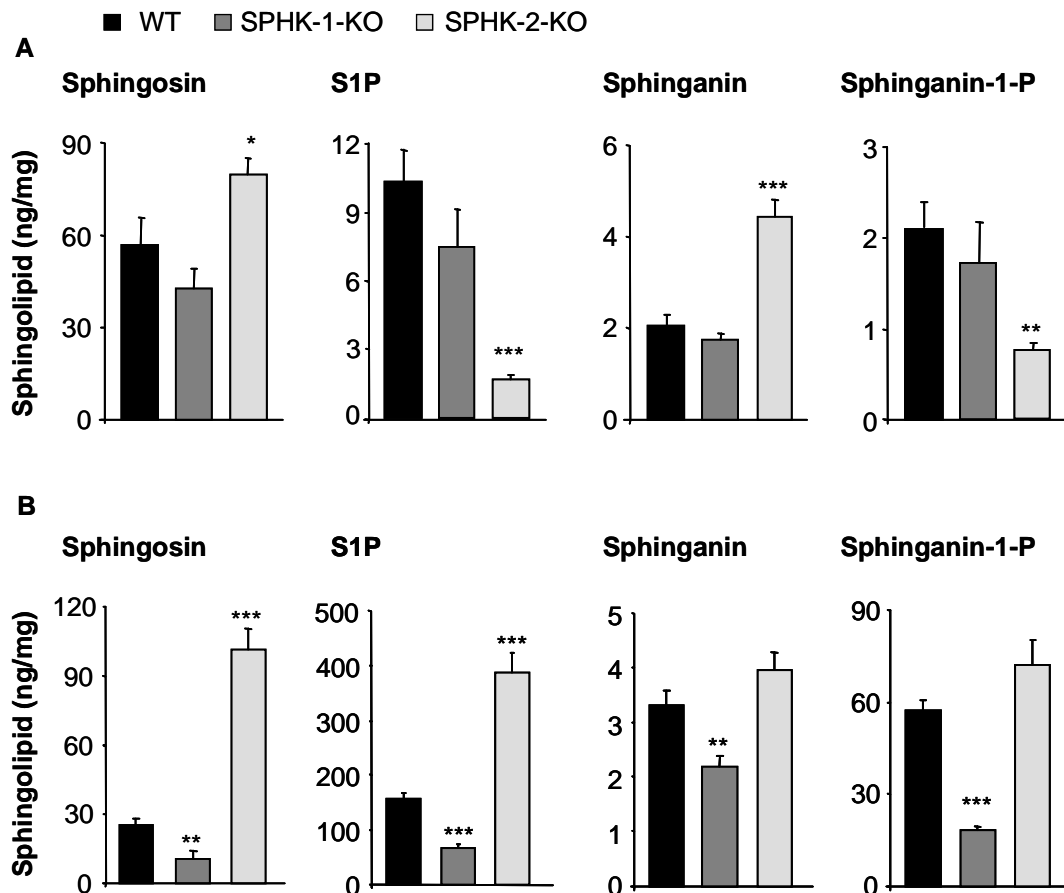
Die SPHK-2 Knockout Mäuse zeigten, in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen [70], eine signifikant reduzierte Schmerzschwelle (Abbildung 3.19). Dies steht im Gegensatz zu der in Kapitel 3.2.4.3 gemachten Feststellung, dass durch SPHK-2 gebildetes intrazelluläres S1P keinen Einfluss auf die akute Schmerzverarbeitung ausübt.



**Abbildung 3.19: Schmerzverhalten SPHK-1- und 2-defizienter Mäuse in einem Modell für akuten Schmerz. Hot-Plate Test.** Die Mäuse wurden auf eine 52 °C heiße Platte gesetzt und die Zeit bis zum Einsetzen des nozizeptiven Verhaltens gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 5-9 Messungen. Einseitiger t-TEST; \*\*  $P < 0,01$ .

Bei Betrachtung der Sphingolipidkonzentrationen in den lumbalen Bereichen (L4-L5) adulten Rückenmarks fällt auf, dass sich die Sphingolipid-Werte SPHK-1-defizienter Mäuse nicht signifikant von denen der Wildtyp Tiere unterscheiden (Abbildung 3.20 A), während im Rückenmark SPHK-2-defizienter Mäuse eine signifikante Erhöhung von Sphingosin und Sphingonin und eine signifikante Reduktion von S1P- und Sphingonin-1-P stattfand. Diese Beobachtungen stimmen auch mit den Analysen der akuten Rückenmarksschnitte überein. Diese Daten deuten darauf hin, dass nicht, wie zuvor angenommen [70], die Reduktion von endogenem S1P, sondern der erhöhte Sphingosin Gehalt im Rückenmark SPHK-2-defizienter Mäuse für die pronozizeptiven Effekte verantwortlich sein könnte. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Sphingosin die Fusion synaptischer Vesikel erhöhen kann [92]. Die erhöhte Sphingosinkonzentration in den SPHK-2 Knockout Mäusen könnte demnach die Ausschüttung der Neurotransmitter steigern und so die Schmerzverarbeitung fördern.

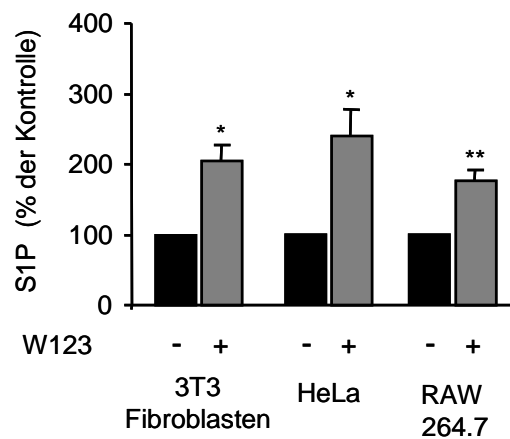
Desweiteren waren im Blutplasma SPHK-1-defizienter Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen die Konzentrationen von Sphingosin, S1P, Sphinganin und Sphinganin-1-P signifikant reduziert (Abbildung 3.20 B), wohingegen im Blutplasma SPHK-2-defizienter Mäuse eine signifikante Steigerung der Sphingosin- und S1P-Konzentrationen festgestellt werden konnte. Die hohe Konzentration von S1P im Blut trägt ebenfalls dazu bei, dass SPHK Knockout Mäuse nicht für Untersuchungen am Schmerzmodell der Zymosan-induzierten Hyperalgesie geeignet sind, da S1P bei Entzündungsreaktionen und der peripheren Schmerzverarbeitung eine pronozizeptive Rolle spielt (persönliche Mitteilung von Professor Michaela Kress) [20, 93, 94]. Daher ist es nicht möglich, die Ergebnisse inflammatorischer Schmerzmodelle unter Einsatz von SPHK Knockout Mäusen spezifischen S1P Effekten zuzuordnen.



**Abbildung 3.20: Spingolipidkonzentration in SPHK-1 und -2-defizienten Mäusen. A.** Konzentrationen von Sphingosin, S1P, Sphinganin und Sphinganin-1-P im Rückenmark adulter Balb/c Wildtyp Mäuse, SPHK-1 und -2-defizienter Mäuse, detektiert mittels LC-MS/MS. **B.** Konzentrationen von Sphingosin, S1P, Sphinganin und Sphinganin-1-P im Blutplasma, detektiert mittels LC-MS/MS. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 7 Tieren. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$  im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

### 3.2.4.6 Negative Rückkopplung in nicht-neuronalen Zelllinien

Als nächstes wurde geprüft, ob es sich bei der negativen Rückkopplung um ein rückenmarksspezifisches Phänomen handelt oder einen generellen Mechanismus darstellt. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien für zwei Stunden mit dem S1P<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten W123 (die Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren ist nicht bekannt) inkubiert. Anschließend wurde bestimmt, ob die Blockade der S1P-Rezeptoren die S1P-Konzentrationen der Zelllinien beeinflusst. Tatsächlich erhöhte die Behandlung mit dem S1P-Rezeptor-Antagonisten den S1P-Gehalt in murinen 3T3 Fibroblasten, murinen RAW264.7 Makrophagen und der humanen Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa (Abbildung 3.21). Dieses Ergebniss lässt vermuten, dass es sich bei der im Rückenmark beobachteten negativen Rückkopplung um einen allgemeinen regulatorischen Mechanismus handelt.



**Abbildung 3.21: Wirkung eines S1P-Rezeptor-Antagonisten auf die S1P-Konzentration in nicht-neuronalen Zelllinien.** Mittels LC-MS/MS detektierte Konzentrationen von S1P in Zelllysaten von murinen 3T3 Fibroblasten, murinen RAW264.7 Makrophagen und der humanen Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa. Die Zellen wurden für 2 h mit oder ohne Zugabe des S1P-Rezeptor-Antagonisten W123 (7  $\mu$ M) inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte+ SEM von 3 Versuchen. Zweiseitiger t-TEST; \* P  $\leq$  0,05, \*\* P  $\leq$  0,01.

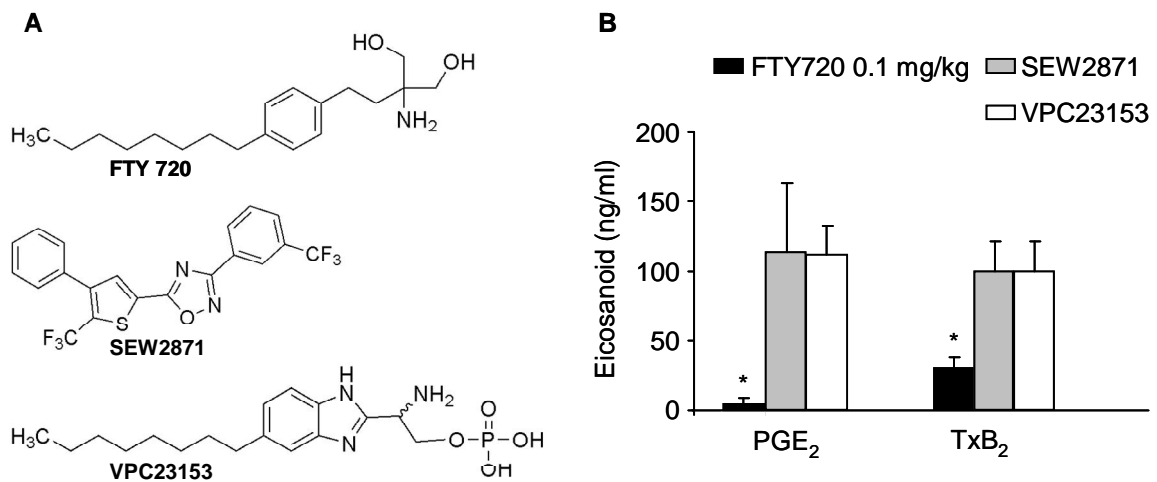
### 3.3 Nicht-Rezeptorvermittelte Effekte von FTY720 und dessen Analoga

#### 3.3.1 Wirkung von FTY720 auf Eicosanoidplasmakonzentrationen

Mit Hilfe von Untersuchungen an bekannten und neu synthetisierten S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten sollten Hinweise für eine neuartige, pharmakologische Schmerztherapie erarbeitet werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind bereits eine Vielzahl verschiedener S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten entwickelt und charakterisiert worden. Der bekannteste und wohl am besten untersuchte S1P Agonist ist FTY720.

Wie bereits in Kapitel 3.2.4.5 beschrieben, verringert intrathekal injiziertes FTY720 (20 µl einer 3 µM-Lösung) das nozizeptive Verhalten von Ratten im Formalin Test im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant [74]. Neben dem antinozizeptiven Effekt wurde ein inhibitorischer Effekt von FTY720 auf die Sekretion von Eicosanoiden im Blutplasma nachgewiesen [70, 74]. Nach intraperitonealer Injektion von 0,01 mg/kg FTY720 wurde eine signifikante Reduktion der Konzentrationen von PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), gemessen als dessen stabiles Metabolit TxB<sub>2</sub>, im Blutplasma von Ratten nachgewiesen.

Im Blutplasma von Mäusen reduzierte intraperitoneal gegebenes 0,1 mg/kg FTY720 die Konzentration von PGE<sub>2</sub> und TxB<sub>2</sub> ebenfalls signifikant (Abbildung 3.22). Neben FTY720 wurde der Effekt zweier S1P-Rezeptor selektiver Agonisten auf die Plasmakonzentration von PGE<sub>2</sub> getestet. Sowohl der selektive S1P<sub>1</sub> Agonist SEW2871 als auch VPC23153, ein Agonist für S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion von PGE<sub>2</sub> und TxB<sub>2</sub>.



**Abbildung 3.22: Einfluss von S1P-Rezeptor-Agonisten auf die Prostanoidsynthese. A. Strukturen bekannter S1P-Rezeptor-Agonisten. SEW2871, (5-(4-Phenyl-5-trifluoromethylthiophen-2-yl)-3-(3-trifluoromethylphenyl)-(1,2,4)-oxadiazol); VPC23153, (R)-Phosphorsäure mono-[2-amino-2-(6-octyl-1H-benzimidazol-2-yl)-ethyl] ester; FTY720, 2-amino-2-(2-(4-octylphenyl) ethyl)-1,3-propanediol hydrochlorid. B. PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Blutplasma adulter Mäuse eine Stunde nach intraperitonealer Gabe von 0,1 mg/kg FTY720, 3,25 mg/kg SEW2871 und 0,92 mg/kg VPC23153. Gezeigt sind die Mittelwerte von 6 Messungen + SEM in Prozent der Kontrolle. Zweiseitiger t-TEST; \* P ≤ 0,05.**

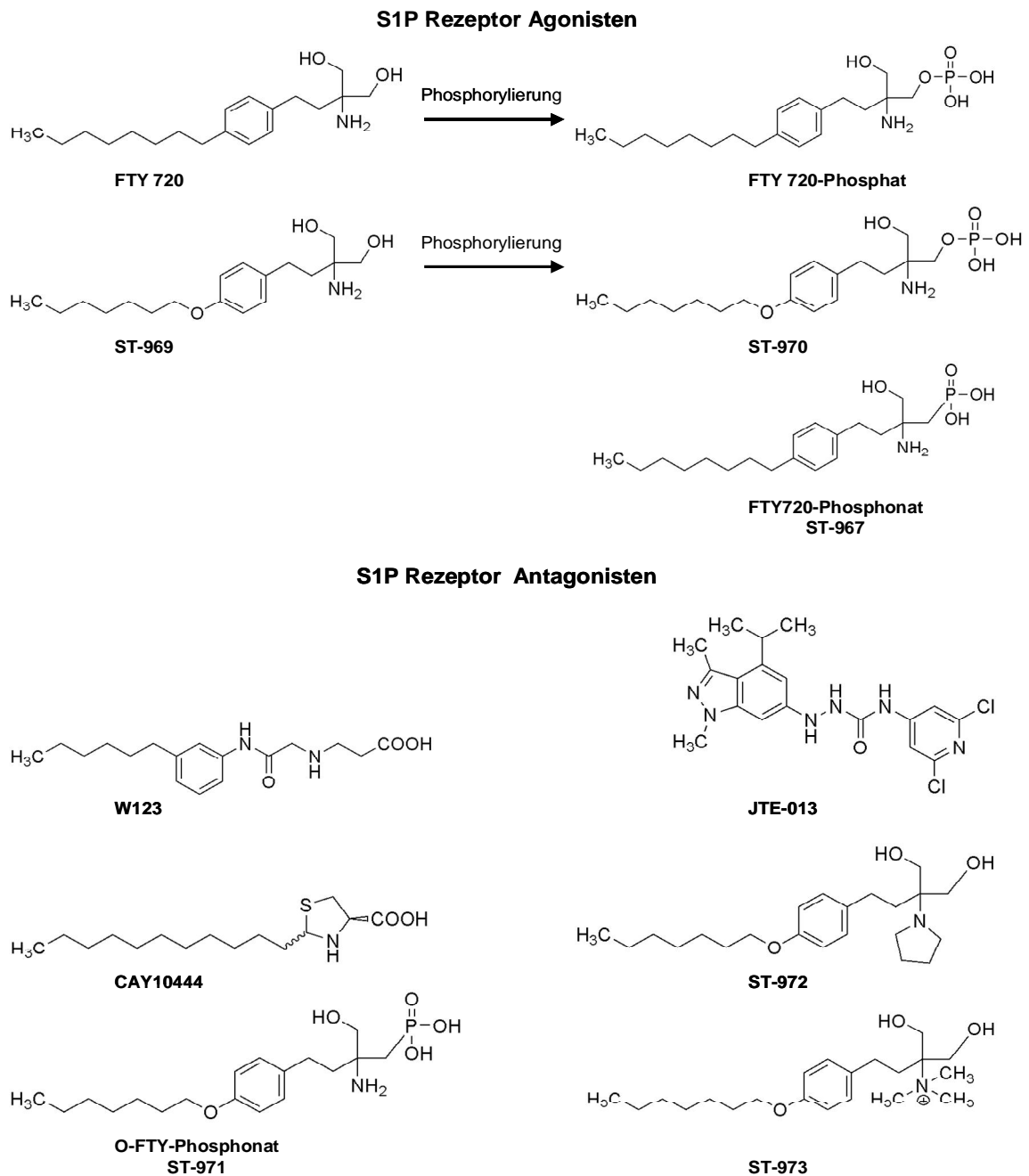
Eicosanoidmetabolite spielen in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Ereignissen eine wichtige Rolle, die Schmerzverarbeitung eingeschlossen. So ist bekannt, dass eine Hemmung der Prostanoidsynthese im Rückenmark eine antinozizeptive Wirkung vermittelt [75]. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung der Prostanoidsynthese zu der antinozizeptiven Wirkung von FTY720 beiträgt. Darüber hinaus ist bekannt, dass FTY720 die cAMP-Synthese verringert [55]. FTY720 vereint demnach den cAMP-reduzierenden Effekt der Opioide und den Prostaglandin-inhibierenden Effekt der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), welche die beiden weltweit am häufigsten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzten Arzneimittel-Gruppen darstellen. Aus diesem Grund ist die Herstellung und Erforschung neuer S1P- Rezeptor subtypspezifische Agonisten oder Antagonisten, welche hemmend auf die Synthese von Prostaglandinen und cAMP wirken können, von großem Interesse für die Entwicklung innovativer Therapeutika zur Behandlung chronischer Schmerzen.

### 3.3.2 Charakterisierung der Wirkung von FTY720-Analoga auf die Eicosanoidsynthese

Zur vergleichenden Analyse neu synthetisierter potentieller Agonisten und Antagonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt), wurden bereits bekannte und umfassend beschriebene S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten herangezogen. Aus der Literatur bekannte Agonisten, die bei den folgenden Untersuchungen zum Einsatz kamen, waren SEW2871, VPC23153, FTY720 und FTY720-P. FTY720 stellt ein strukturelles Analogon zu S1P dar [55, 56] und kann *in vivo* durch SPHK-2 zu FTY720-P phosphoryliert werden. Das Phosphatestermetabolit von FTY720 (FTY720-P) ist ein hochaffiner Ligand der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> [18]. Im Vergleich zu diesen bereits gut charakterisierten Agonisten wurden die neu synthetisierten potentiellen Agonisten ST-967, ST-969 und ST-970 getestet. ST-967 ist ein Phosphonat-Analogon von FTY720. ST-969 stellt die unphosphorylierte Form von ST-970 dar.

Neben den S1P-Rezeptor-aktivierenden Substanzen wurden auch Antagonisten in den folgenden Untersuchungen eingesetzt. Zu den gut charakterisierten S1P-Rezeptor-Antagonisten gehört der S1P<sub>2</sub> Antagonist JTE-013, der S1P<sub>1</sub> Antagonist W123 mit unbekannter Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren [65] und der S1P<sub>3</sub> selektive Antagonist CAY10444. ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 sind neu synthetisierte FTY720-Analoga, welche auf ihre antagonistische Wirkung getestet werden sollten.

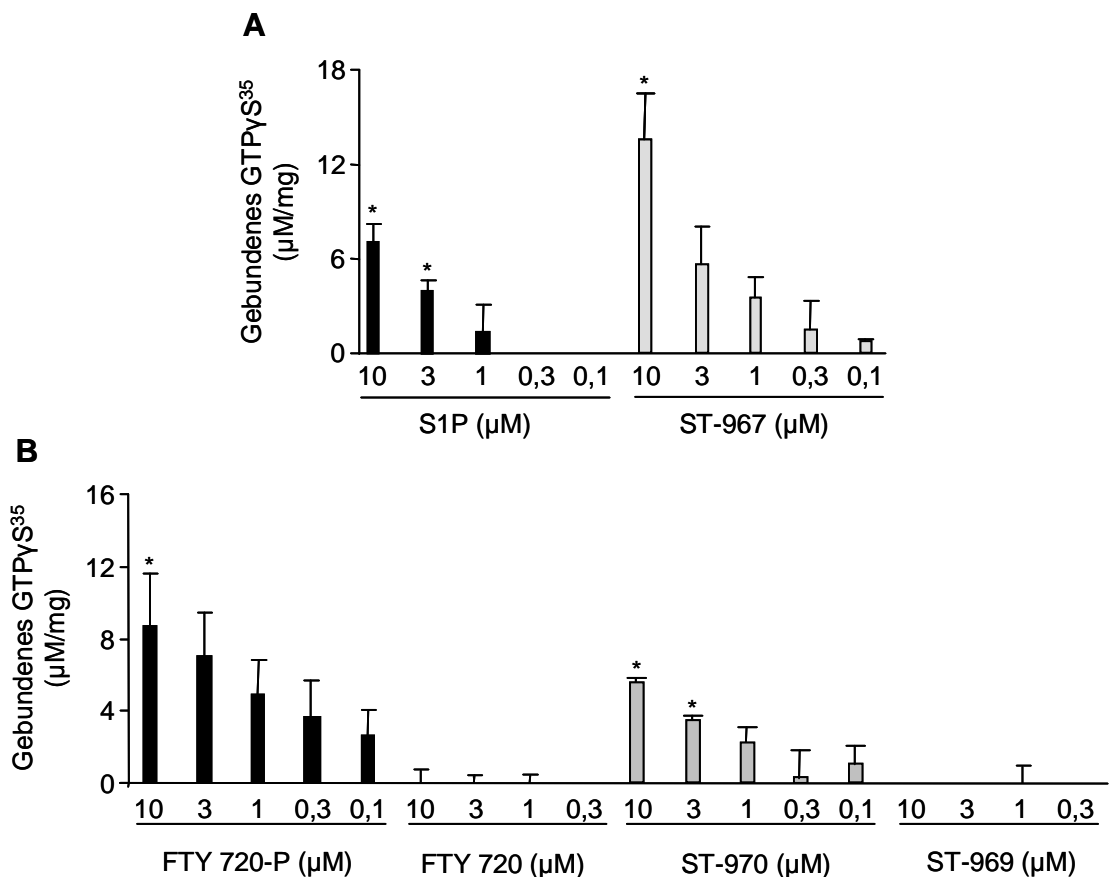




**Abbildung 3.23: Strukturen bekannter und neu synthetisierter S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.** FTY720 (2-Amino-2-(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propandiol-hydrochlorid) wird *in vivo* zu FTY720-P phosphoryliert, ST-967 (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-4-(4-octylphenyl)butyl phosphonsäure), ST-969 (2-Amino-2-(4-(heptyloxy)phenethyl)propan-1,3-diol), ST-970 (2-Amino-4-(4-(heptyloxy)phenyl)-2-(hydroxymethyl)butyl-dihydrogen-phosphat). W123 (3-[[3-hexyl-phenylcarbamoyl]-methyl]-amino}-propionsäure), JTE-013 [1,3-Dimethyl-4-(2-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-4-(3,5-dichloro-4-pyridinyl)-semicarbazid, CAY10444 (2-undecylthiazolidin-4-carbonsäure), ST-971 (2-Amino-4-(4-(heptyloxy)phenyl)-2-(hydroxymethyl)butyl-phosphonsäure), ST-972 (2-(4-(Heptyloxy)phenethyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)propan-1,3-diol) und ST-973 (1-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-N,N,N-trimethyl-4-(4-octylphenyl)butan-2-ammonium iodide).

### 3.3.3 Rezeptoraktivierung potentieller S1P-Rezeptor-Agonisten

Zunächst wurden die neu synthetisierten FTY720-Analoga auf die Fähigkeit hin getestet, Rezeptoren zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurden  $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}$  Bindungsstudien unter Verwendung von Membranpreparationen von Gehirnen adulter Mäuse durchgeführt. Wie in Abbildung 3.24 A dargestellt, vermittelte S1P in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante  $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}$  Anbindung an die membranständige G-Protein-Rezeptoren von 7  $\mu\text{M}/\text{mg}$ . Eine signifikante G-Proteinaktivierung konnte bis hin zu physiologischen Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  S1P detektiert werden. Niedrigere Konzentrationen von S1P zeigten keinen G-Proteinaktivierenden Effekt mehr. Im Vergleich zu S1P vermittelte das neu synthetisierte FTY720-Analogon ST-967 eine wesentlich höhere  $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}$  Bindung. Die G-Proteinaktivierung durch das FTY720-Phosphonat ST-967 konnte bis in den Konzentrationsbereich von 100 nM nachgewiesen werden. Bei vergleichender Analyse der unphosphorylierten Substanzen und deren Phosphatester Metabolite FTY720-P und ST-970 zeigte sich, dass lediglich die phosphorylierten Formen eine G-Protein-Aktivierung vermitteln konnten (Abbildung 3.24 B). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung für die agonistische Wirkung ausschlaggebend ist. Sowohl FTY720-P als auch ST-970 vermittelten eine  $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}$  Anbindung in Konzentrationen von 10 bis 0,1  $\mu\text{M}$ , wobei FTY720-P die G-Proteine stärker aktivierte als ST-970.

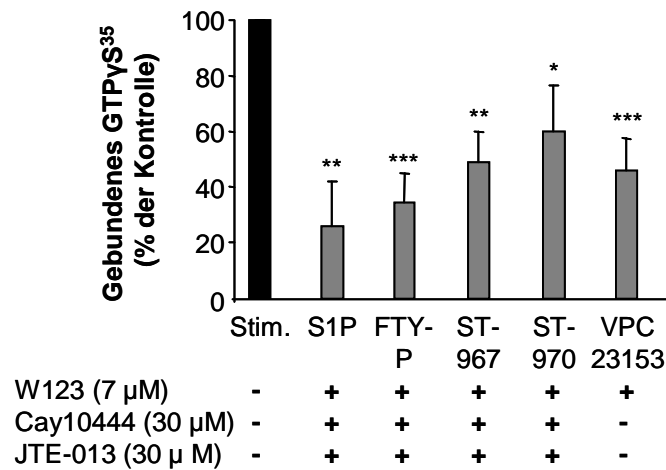


**Abbildung 3.24: GTP $\gamma$ S<sup>35</sup>-Bindungsstudie mit S1P-Rezeptor-Agonisten.** A. Konzentrationsabhängige G-Proteinaktivierung durch S1P und ST-967. B. Konzentrationsabhängige G-Proteinaktivierung durch FTY720-P, ST-970 und deren unphosphorylierten Derivaten FTY720 und ST-969. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3-4 Messungen. Die Signifikanz bezieht sich auf die niedrigste Konzentration. Einseitiger t-TEST; \* P  $\leq$  0,05.

### 3.3.4 S1P-Rezeptoraktivierung potentieller Agonisten

Zur Untersuchung der Affinität der neu synthetisierten FTY720-Analoga zu S1P-Rezeptoren, wurden die Membranproteine mit drei spezifischen S1P-Rezeptor-Antagonisten vorinkubiert und die verbleibende Aktivierung der G-Protein durch die einzelnen Substanzen bestimmt. Um deren Wirkung an möglichst vielen S1P-Rezeptoren zu antagonisieren, wurde eine Mischung aus dem S1P<sub>1</sub> Antagonisten W123 mit unbekannter Selektivität zu den anderen S1P-Rezeptoren, dem S1P<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist Cay10444 und dem S1P<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist JTE-013 eingesetzt. Diese Antagonistenmischung reduzierte die durch S1P und FTY720-P vermittelte GTP $\gamma$ S<sup>35</sup>Anbindung um >60 % (Abbildung 3.25). Durch die S1P Antagonistenmischung konnte

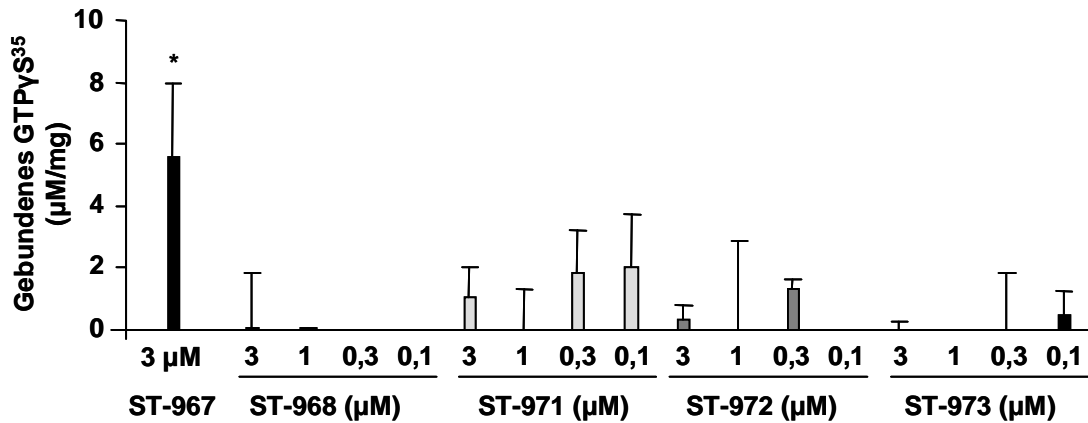
ca. die Hälfte der mittels ST-967 stimulierten G-Proteinaktivierung verhindert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich beim Einsatz des S1P<sub>1/3/4/5</sub> Agonisten VPC23153. Das FTY720 Analog ST-970 konnte noch rund 60 % seines G-Proteinaktivierenden Effekts ausüben. Die neu hergestellten FTY720-Analoga aktivieren demnach S1P-Rezeptoren. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die FTY720-Analoga ST-967 und ST-970 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, was durch S1P-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden kann. ST-967 weist dabei eine stärkere S1P-Rezeptoraffinität auf als ST-970. Lediglich die phosphorylierten Formen der getesteten Substanzen konnten die G-Protein-Aktivierung vermitteln. Die Phosphorylierung ist demnach für die agonistische Wirkung ausschlaggebend.



**Abbildung 3.25: Affinität neu synthetisierter FTY720-Analoga zu S1P-Rezeptoren.** Inhibierung der durch die S1P-Rezeptor-Agonisten induzierten G-Proteinaktivierung durch einen S1P<sub>1/2/3</sub>-Rezeptorantagonisten-Mix. Membranproteine wurden mit 30 μM JTE-013, 7 μM W123 und 30 μM Cay10444 15 Minuten vorinkubiert bevor 10 μM S1P, FTY720-P, ST-967, ST-970 oder 3 μM VPC23153 zugegeben wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3 Messungen. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ .

### 3.3.5 Rezeptoraktivierung durch potentielle S1P-Rezeptor-Antagonisten

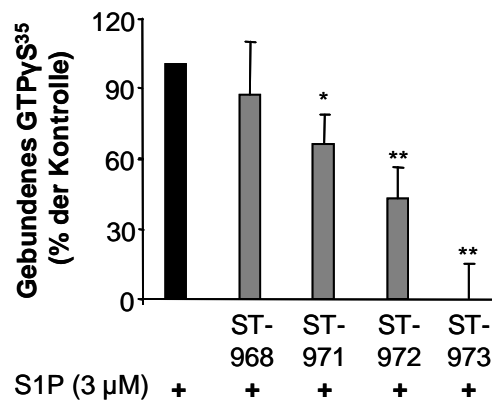
Als nächstes wurden die potentiellen G-Protein Rezeptor-Antagonisten auf ihre Fähigkeit hin getestet, G-Proteine zu aktivieren. Wie in Abbildung 3.26 zu erkennen, vermittelten die Substanzen ST-968, ST-971, ST972 und ST-973 keine signifikante GTPγS<sup>35</sup> Anbindung.



**Abbildung 3.26: GTP $\gamma$ S<sup>35</sup>-Bindungsstudie mit S1P-Rezeptor-Antagonisten.** Die Aktivierung von G-Proteinen durch ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 wurde im Konzentrationsbereich von 3  $\mu$ M bis hin zu 0,1  $\mu$ M bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3 Messungen. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ .

Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die FTY720-Analoga ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 die Fähigkeit besitzen, einen antagonistischen Effekt auf S1P-Rezeptoren auszuüben. Zu diesem Zweck wurden die Membranproteine mit 30  $\mu$ M der einzelnen Antagonisten vorinkubiert und im Anschluss die verbleibende durch 3  $\mu$ M S1P vermittelte GTP $\gamma$ S<sup>35</sup> Anbindung bestimmt. In Kombination mit ST-968 induzierte S1P eine normale G-Proteinaktivierung, was einen antagonistischen Effekt dieser Substanz ausschließt. ST-971, ST-972 und ST-973 senkten die S1P vermittelte GTP $\gamma$ S<sup>35</sup> Anbindung signifikant, wobei ST-973 die S1P stimulierte G-Proteinaktivierung komplett hemmte (Abbildung 3.27).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die FTY720-Analoga ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 keine agonistische Wirkung auf Rezeptoren ausüben. Mit Ausnahme von ST-968 inhibierten alle getesteten Substanzen die durch S1P induzierte G-Proteinaktivierung. ST-968 ist demnach kein S1P-Rezeptor-Antagonist, während es sich bei ST-971, ST-972 und ST-973 um S1P-Rezeptor-Antagonisten handelt.



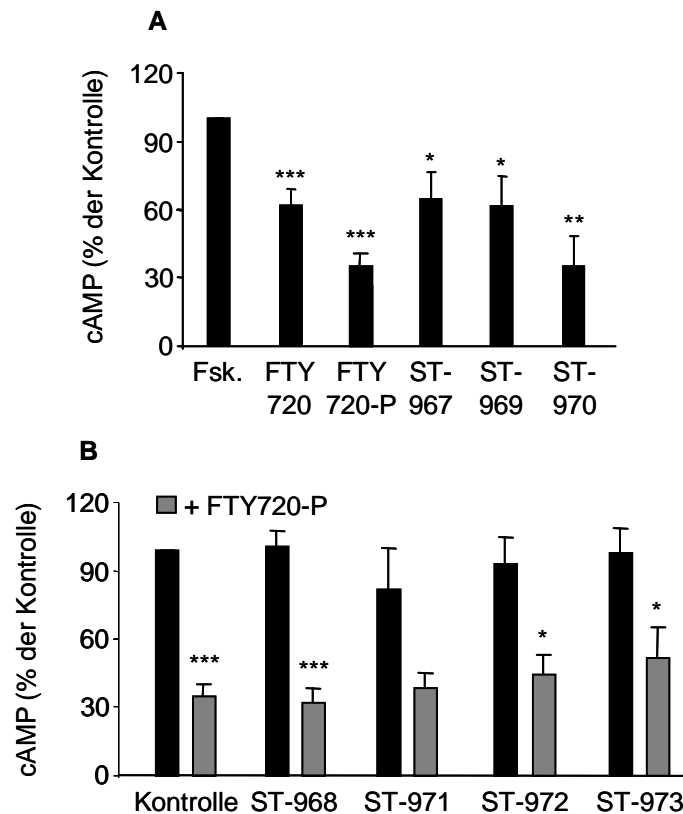
**Abbildung 3.27: Antagonistische Effekte neu synthetisierter FTY720-Analoga.** Inhibierung der S1P induzierten G-Proteinaktivierung durch die neu synthetisierten Antagonisten. Membranproteine wurden mit 30 μM ST-968, ST-971, ST-972 oder ST-973 für 15 Minuten vorinkubiert bevor die Aktivierung durch 3 μM S1P stimuliert wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3 Messungen. Einseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

### 3.3.6 Wirkung der FTY720-Analoga auf die cAMP-Synthese primärer embryonaler Rückenmarkszellen

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben hemmt S1P die Synthese von cAMP mittels Aktivierung inhibitorischer G-Proteine. Die Effekte der FTY720-Analoga auf die cAMP-Synthese in primären embryonalen Rückenmarkszellen sollten ebenfalls untersucht werden. Alle getesteten S1P-Rezeptor-Agonisten inhibierten signifikant die Forskolin-stimulierte cAMP-Synthese in Rückenmarkskulturen (Abbildung 3.28). Auffällig ist, dass die unphosphorylierten Substanzen FTY720 und ST-969 eine geringere inhibitorische Wirkung zeigen als deren bereits in phosphoryliertem Zustand eingesetzte Analoga FTY720-P und ST-970. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass FTY720 und ST-969 zunächst in den Zellen phosphoryliert werden müssen bevor sie an S1P-Rezeptoren binden und damit die cAMP-Synthese hemmen können.

Alle potentiellen S1P-Rezeptor-Antagonisten wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Synthese in Rückenmarkskulturen auf. Bei gleichzeitiger Gabe mit FTY720-P war ST-968 nicht in der Lage, die FTY720-P vermittelte Hemmung der cAMP-Synthese zu revidieren. Auch die anderen Antagonisten ST-971, ST-972 und ST-973 konnten den Effekt von FTY720-P nicht signifikant vermindern. Dennoch war eine leichte antagonistische Tendenz zu erkennen, die bei ST-973 am stärksten ausgeprägt war.

Die FTY720-Analoga ST-968, ST-971, ST-972 und ST-973 wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Synthese in Rückenmarkskulturen auf und konnten die durch FTY720-P verursachte Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentration nicht inhibieren. Da es sich bei den neu synthetisierten Substanzen vermutlich um kompetitive Antagonisten handelt, könnte deren Effekt erst bei Einsatz höherer Konzentrationen zum Tragen kommen.



**Abbildung 3.28: Inhibierung der cAMP-Synthese in primären embryonalen Rückenmarkszellen durch FTY720-Analoga.** A. Gemischtkulturen embryonaler Rückenmarkszellen wurden 5 Minuten mit 100  $\mu$ M IBMX vorinkubiert. Die Stimulation der cAMP-Synthese erfolgte durch 15 minütige Inkubation mit Forskolin unter zeitgleicher Gabe von 1  $\mu$ M der FTY720-Analoga. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3-4 Messungen. B. Gemischtkulturen embryonaler Rückenmarkszellen wurden mit 100  $\mu$ M IBMX vorinkubiert. Die Stimulation der cAMP-Synthese erfolgte durch 15 minütige Inkubation mit Forskolin unter zeitgleicher Gabe von 1  $\mu$ M FTY720-P und 1  $\mu$ M der jeweiligen Antagonisten. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 6-11 Messungen. Die Signifikanz bezieht sich auf die Proben ohne FTY720. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,002$ .

### 3.3.7 Effekte der FTY720-Analoga auf die Eicosanoidsynthese *in vitro*

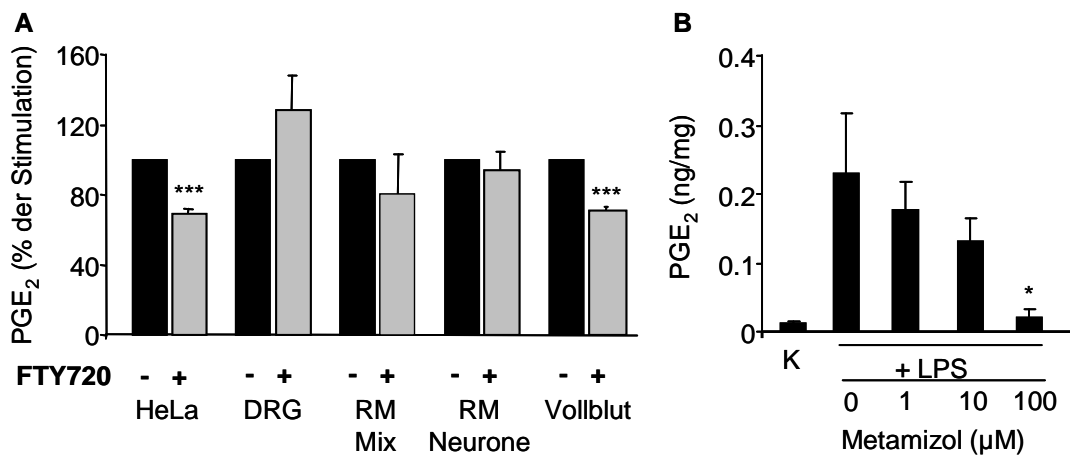
#### 3.3.7.1 Einfluss von FTY720 auf die Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese

Zur näheren Analyse der Wirkung von FTY720 und dessen Analoga auf die Synthese von Prostaglandinen wurde eine geeignete Zelllinie zur Durchführung von *in vitro* Versuchen gesucht. FTY720 rief in aus Dorsalwurzelganglien adulter Mäuse isolierten Neuronen (DRGs) sowie in Gemischt- (Mix) und neuronenangereicherte Kulturen embryonaler Rückenmarkszellen keine Veränderung der TNF $\alpha$ /A23107 stimulierten PGE<sub>2</sub>-Konzentration hervor (Abbildung 3.29 A).

Zur Prüfung der Integrität der embryonalen Rückenmarkskulturen wurden diese mit LPS und verschiedenen Konzentrationen an Metamizol, einem potenten analgetischen und antipyretischen Arzneimittel (freundlicherweise von Sanofi-Aventis, Frankfurt zur Verfügung gestellt) stimuliert. Metamizol hemmt *in vitro* [95, 96] und *in vivo* [97, 98] Cyclooxygenasen, die Arachidonsäure zu PGH<sub>2</sub> umformen, welches anschließend durch verschiedene terminal Synthesen z.B. zu Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) umgesetzt wird. Die Detektion der PGE<sub>2</sub>-Konzentration mittels LC-MS/MS ergab eine dosisabhängige Hemmung der PGE<sub>2</sub>-synthese durch Metamizol in den LPS-stimulierten embryonalen Rückenmarkszellen, publiziert in Linke et al. [85] (Abbildung 3.29 B).

FTY720 senkte die A23107-stimulierte PGE<sub>2</sub> Freisetzung aus HeLa-Zellen signifikant ab. Eine signifikante Abnahme des PGE<sub>2</sub>-Gehalts konnte ebenfalls bei FTY720-Behandlung LPS-stimulierter Blutzellen festgestellt werden. Der Vollbluttest wurde als geeignetes *in vitro* Model zur näheren Analyse der Effekte von FTY720 und dessen Analoga auf die Prostaglandinsynthese ausgewählt.





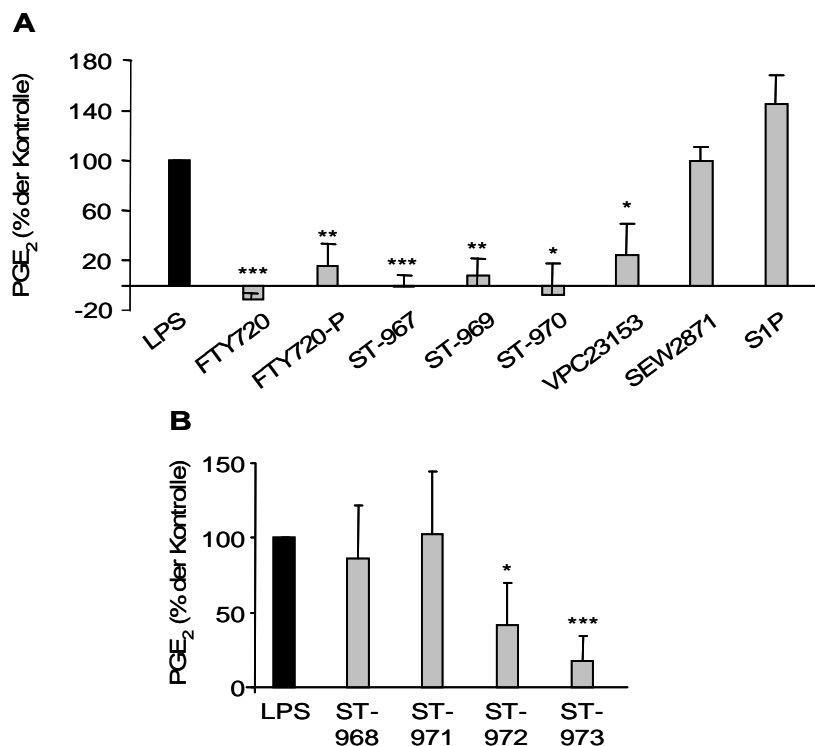
**Abbildung 3.29: Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentrationen in verschiedenen Zellkultur-Systemen.** A. HeLa-Zellen wurden 15 Minuten mit oder ohne 1 µM FTY720 inkubiert, bevor 2 µM A23187 für 2 h zugegeben wurde. DRG Neurone von adulten Mäusen, sowie Gemischt- (Mix) und neuronengereicherte Kulturen embryonaler Rückenmarkszellen wurden 15 h mit 50 ng/ml TNF-α inkubiert. 1 µM FTY720 wurde 15 Minuten vor Beginn der zweistündigen Stimulation mit 2 µM A23187 gegeben. Frisch heparinisiertes murines Blut wurde für 24 h mit 100 µg/ml LPS und gleichzeitiger Gabe von 1 µM FTY720 inkubiert und die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Blutplasma bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 3-5 Messungen. Zweiseitiger t-TEST; \*\*\* P ≤ 0,002 verglichen mit FTY720-unbehandelten Zellen. B. Gemischtkulturen embryonaler Rückenmarkszellen wurden für 24 h mit LPS (1 µg/ml) und den angegebenen Metamizol-Konzentrationen inkubiert. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden im Zellüberstand mittels LC-MS/MS detektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 2 Messungen. Einseitiger t-TEST; \* P ≤ 0,05.

### 3.3.7.2 Wirkung der FTY720-Analoga auf die Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese im Vollbluttest

Wie bereits in Kapitel 3.4.4.1 beschrieben hemmt FTY720 die LPS-stimulierte PGE<sub>2</sub> Freisetzung aus Blutzellen adulter Mäuse vollständig. Dessen phosphorylierte Form FTY720-P senkte die PGE<sub>2</sub>-Konzentration ebenfalls, nicht aber so stark wie dessen unphosphorylierte Form FTY720. FTY720-Phosphonat (ST-967) und ST-970 blockten die PGE<sub>2</sub> Sekretion komplett und auch ST-969, die unphosphorylierte Form von ST-970, inhibierte die Freisetzung deutlich. Darüber hinaus zeigte der S1P<sub>1/3/4/5</sub> Agonist VPC23153 einen inhibitorischen Effekt auf die Synthese von PGE<sub>2</sub>. Der S1P<sub>1</sub> Agonist SEW2871 hingegen bedingte keine Veränderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Blutplasma.

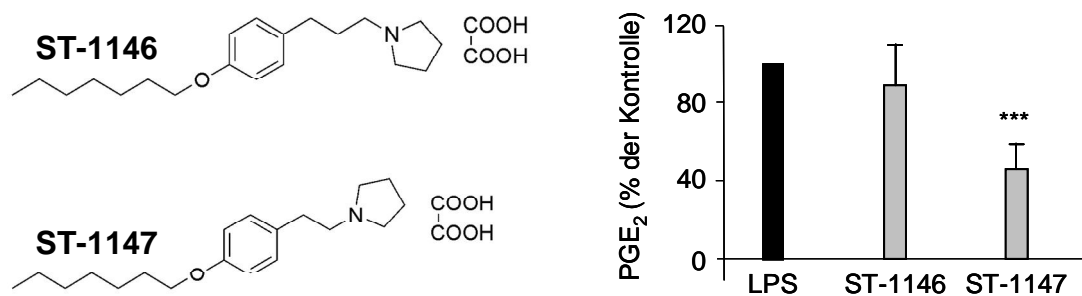
Der Vollbluttest mit den potentiellen S1P-Rezeptor-Antagonisten ST-968, ST-971, ST-972 oder ST-973 ergab, dass lediglich ST-972 und ST-973 zu einer signifikanten Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Blutplasma führten (Abbildung 3.30).

Sowohl die bereits phosphoryliert eingesetzten Agonisten FTY720-P und ST-970 als auch deren unphosphorylierte Formen FTY720 und ST-969 hemmten die LPS-stimulierten Sekretion von PGE<sub>2</sub> im Vollbluttest, wobei die phosphorylierten Formen der eingesetzten Metabolite die stärkste Hemmung verursachten. Auch die Inkubation mit dem S1P<sub>1/3/4/5</sub> Agonisten VPC23153, FTY720-Phosphonat ST-967, den potentiellen Antagonisten ST-972 und ST-973 führten zu einer signifikanten Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Konzentration. Der S1P<sub>1</sub>-spezifische Agonist SEW2817, S1P, sowie die beiden potentiellen S1P-Rezeptor Antagonisten ST-968 und ST-971 bedingten keine signifikante Änderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration.



**Abbildung 3.30: Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Vollbluttest.** Frisch heparinisertes murines Blut wurde für 24 Stunden mit 100 µg/ml LPS und Zugabe von 1 µM der verschiedenen Substanzen inkubiert und die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Blutplasma bestimmt. **A.** Vollbluttest mit S1P-Rezeptor-Agonisten. Getestet wurden FTY720 und dessen phosphorylierte Form FTY720-P, ST-967, ST-969, ST-970, VPC23153, SEW2817, S1P ST-1146 und ST-1147. **B.** Vollbluttest mit S1P-Rezeptor-Antagonisten. Getestet wurden ST-968, ST-971, ST-972 oder ST-973. Dargestellt sind die Mittelwerte der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen von 3-5 Messungen + SEM. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,002$ .

Betrachtet man die Substanzen, welche keinen Einfluss auf die PGE<sub>2</sub> Sekretion aus Blutzellen ausüben, so fällt auf, dass SEW2871 kein basisches Zentrum besitzt, bei ST-968 ist ein basisches Zentrum kaum erreichbar ist und bei ST-971 dieses durch die nahe Phosphatgruppe maskiert werden könnte. Zur Prüfung, ob tatsächlich ein basisches Zentrum ausschlaggebend für den inhibitorischen Effekt ist, wurde die Wirkung der alkalischen tertiären Amin-Analoga ST-1146 und ST-1147 auf die PGE<sub>2</sub> Sekretion getestet. Während ST-1146 keine Änderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration verursachte, reduzierte ST-1147 den PGE<sub>2</sub>-Gehalt signifikant (Abbildung 3.31). Demnach scheint das basische Zentrum einer Substanz wichtig für die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch FTY720-Analoga, reicht jedoch nicht für eine Hemmung aus, da zusätzlich die Konformationen der Moleküle eine Rolle spielen.



**Abbildung 3.31: PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Vollbluttest nach Stimulation mit tertiären Aminen.** Frisch heparinisiertes murines Blut wurde für 24 Stunden mit 100 µg/ml LPS und Zugabe von 1 µM der tertiären Amine ST-1146 (1-(3-(4-(Heptyloxy)phenyl)propyl)pyrrolidin hydrogenoxalat) und ST-1147 (1-(4-(Heptyloxy)phenethyl)pyrrolidin hydrogenoxalat) inkubiert und die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Blutplasma bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen von 4-6 Messungen + SEM. Zweiseitiger t-TEST; \*\*\* $P \leq 0,002$ .

### 3.3.8 Effekte der FTY720-Analoga *in vivo*

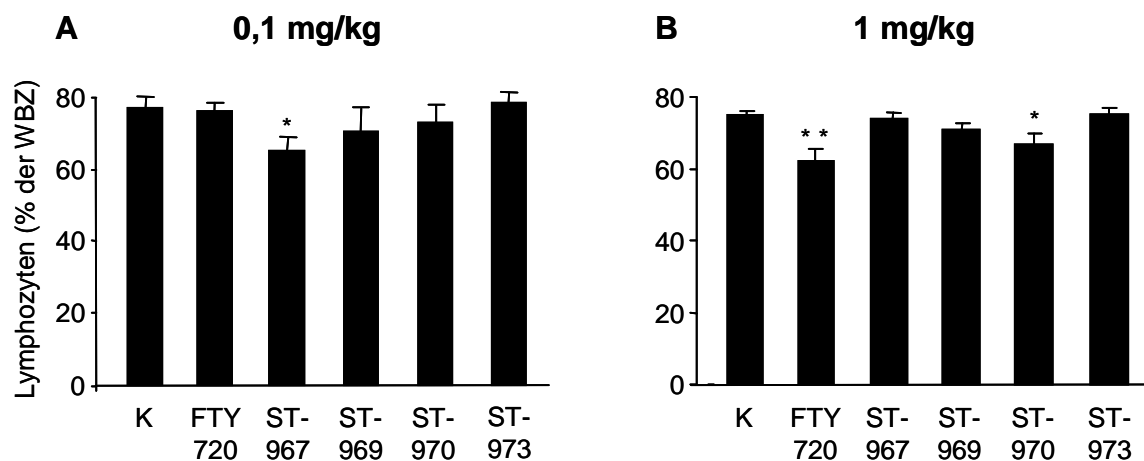
#### 3.3.8.1 Effekte der FTY720-Analoga auf die Lymphozytenzahl

FTY720 kann durch Reduktion der T-Lymphozytenzahl im Blut von Tieren dosisabhängig eine Lymphopenie verursachen [99]. Diese immunosuppressive Eigenschaft von FTY720 basieren auf dessen Fähigkeit, den Wiederaustritt von Lymphozyten aus dem peripheren lymphatischen Gewebe bzw. dem Thymus zu verhindern. Die neu

synthetisierten S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten sollten daher auf immunosuppressive Eigenschaften hin untersucht werden.

Die intraperitoneale (i.p.) Gabe von 0,1 mg/kg FTY720 führte nach einer Stunde zu keiner Änderung der Lymphozytenanzahl im Blut, wohingegen die i.p. Gabe von 1 mg/kg die Anzahl der Lymphozyten signifikant reduzierte (Abbildung 3.32). Der S1P-Rezeptor-Agonist ST-967 erniedrigt die Anzahl der Lymphozyten nach intraperitonealer Gabe von 0,1 mg/kg signifikant. Bei i.p. Gabe von jeweils 1 mg/kg der verschiedenen Substanzen bewirkt neben FTY720 nur ST-970 eine Abnahme der Lymphozytenzahl. Der S1P-Rezeptor-Agonist ST-969, sowie der Antagonist ST-973 führten nicht zu einer signifikanten Änderung der Lymphozytenzahl im Blut der adulten Mäuse.

Der Grund für die unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Wirkungen der verschiedenen Substanzen könnte in deren unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften liegen.



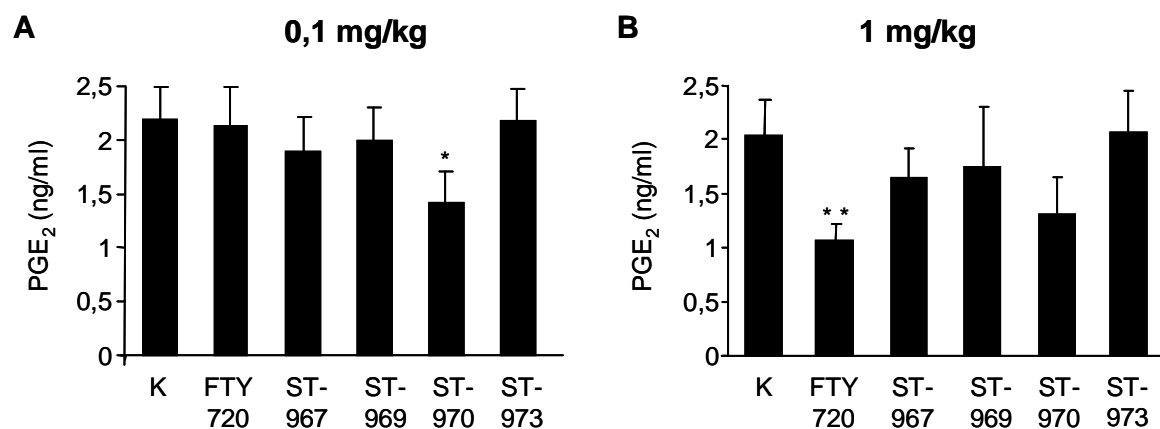
**Abbildung 3.32: Lymphozytenkonzentration nach intraperitonealer Injektion von FTY720-Analoga:** Gemessen wurden die Lymphozytenkonzentrationen in frisch heparinisierem Blut eine Stunde nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von 0,1 bzw. 1 mg/kg der verschiedenen FTY720-Analoga. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 8 Messungen. Zweiseitiger t-TEST; \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

### 3.3.8.2 Einfluss der FTY720-Analoga auf die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Plasmakonzentrationen

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben, konnte bereits ein inhibitorischer Effekt von FTY720 auf die Sekretion von Eicosanoiden im Blutplasma nachgewiesen werden. Im Blutplasma von Mäusen reduzierte intraperitoneal appliziertes FTY720 die Konzentration

von PGE<sub>2</sub> und TxB<sub>2</sub> signifikant, während der S1P<sub>1</sub> Agonist SEW2871, der S1P-Rezeptor-Agonist VPC23153, keinen Effekt auf die Konzentration der Eicosanoide ausübten. Um zu untersuchen, ob die neu synthetisierten FTY720-Analoga *in vivo* die Konzentration von PGE<sub>2</sub> im Blut beeinflussen, wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Messungen der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentration im Blut von Mäusen nach (i.p.) Injektion von 0,1 mg/kg der FTY720-Analoga ergaben eine signifikante Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Gehalts durch den S1P-Rezeptor-Agonisten ST-970. Die i.p. Injektion von 1 mg/kg FTY720 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Blutplasma adulter Mäuse. Die FTY720-Behandlung senkte den Gehalt von PGE<sub>2</sub> um circa 50%. Die übrigen Analoga ST-967, ST-969 und ST-973 beeinflussten die Plasmakonzentrationen der Prostaglandine nicht.

Lediglich FTY720 und der S1P-Rezeptor-Agonist ST-970 zeigten nach intraperitonealer Injektion einen hemmenden Effekt auf die PGE<sub>2</sub> Synthese (Abbildung 3.33). Allerdings war dieser Effekt nicht bei jeder Dosis zu erkennen. Grund dafür könnte wie bei dem Einfluss auf die Lymphozytenzahl die unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen sein. Von Vorteil ist, dass ST-970 bereits bei 0,1 mg/kg die PGE<sub>2</sub>-Konzentration signifikant senkt und bei dieser Konzentration noch keine Reduktion der Lymphozytenzahl auslöst, wohingegen die wirksame Dosis von FTY720 sowohl auf die Prostaglandinsynthese als auch auf die Lymphozytenwanderung hemmend wirkt.



**Abbildung 3.33: Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentrationen nach intraperitonealer Injektion von FTY720-Analoga:** Gemessen wurden die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentrationen im Blutplasma eine Stunde nach i.p. Injektion von 0,1 bzw. 1 mg/kg FTY720. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 8 Messungen. Einseitiger t-TEST; \* P ≤ 0,05, \*\* P ≤ 0,01 verglichen mit Mäusen, denen Vehikel appliziert wurde.

Tabelle 3.2: Effekte der S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Substanz	S1P Rezeptor-aktivität	cAMP-Synthese <i>in vitro</i> <sup>1</sup>	PGE <sub>2</sub> -Synthese <i>in vitro</i> <sup>2</sup>	PGE <sub>2</sub> -Synthese <i>in vivo</i> <sup>3</sup>	Lymphozytenkonzentration <sup>4</sup>
S1P	Agonist	Inhibition	-	n.d.	n.d.
FTY720	-	Inhibition	Inhibition	Inhibition <sup>5</sup>	Inhibition <sup>5</sup>
FTY720-Phosphat	Agonist	Inhibition	Inhibition		
SEW2871	Agonist	n.d.	-	-	n.d.
VPC23153	Agonist	n.d.	Inhibition	-	n.d.
ST-969	-	Inhibition	Inhibition	-	-
ST-970	Agonist	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
ST-967	Agonist	Inhibition	Inhibition	-	Inhibition
ST-968	-	-	-	n.d.	n.d.
ST-971	Antagonist	-	-	n.d.	n.d.
ST-972	Antagonist	-	Inhibition	n.d.	n.d.
ST-973	Antagonist	-	Inhibition	-	-
ST-1146	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
ST-1147	n.d.	n.d.	Inhibition	n.d.	n.d.

<sup>1</sup> cAMP Synthese in primären embryonalen Rückenmarkszellen unter Verwendung von 1 µM Substanz

<sup>2</sup> PGE<sub>2</sub> Synthese im Vollbluttest unter Verwendung von 1 µM Substanz

<sup>3</sup> PGE<sub>2</sub> Gehalt im Blut 1 h nach i.p. Injektion von 0,1 bzw. 1 mg/kg Substanz

<sup>4</sup> Lymphozytenkonzentration 1 h nach i.p. Injektion von 0,1 bzw. 1 mg/kg Substanz

<sup>5</sup> FTY720 und FTY720-P sind austauschbar *in vivo*, Effekte können nicht unterschieden werden

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die antinozizeptive Rolle von S1P bei der spinalen Schmerzverarbeitung**

Die noxische Reizung freier sensorischer Nervenendigungen primärer afferenter C- und A $\delta$ -Nervenfasern (Nozizeptoren) bedingt eine Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter an den zentralen Nervenendigungen im Hinterhorn des Rückenmarks. Dort werden die aus der Peripherie ankommenden nozizeptiven Reize auf zentrale Projektionsneurone umgeschaltet und zu höheren Zentren im Gehirn weitergeleitet um die Empfindung „Schmerz“ auszulösen.

Sphingosin-1-Phosphat [56] wird als potentieller Modulator der spinalen nozizeptiven Transmission angesehen. Erste Hinweise auf eine Rolle von S1P bei der Regulation synaptischer Funktionen wurden aus Experimenten mit Knockout Mäusen des S1P-spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptors S1P<sub>2</sub> abgeleitet. Diese Mäuse wiesen eine Hypererregbarkeit pyramidaler Neurone im Neocortex auf, was auf einen inhibitorischen Effekt von S1P<sub>2</sub> auf die neuronale Erregbarkeit hindeutet [73].

Vorarbeiten zeigten, dass die intrathekale Applikation von S1P zu einer Verringerung des nozizeptiven Verhaltens im Formalin-Test, einem Schmerzmodell, das auf zentraler Sensibilisierung beruht, führt. Darüber hinaus wurden nach peripherer Nozizeption Änderungen der spinalen S1P-Konzentration festgestellt, die die Schmerzverarbeitung und -weiterleitung beeinflussen [70]. Aus diesen Ergebnissen leitete sich die Hypothese ab, dass S1P ein wichtiger Modulator der spinalen nozizeptiven Transmission ist und somit sowohl Enzymsysteme, welche die spinale S1P-Konzentration regulieren, als auch spezifische S1P-Rezeptoren und deren Aktivatoren und Inhibitoren potentielle ‚Targets‘ bzw. ‚Tools‘ für eine suffiziente Schmerztherapie sein könnten.

#### **4.1.1 Spinale Expression der S1P-Rezeptoren und Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktionswege der S1P-vermittelten antinozizeptiven Wirkung**

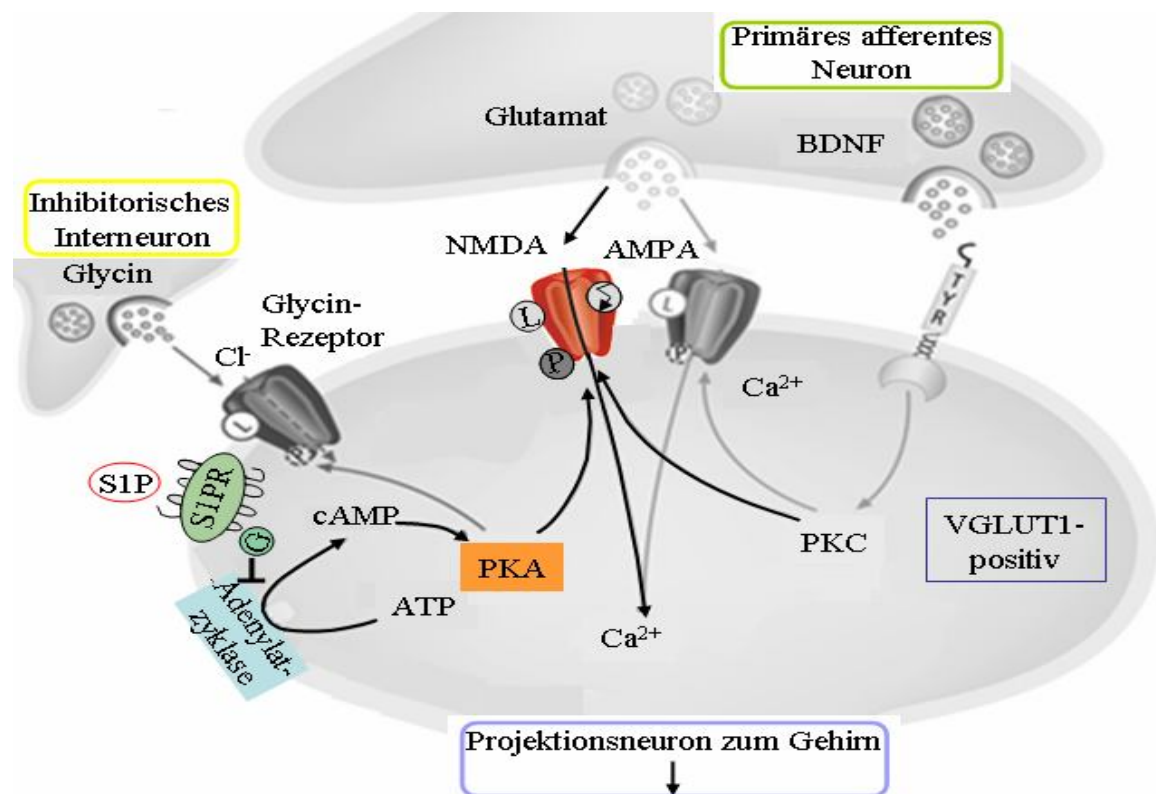
Zur Aufklärung der dem antinozizeptiven Effekt von S1P zugrunde liegenden Mechanismen wurde zunächst die Expression der S1P-Rezeptoren im zentralen

Nervensystem (ZNS) untersucht. Sowohl die mRNA als auch die Proteine aller fünf S1P-Rezeptoren wurden im Rückenmark adulter Mäuse nachgewiesen. S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> wurden am stärksten in den äußeren Laminae I-III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks exprimiert. Diese Region spielt bei der Schmerzverarbeitung eine wichtige Rolle, da primäre afferente, sowie GABAerge Neurone in diesen Laminae terminieren und Dendriten exzitatorischer Neurone von dort aus in die übergeordneten Laminae eintreten [87, 88]. Folglich besteht die Möglichkeit, dass S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> maßgeblich an der S1P-vermittelten Modulation der spinalen nozizeptiven Prozessierung beteiligt sind.

Es ist bekannt, dass alle S1P-Rezeptoren die Adenylatzyklase, das Enzym, welches die Bildung von cAMP katalysiert, über die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine (G<sub>i</sub>) hemmen können. Die cAMP-abhängigen Signalkaskaden spielen bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit eine zentrale Rolle. So steigert z.B. die intraplantare Gabe stabiler cAMP-Analoga oder des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin die PGE<sub>2</sub>-induzierte mechanische Hyperalgesie [100, 101] und die Hemmung der 3',5'-cyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase führt nachweislich zu einer verlängerten Hyperalgesie. Darüber hinaus ist bekannt, dass Substanzen, welche die cAMP-Synthese bzw. Konzentration senken (z.B. Opioide und NSAIDs), der Entstehung einer Hyperalgesie entgegenwirken können [78, 79]. Auf Grund dieser Beobachtungen entstand die Annahme, dass S1P seine antinozizeptiven Effekte u.a. über die Senkung der cAMP-Konzentration im Rückenmark vermittelt. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten diese Vermutung. Es konnte gezeigt werden, dass S1P zu einer Hemmung der cAMP-Synthese in exzitatorischen Neuronen führt (Kapitel 3.1.2). Diese S1P-sensitiven Neurone sind in den für die Schmerzverarbeitung wichtigen Laminae II und III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks lokalisiert (Abbildung 4.1). Diese Feststellung wurde durch den Befund unterstützt, dass intrathekal gegebenes dihydro-S1P (Sphingalin-1-P) die Formalin-induzierte cAMP-abhängige Phosphorylierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in den äußeren Laminae reduzierte, während die Calcium-abhängige, Formalin-induzierte Phosphorylierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin regulierten Kinase II (CamKII) nur teilweise reduziert wurde. Eine solche Reduktion der CamKII Phosphorylierung entspricht den Erwartungen, da die Reduktion der spinalen Schmerzverarbeitung über Inhibierung der cAMP-abhängigen Sensitivierung auch schmerzrelevante calciumabhängige Signalkaskaden beeinflussen würde.



Eine cAMP-reduzierende Wirkung wurde auch bei den Opioid-Analgetika beobachtet und mit der Hemmung der Hyperalgesie in Verbindung gesetzt [78, 79]. Die Opioide zählen mit den nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), welche über die Hemmung der Prostaglandinsynthese die Aktivierung der Adenylatzyklen verhindern, zu den weltweit am häufigsten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzten Arzneimitteln [77]. Eine Reduktion der cAMP-Synthese in exzitatorischen Neuronen der Laminae II und III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks könnte daher maßgeblich zu der antinozizeptiven Wirkung von S1P beitragen.



**Abbildung 4.1: Mechanismus der S1P-vermittelten Antinozizeption im Hinterhorn des Rückenmarks.** In den Laminae I-III terminieren primäre afferente Neurone (grün) und es findet die Übertragung nozizeptiver Signale auf Projektionsneurone [47] statt, welche die Schmerzinformation zum Gehirn weiterleiten. Die Neurone, welche auf S1P mit einer Verringerung der cAMP-Synthese reagieren, konnten als VGLUT1-positive Projektionsneurone identifiziert werden. S1P aktiviert S1P-Rezeptoren, was zur Hemmung der Adenylatzyklase, dem Enzym welches die cAMP-Bildung katalysiert, führt. Weniger cAMP bedingt eine verringerte Aktivität der Proteinkinase A (PKA) und führt dadurch zu einer erniedrigten Phosphorylierungen der in den Membranen der Projektionsneurone sitzenden N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren. Zusätzlich sinkt die PKA-vermittelte Phosphorylierung der Glycin-Rezeptoren auf den inhibitorischen Interneuronen (gelb), welche dadurch erregungshemmend wirken. Modifizierte Abbildung nach Mutschler et al. [17].

#### **4.1.2 Beteiligung verschiedener Enzymsysteme an der Regulation der spinalen S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation**

Änderungen der spinalen S1P-Konzentration beeinflussen die Übertragung nozizeptiver Signale im Rückenmark [70]. Erhöhte spinale S1P-Konzentrationen reduzieren das Schmerzverhalten von Tieren während eine Verringerung der S1P-Konzentration die basale Schmerzschwelle senkt. Interessanterweise wurde im Liquor cerebrospinalis von Versuchstieren nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Formalin und Zymosan eine signifikante Abnahme der S1P-Konzentration gefunden, während Sphingosin- und Ceramidkonzentrationen unverändert blieben. Dies bedeutet, dass eine spezifische Regulation der S1P-Konzentrationen stattfindet. Die gemessenen Änderungen der S1P-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis sind indikativ für eine veränderte Freisetzung von S1P. Über die intrazellulären S1P-Konzentrationen können jedoch keine Aussagen getroffen werden.

Zur Aufklärung der Regulation der S1P-Konzentration im Rückenmark nach peripherer nozizeptiver Stimulation wurde die Aktivität der S1P-anabolisierenden und-katabolisierenden Enzyme untersucht. Die Expression der am Abbau von S1P beteiligten Enzymklassen im Rückenmark wurde bereits mittels *in situ* Hybridisierung vom (Allen Institute for Brain Science, Seattle, WA) gezeigt. Sowohl die mRNA für die S1P-dephosphorylierenden S1P-Phosphatasen (SPP-1/-2) als auch die S1P irreversibel degradierende S1P-Lyase (SPL) ist in allen Regionen des adulten Maus-Rückenmarks detektierbar, wobei SPL eine schwache Expression aufweist (<http://www.brain-map.org>). Die Expression von mRNA der Sphingosin-phosphorylierenden Sphingosin-Kinasen (SPHK-1/-2) wurde ebenfalls im Rückenmark adulter Mäuse nachgewiesen (Abbildung 3.9). Die im Liquor cerebrospinalis von Versuchstieren nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Formalin und Zymosan beobachtete Abnahme der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation wurde auch *in vitro* festgestellt. Eine erhöhte Aktivität S1P abbauender S1P-Phosphatasen-1/-2 und S1P-Lyasen konnte jedoch mittels einer Aktivitätsanalyse als Grund für die LPS-stimulierte Abnahme der S1P-Konzentration in Rückenmarkskulturen und die KCl-stimulierte S1P Reduktion in akuten Rückenmarksschnitten ausgeschlossen werden. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Aktivität der S1P-synthetisierenden SPHKs für die Erniedrigung der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation verantwortlich ist.

In Vorarbeiten wurden bereits zwei SPHK Inhibitoren auf die Beeinflussung des Schmerzverhaltens von Ratten nach peripherer nozizeptiver Stimulation hin getestet [70]. Die intrathekale Gabe der SPHK Inhibitoren *N,N*-dimethylsphingosin (NNDS) und DL-*threo*-dihydrosphingosin (DHS) reduzierten die Schmerzschwelle im Hot-Plate Test, einem Model für akute thermale Nozizeption [80], im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant. Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass die Hemmung der SPHKs zu einer Absenkung der spinalen S1P-Freisetzung führt, aufgrund dessen der antinozizeptive Effekt des S1P wegfällt und daher die Schmerzschwelle herabgesenkt wird. Zu beachten ist jedoch, dass die verwendeten Inhibitoren nicht nur beide SPHK Isoenzyme hemmen, sondern darüber hinaus bei höheren Konzentrationen auch andere Enzyme, wie die Protein Kinase C (PKC) [102], Sphingosin-abhängige Protein Kinasen [103], 3-phosphoinositid-abhängige Kinasen [104] und Casein Kinase II [105] inhibieren können. Die beobachtete Reduktion der Schmerzschwelle könnte demnach auch durch Nebeneffekte der Inhibitoren beeinflusst worden sein.

#### **4.1.3 Regulation der spinalen S1P-Konzentrationen durch Sphingosin-Kinasen**

Zur näheren Untersuchung der Regulation der spinalen S1P-Konzentrationen durch die SPHKs wurden SPHK Knockout Mausstämme verwendet. SPHK-1- und SPHK-2-defiziente Mausstämme sind lebensfähig und phänotypisch unauffällig, was auf einen kompensatorischen Effekt der SPHKs hindeutet [37]. Untersuchungen des S1P-Gehalts im Rückenmark im Rahmen dieser Arbeit ergaben keinen signifikanten Unterschied im Sphingolipidgehalt zwischen Wildtyp Mäusen und SPHK-1-defizienten Mäusen (Abbildung 3.10). In SPHK-2-defizienten Rückenmarksproben war dagegen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nur 10% der Menge von S1P und Sphinganin-1-P nachweisbar. Die Konzentrationen der SPHK Substrate Sphingosin und Sphinganin waren dagegen erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass 90% des S1P im Rückenmark von SPHK-2 und nur ca. 10% von SPHK-1 gebildet wird. Diese Befunde weisen auf eine mangelhafte Kompensation der SPHKs hin und unterstützen die Hypothese, dass beide Isoenzyme unterschiedliche Funktionen im Rückenmark erfüllen.

Die Expression der SPHK-2 scheint demnach für die Synthese von S1P im Rückenmark von entscheidender Bedeutung zu sein. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen

akuter Rückenmarksschnitte bestätigt, welche als biochemisches *in vitro* Modellsystem zur näheren Analyse der Regulation der S1P-Konzentration verwendet wurden. Bei einem Vergleich des S1P-Gehalts in Rückenmarksgewebe (kompletter ungeschnittener lumbaler Bereich L4-L5) und Lysaten akuter Rückenmarksschnitte von SPHK-1 und 2-defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen wurde eine hohe Ausgangskonzentration von S1P in Schnitten von Wildtyp-Mäusen und SPHK-1-defizienter Mäusen festgestellt, welche vermutlich auf Grund der Beschädigung des Gewebes durch den Schnittvorgang und der damit verbundenen Freisetzung von proinflammatorischen Signalstoffen zustande kommt (Abbildung 3.10). Da in den SPHK-2-defizienten Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen Gewebe und Schnitt detektiert wurde, ist diese hohe Ausgangskonzentration an S1P hauptsächlich abhängig von einer Aktivität der SPHK-2.

Bei Betrachtung der Sphingolipidkonzentration im Blutplasma ergibt sich im Vergleich zum Rückenmark ein anderes Bild. Hier war eine signifikante Reduktion der Sphingolipidkonzentrationen in SPHK-1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren sichtbar, wohingegen die Konzentrationen an S1P und Sphingosin in SPHK-2 Knockout Mäusen erhöht waren. Dies lässt vermuten, dass im Blut die SPHK-1, und nicht wie im Rückenmark beobachtet, das Isoenzym SPHK-2, für die Synthese von S1P hauptverantwortlich ist. Dies deutet auf eine differentielle und gewebsspezifische Regulation der SPHKs hin. Hinweise für eine solche unterschiedliche Regulation der SPHKs finden sich in der Literatur. Allende et al. [37] berichtete von einer 60%igen Reduktion der Serumkonzentration von S1P in SPHK-1-defizienten Mäusen. Allerdings konnte keine signifikante Abnahme des S1P-Gehalts in anderen Geweben, wie Gehirn Herz, Leber und Niere, detektiert werden. Diese gewebsspezifische Regulation der SPHKs und deren teilweise gegensätzlichen Funktionen werden vermutlich durch deren unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen verursacht. Es wird zur Zeit in der Literatur davon ausgegangen, dass das durch SPHK-2 gebildete S1P aufgrund der hauptsächlich Lokalisation des Isoenzym im Nukleus [106] intrazellulär verbleibt. Takabe et al. [107] beschreiben in einer Studie mit MCF-7 Brutkrebszellen, dass SPHK-1, nicht SPHK-2, für die Produktion von S1P verantwortlich ist, das aus den Zellen freigesetzt wird. Ein Beispiel für intrazelluläre Funktionen von SPHK-2 ist die Interaktion von SPHK-2 mit Histon H3 im Nukleus. Hier produziert SPHK-2 S1P, dass die Histonacetylierung reguliert und dadurch Einfluss auf die Verpackungsdichte der DNA und die Genexpression hat [108]. Im Hinblick auf die S1P-vermittelte Antinozizeption könnte

durch SPHK-2 gebildetes S1P zu Veränderungen in der Proteinexpression führen und dadurch langfristige Effekte verursachen. Für die SPHK-1 wird angenommen, dass sie für die S1P Freisetzung in den extrazellulären Raum verantwortlich ist, da sie nach Aktivierung vom Cytoplasma zur Plasmamembran wandert [107, 109]. Beispielsweise führt NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) zu einer Hochregulation der SPHK-1 und steigert die S1P Produktion, sowie dessen Freisetzung aus Knochenmark-abstammenden Makrophagen [110].

#### **4.1.4 Negative Rückkopplung durch S1P im Rückenmark**

Zur näheren Untersuchung der Rolle der SPHKs bei der Regulation von S1P nach nozizeptiver Stimulation im Rückenmark wurden Versuche an akuten Rückenmarksschnitten von Wildtyp Mäusen durchgeführt. SPHKs werden u.a. durch Substanzen, die intrazelluläre Calciumkonzentrationen erhöhen, wie KCl und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), oder Rezeptor Tyrosin Kinase Agonisten, wie z.B. das proinflammatorische Cytokin TNF- $\alpha$ , stimuliert. Aus diesem Grund wurde eine Änderung der Aktivität der SPHKs und folglich der S1P-Konzentration nach Inkubation akuter Rückenmarksschnitte unter Zugabe von KCl, NMDA und TNF- $\alpha$  erwartet. Interessanterweise ergaben Untersuchungen an akuten Rückenmarksschnitten adulter Wildtyp Mäuse eine Reduktion der S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulation (Abbildung 3.11), was auf eine Hemmung der SPHKs hindeutet. Die Stimulierung von akuten Rückenmarksschnitten SPHK-2-defizienter Mäuse mit NMDA führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des S1P-Gehalts im Vergleich zu unbehandelten Schnitten (Abbildung 3.13 B). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Steigerung der S1P-Menge in SPHK-1-defizienten Mäusen nach Behandlung mit KCl, NMDA und TNF- $\alpha$  festgestellt werden (Abbildung 3.11 A). Da in SPHK-2-defizienten Mäusen die im Wildtyp beobachtete Reduktion des S1P-Gehalts auftritt, ist die SPHK-1 ausschlaggebend für die Reduktion der S1P-Konzentration in den Schnitten. Die Daten legen daher nahe, dass SPHK-2 das für die Synthese von S1P hauptverantwortliche Enzym ist, während SPHK-1 die Konzentration von S1P als Antwort auf die nozizeptive Stimulierung reguliert.

Das durch SPHK-2 gebildete S1P verbleibt zumeist intrazellulär, während die SPHK-1 für die S1P Freisetzung in den extrazellulären Raum verantwortlich ist [107, 109].

Interessanterweise zeigen Studien, dass extrazelluläres und intrazelluläres S1P teilweise gegensätzliche Effekte vermitteln. So verstärkt extrazelluläres S1P die Barrierefunktion der Endothelzellen in Blutgefäßen [111, 112]. Die verstärkenden Effekte von exogenem S1P wurden auch *in vivo* festgestellt und deuten auf eine reduzierte vaskuläre Durchlässigkeit in Endotoxin-induzierten Lungenödemen nach S1P Behandlung hin [113]. Im Gegensatz dazu wirkt endogen gebildetes S1P als ein positiver Modulator des Calcium Eintritts mittels speicherabhängigen Calcium-Kanälen und als Vermittler gesteigerter Endothelpermeabilität [114]. Darüber hinaus ist bekannt, dass extrazellulär gegebenes S1P das Einziehen von Neuriten bedingt, während intrazelluläres S1P notwendig ist, um das NGF-induzierte Neuritenwachstum zu vermitteln [72]. Die differenzielle Lokalisation der SPHKs und die teils gegensätzlichen Effekte extra- und intrazellulären S1Ps deuten auf unterschiedliche physiologische Funktionen der SPHKs hin. Es ist erwiesen, dass die Expression von SPHK-1 die Proliferation und das Wachstum steigert, den Übergang in die G1-S-Phase unterstützt, Zellen vor Apoptose schützt [115-117] und Tumorbildung in Mäusen induzieren kann [117, 118]. Im Gegensatz dazu hemmt die SPHK-2 das Zellwachstum und steigert die Apoptose [119]. Der unterschiedliche Effekt auf die Apoptose ist auf die gegensätzliche Regulation der Ceramid-Biosynthese durch die beiden Isoenzyme zurückzuführen. Eine Verringerung der SPHK-2-Expression reduziert die Umwandlung von Sphingosin zu Ceramid, wohingegen eine Verringerung der SPHK-1-Expression diese steigert. Eine Studie geht davon aus, dass nur das von SPHK-2 produzierte S1P zu Ceramid umgewandelt werden kann [120]. Die aus diesen Daten abgeleitete Hypothese basiert auf einer anfänglichen Aktivierung beider SPHKs durch die nozizeptive Stimulierung. Das durch SPHK-1 gebildete S1P gelangt in den extrazellulären Raum und vermittelt dort über eine negative Rückkopplung eine Hemmung beider SPHKs, was die in akuten Rückenmarksschnitten von Wildtypen beobachtete Abnahme der S1P-Konzentration bedingt (Abbildung 4.2). Das durch SPHK-2 gebildete S1P hingegen wird nicht ausgeschleust und verursacht demnach keine Hemmung der S1P-Synthese. Aus diesem Grund kommt es nach SK1-II Gabe zu der beobachteten S1P Akkumulation nach nozizeptiver Stimulierung.

In der Literatur wurde bereits von rückkoppelnden Effekten von S1P berichtet. Takeya et al [121] berichtet von einem synergistischen Effekt S1Ps auf die Thrombin-induzierte Expression des *tissue factor* (TF) in Endothelzellen, was die weitere Bildung von Thrombin und S1P unterstützt, d.h S1P vermittelt in diesem Fall eine positive

Rückkopplung. Im Gegensatz dazu vermittelt das nach Stimulierung mit *activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL), einem Mitglied der TNF-Familie, durch SPHK-1 gebildete S1P eine negative Rückkopplung während der Osteoklastogenese [110]. Allerdings wird dieser Effekt durch intrazelluläres S1P vermittelt, während die negative Rückkopplung in der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hypothese durch von SPHK-1 gebildetem extrazellulärem S1P hervorgerufen wird.

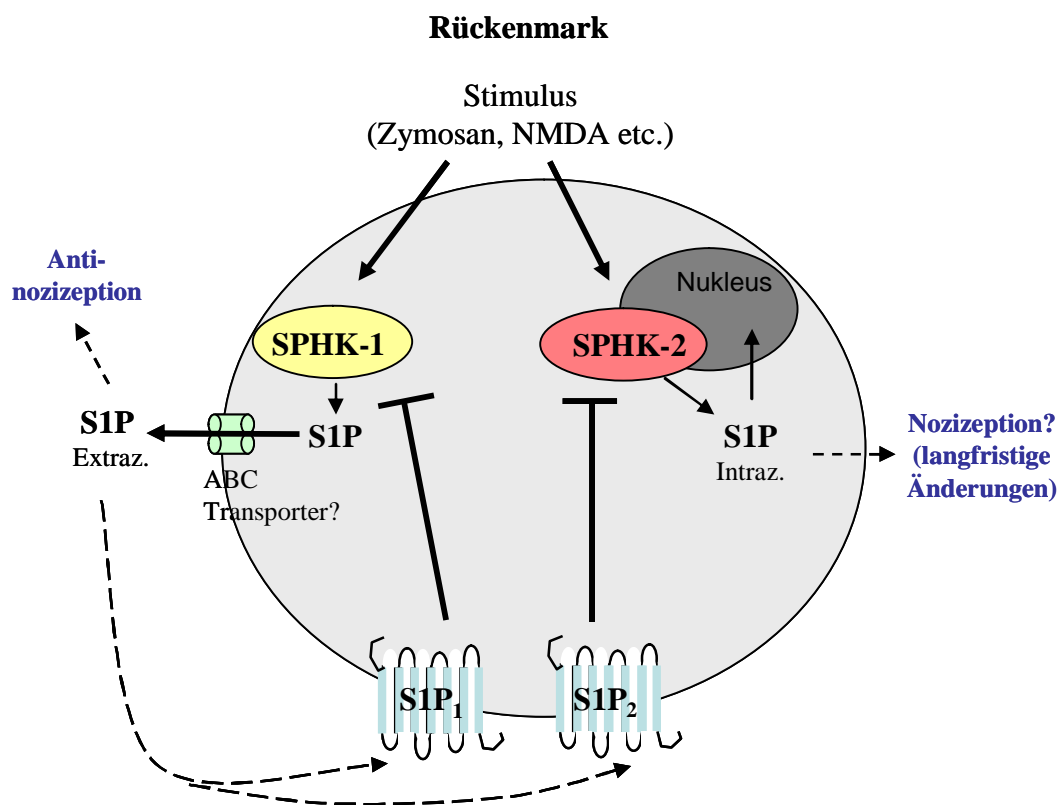
#### **4.1.5 Charakterisierung der an der Hemmung der Sphingosin-Kinasen beteiligten S1P-Rezeptoren**

Eine Aktivierung von SPHKs kann über eine Vielzahl verschiedener Mediatoren, darunter G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, vermittelt werden [30]. Für das inflammatorische Cytokin TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass es zu einer Aktivierung der SPHK-1 führt und dass das dadurch gebildete S1P seine Effekte extrazellulär über Anbindung an den Rezeptor S1P<sub>2</sub> vermittelt [122]. Ein Zusammenspiel zwischen von SPHK-1 gebildetem S1P und S1P<sub>1</sub> wurde bereits in HEK-293 Zellen und humanen Endothelzellen festgestellt [106]. Darüber hinaus vermittelt die Stimulierung mit PDGF die Aktivierung und Translokation der SPHK-1 an die Plasmamembran, wo sie S1P bildet, dass anschließend im extrazellulären Raum den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor agonisiert und somit die Zellbeweglichkeit beeinflusst [123]. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Aktivierung von S1P-Rezeptoren bei der Verringerung der S1P-Konzentration eine entscheidende Rolle spielt. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass der potente S1P-Rezeptor-Agonist FTY720-P in physiologisch relevanten Konzentrationen eine signifikante Abnahme des S1P-Gehalts in akuten Rückenmarksschnitten adulter Wildtyp-Mäuse verursachte und dass diese Abnahme durch den Einsatz spezifischer S1P-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden konnte. Dies spricht für eine Beteiligung der S1P-Rezeptoren bei der Hemmung der SPHK Aktivität.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor bei der Hemmung der SPHK-2 eine zentrale Rolle spielt. Die Behandlung von akuten Rückenmarksschnitten SPHK-1-defizienter Mäuse mit dem S1P<sub>1</sub> spezifischen Agonisten SEW2871 und FTY720-P, das außer S1P<sub>2</sub> alle S1P-Rezeptoren aktiviert, zeigte keine signifikante Beeinflussung der S1P-Konzentration (Abbildung 3.13). Darüber hinaus verursachte die Inkubation SPHK-

1-defizienter Rückenmarksschnitte mit dem S1P<sub>2</sub> spezifischen Antagoniste JTE-013, einen signifikanten Anstieg der S1P-Konzentration.

Interessanterweise wurde die Hemmung des Isoenzym SPHK-1 jedoch nicht über S1P<sub>2</sub> sondern über S1P<sub>1</sub> vermittelt. Die Aktivierung des Rezeptor S1P<sub>1</sub> durch SEW2871 führte zu einer Hemmung der SPHK-1 und somit zu einer Reduktion der S1P-Konzentration. Die Behandlung von akuten Rückenmarksschnitten SPHK-2-defizienter Mäuse mit dem S1P<sub>2</sub> spezifischen Antagonisten JTE-013 hatte keinen Effekt auf die S1P-Konzentration. Das nach nozizeptiver Stimulierung durch SPHK-1 gebildete und anschließend freigesetzte S1P vermittelt demnach über Anbindung an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor die Hemmung der SPHK-1 Isoform, während es über Aktivierung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors die Inhibition der SPHK-2 verursacht und dadurch zu einer Absenkung der S1P-Konzentration in Wildtyp Rückenmarksschnitten führt.



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulierung. Durch nozizeptive Stimulierung werden beide SPHKs innerhalb einer Zelle (hellgrau) aktiviert. SPHK-1 transloziert nach Aktivierung an die Plasmamembran und bildet dort S1P, welches vermutlich über ABC-Transporter in den extrazellulären Raum transportiert wird. Dort führt es durch Anbindung an S1P<sub>1</sub> zur Hemmung der SPHK-1 und durch Aktivierung des S1P<sub>2</sub> zur Hemmung der SPHK-2. Die am Nukleus (dunkelgrau) lokalisierte SPHK-2 bildet hingegen intrazellulär verbleibendes S1P.



#### 4.1.6 Regulation der spinalen S1P-Konzentration nach nozizeptiver Stimulierung

Um zu prüfen, ob die *in vitro* beobachtete negative Rückkopplung auch *in vivo* auftritt, wurde die spinale S1P-Konzentration in einem häufig verwendeten Modell für entzündlichen Schmerz untersucht.

Nach intraplantarer Injektion von Zymosan A wurden die Sphingolipidkonzentrationen im Dorsalhorn des Rückenmarks (L4-L5) gemessen. Die Konzentrationen von Sphingosin, S1P, Sphinganin und Sphinganin-1-P waren eine Stunde nach intraplantarer Injektion von Zymosan deutlich gesteigert, fielen nach zwei Stunden wieder ab und blieben über den Zeitraum von 48 Stunden in diesem Konzentrationsbereich (Abbildung 3.15).

Der eine Stunde nach Induktion der peripheren Nozizeption durch Zymosan beobachtete signifikante Anstieg der S1P-Konzentration wird hauptsächlich durch die Aktivität der SPHK-1 verursacht, da bei Hemmung der SPHK-1 durch intrathekale Injektion eines SPHK-1 spezifischen Inhibitors SK1-II der Anstieg ausblieb. Auch die intrathekale (i.th.) Injektion von FTY720-P verhinderte den S1P Anstieg, vermutlich über Aktivierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors, der nachweislich die Hemmung der SPHK-1 vermittelt (Kapitel 3.2.4.4). FTY720-P ist kein Agonist für S1P<sub>2</sub> und kann daher nicht die SPHK-2 hemmen. Bei der nozizeptiven Stimulierung akuter Rückenmarksschnitte adulter Wildtyp Mäuse war jedoch keine anfängliche Steigerung der S1P-Konzentration zu erkennen. Diese wird vermutlich durch die Gewebsverletzungen bereits aktivierter SPHKs und der dadurch verursachten Erhöhung der X-fachen S1P-Konzentration überdeckt.

Wendet man die mittels der *in vitro* Daten aufgestellte Hypothese der negativen Rückkopplung auf die *in vivo* beobachteten Effekte an, so wird die Reduktion des S1P-Gehaltes nach zweistündiger Zymosan-Behandlung durch das von SPHK-1 gebildete und anschließend freigesetzte S1P vermittelt. Dieses extrazelluläre S1P führt durch Anbindung an die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> zur Hemmung der SPHK-1 bzw. SPHK-2 und somit zur Abnahme des S1P-Gehaltes nach zweistündiger Zymosan-Behandlung (Abbildung 4.2).

Die nach intrathekalen Injektion des SPHK-1 spezifischen Inhibitors SK1-II beobachtete Akkumulation der S1P-Konzentration nach zweistündiger Zymosan Behandlung, wird durch die Aktivität der SPHK-2 hervorgerufen. Dieser Effekt wurde bereits nach nozizeptiver Stimulierung akuter Rückenmarksschnitte SPHK-1-defizienter Mäuse

beobachtet und ist Beleg dafür, dass das durch SPHK-2 gebildete S1P weder *in vitro* noch *in vivo* eine Hemmung der SPHKs bedingt. Die negative Rückkopplung tritt demnach auch *in vivo* auf und wird ausschließlich über SPHK-1 gebildetes S1P vermittelt.

S1P-Rezeptor vermittelte S1P-Synthese wurde darüber hinaus in 3T3 Fibroblasten, murinen RAW264.7 Makrophagen und der humanen Krebszelllinie HeLa beobachtet, was vermuten lässt, dass die negative Rückkopplung einen allgemeingültigen regulatorischen Mechanismus darstellt.

#### **4.1.7 Die Rolle der Sphingosin-Kinasen in der spinalen Schmerzverarbeitung**

SPHK Knockout Mäuse sind für Untersuchungen am Schmerzmodell der Zymosan-induzierten Hyperalgesie nicht geeignet, da S1P bei Entzündungsreaktionen und der peripheren Schmerzverarbeitung eine pronozizeptive Rolle spielt. So führen sowohl intra- als auch extrazelluläre Erhöhungen der S1P-Konzentrationen zu einer gesteigerten Erregbarkeit von Neuronen der Hinterwurzelganglien (DRG) [94, 124]. Weitere indirekte pronozizeptive Effekte von S1P am Ort der Schmerzentstehung beruhen auf der Aktivierung immunkompetenter Zellen. So induziert S1P z.B. die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Freisetzung proinflammatorischer und pronozizeptiver Mediatoren aus Mastzellen [93]. Darüber hinaus ist S1P an der Regulation der Prostaglandinsynthese beteiligt [20]. Daher wäre es nicht möglich, die Ergebnisse inflammatorischer Schmerzmodelle unter Einsatz von SPHK Knockout Mäusen spezifischen S1P Effekten zuzuordnen. Aus diesem Grund wurden SPHK-1/-2-defiziente Mäuse lediglich in Modellen für akute Schmerzen untersucht.

Im Hot-Plate Test zeigten, in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen [70], SPHK-2 Knockout Mäuse eine signifikant reduzierte Schmerzschwelle. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten deuten darauf hin, dass nicht, wie zuvor angenommen, die Reduktion von endogenem S1P, sondern der erhöhte Sphingosingehalt im Rückenmark SPHK-2-defizienter Mäuse für die pronozizeptiven Effekte verantwortlich sein könnte. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Sphingosin die Fusion synaptischer Vesikel erhöhen kann [92]. Die erhöhte Sphingosinkonzentration in den SPHK-2 Knockout Mäusen könnte demnach die Ausschüttung der Neurotransmitter steigern und so die Schmerzverarbeitung fördern.

Bei der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie konnte durch die Gabe des selektiven SPHK-1 Inhibitors SK1-II; (2-(*p*-hydroxyanilino)-4-(*p*-chlorophenyl) thiazol)

eine Stunde nach Zymosaninjektion ein erhöhtes Schmerzverhalten von Wildtyp Mäusen festgestellt werden. Interessanterweise war nach zweistündiger Zymosanbehandlung keine Änderung des nozizeptiven Verhaltens gegenüber Kontrolltieren zu erkennen. Untersuchungen der spinalen S1P-Konzentration ergaben, dass die intrathekale Injektion des SPHK-1-spezifischen Inhibitors SK1-II eine Akkumulation der Gesamt-S1P-Konzentration im Rückenmark verursachte (Abbildung 3.15). Zwei Stunden nach Zymosaninjektion, dem Zeitpunkt an dem die S1P-Konzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks signifikant erhöht vorlag, war jedoch keine Änderung des nozizeptiven Verhaltens zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass durch SPHK-2 gebildetes intrazelluläres S1P keinen Einfluss auf die akute Schmerzverarbeitung ausübt. Vorarbeiten zeigten jedoch, dass die intrathekale Injektion von Sphingalin-1-P (dihydro-S1P) und niedrigen Konzentrationen an S1P (1-10  $\mu\text{M}$ ) das Schmerzverhalten von Tieren signifikant reduziert [70, 74]. Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem antinozizeptiv wirkenden S1P um von SPHK-1 gebildetes und anschließend sezerniertes S1P handelt. Daher scheint die SPHK-1 ausschlaggebend für die vermittelten Effekte auf die Nozizeption zu sein.

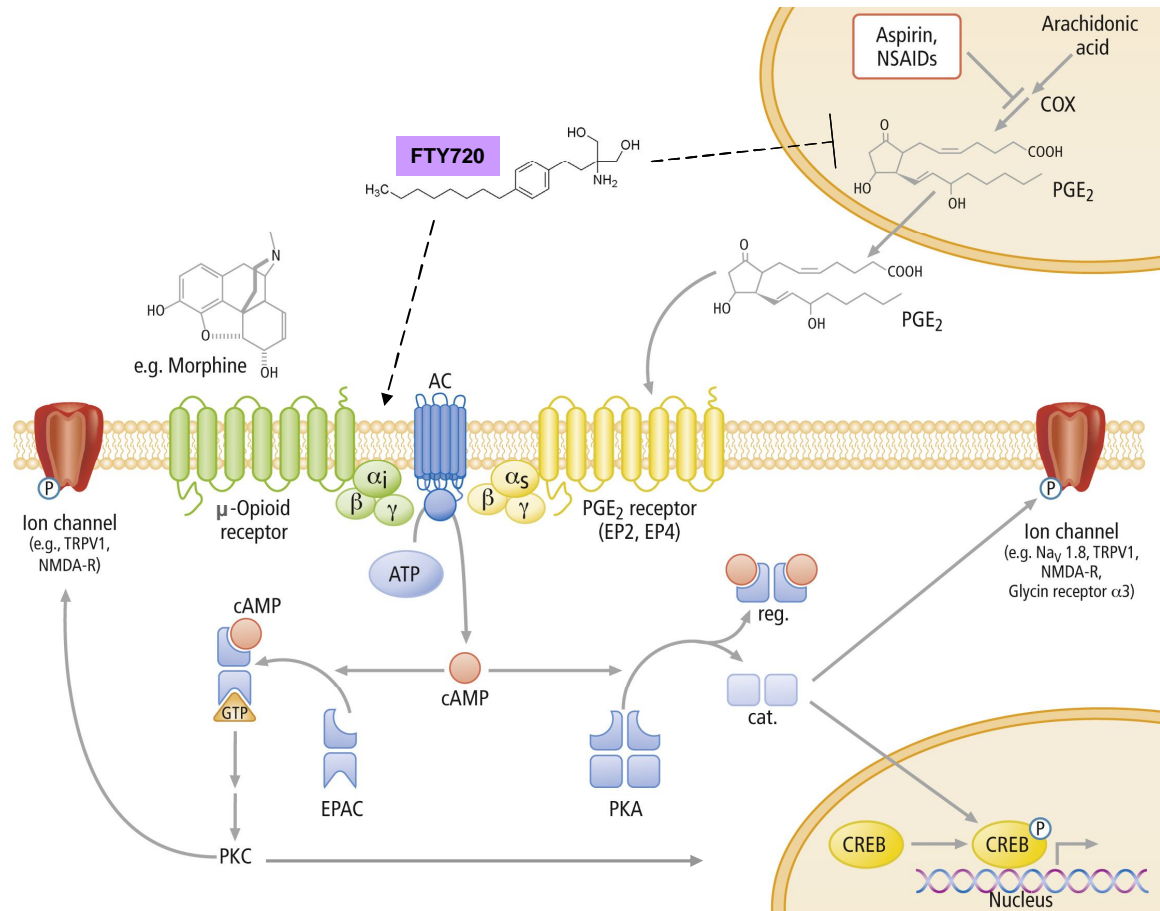
Die durch verstärkte Aktivität der SPHK-1 nach nozizeptiver Stimulierung hervorgerufene Hemmung beider SPHKs ist darüber hinaus ein möglicher Grund für den Verlust der antinozizeptiven Wirkung bei intrathekaler Applikation hoher S1P-Konzentrationen [70, 125]. Neben der von intrazellulärem S1P vermittelten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und der damit verbundenen verstärkten Ausschüttung von Neurotransmittern aus Neuronen könnte die hohe S1P-Konzentration die Hemmung der SPHKs durch negative Rückkopplung bedingen und zur Aufhebung des antinozizeptiven Effekts beitragen.

Wie sich die Hemmung einer oder beider SPHK Isoenzyme längerfristig auf die Schmerzverarbeitung auswirkt, muss allerdings noch an geeigneten Modellsystemen untersucht werden. Gegen eine Schmerztherapie durch gezielte Aktivierung der SPHKs spricht jedoch, dass SPHK-1 ein Onkogen ist, dessen Hochregulierung mit der Tumorangio-genese und der Resistenz von Krebszellen gegen radioaktive Chemotherapie in Verbindung gebracht wird [126]. Die Aktivierung der SPHKs hätte demnach unerwünschte Nebeneffekte und stellt deren Verwendung als ‚Target‘ zur Schmerzbehandlung in Frage.

#### ***4.2 S1P- Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten als Analgetika***

Mit Hilfe von Untersuchungen an bekannten und neu synthetisierten S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten sollten Hinweise für eine neuartige, pharmakologische Schmerztherapie erarbeitet werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind bereits eine Vielzahl verschiedener S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten entwickelt und charakterisiert worden. Der bekannteste und wohl am besten untersuchte S1P Agonist ist FTY720-P, ein hochaffiner Ligand der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3,5</sub> [18]. Vorarbeiten zeigten, dass intraperitoneal oder intrathekal gegebenes FTY720 einen antinozeptiven Effekt ausüben kann. Da es nach intrathekaler Injektion von FTY720-P zu keinen Änderungen des S1P-Gehalts nach einstündiger nozizeptiver Stimulierung mit Zymosan kommt (Abbildung 3.18), wird die Antinozeption von FTY720-P wohl unabhängig von endogenem S1P über die Aktivierung von S1P-Rezeptoren vermittelt.

Es wurde ein inhibitorischer Effekt von FTY720 auf die Sekretion von Eicosanoiden im Blutplasma nachgewiesen [70, 74]. Da bereits gut beschrieben ist, dass eine Hemmung der Prostaglandinsynthese im Rückenmark eine antinozeptive Wirkung vermittelt [75], besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung der Prostanoid Synthese zu der antinozeptiven Wirkung von FTY720 beiträgt. Darüber hinaus ist bekannt, dass FTY720 die intrazelluläre cAMP-Akkumulation herabsenkt [55]. FTY720 vereint demnach den cAMP-reduzierenden Effekt der Opioide und den Prostaglandin-inhibierenden Effekt der NSAIDs, welche die beiden weltweit am häufigsten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzten Arzneimittel-Gruppen darstellen (Abbildung 4.3). Aus diesem Grund ist die Herstellung und Erforschung neuer S1P-Rezeptor subtypspezifische Agonisten oder Antagonisten, welche hemmend auf die Synthese von Prostaglandinen und cAMP wirken können, von großem Interesse für die Entwicklung innovativer Therapeutika zur Behandlung chronischer Schmerzen.



**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der cAMP-Signalkaskade in sensorischen Neuronen.** Die Stimulation von G-Protein ( $G_s$ ) gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren (Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ )-Rezeptoren EP2 und EP4) in zentralen sensorischen Neuronen, führt zur Aktivierung der Adenylatzyklasen (ACs), welche die Umsetzung von ATP zu cAMP katalysieren. Die Anbindung von cAMP an die Protein Kinase A (PKA) bewirkt dessen Aktivierung. Durch PKA-abhängige Phosphorylierung von z.B. Transient-Receptor-Potential-Vanilloidrezeptor 1 (TRPV1)-Ionenkanälen und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor 1 (NMR) in peripheren und zentralen Neuronen wird die neuronale Erregbarkeit während akuter und chronischer Schmerzen gesteigert. Die Schmerzweiterleitung wird zusätzlich durch Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) gesteigert. Die weltweit am häufigsten zur Behandlung von Schmerzen eingesetzten Arzneimittel, nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) und Opiode, vermitteln die Hemmung der cAMP-Synthese durch verschiedene Mechanismen. Opiode (wie Morphin) stimulieren das inhibitorische G-Protein  $G_{ai}$  über den zugehörigen Rezeptor. Die  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_{ai}$  hemmt die AC-Aktivität. NSAIDs verringern cAMP durch die Hemmung der Cyclooxygenasen (COX), die normalerweise zur Bildung von  $PGE_2$  führen, welches die cAMP-Synthese über EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelt. Die antinozizeptive Wirkung des S1P-Strukturanalogons FTY720 basiert vermutlich auf einer Reduktion der cAMP-Synthese, sowie einer Reduktion der Prostaglandinsynthese durch direkte Hemmung der cPLA<sub>2</sub>. Modifizierte Abbildung nach Pierre et al. [127].

#### 4.2.1 Charakterisierung von S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Die neu synthetisierten potentiellen Agonisten und Antagonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurden von Prof. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. In  $GTP\gamma S^{35}$  Bindungsstudien zeigten die neu synthetisierten potentiellen Agonisten ST-967, ein Phosphonat-Analogon von FTY720, sowie das phosphorylierte Analogon ST-970 eine signifikante G-Proteinaktivierung und eine Affinität gegenüber S1P-Rezeptoren. Das FTY720-Phosphonat ST-967 wurde in der Literatur bereits als potenter Agonist, der alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von  $S1P_2$  aktiviert, beschrieben [128, 129] und zeigte eine stärkere S1P-Rezeptoraktivierung als ST-970. Die Phosphorylierung dieser Substanzen erwies sich als ausschlaggebend für die Aktivierung G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, da ST-969, die unphosphorylierte Form von ST-970, sowie FTY720 keine  $GTP\gamma S^{35}$  Anbindung auslösten. Da ST-969 zu einer signifikanten Reduktion der Forskolin-stimulierten cAMP-Synthese in Rückenmarkszellen führte, wird es vermutlich ähnlich wie FTY720 in den Zellen phosphoryliert und bedingt anschließend über die Anbindung an  $G_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren die Hemmung der Adenylatzyklase, dem cAMP synthetisierenden Enzym.

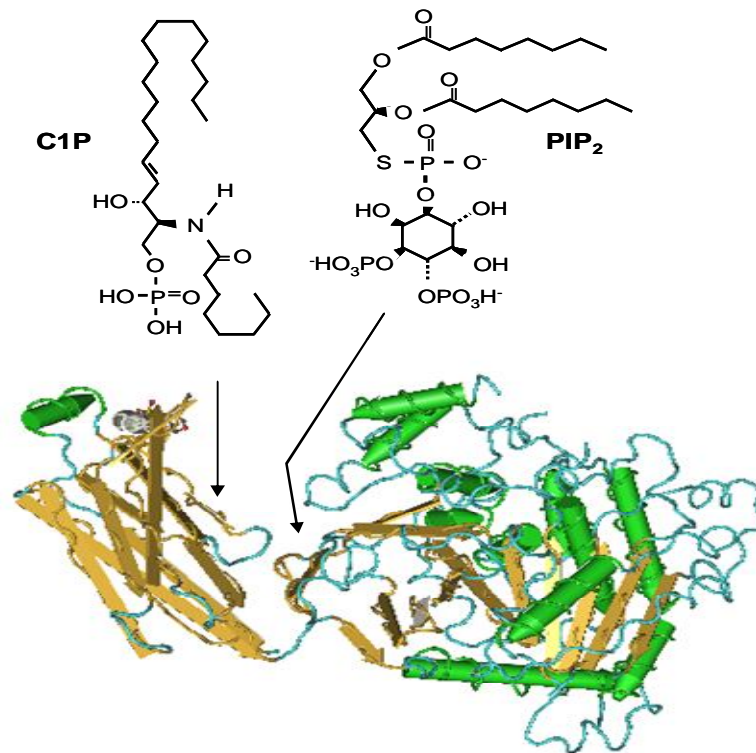
Die potentiellen G-Protein Rezeptor-Antagonisten ST-968, ST-971, ST972 und ST-973 zeigten keine agonistische Wirkung auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Mit Ausnahme von ST-968 inhibierten diese Substanzen die durch S1P induzierte G-Protein Aktivierung. Bei ST-971, ST972 und ST-973 handelt es sich demnach um S1P-Rezeptor-Antagonisten. Die antagonistische Wirkung dieser Substanzen konnte jedoch nicht in Zellkulturrexperimenten nachgewiesen werden. ST-971, ST972 und ST-973 konnten die durch FTY720-P verursachte Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentration nicht hemmen. Daher kann vermutet werden, dass es sich bei diesen Substanzen um kompetitive Antagonisten handelt, die mit FTY720-P um dieselbe Bindestelle am Rezeptor konkurrieren. Aus diesem Grund müssten die kompetitiven Inhibitoren in höherer Konzentration als der Antagonist vorliegen, damit die blockierende Wirkung zum tragen kommt.

#### 4.2.2 Einfluss der FTY720-Analoga auf die Prostaglandin $E_2$ Synthese

Neben der antinozizeptiven Wirkung von FTY720 wurde in Vorarbeiten ein inhibitorischer Effekt auf die Sekretion von Eicosanoiden im Blutplasma von Ratten

nachgewiesen [70, 74]. Diese inhibitorische Wirkung von FTY720 auf die Sekretion von PGE<sub>2</sub> konnte ebenfalls im Vollbluttest, einem *in vitro* Modellsystem, detektiert werden (Abbildung 3.30). Auch die Inkubation mit FTY720-P, dem S1P<sub>1/3/4/5</sub> Agonisten VPC23153, ST-967, ST-970, ST-972 und ST-973 führten zu einer signifikanten Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Konzentration. Der S1P<sub>1</sub> spezifische Agonist SEW2817, S1P, ST-968, sowie der S1P-Rezeptor Antagonist ST-971 bedingten keine Abänderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration.

Aufgrund der Tatsache, dass auch die S1P-Rezeptor-Antagonisten ST-972 und ST-973 zu einer Hemmung der PGE<sub>2</sub> Sekretion führen und diese nachweislich keine G-Proteinaktivierung bedingen (Abbildung 3.26), muss die Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese S1P-Rezeptor-unabhängig vermittelt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass FTY720 unabhängig von seinem Phosphorylierungsgrad und S1P-Rezeptor Aktivierung zu einer Verringerung der Freisetzung von PGD<sub>2</sub> aus Mastzellen und von PGE<sub>2</sub> aus RAW264.7 Makrophagen führt [42]. Stattdessen vermittelt FTY720 seine Wirkung über direkte Bindung an die Gruppe IVA cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ). Bei diesem Enzym handelt es sich um das konzentrationslimitierende Enzym der Eicosanoid-Biosynthesekaskade, welches für die Freisetzung der Arachidonsäure (AA) verantwortlich ist, die anschließend zu Prostaglandinen, Prostacyclin oder Thromboxan umgesetzt wird [76, 130].



**Abbildung 4.4:** C1P und PIP<sub>2</sub> interagieren mit unterschiedlichen Bindestellen der cPLA<sub>2</sub>. Das Enzym cPLA<sub>2</sub> besteht aus einer Calcium-bindenden C2-Domäne und einer α/β-Hydrolase Domäne inklusive dem aktiven Zentrum (katalytische Domäne). C1P [131, 132] und Phosphatidylinositol-(4,5) bis-phosphat (PIP<sub>2</sub>) [133, 134] binden im Bereich zwischen der regulatorischen und der katalytischen Domäne. C1P interagiert mit basischen Resten der C2-Domäne, während PIP<sub>2</sub> an basische Reste der katalytischen Domäne bindet.

Es existieren innerhalb der cPLA<sub>2</sub> mehrere potentielle Bindestellen, an die FTY720-Analoga binden und so die Hemmung der Eicosanoid-Synthese vermitteln könnten. Beispielsweise konkurriert der selektive cPLA<sub>2</sub> Inhibitor BMS-229724 (4-[4-[2-[2-[bis(4-chlorophenyl) methoxy]ethyl-sulfonyl]ethoxy]phenyl]-1,1,1-trifluoro-2-butanon) mit dem Phospholipid-Substrat um das aktive Zentrum [135]. Darüber hinaus existieren verschiedene Stellen, an denen die cPLA<sub>2</sub> Aktivatoren C1P [131, 132] und Phosphatidylinositol-(4,5) bis-phosphat (PIP) [133, 134] binden, welche auch durch Inhibitoren besetzt werden könnten (Abbildung 4.4). Die Hemmung der cPLA<sub>2</sub> über direkte Bindung der FTY720-Analoga ist demnach eine mögliche Erklärung für die induzierte Reduktion der PGE<sub>2</sub> Sekretion aus Blutzellen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass durch LPS-Stimulierung die im Blut vorhandenen Monozyten und Makrophagen Cyclooxygenase-2 (COX-2) exprimieren, was zu einer erhöhten Produktion



von PGE<sub>2</sub> führt [136]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die FTY720-Analoga auch über die Hemmung der COX-2 oder der terminalen Synthasen (z.B. mPGES-1) die Reduktion der LPS-stimulierten PGE<sub>2</sub> Synthese beeinflussen.

Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die strukturelle Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung auf die PGE<sub>2</sub> Synthese vermutlich der Besitz eines basischen Zentrums ist. SEW2871 weist kein basisches Zentrum auf und verändert demnach die PGE<sub>2</sub>-Konzentration nicht. Bei ST-968 ist ein basisches Zentrum kaum erreichbar und bei ST-971 könnte dieses durch die nahe Phosphatgruppe maskiert werden. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde die Wirkung der alkalischen tertiären Amin-Analoga ST-1146 und ST-1147 auf die PGE<sub>2</sub> Sekretion getestet. Während ST-1146 keine Änderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration bedingte, reduzierte ST-1147 den PGE<sub>2</sub>-Gehalt signifikant. Da sich die beiden tertiären Aminverbindungen lediglich in der Länge der Kohlenstoffkette unterscheiden, ist vermutlich die Anzahl der Freiheitsgrade entscheidend für die inhibitorische Wirkung. ST-1146 besitzt aufgrund der längeren Kohlenstoffkette mehr Freiheitsgrade, d.h. die basische Amingruppe kann vermehrt geometrischen Transformationen, wie Rotationen oder Translationen, erfahren und somit die zur Wechselwirkung mit dem Enzym benötigte Konformation nicht Aufrecht erhalten. Die Amingruppe des ST-1147 hingegen besitzt aufgrund der kurzen Kohlenstoffkette weniger Spielraum, verweilt dadurch in der für die Anbindung an die cPLA<sub>2</sub> benötigte Position und führt so zur Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese. Demnach ist die basische Eigenschaft einer Substanz wichtig für die Hemmung der Prostaglandinsynthese, stellt jedoch keine Garantie für eine Inhibition dar.

#### 4.2.3 Wirkung der FTY720-Analoga *in vivo*

Um zu prüfen, ob die *in vitro* beobachtete Hemmung der Prostaglandinsynthese auch vor einem physiologischen Hintergrund auftritt, wurden verschiedene Konzentrationen der FTY720-Analoga intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Analoga ST-967, ST-969 und ST-973 beeinflussten nach i.p. Gabe die Plasmakonzentrationen von PGE<sub>2</sub> nicht, während die bereits im Vollblut-Test inhibitorisch wirkenden Substanzen FTY720 und ST-970 einen reduzierenden Effekt auf den PGE<sub>2</sub>-Gehalt ausübten.

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die Prostaglandinsynthese wurde nach i.p. Injektion von ST-970 und FTY720 eine signifikante Reduktion der Lymphozytenzahl festgestellt. Für FTY720-Phosphonat wurde in der Literatur bereits die Induktion einer Lymphopenie

im Blut von Mäusen und Ratten beschrieben [128]. Da die immunsuppressive Eigenschaft von FTY720-P auf der Hemmung der S1P<sub>1</sub> Signalkaskade basiert [137, 138], wird vermutet, dass auch ST-970 durch Anbindung an S1P<sub>1</sub> den Austritt der Lymphozyten aus dem peripheren lymphatischen Gewebe bzw. dem Thymus behindert. Allerdings traten die beobachteten Effekte der FTY720-Analoga nicht bei jeder Dosis auf. Der S1P-Rezeptor-Agonist ST-970 verursachte bei i.p. Gabe von 0,1 mg/kg keine Reduktion der Lymphozytenzahl, reduzierte in dieser Konzentration jedoch auch nicht die Synthese von PGE<sub>2</sub>, wohingegen 1 mg/kg FTY720 sowohl auf die Prostaglandinsynthese als auch auf die Lymphozytenwanderung hemmend wirkte. Eine Erklärung dafür könnte in den pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen liegen. Von FTY720 ist bekannt, dass es in Ratten eine Bioverfügbarkeit von über 60% und eine Halbwertszeit von zwölf Stunden aufweist und dadurch die FTY720-Konzentration im Blut über längeren Zeitraum hoch bleibt [75]. Von den in dieser Arbeit untersuchten FTY720-Analoga sind keine Daten zur Absorption, der Verteilung oder dem Metabolismus im Körper bekannt. Es ist unklar, wie schnell die Substanzen von dem peritonealen Überzug des Bauchraums aufgenommen werden und in das Blut gelangen. Darüber hinaus könnte die Wirkung der Substanzen durch deren Transport über die Zellmembran und deren intrazelluläre Verarbeitung beeinflusst werden.

Die Therapie von chronischen Schmerzen ist unbefriedigend, da die Medikamente nicht sehr effektiv sind und meist unerwünschte Nebenwirkungen besitzen. Hier könnten FTY720 Derivate Alternativen zu herkömmlichen Schmerztherapien darstellen. Neben einer Infektneigung können bei Gabe von FTY720 ein initialer Herzfrequenzabfall, sowie Kopfschmerzen, Durchfall und Übelkeit auftreten. Die Beeinträchtigungen der kardiovaskulären Funktionen sind vermutlich auf die Aktivierung des Rezeptors S1P<sub>3</sub> zurückzuführen [139]. Die Verwendung von FTY720-Analoga, welche keine Aktivierung des für die immunsuppressiven Effekte verantwortlichen Rezeptor S1P<sub>1</sub> oder des mit Bradykardie und Bluthochdruck assoziierten Rezeptor S1P<sub>3</sub> ausüben und dennoch ein analgetisches Potential, vermittelt durch die Reduktion der Prostaglandin- und cAMP-Synthese, besitzen, wären viel versprechende neue Substanzen für die Entwicklung innovativer Therapeutika zur Behandlung chronischer Schmerzen. Zu empfehlen wären FTY720-Analoga wie z.B. ST-967 mit basischem Zentrum und geringem Freiheitsgrad, damit die zur Wechselwirkung mit der cPLA<sub>2</sub> benötigte Konformation Aufrecht erhalten

---

werden kann. Ebenfalls denkbar wäre der Einsatz eines S1P-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. ST-973, oder die Kombination von selektiven Agonisten und Antagonisten.

## 5 Zusammenfassung

Im Hinterhorn des Rückenmarks werden aus der Peripherie kommende nozizeptive Reize auf zentrale Neurone umgeschaltet. Sphingosin-1-Phosphat [56] ist ein potentieller Modulator dieser spinalen nozizeptiven Transmission. Vorarbeiten zeigten, dass die intrathekale Applikation von S1P zu einer Verringerung des nozizeptiven Verhaltens führt [70]. Aus diesem Grund sind sowohl Enzymsysteme, welche die spinale S1P-Konzentration regulieren, als auch spezifische S1P-Rezeptoren und deren Aktivatoren und Inhibitoren potentielle ‚Targets‘ und ‚Tools‘ für eine suffiziente Schmerztherapie. Zur Charakterisierung der dem antinozizeptiven Effekt von S1P zugrunde liegenden Mechanismen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> in den für die Schmerzverarbeitung wichtigen äußeren Laminae I-III des dorsalen Hinterhorns des Rückenmarks exprimiert werden. S1P verringert über Aktivierung G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelter Rezeptoren die Hemmung der cAMP-Synthese in exzitatorischen Rückenmarksneuronen dieser Laminae, was die antinozizeptive Wirkung von S1P erklären könnte.

Zur Aufklärung der Regulation der S1P-Konzentration im Rückenmark nach peripherer nozizeptiver Stimulation sollte die Aktivität S1P metabolisierender Enzyme näher betrachtet werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach peripherer nozizeptiver Stimulierung *in vitro* und *in vivo* zu einer negativen Rückkopplung durch S1P kommt, basierend auf einer anfänglichen Aktivierung beider SPHKs. Das durch SPHK-1 gebildete S1P vermittelt extrazellulär über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor die Hemmung der SPHK-1, während es über den S1P<sub>2</sub>-Rezeptor die SPHK-2 hemmt und dadurch zu einer Absenkung der S1P-Konzentration führt. Das durch SPHK-2 gebildete S1P hingegen wird nicht sezerniert, bedingt demnach keine Hemmung der S1P-Synthese und übt keinen direkten Einfluss auf die akute spinale Schmerzverarbeitung aus. Bei dem antinozizeptiv wirkenden S1P handelt es sich um von SPHK-1 gebildetes und anschließend sezerniertes S1P. Auch in nicht-neuronalen Zellen konnte die negative Rückkopplung detektiert werden und stellt daher einen allgemeinen regulatorischen Mechanismus dar.

Des Weiteren sollte die Untersuchung von neu synthetisierten S1P-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten weitere Grundlagen für eine neuartige, pharmakologische Schmerztherapie liefern. Vorarbeiten zeigten, dass die intraperitoneale oder intrathekale Gabe des strukturellen S1P-Analogons FTY720 das Schmerzverhalten von Tieren

---

reduziert [74]. Die hemmende Wirkung des FTY720 auf die Eicosanoidsynthese durch direkte Hemmung der cPLA<sub>2</sub> kann zur Vermittlung des antinozizeptiven Effekts von FTY720 beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass FTY720-Analoga die PGE<sub>2</sub>-Synthese *in vivo* und *in vitro* hemmen können. Die strukturelle Voraussetzung für die hemmende Wirkung dieser S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten ist der Besitz eines basischen Zentrums und darüber hinaus die Freiheitsgrade der Substanzen eine Rolle für die Bindung an die cPLA<sub>2</sub> spielen. Die Verwendung von FTY720-Analoga, welche keine Aktivierung der für Nebenwirkungen verantwortlichen S1P-Rezeptoren bedingen und dennoch eine Reduktion der Prostaglandin- und cAMP-Synthese vermitteln, wären viel versprechende neue Substanzen zur Behandlung chronischer Schmerzen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<i>AA</i>	Arachidonsäure
<i>ABC-Transporter</i>	ATB-binding cassette-Transporter
<i>AC</i>	Adenylatzyklase
<i>AMPA</i>	Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionat
<i>As</i>	Aminosäuren
<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
<i>BDNF</i>	Brain-derived neurotrophic factor
<i>BSA</i>	Rinderserumalbumin
<i>CIP</i>	Ceramid-1-Phosphat
<i>CaMKII</i>	Calmodulinkinase II
<i>cAMP</i>	cyclisches Adenosin Monophosphat
<i>CGRP</i>	Calcitonine-Gene-Related-Peptide
<i>COX</i>	Cyclooxygenase
<i>cPLA<sub>2</sub></i>	cytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
<i>DG</i>	Diacylglycerol
<i>DRG</i>	Hinterwurzelganglion
<i>EC<sub>50</sub></i>	halbmaximale effektive Konzentration
<i>EDG</i>	Endothelial Differentiation Gene
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ERK</i>	Extracellular-signal-regulated Proteinkinase
<i>GABA</i>	Gamma-Aminobuttersäure
<i>GAD</i>	Glutamat Decarboxylase
<i>G<sub>i</sub></i>	inhibitorisches G-Protein
<i>GlyRa3</i>	Glycinrezeptor $\alpha$ 3
<i>GPR</i>	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
<i>GTP</i>	Guanosintriphosphat
<i>hACCA</i>	Human Adenylate Cyclase Constitutive Activator
<i>IB-4</i>	Isolectin B-4
<i>IC<sub>50</sub></i>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
<i>IP<sub>3</sub></i>	Inositol triphosphate
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.pl.</i>	intraplantar
<i>i.th.</i>	intrathekal
<i>IFN</i>	Interferon
<i>IL</i>	Interleukin
<i>IP<sub>3</sub></i>	Inositol-3-Phosphat
<i>KCl</i>	Kalium Chlorid
<i>kDa</i>	Kilo-Dalton
<i>KO</i>	Knockout
<i>LPP</i>	Lipidphosphat-Phosphatase
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharid
<i>LZP</i>	Langzeitpotenzierung
<i>MELK</i>	Multi-Epitope-Ligand-Kartographie
<i>mGluR</i>	metabotropher Glutamat Rezeptoren
<i>mRNA</i>	messenger Ribonukleinsäure
<i>NGF</i>	Nerve Growth Faktor

---

<i>NMDA</i>	N-Methyl-D-Aspartat
<i>NO</i>	Stichstoffmonoxid
<i>PDGF</i>	Platelet Derived Growth Factor
<i>PG</i>	Prostaglandin
<i>PIP<sub>2</sub></i>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate or PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> ,
<i>PKA</i>	Proteinkinase A
<i>PKC</i>	Proteinkinase C
<i>PLA</i>	Phospholipase A
<i>PLD</i>	Phospholipase D
<i>RANKL</i>	Receptor activator of NF-κB ligand
<i>Rho</i>	Rho-GTPasen
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>S1P</i>	Sphingosin-1-Phosphat
<i>SDS</i>	Sodium-dodecyl-sulfat
<i>SEM</i>	Standardfehler des Mittelwerts
<i>SPHK</i>	Sphingosin-Kinase
<i>SPL</i>	S1P-Lyase
<i>SPP</i>	S1P-Phosphatase
<i>TEMED</i>	N, N, N, N- Tetramethylethyldiamin
<i>TF</i>	tissue factor
<i>TGF-β</i>	Transforming growth factor
<i>TNFα</i>	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
<i>TRPV-1</i>	Transient-Receptor-Potential-Vanilloidrezeptor
<i>TXA<sub>2</sub></i>	Thromboxan A <sub>2</sub>
<i>u.a.</i>	unter anderem
<i>UV</i>	Ultraviolett
<i>VEGF</i>	Vasvular endothelial growth factor
<i>ZNS</i>	Zentrales Nervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8 ed. 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart. 205-207.
2. Backonja, M.M., *Defining neuropathic pain*. *Anesth Analg*, 2003. 97(3): p. 785-90.
3. Talavera, K., B. Nilius, and T. Voets, *Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers*. *Trends Neurosci*, 2008. 31(6): p. 287-95.
4. Roosterman, D., et al., *Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ*. *Physiol Rev*, 2006. 86(4): p. 1309-79.
5. Melendez, A.J., *Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1784(1): p. 66-75.
6. Zemann, B., et al., *Normal neutrophil functions in sphingosine kinase type 1 and 2 knockout mice*. *Immunol Lett*, 2007. 109(1): p. 56-63.
7. Scholich, K. and G. Geisslinger, *Is mPGES-1 a promising target for pain therapy?* *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(8): p. 399-401.
8. Lopshire, J.C. and G.D. Nicol, *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*, 1998. 18(16): p. 6081-92.
9. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. *Prog Neurobiol*, 1999. 57(1): p. 1-164.
10. Zaccolo, M., et al., *Imaging the cAMP-dependent signal transduction pathway*. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 6): p. 1323-6.
11. Ji, R.R., et al., *Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?* *Trends Neurosci*, 2003. 26(12): p. 696-705.
12. Malenka, R.C. and R.A. Nicoll, *Long-term potentiation--a decade of progress?* *Science*, 1999. 285(5435): p. 1870-4.
13. Schaffhauser, H., et al., *cAMP-dependent protein kinase inhibits mGluR2 coupling to G-proteins by direct receptor phosphorylation*. *J Neurosci*, 2000. 20(15): p. 5663-70.
14. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. *Semin Immunol*, 2004. 16(1): p. 3-9.
15. Zeilhofer, H.U., et al., *Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice*. *J Comp Neurol*, 2005. 482(2): p. 123-41.
16. Zeilhofer, H.U., *The glycinergic control of spinal pain processing*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(18): p. 2027-35.
17. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, 2008. 9: p. 220.
18. Sensken, S.C., et al., *Selective activation of G alpha i mediated signalling of SIP3 by FTY720-phosphate*. *Cell Signal*, 2008. 20(6): p. 1125-33.
19. Kihara, A. and Y. Igarashi, *Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720*. *Biochim Biophys Acta*, 2008.



20. Chalfant, C.E. and S. Spiegel, *Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 20): p. 4605-12.
21. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(2): p. 139-50.
22. Bingham, C.O., 3rd, et al., *A heparin-sensitive phospholipase A2 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 are functionally linked in the delayed phase of prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow-derived mast cells*. J Biol Chem, 1996. 271(42): p. 25936-44.
23. Johnson, K.R., et al., *PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)*. J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 35257-62.
24. Hla, T. and T. Maciag, *An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 1990. 265(16): p. 9308-13.
25. Le Stunff, H., et al., *Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase*. J Biol Chem, 2002. 277(11): p. 8920-7.
26. Mechtcheriakova, D., et al., *Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses*. Cell Signal, 2007. 19(4): p. 748-60.
27. Aoki, S., et al., *Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel*. J Biochem, 2005. 138(1): p. 47-55.
28. Schwab, S.R., et al., *Lymphocyte sequestration through SIP lyase inhibition and disruption of SIP gradients*. Science, 2005. 309(5741): p. 1735-9.
29. Kee, T.H., P. Vit, and A.J. Melendez, *Sphingosine kinase signalling in immune cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005. 32(3): p. 153-61.
30. Maceyka, M., et al., *Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1585(2-3): p. 193-201.
31. Meyer zu Heringdorf, D., et al., *Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors*. Eur J Pharmacol, 2001. 414(2-3): p. 145-54.
32. Huwiler, A., et al., *Histamine increases sphingosine kinase-1 expression and activity in the human arterial endothelial cell line EA.hy 926 by a PKC-alpha-dependent mechanism*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(3): p. 367-76.
33. Taha, T.A., et al., *Sphingosine kinase-1 is cleaved by cathepsin B in vitro: identification of the initial cleavage sites for the protease*. FEBS Lett, 2006. 580(26): p. 6047-54.
34. Kono, M., M.L. Allende, and R.L. Proia, *Sphingosine-1-phosphate regulation of mammalian development*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1781(9): p. 435-41.
35. Edsall, L.C., G.G. Pirianov, and S. Spiegel, *Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation*. J Neurosci, 1997. 17(18): p. 6952-60.
36. Maceyka, M., S. Milstien, and S. Spiegel, *Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005. 77(1-4): p. 15-22.
37. Allende, M.L., et al., *Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720*. J Biol Chem, 2004. 279(50): p. 52487-92.

38. Liu, Y.T., et al., *Potential misidentification of cyclooxygenase-2 by Western blot analysis and prevention through the inclusion of appropriate controls*. Mol Biotechnol, 2006. 34(3): p. 329-35.
39. Okada, T., et al., *Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis*. J Biol Chem, 2005. 280(43): p. 36318-25.
40. Paugh, S.W., et al., *A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia*. Blood, 2008. 112(4): p. 1382-91.
41. Cuvillier, O., et al., *Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes*. J Biol Chem, 1998. 273(5): p. 2910-6.
42. Payne, S.G., et al., *The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors*. Blood, 2007. 109(3): p. 1077-85.
43. Kim, R.H., et al., *Export and functions of sphingosine-1-phosphate*. Biochim Biophys Acta, 2009.
44. Kobayashi, N., et al., *Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner*. J Lipid Res, 2006. 47(3): p. 614-21.
45. Yamaguchi, F., et al., *Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 227(2): p. 608-14.
46. Uhlenbrock, K., H. Gassenhuber, and E. Kostenis, *Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors*. Cell Signal, 2002. 14(11): p. 941-53.
47. Niedernberg, A., et al., *Sphingosine 1-phosphate and dioleoylphosphatidic acid are low affinity agonists for the orphan receptor GPR63*. Cell Signal, 2003. 15(4): p. 435-46.
48. Lynch, K.R. and T.L. Macdonald, *Sphingosine 1-phosphate chemical biology*. Biochim Biophys Acta, 2008.
49. Dev, K.K., et al., *Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis*. Pharmacol Ther, 2008. 117(1): p. 77-93.
50. Saba, J.D. and T. Hla, *Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism*. Circ Res, 2004. 94(6): p. 724-34.
51. Anliker, B. and J. Chun, *Cell surface receptors in lysophospholipid signaling*. Semin Cell Dev Biol, 2004. 15(5): p. 457-65.
52. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(5): p. 397-407.
53. Alemany, R., et al., *Regulation and functional roles of sphingosine kinases*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. 374(5-6): p. 413-28.
54. Pyne, S., et al., *Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease*. Cell Signal, 2009. 21(1): p. 14-21.
55. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2002. 277(24): p. 21453-7.
56. Migration, E.R.o.S.-P.S.P.R.A.i.t.

57. Billich, A., et al., *Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases*. J Biol Chem, 2003. 278(48): p. 47408-15.
58. Chiba, K., et al., *Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus*. Cell Mol Immunol, 2006. 3(1): p. 11-9.
59. Budde, K., et al., *FTY720 (fingolimod) in renal transplantation*. Clin Transplant, 2006. 20 Suppl 17: p. 17-24.
60. Saab, G., et al., *Reversible cystoid macular edema secondary to fingolimod in a renal transplant recipient*. Arch Ophthalmol, 2008. 126(1): p. 140-1.
61. Rammohan, K.W. and J. Shoemaker, *Emerging multiple sclerosis oral therapies*. Neurology. 74 Suppl 1: p. S47-53.
62. Osinde, M., F. Mullershausen, and K.K. Dev, *Phosphorylated FTY720 stimulates ERK phosphorylation in astrocytes via SIP receptors*. Neuropharmacology, 2007. 52(5): p. 1210-8.
63. Yatomi, Y., et al., *[Sphingosine 1-phosphate and vascular endothelial cells]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2002. 47(4 Suppl): p. 488-95.
64. Kawanabe, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate accelerates wound healing in diabetic mice*. J Dermatol Sci, 2007. 48(1): p. 53-60.
65. Wei, S.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses*. Nat Immunol, 2005. 6(12): p. 1228-35.
66. Brinkmann, V. and K.R. Lynch, *FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(5): p. 569-75.
67. Clemens, J.J., et al., *Synthesis of benzimidazole based analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent, subtype-selective SIP4 receptor agonists*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. 14(19): p. 4903-6.
68. Osada, M., et al., *Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 299(3): p. 483-7.
69. Ohuchi, H., et al., *Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development*. Dev Dyn, 2008. 237(11): p. 3280-94.
70. Coste, O., et al., *Sphingosine-1-phosphate modulates spinal nociceptive processing*. J Biol Chem, 2008.
71. Jaillard, C., et al., *Edg8/SIP5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival*. J Neurosci, 2005. 25(6): p. 1459-69.
72. Colombaioni, L. and M. Garcia-Gil, *Sphingolipid metabolites in neural signalling and function*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. 46(3): p. 328-55.
73. MacLennan, A.J., et al., *The SIP2 sphingosine 1-phosphate receptor is essential for auditory and vestibular function*. Hear Res, 2006. 220(1-2): p. 38-48.
74. Coste, O., et al., *Antinociceptive activity of the SIP-receptor agonist FTY720*. J Cell Mol Med, 2008. 12(3): p. 995-1004.
75. Kim, D.H., et al., *Inhibition of spinal cytosolic phospholipase A(2) expression by an antisense oligonucleotide attenuates tissue injury-induced hyperalgesia*. Neuroscience, 2008. 154(3): p. 1077-87.
76. Murakami, M., et al., *Prostaglandin E synthase*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 383-99.
77. Bovill, J.G., *Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Eur J Anaesthesiol Suppl, 1997. 15: p. 9-15.

78. Williams, J.T., M.J. Christie, and O. Manzoni, *Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence*. *Physiol Rev*, 2001. 81(1): p. 299-343.
79. Vasquez, E., et al., *Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability*. *J Neurosci*, 2001. 21(22): p. 9001-8.
80. Tegeder, I., et al., *Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(9): p. 3253-7.
81. Hofacker, A., et al., *Downregulation of cytosolic prostaglandin E2 synthase results in decreased nociceptive behavior in rats*. *J Neurosci*, 2005. 25(39): p. 9005-9.
82. Schubert, W., et al., *Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy*. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(10): p. 1270-8.
83. Lissandron, V., et al., *Improvement of a FRET-based indicator for cAMP by linker design and stabilization of donor-acceptor interaction*. *J Mol Biol*, 2005. 354(3): p. 546-55.
84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
85. Linke, B., et al., *Toponomics analysis of drug-induced changes in arachidonic acid-dependent signaling pathways during spinal nociceptive processing*. *J Proteome Res*, 2009. 8(10): p. 4851-9.
86. Schmidt, H., R. Schmidt, and G. Geisslinger, *LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2006. 81(3-4): p. 162-70.
87. Watson, A.H., *GABA- and glycine-like immunoreactivity in axons and dendrites contacting the central terminals of rapidly adapting glabrous skin afferents in rat spinal cord*. *J Comp Neurol*, 2003. 464(4): p. 497-510.
88. Todd, A.J., et al., *The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn*. *Eur J Neurosci*, 2003. 17(1): p. 13-27.
89. Zhao, J., et al., *Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. 31(3): p. 539-48.
90. Kim, H.W., et al., *Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice*. *Br J Pharmacol*, 2006. 148(4): p. 490-8.
91. Zemann, B., et al., *Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720*. *Blood*, 2006. 107(4): p. 1454-8.
92. Camoletto, P.G., et al., *Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18*. *PLoS One*, 2009. 4(4): p. e5310.
93. Baumruker, T., F. Bornancin, and A. Billich, *The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses*. *Immunol Lett*, 2005. 96(2): p. 175-85.
94. Zhang, Y.H., et al., *Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons*. *J Neurophysiol*, 2006. 96(3): p. 1042-52.

95. Abbate, R., et al., *Cyclooxygenase and lipoxigenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: in vitro effect of dipyrene*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990. 41(2): p. 89-93.
96. Campos, C., et al., *Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol*. Eur J Pharmacol, 1999. 378(3): p. 339-47.
97. Ayoub, S.S., et al., *Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(30): p. 11165-9.
98. Levy, M., et al., *Cerebrospinal fluid prostaglandins after systemic dipyrene intake*. Clin Pharmacol Ther, 1998. 64(1): p. 117-22.
99. Kaudel, C.P., et al., *FTY720 for treatment of ischemia-reperfusion injury following complete renal ischemia in C57/BL6 mice*. Transplant Proc, 2006. 38(3): p. 679-81.
100. Ferreira, S.H. and M. Nakamura, *I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process*. Prostaglandins, 1979. 18(2): p. 179-90.
101. Taiwo, Y.O. and J.D. Levine, *Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia*. Neuroscience, 1991. 44(1): p. 131-5.
102. Igarashi, Y., et al., *Effect of chemically well-defined sphingosine and its N-methyl derivatives on protein kinase C and src kinase activities*. Biochemistry, 1989. 28(17): p. 6796-800.
103. Megidish, T., et al., *Endogenous substrates of sphingosine-dependent kinases (SDKs) are chaperone proteins: heat shock proteins, glucose-regulated proteins, protein disulfide isomerase, and calreticulin*. Biochemistry, 1999. 38(11): p. 3369-78.
104. King, C.C., et al., *Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1*. J Biol Chem, 2000. 275(24): p. 18108-13.
105. McDonald, O.B., et al., *Activation of casein kinase II by sphingosine*. J Biol Chem, 1991. 266(32): p. 21773-6.
106. Venkataraman, K., et al., *Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular SIP gradient*. Biochem J, 2006. 397(3): p. 461-71.
107. Takabe, K., et al., *Estradiol induces export of sphingosine-1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2*. J Biol Chem.
108. Hait, N.C., et al., *Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate*. Science, 2009. 325(5945): p. 1254-7.
109. Sabbadini, R.A., *Targeting sphingosine-1-phosphate for cancer therapy*. Br J Cancer, 2006. 95(9): p. 1131-5.
110. Ryu, J., et al., *Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling*. Embo J, 2006. 25(24): p. 5840-51.
111. Mehta, D., et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> mediates rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. 280(17): p. 17320-8.
112. Dudek, S.M., et al., *Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase*. J Biol Chem, 2004. 279(23): p. 24692-700.
113. Peng, X., et al., *Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. 169(11): p. 1245-51.

114. Itagaki, K., et al., *Sphingosine 1-phosphate has dual functions in the regulation of endothelial cell permeability and Ca<sup>2+</sup> metabolism*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 323(1): p. 186-91.
115. Olivera, A., et al., *Platelet-derived growth factor-induced activation of sphingosine kinase requires phosphorylation of the PDGF receptor tyrosine residue responsible for binding of PLCgamma*. Faseb J, 1999. 13(12): p. 1593-600.
116. Olivera, A., et al., *Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 2003. 278(47): p. 46452-60.
117. Xia, P., et al., *An oncogenic role of sphingosine kinase*. Curr Biol, 2000. 10(23): p. 1527-30.
118. Nava, V.E., et al., *Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells*. Exp Cell Res, 2002. 281(1): p. 115-27.
119. Maceyka, M., et al., *SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism*. J Biol Chem, 2005. 280(44): p. 37118-29.
120. Le Stunff, H., et al., *Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2*. J Biol Chem, 2007. 282(47): p. 34372-80.
121. Takeya, H., et al., *Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells*. Blood, 2003. 102(5): p. 1693-700.
122. Donati, C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha exerts pro-myogenic action in C2C12 myoblasts via sphingosine kinase/S1P2 signaling*. FEBS Lett, 2007. 581(23): p. 4384-8.
123. Hobson, J.P., et al., *Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility*. Science, 2001. 291(5509): p. 1800-3.
124. Zhang, Y.H., M.R. Vasko, and G.D. Nicol, *Intracellular sphingosine 1-phosphate mediates the increased excitability produced by nerve growth factor in rat sensory neurons*. J Physiol, 2006. 575(Pt 1): p. 101-13.
125. Albert, R., et al., *Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its enantiomer*. J Med Chem, 2005. 48(16): p. 5373-7.
126. Shida, D., et al., *Targeting SphK1 as a new strategy against cancer*. Curr Drug Targets, 2008. 9(8): p. 662-73.
127. Pierre, S., et al., *Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2009. 8(4): p. 321-35.
128. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. 296(5566): p. 346-9.
129. Hale, J.J., et al., *Potent S1P receptor agonists replicate the pharmacologic actions of the novel immune modulator FTY720*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. 14(12): p. 3351-5.
130. Lu, G., et al., *Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2*. J Biol Chem, 1999. 274(23): p. 16162-7.

131. Stahelin, R.V., et al., *Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain*. J Biol Chem, 2007. 282(28): p. 20467-74.
132. Subramanian, P., et al., *Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms*. J Lipid Res, 2007. 48(12): p. 2701-8.
133. Mosior, M., D.A. Six, and E.A. Dennis, *Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity*. J Biol Chem, 1998. 273(4): p. 2184-91.
134. Six, D.A. and E.A. Dennis, *Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity*. J Biol Chem, 2003. 278(26): p. 23842-50.
135. Burke, J.R., et al., *BMS-229724 is a tight-binding inhibitor of cytosolic phospholipase A2 that acts at the lipid/water interface and possesses anti-inflammatory activity in skin inflammation models*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 298(1): p. 376-85.
136. Hempel, S.L., M.M. Monick, and G.W. Hunninghake, *Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes*. J Clin Invest, 1994. 93(1): p. 391-6.
137. Honig, S.M., et al., *FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes*. J Clin Invest, 2003. 111(5): p. 627-37.
138. Graler, M.H. and E.J. Goetzl, *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors*. Faseb J, 2004. 18(3): p. 551-3.
139. Forrest, M., et al., *Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. 309(2): p. 758-68.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der nozizeptiven Übertragung im Hinterhorn des Rückenmarks.	5
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Sphingosin-1-Phosphat-Synthesekaskade.	8
Abbildung 1.3: Signalwege von S1P.	12
Abbildung 3.1: Expression der S1P Rezeptoren im ZNS.	44
Abbildung 3.2: S1P senkt die cAMP-Akkumulation in Rückenmarks-Neuronen.	46
Abbildung 3.3: S1P senkt die cAMP-Akkumulation in exzitatorischen Neuronen.	47
Abbildung 3.4: Lokalisation der auf S1P reagierenden exzitatorischen Neurone im Rückenmark mittels Immunohistochemie.	48
Abbildung 3.5: Intrathekal verabreichtes dihydro-S1P verhindert die PKA-abhängige Phosphorylierung von NMDA Rezeptoren.	50
Abbildung 3.6: S1P-Konzentration in stimulierten primären embryonalen Rückenmarkszellen.	51
Abbildung 3.7: Stimulation akuter Rückenmarksschnitte mit KCl.	52
Abbildung 3.8: Fluorimetrischer S1P-Lyase/Phosphatase Aktivitätstest.	54
Abbildung 3.9: Expression von SPHKs im ZNS.	56
Abbildung 3.10: Basale S1P-Konzentration im Rückenmarksgewebe und akuten Rückenmarksschnitten.	57
Abbildung 3.11: Stimulation akuter Rückenmarksschnitte.	59
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P in akuten Rückenmarksschnitten nach nozizeptiver Stimulation.	60
Abbildung 3.13: S1P-Konzentration in Lysaten akuter Rückenmarksschnitte SPHK-defizienter Mäuse.	62
Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P in Rückenmarksschnitten nach nozizeptiver Stimulation.	63
Abbildung 3.15: Sphingolipid-Konzentration im Dorsalhorn nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.	64
Abbildung 3.16: Wirkung des SPHK-1 Inhibitors SK1-II auf die Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.	66



---

Abbildung 3.17: Effekte der SPHK-1 Inhibierung in der Zymosan induzierten, mechanischen Hyperalgesie.	67
Abbildung 3.18: Wirkung von FTY720-P auf die Sphingolipidkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Zymosan.	68
Abbildung 3.19: Schmerzverhalten SPHK-1- und 2-defizienter Mäuse in einem Model für akuten Schmerz.	69
Abbildung 3.20: Sphingolipid-Konzentration in SPHK-1 (SK1)- und SPHK-2 (SK2)-defizienten Mäusen.	70
Abbildung 3.21: Wirkung eines S1P-Rezeptor-Antagonisten auf die S1P-Konzentration in nicht-neuronalen Zelllinien.	71
Abbildung 22: Einfluss von S1P-Rezeptor-Analoga auf die Prostaglandinsynthese.	73
Abbildung 3.23: Strukturen bekannter und neu synthetisierter S1P-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.	75
Abbildung 3.24: GTP $\gamma$ S <sup>35</sup> -Bindungsstudie mit S1P-Rezeptor-Agonisten.	77
Abbildung 3.25: Affinität neu synthetisierter FTY720-Analoga zu S1P-Rezeptoren.	78
Abbildung 3.26: GTP $\gamma$ S <sup>35</sup> -Bindungsstudie mit S1P-Rezeptor-Antagonisten.	79
Abbildung 3.27: Antagonistische Effekte neu synthetisierter FTY720-Analoga.	80
Abbildung 3.28: Inhibierung der cAMP-Synthese in primären embryonalen Rückenmarkszellen durch FTY720-Analoga.	81
Abbildung 3.29: Prostaglandin E <sub>2</sub> -Konzentrationen in verschiedenen Zellkultur-Systemen.	83
Abbildung 3.30: Bestimmung der PGE <sub>2</sub> -Konzentrationen im Vollbluttest.	84
Abbildung 3.31: PGE <sub>2</sub> -Konzentrationen im Vollbluttest nach Stimulation mit tertiären Aminen.	85
Abbildung 3.32: Lymphozytenkonzentration nach intraperitonealer Injektion von FTY720-Analoga:	86
Abbildung 3.33: Prostaglandin E <sub>2</sub> -Konzentration nach intraperitonealer Injektion von FTY720-Analoga:	87
Abbildung 4.1: Mechanismus der S1P-vermittelten Antinozizeption im Hinterhorn des Rückenmarks.	91
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung von S1P im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation.	98

---

Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der cAMP-Signalkaskade in sensorischen Neuronen.	103
Abbildung 4.4: C1P und PIP <sub>2</sub> interagieren mit unterschiedlichen Bindestellen der cPLA <sub>2</sub> .	106

---

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Eigenschaften der Sphingosin Kinasen 1 und -2.	10
Tabelle 1.2: S1P-Rezeptor Aonisten und Antagonisten.	14
Tabelle 3.1: FRET-Änderungen in Neuronen definiert als Zeitpunkte $T_{10}$ und $T_{50}$ .	46
Tabelle 3.2: Effekte der S1P Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.	88

---

## 10 Anhang

### 10.1 Veröffentlichungen

**Ovidiu Coste, Christian Brenneis, Bona Linke, Sandra Pierre, Christian Maeurer, Wiebke Becker, Helmut Schmidt, Gao Wei, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich.**

*“Sphingosine-1-phosphate modulates spinal nociceptive processing”*, **J Biol Chem.**, 2008 Sep., 283(47):32442-51.

**Bona Linke, Sandra Pierre, Ovidiu Coste, Carlo Angioni, Wiebke Becker, Thorsten Maier, Dieter Steinhilber, Claus Wittpoth, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich.**

*“Toponomics analysis of drug-induced changes in arachidonic acid-dependent signaling pathways during spinal nociceptive processing”*, **J Proteome Res.** 2009 Oct.,8(10):4851-9.

**Bona Linke, Yannick Schreiber, Dong Dong Zhang, Marina Henke, Judith Fuchs, Claus Schuh, Ovidiu Coste, Carlo Angioni, Aleksandra Zivkovic, Holger Stark, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich.**

*“A negative feedback loop regulates sphingosine kinase activity through sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors”*, **eingereicht.**

**Bona Linke, Ovidiu Coste, Aleksandra Zivkovic, Carlo Angioni, Gerd Geisslinger, Holger Stark, Klaus Scholich.**

*“Inhibition of prostanoid synthesis by S1P-receptor ligands”*, **eingereicht.**

---

## 10.2 Poster-Präsentationen

**Christian Brenneis, Bona Linke, Sandra Pierre, Wiebke Becker, Ovidiu Coste, Sabrina Holland, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich.**

*“Analysis of nociceptive signalling combining calcium imaging, FRET based cAMP imaging and multi epitope ligand kartography (MELC)”*, wissenschaftliches “meeting” des “interdisciplinary centre for neuroscience (ICN)”, April 2008, Frankfurt

**Bona Linke, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich.**

*„Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat [56] und seiner Rezeptoren für die Verarbeitung nozizeptiver Informationen im Rückenmark“*, wissenschaftliches “meeting” des “LOEWE Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LiFF)“, 2008, Frankfurt

**Bona Linke, Ovidiu Coste, Christian Brenneis, Sandra Pierre, Wiebke Becker, C.arlo Angioni, Helmut Schmidt, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich**

*“SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE MODULATES SPINAL NOCICEPTIVE PROCESSING”*,

Frühjahrstagung Mainz, März 2009

### 10.3 Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. Stark bedanke ich mich für die Synthese der FTY720-Analoga und dafür, dass er die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

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

Bei Herrn Dr. Ovidiu Coste, Herrn Dong Dong Zhang, Frau Judith Fuchs und Herrn Claus Schuh bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Für technische und beratende Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Wiebke Becker, Frau Marina Henke, Herrn Yannick Schreiber, Herrn Carlo Angioni, Frau Dr. Sandra Pierre und Herrn Dr. Christian Brenneis.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Scholich, bei Frau Sabrina Holland, Herrn Marco Sisignano, Frau Marina Henke und Herrn Claus Schuh.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und vor allem an meinen Schatz Michael Zabelt für ihre Unterstützung und Motivation.

---

## 10.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Bona Linke

Pfarrer-Papon Straße 21

64546 Mörfelden-Walldorf

geboren am 16.05.1981 in Wiesbaden

ledig

### Schulbildung

---

1987 – 1991 Walluftalschule in Walluf

1991 – 1997 Gutenberg Realschule in Eltville

1997 – 2000 Carl von Ossietzky Gymnasium Kreuzburg in Wiesbaden

2000 Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulausbildung

---

2000 – 2005 Studium der Biologie

an der Gutenberg Universität Mainz

Sep. 2005 Abschluss der Diplomarbeit

2007 – 2010 Naturwissenschaftliche Promotion

am Institut für Klinische Pharmakologie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger