

Charakterisierung der Expression und Funktion von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen im nozizeptiven System

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Sandra Heine
aus Celle

Frankfurt am Main 2011
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Holger Stark
Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger

Datum der Disputation: 25.05.2011

1. Einleitung	1
1.1. Schmerztypen	1
1.2. Das nozizeptive System	2
1.3. Periphere und zentrale Sensibilisierung	4
1.4. Das endogene schmerzhemmende System	9
1.5. cGMP-vermittelte Schmerzverarbeitung im Rückenmark	9
1.5.1. cGMP-produzierende Enzyme.....	10
1.5.2. cGMP-,Targets'	11
1.5.3. Kolokalisation von cGMP-produzierenden Enzymen und cGMP-,Targets' ..	12
1.6. CNG-Kanäle	13
1.6.1. Signaltransduktion in Photorezeptoren	16
1.6.2. CNG-Kanal-Untereinheiten in Stäbchen-Photorezeptoren.....	17
1.6.3. CNG-Kanal-Untereinheiten in Zapfen-Photorezeptoren.....	18
1.6.4. Signaltransduktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen	19
1.6.5. CNG-Kanal-Untereinheiten in olfaktorischen Rezeptorneuronen	20
1.7. Zielsetzungen dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Versuchstiere	22
2.2. Überprüfung der Motorik	22
2.2.1. Rotarod-Test	22
2.3. Nozizeptive Tiermodelle	23
2.3.1. Tailflick-Test	23
2.3.2. Hotplate-Test.....	23
2.3.3. Formalin-Test	24
2.3.4. Zymosan-induzierte mechanische und thermische Hyperalgesie	25
2.3.5. SNI-Modell für neuropathische Schmerzen	26
2.3.6. Intrathekale Applikation von Prüfsubstanzen	26
2.4. Immunhistochemie	28
2.4.1. Gewebepräparation	29
2.4.2. Konventionelle Immunhistochemie	29
2.4.3. Immunhistochemie mit dem Tyramide Signal Amplification (TSA)-System ..	30
2.4.4. Detektion	32
2.5. In situ-Hybridisierung	32
2.5.1. Generierung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	33
2.5.2. In situ-Hybridisierung.....	34

2.5.3.	Detektion	37
2.6.	RT-PCR	37
2.6.1.	Gewebepräparation	37
2.6.2.	Konventionelle RT-PCR	38
2.6.3.	Real-time quantitative PCR	39
2.6.3.1.	Quantifizierung der Real-time quantitativen PCR.....	42
2.6.4.	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.7.	Statistik	45
2.8.	Chemikalien und Reagenzien	46
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Expression der CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark	48
3.2.	Gewebeexpression der Untereinheit CNGA3	49
3.2.1.	Vergleich der Expression von CNGA3 in Rückenmark, Spinalganglien und Retina.....	49
3.2.2.	Lokalisation von CNGA3 im Rückenmark.....	50
3.2.3.	CNGA3-Expression in Spinalganglien nach nozizeptiver Stimulation	53
3.2.4.	Lokalisation von CNGA3 in Spinalganglien.....	54
3.3.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen	55
3.3.1.	Morphologie des Rückenmarks	56
3.3.2.	Expression anderer CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark.....	56
3.3.3.	Motorische Koordination von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen	57
3.3.4.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen in Modellen für akute Schmerzen.....	58
3.3.5.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen in Modellen für inflammatorische Schmerzen (Hyperalgesie)	59
3.3.6.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen nach intrathekaler Applikation von cGMP-Analoga	62
3.3.7.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen nach intrathekaler Applikation von NOC-5 und CNP.....	64
3.3.8.	Nozizeptives Verhalten von CNGA3 ^{-/-} -Mäusen in einem Modell für neuropathische Schmerzen	65
3.4.	Gewebeexpression der Untereinheit CNGB1	66
3.4.1.	Vergleich der Expression von CNGB1 in Rückenmark, Spinalganglien und Retina.....	66
3.4.2.	Lokalisation von CNGB1 im Rückenmark.....	66
3.4.3.	CNGB1-Expression in Spinalganglien nach nozizeptiver Stimulation	68

3.5. Nozizeptives Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen	69
3.5.1. Motorische Koordination von CNGB1 ^{-/-} -Mäusen	69
3.5.2. Nozizeptives Verhalten von CNGB1 ^{-/-} -Mäusen in Modellen für inflammatorische Schmerzen	70
3.5.3. Nozizeptives Verhalten von CNGB1 ^{-/-} -Mäusen nach intrathekaler Applikation eines cGMP-Analogons.....	72
3.6. Nozizeptives Verhalten von Wildtyp-Mäusen nach intrathekaler Applikation eines CNG-Kanal-Inhibitors	73
4. Diskussion	74
4.1. CNGA3 als ‚Target‘ der cGMP-vermittelten Nozizeption	75
4.2. CNGB1 als ‚Target‘ der cGMP-vermittelten Nozizeption	83
4.3. Therapiemöglichkeiten	85
5. Zusammenfassung	87
6. Abkürzungsverzeichnis	88
7. Literaturverzeichnis	93
8. Anhang	107
8.1. Veröffentlichungen	107
8.2. Lebenslauf	108

1. Einleitung

Schmerzen werden von der International Association for the Study of Pain (IASP) definiert als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Auf der einen Seite sind Schmerzen überlebenswichtig, da sie eine wichtige Schutz- und Warnfunktion übernehmen. Dieser akute Schmerz tritt z.B. infolge der Berührung einer heißen Herdplatte oder nach einem Stich durch eine Nadel auf und bedingt, dass die betroffene Stelle bzw. das betroffene Organ geschont wird. Auf der anderen Seite gibt es den chronischen Schmerz, der den Charakter einer Schutz- und Warnfunktion verloren hat und in Form des Dauerschmerzes oder des ständig wiederkehrenden Schmerzes auftreten kann. Chronische Schmerzen beeinträchtigen das Wohlbefinden und die Lebensqualität und können sich zu einem eigenständigen Krankheitsbild, der chronischen Schmerzkrankheit, entwickeln.

Laut einer Schmerzstudie (Breivik et al., 2006) sind bis zu 17 % der deutschen Gesamtbevölkerung von chronischen Schmerzen betroffen. Mit all seinen Facetten ist Schmerz das häufigste Krankheitsbild überhaupt – häufiger als Diabetes, Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Weissbuch Schmerz, 2008). Chronische Schmerzen zählen somit zu den teuersten Krankheiten im deutschen Gesundheitssystem und kosten etwa 25 Milliarden Euro pro Jahr. Trotz der großen wirtschaftlichen und therapeutischen Relevanz ist die Behandlung chronischer Schmerzpatienten in Deutschland noch unzureichend oder nur unter Inkaufnahme von z. T. erheblichen Nebenwirkungen möglich. Demzufolge besteht ein hoher Forschungsbedarf hinsichtlich der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der Schmerzsensibilisierung zugrunde liegen, und die letztlich zur Entwicklung von Therapiealternativen beitragen können.

1.1. Schmerztypen

Die Auslösung, Weiterleitung und zentrale Verarbeitung von Schmerzimpulsen wird als Nozizeption bezeichnet. Nach ihrer Ätiologie und Pathophysiologie lassen sich drei Schmerztypen unterscheiden: der physiologische Nozizeptorschmerz (akuter Schmerz), der pathophysiologische Nozizeptorschmerz (inflammatorischer oder entzündlicher Schmerz) und der neuropathische Schmerz (Cervero und Laird, 1991).

- Der physiologische Nozizeptorschmerz entsteht bei Einwirkung von Schmerzreizen auf gesundes Gewebe. Die kurze Schmerzreaktion wird durch die Erregung von

Schmerzrezeptoren im Gewebe (Nozizeptoren) ausgelöst und führt zu einer sofortigen motorischen Reflexreaktion, um eine Schädigung des Gewebes zu vermeiden.

- Der pathophysiologische Nozizeptorschmerz entsteht bei Gewebeschädigungen oder Entzündungen. Das nozizeptive System wird hierbei durch periphere und zentrale Mechanismen sensibilisiert. Dieses wirkt sich in Form von Allodynie (Schmerzauslösung durch Reize, die normalerweise keinen Schmerz verursachen), Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindung auf physiologisch schmerzhaft Reize) oder Spontanschmerz aus.
- Neuropathische Schmerzen entstehen, wenn periphere Nerven durch z.B. Quetschung, Durchtrennung oder metabolische Störungen geschädigt werden. Es kommt ebenfalls zu einer Sensibilisierung, sowie zur Bildung ektooper Nervenimpulse (spontane Aktionspotentiale an der geschädigten Stelle). Neuropathische Schmerzen haben häufig einen abnormalen Charakter.

1.2. Das nozizeptive System

Nozizeptorschmerzen werden im peripheren Gewebe (Haut, Skelettmuskulatur, Gelenke, innere Organe) von Nozizeptoren detektiert. Diese sind freie Nervenendigungen primär afferenter Neurone, die verschiedene, hochschwellige Rezeptoren für die unterschiedlichen Reizmodalitäten (Hitze, Kälte, chemische und mechanische Reize) enthalten. Der Schmerzreiz wird in Form von Aktionspotentialen über A δ - und C-Fasern, deren Zellkörper in den Spinalganglien (Dorsal root ganglia, DRGs) liegen, zum Hinterhorn des Rückenmarks geleitet (Abbildung 1). A δ -Fasern sind dünn myelinisiert, haben einen mittleren Durchmesser und eine mittlere Leitgeschwindigkeit von 5 - 30 m/s, wohingegen C-Fasern nicht myelinisiert sind, einen kleinen Durchmesser und langsamere Leitgeschwindigkeiten (0,5 - 2 m/s) aufweisen (Abbildung 2). Im Hinterhorn des Rückenmarks erfolgt die Umschaltung auf ein zweites Neuron durch exzitatorische Transmitter (z.B. Glutamat) und Neuropeptide (z.B. Substanz P und CGRP). Der wichtigste Transmitter hierbei ist Glutamat, welches postsynaptisch AMPA-, NMDA- und metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu-Rezeptoren) aktiviert. Diese erste synaptische Umschaltung geschieht vorwiegend in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns (Laminae I und II). Das Axon des postsynaptischen Projektionsneurons kreuzt dann auf die Gegenseite des Rückenmarks und zieht als Tractus spinothalamicus zum Thalamus, von wo aus der Schmerzreiz weiter in verschiedene Regionen des Cortex, die sogenannte ‚pain matrix‘, gelangt (D'Mello und Dickenson, 2008). Hierzu zählen u.a. der primäre und der sekundäre somatosensorische Cortex, die verantwortlich sind für die sensorisch-diskriminative Komponente des Schmerzes. Eine weitere wichtige Rolle spielt das limbische System, welches die affektive Komponente des

Schmerzes generiert. Zusätzlich werden auch spinale exzitatorische und inhibitorische Interneurone aktiviert, die die Schmerzverarbeitung in komplexer Weise modulieren (Schmidtke et al., 2009).

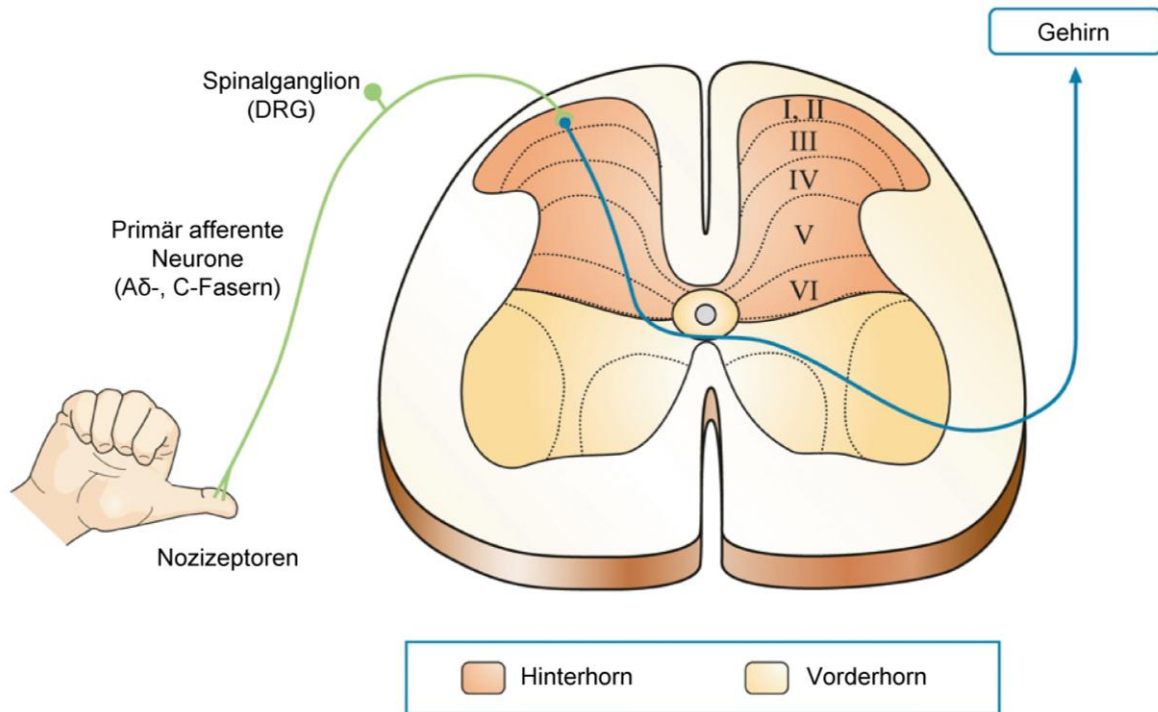


Abbildung 1. Schematische Darstellung des nozizeptiven Systems. Adaptiert aus Schmidtke et al. (2009). I - VI: Laminae des Hinterhorns

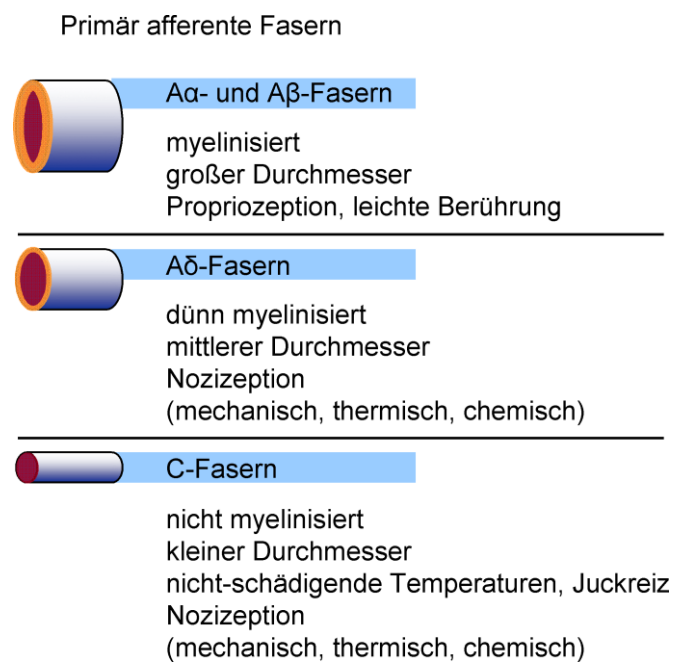


Abbildung 2. Übersicht über die verschiedenen peripheren Fasertypen der Nozizeptoren. Adaptiert aus Julius und Basbaum (2001).

1.3. Periphere und zentrale Sensibilisierung

Eine besondere Eigenschaft des nozizeptiven Systems ist, dass es bei Dauerstimulation einer Sensibilisierung unterliegt (Woolf, 2004). Der Sensibilisierung liegen Vorgänge sowohl am Ort der Gewebeschädigung (periphere Sensibilisierung) als auch im Rückenmark und im Gehirn (zentrale Sensibilisierung) zugrunde. Klinisch manifestiert sich diese Sensibilisierung als Hyperalgesie und Allodynie.

Die periphere Sensibilisierung kommt infolge einer durch die Gewebeschädigung und Entzündung hervorgerufenen verstärkten Produktion und Freisetzung von Entzündungs- und Schmerzmediatoren zustande. Diese werden freigesetzt von geschädigten Zellen (z.B. ATP, H⁺) und Zellen des Immunsystems, die im geschädigten Gewebe sitzen oder das geschädigte Gewebe infiltrieren, wie Mastzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Basbaum et al., 2009). Zu den freigesetzten Mediatoren zählen u.a. Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β), der Nerve growth factor (NGF), Leukotriene, Prostaglandine, Histamin, Serotonin und Bradykinin. Diese binden direkt an ihre spezifischen Rezeptoren auf dem Nozizeptor und führen zu einer Übererregbarkeit der primär afferenten Nervenfasern, indem sie die Reizschwelle der Nozizeptormembran herabsetzen. Aktionspotentiale können demzufolge leichter ausgelöst werden, so dass normalerweise nicht schmerzhaft Reize nun schmerzhaft sind. Sensibilisierte Nozizeptoren synthetisieren ihrerseits auch Schmerzmediatoren wie Substanz P und CGRP. Diese tragen dann ebenfalls zur Nozizeptorstimulation bei und stimulieren zusätzlich die Entzündungszellen zur Synthese weiterer Entzündungs- und Schmerzmediatoren.

Die zentrale Sensibilisierung stellt den Prozess dar, bei dem im zentralen Nervensystem ein Zustand der Übererregbarkeit generiert und etabliert wird, welches in einer vereinfachten und verstärkten Weiterleitung von Schmerzreizen resultiert (Woolf, 1983, 2004). Drei wichtige Mechanismen der zentralen Sensibilisierung sind in Abbildung 3 dargestellt:

Glutamat/NMDA-Rezeptor-vermittelte Sensibilisierung

In der frühen Phase der zentralen Sensibilisierung wird durch die Freisetzung von Transmittern, wie Substanz P, CGRP, Glutamat oder dem Brain derived neurotrophic factor (BDNF) aus den primär afferenten Neuronen eine Signalkaskade im Hinterhorn des Rückenmarks in Gang gesetzt. Glutamat aktiviert als wichtigster exzitatorischer Transmitter die postsynaptischen AMPA-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren. Im Falle anhaltender Nozizeptorstimulation und demzufolge vermehrter Glutamat-Ausschüttung werden ebenfalls NMDA-Rezeptoren aktiviert, die vorher durch einen spannungsabhängigen Mg²⁺-Block blockiert waren (Woolf, 2004). Der resultierende Einstrom von Ca²⁺-Ionen ist für eine Reihe von Prozessen im Hinterhornneuron verantwortlich. Unter anderem kommt es über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Kinasen, wie die

Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC) und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die ihrerseits AMPA- und NMDA-Rezeptoren phosphorylieren und diese somit leichter erregbar machen (Scholz und Woolf, 2002; Woolf, 2004; Jones und Sorkin, 2005). Ebenfalls wird die neuronale NO-Synthase (nNOS) aktiviert, die Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. NO kann in benachbarte Zellen diffundieren und somit als parakriner Mediator die zentrale Sensibilisierung modulieren (siehe Kapitel 1.5). BDNF aktiviert TrkB-Rezeptoren (Tyrosinkinase B-Rezeptoren) und modifiziert somit die Erregbarkeit der Plasmamembran (Woolf, 2004). Neue Rezeptoren translozieren zur Zellmembran postsynaptischer Projektionsneurone, so dass diese nun schon niederschwellig auf Schmerzreize reagieren. Die Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle trägt ebenfalls zur Generierung der zentralen Sensibilisierung bei. Letztendlich kommt es in dieser frühen Phase zu post-translationalen Veränderungen vorhandener Rezeptorproteine bezüglich ihrer Dichte, Erregungsschwelle, Kinetik und Aktivierung, welches in einer verstärkten Schmerzweiterleitung resultiert (Woolf, 2004).

In der späten Phase der zentralen Sensibilisierung kommt es zu Änderungen der Genexpression in postsynaptischen Projektionsneuronen. Dieses beinhaltet sowohl die Induktion neuer Proteine als auch eine gesteigerte Expression bereits vorhandener Proteine (Woolf, 2004). Die Aktivierung von ERK (Extracellular signal-regulated kinase) führt z.B. zu einer Hochregulation des Substanz P-Rezeptors Neurokinin-1 (NK1R) und des immediate early genes c-Fos in Hinterhornneuronen (Ji et al., 2002; Kawasaki et al., 2004). Immediate early genes kodieren für Proteine, die z.B. im Zellkern als Transkriptionsfaktoren verschiedener inflammatorischer Gene, darunter das der Cyclooxygenase 2 (COX2) fungieren, sowie für Gene, die für neue Rezeptor- und Ionenkanalproteine kodieren.

Verlust der GABAergen und glycinergen Kontrolle (Disinhibition)

Ein weiterer Mechanismus, der zur übersteigerten Schmerzleitung beiträgt, ist die Hemmung inhibitorischer Neurone. GABAerge und glycinerge inhibitorische Interneurone sind in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns stark verbreitet. Ein Funktionsverlust dieser inhibitorischen Interneurone führt über eine Übererregbarkeit von Projektionsneuronen somit zu einem gesteigerten Schmerzempfinden auf schmerzhaftes sowie nicht-schmerzhaftes Reize (Scholz und Woolf, 2002). Ein Verlust dieser inhibitorischen Modulation kann z.B. durch Prostaglandine über eine Stimulation des Prostaglandin-E2 (EP2)-Rezeptors mit nachfolgender Phosphorylierung der $\alpha 3$ -Untereinheit des Glycinrezeptors (GlyR $\alpha 3$) erfolgen (Abbildung 3), der infolge der Phosphorylierung nicht mehr durch seinen Liganden Glycin aktiviert werden kann (Harvey et al., 2004; Zeilhofer et al., 2005). Die Disinhibition ist insbesondere an der Sensibilisierung während neuropathischer Schmerzen beteiligt (Woolf, 2004).

Interaktion zwischen Neuronen und Glia

Ein dritter Mechanismus, der zur zentralen Sensibilisierung beiträgt, ist die nach einer Nervenläsion erfolgende Aktivierung und Proliferation von Mikroglia in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns und die anschließende Ausschüttung von Mediatoren wie Zytokinen (Watkins und Maier, 2000; Jin et al., 2003; Woolf, 2004). Diese Mediatoren können die Eigenschaften bzw. das Genexpressionsmuster von Neuronen und den umgebenden Gliazellen verändern (Woolf, 2004).

Nach einer Nervenläsion bilden Mikroglia dichte Cluster um geschädigte Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks. Im Hinterhorn wird ebenfalls eine vermehrte Aktivierung von Mikroglia beobachtet, welche sich in den Projektionsarealen der geschädigten primär afferenten Fasern ansammeln. Die durch Nervenläsion induzierte Aktivierung der Mikroglia ist charakterisiert durch Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAP-Kinase, der Isoformen 1 und 2 der ERK sowie der Kinasen der Src-Familie (Jin et al., 2003; Svensson et al., 2005; Zhuang et al., 2005; Katsura et al., 2006). Es existieren drei Signalwege, über die Mikroglia rekrutiert und aktiviert werden. Zum einen über das Chemokin Fraktalkin, welches auf den CX3C-Rezeptor 1 wirkt (Verge et al., 2004), zweitens über CCL2, welches an den Rezeptor CCR2 bindet (White et al., 2005) und drittens über einen Signalweg, der Toll-like Rezeptoren enthält (Tanga et al., 2005; Kim et al., 2007).

Fraktalkin ist ein neuronales Transmembran-Glykoprotein, von dem eine lösliche Chemokin-Domäne proteolytisch abgespalten werden kann. Das Chemokin ist sowohl in der gebundenen als auch in der löslichen Form aktiv. Astrozyten (Dorf et al., 2000) und Mikroglia (Verge et al., 2004) besitzen den CX3C-Rezeptor 1, an den Fraktalkin bindet, so dass es in der Umgebung geschädigter primär afferenter Fasern zur Rekrutierung von Mikroglia und einer Proliferation von Astrozyten kommt. Die über Fraktalkin vermittelte Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen scheint zur Entwicklung neuropathischer Schmerzen beizutragen. Das Chemokin CCL2 wird von primär afferenten Fasern und Schwannschen Zellen nach peripherer Nervenschädigung exprimiert und an die zentralen Enden der primär afferenten Fasern im Hinterhorn transportiert (Zhang und De Koninck, 2006). Mikroglia exprimieren den CCL2-Rezeptor CCR2 (Abbadie et al., 2003), welcher eine direkte Kommunikation zwischen geschädigten primär afferenten Nervenfasern und im Hinterhorn sitzenden Mikroglia erlaubt. Toll-like Rezeptoren sind eine Familie aus zwölf Membranproteinen, die bei der Initiierung der angeborenen Immunabwehr eine fundamentale Rolle spielen (Trinchieri und Sher, 2007). Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren führt u.a. zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Ein Zusammenhang zwischen neuropathischen Schmerzen und der über Toll-like Rezeptoren vermittelten angeborenen Immunabwehr soll bestehen. Mikroglia exprimieren die Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4. Bei TLR2^{-/-}- und TLR4^{-/-}-Mäusen ist die Aktivierung

von Mikroglia und die Induktion proinflammatorischer Zytokine nach peripherer Nervenschädigung reduziert (Tanga et al., 2005; Kim et al., 2007).

Neben der Rekrutierung und Aktivierung von Mikroglia im Hinterhorn führt eine Nervenschädigung ebenfalls zu einer Proliferation und Aktivierung von Astrozyten. Die Astrozyten-Proliferation beginnt später und verläuft langsamer, hält jedoch für einen längeren Zeitraum an (Zhuang et al., 2005; Zhang und De Koninck, 2006; Echeverry et al., 2008). Die Rekrutierung und Aktivierung von verschiedenen Gliazellen bedarf einer gut organisierten reziproken Kommunikation zwischen Neuronen und Glia und zwischen den verschiedenen Gliazellen.

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der bei der Entwicklung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielt, involviert ATP, welches an purinergen Mikroglia-Rezeptoren wirkt. Die Synthese von Zytokinen, u.a. IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF und TGF- β und die dadurch hervorgerufene Modulation der Aktivität von Hinterhornneuronen bzw. die Wirkung an zentralen Enden primär afferenter Fasern könnte ebenfalls in die Generierung von neuropathischen Schmerzen involviert sein (Winkelstein et al., 2001). Einige dieser Zytokine rufen ebenfalls einen ‚Feedback‘-Mechanismus in den Mikroglia-Zellen selbst aus (Review: Scholz und Woolf, 2007).

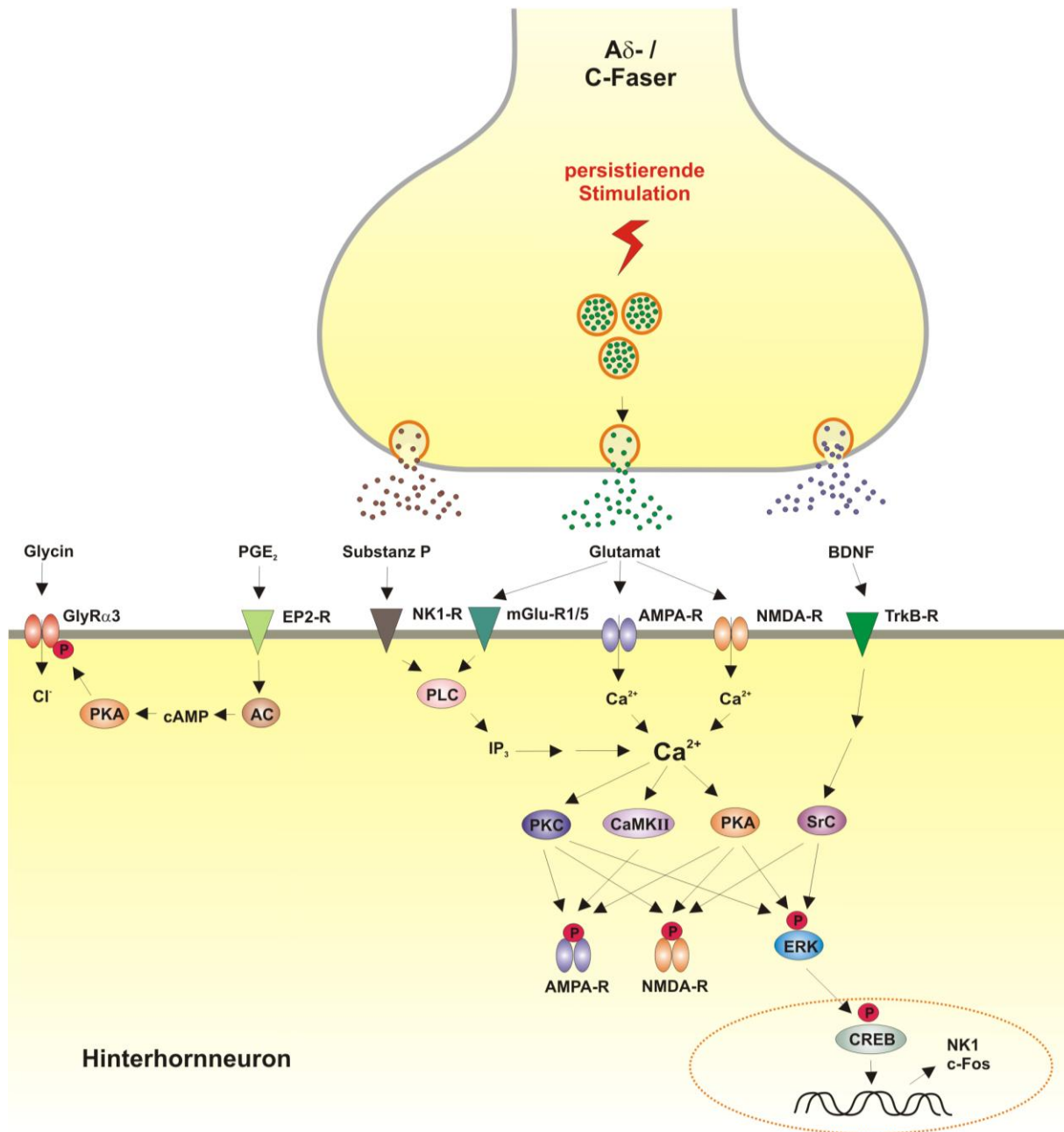


Abbildung 3. Übersicht über wichtige Mechanismen, die der zentralen Sensibilisierung in Hinterhornneuronen des Rückenmarks zugrunde liegen. Adaptiert aus Schmidtko (2008). AC: Adenylatzyklase, AMPA-R: AMPA-Rezeptor, BDNF: Brain-derived neurotrophic factor, CaMKII: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CREB: cAMP response element-binding protein, EP2-R: Prostaglandin E2-Rezeptor, ERK: Extracellular signal-regulated kinase, GlyR α 3: α 3-Untereinheit des Glycinrezeptors, IP₃: Inositoltrisphosphat, mGlu-R: metabotroper Glutamatrezeptor, NK1-R: Neurokinin 1-Rezeptor, NMDA-R: NMDA-Rezeptor, P: Phosphatrest, PGE₂: Prostaglandin E2, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, TrkB-R: Tyrosinkinase B-Rezeptor

1.4. Das endogene schmerzhemmende System

Neben dem aufsteigenden schmerzleitenden System existiert auch ein absteigendes schmerzhemmendes System. Es ist insbesondere in Stresssituationen, wie z.B. bei schweren Verletzungen von Bedeutung, in denen der Körper seine Handlungsfähigkeit braucht, die durch Schmerzen sonst gelähmt wäre. Das schmerzhemmende System ist also ein Merkmal der ‚fight-or-flight‘-Reaktion (Woolf, 2004).

Die Fasern des schmerzhemmenden Systems entspringen aus verschiedenen Ebenen des ZNS. Wichtige Strukturen für die Vermittlung der absteigenden Hemmung sind das periaquäduktale Grau (PAG) und der Locus coeruleus in der Pons des Mittelhirns, die mit höher gelegenen Hirnregionen verschaltet sind (Baumgärtner, 2010). Das PAG weist eine hohe Dichte an μ -Opioid-Rezeptoren auf, die von endogenen Opioid-Peptiden, wie β -Endorphin, Dynorphinen und Methionin- und Leucin-Enkephalin, aktiviert werden. Einige Fasern des schmerzhemmenden Systems ziehen direkt zum Rückenmark, wobei die meisten anderen in Kernen der rostroventromedialen Medulla (RVM) umgeschaltet werden. Vom Locus coeruleus gehen noradrenerge Fasern, vom Nucleus raphe magnus serotonerge Fasern und vom PAG sowohl GABAerge als auch Fasern mit Enkephalin als Neurotransmitter ab. Die PAG-RVM-Achse ist also entscheidend für die Modulation von Schmerzen (McMahon, 2006). Die Axone der RVM-Neurone enden in den Laminae I, II und V des spinalen Hinterhorns (McMahon, 2006), wo die Umschaltung auf inhibitorische Interneurone erfolgt, die die inhibitorischen Transmitter GABA oder Glycin ausschütten (Todd et al., 1996). Dadurch wird die Weiterleitung nozizeptiver Neurone (Sorkin et al., 1993) gehemmt. Zudem werden auch exzitatorische Interneurone, die das Schmerzsignal an Projektionsneurone weiterleiten, inhibiert (Bennett und Mayer, 1979; Light und Kavookjian, 1988).

1.5. cGMP-vermittelte Schmerzverarbeitung im Rückenmark

In den letzten Jahren konnten mehrere Signalwege im Hinterhorn des Rückenmarks ausfindig gemacht werden, die zur Entwicklung der Schmerzsensibilisierung beitragen (siehe Kapitel 1.3). In zahlreichen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ebenfalls wichtige Mediatoren sind (Abbildung 4), die in die Sensibilisierung infolge inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen, aber nicht in die Verarbeitung akuter Schmerzen involviert sind (Woolf, 2004; Schmidtke et al., 2009). Daher könnte eine pharmakologische Hemmung der NO- und cGMP-vermittelten Signalwege potentiell eine neue Möglichkeit sein, sowohl inflammatorische als auch neuropathische Schmerzen zu therapieren.

1.5.1. cGMP-produzierende Enzyme

cGMP wird von sogenannten Guanylatzyklasen produziert, von denen verschiedene Isoformen existieren. Die NO-sensitive Guanylatzyklase (NO-GC oder auch soluble guanylyl cyclase, sGC) ist ein heterodimeres Enzym, welches aus zwei Untereinheiten (α und β) besteht und die Bildung von cGMP aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. Es sind wiederum zwei Isoformen dieses Enzyms mit der Zusammensetzung $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ bekannt (Friebe et al., 2007). Die NO-GC ist sowohl in Neurokinin 1-Rezeptor-positiven Projektionsneuronen in Lamina I als auch in inhibitorischen Interneuronen in Laminae II und III des Hinterhorns exprimiert (Ding und Weinberg, 2006; Ruscheweyh et al., 2006; Schmidtko et al., 2008a). In Spinalganglien wird die NO-GC nicht neuronal, sondern in Astrozyten, Perizyten und glatten Muskelzellen von Blutgefäßen exprimiert (Schmidtko et al., 2008a).

Die NO-GC wird durch NO aktiviert, welches im Rahmen der Schmerzverarbeitung offenbar den wichtigsten pronozizeptiven Mechanismus von NO darstellt. NO wird von sogenannten NO-Synthasen unter Verbrauch von NADPH aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff gebildet, wobei das Nebenprodukt L-Citrullin anfällt. Es existieren eine neuronale NO-Synthase (nNOS), eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) und eine endotheliale NO-Synthase (eNOS). Die nNOS ist das wichtigste NO-produzierende Enzym im Rückenmark infolge inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen (Tao et al., 2004; Chu et al., 2005; Boettger et al., 2007; Guan et al., 2007). Basal ist die nNOS in GABAergen inhibitorischen Interneuronen in Lamina II und III des Rückenmarks und nur in einigen Neuronen der Spinalganglien (< 5 %) exprimiert (Aimi et al., 1991; Valtschanoff et al., 1992; Spike et al., 1993; Laing et al., 1994; Bernardi et al., 1995; Henrich et al., 2002; Ruscheweyh et al., 2006). Infolge persistierender inflammatorischer Schmerzen wird die nNOS in den inhibitorischen Interneuronen hochreguliert, während infolge neuropathischer Schmerzen die Anzahl der nNOS-exprimierenden Spinalganglien-Neurone ansteigt (Zhang et al., 1993; Herdegen et al., 1994; Yonehara et al., 1997; Luo et al., 1999; Maihöfner et al., 2000; Mabuchi et al., 2004; Chu et al., 2005; Guan et al., 2007; Martucci et al., 2008). NO ist ein leicht membrangängiges Gas und wirkt somit als Messenger zwischen verschiedenen neuronalen Zelltypen im Rückenmark und zwischen Neuronen und nicht-neuronalen Zellen in den Spinalganglien. In Tierversuchen mit intrathekal applizierten Inhibitoren der NO-Synthasen oder der NO-GC sowie mit NO-GC^{-/-}-Mäusen konnte die herausragende Funktion der NO-vermittelten cGMP-Produktion in der Schmerzsensibilisierung bestätigt werden (Luo und Cizkova, 2000; Schmidtko et al., 2008a).

Neben der NO-GC existieren auch membranständige partikuläre Guanylatzyklasen, u.a. die Guanylatzyklasen A (GC-A, auch natriuretic peptide receptor A, NPR-A) und B (GC-B, auch natriuretic peptide receptor B, NPR-B). Die GC-B katalysiert, nach Aktivierung durch ihren

Liganden CNP (C-type natriuretic peptide), die Bildung von cGMP in primär afferenten Neuronen (Kishimoto et al., 2008; Schmidtko et al., 2008a; Schmidt et al., 2009).

1.5.2. cGMP-,Targets'

Ein wichtiges cGMP-,Target' in der Schmerzverarbeitung stellt die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI oder auch Proteinkinase G-I, PKG-I) dar, von der die α -Isoform in den meisten primär afferenten Neuronen und in einigen Hinterhornneuronen exprimiert wird (Qian et al., 1996; Johns, 2000; Sung et al., 2006; Schmidtko et al., 2008b). Infolge peripherer Nervenschädigung und Entzündung wird cGKI in primär afferenten Neuronen aktiviert und vermehrt exprimiert (Tao et al., 2000; Tegeder et al., 2002; Schmidtko et al., 2003). Da cGKI^{-/-}-Mäuse eine herabgesetzte inflammatorische Hyperalgesie zeigten (Tegeder et al., 2004) und intrathekal applizierte cGKI-Inhibitoren in verschiedenen inflammatorischen Tiermodellen antinozizeptive Effekte aufwiesen (Tao et al., 2000; Schmidtko et al., 2003), kann die Beteiligung von cGKI an den Mechanismen der Schmerzsensibilisierung angenommen werden. Da ein Knockout oder eine Inhibition der cGKI im Rückenmark das nozizeptive Verhalten hemmt, sollten cGKI-aktivierende cGMP-Analoga pronozizeptiv wirken. Dementsprechend konnte eine verstärkte Hyperalgesie nach intrathekaler Applikation von cGMP-Analoga gezeigt werden (Garry et al., 1994; Song et al., 2006). Ein ‚Downstream-Target‘ der cGKI in primär afferenten Neuronen ist das Cysteine-rich protein 4 (CRP4), welches bei der Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen inhibierend wirkt (Schmidtko et al., 2008b).

Neben der cGKI sind noch weitere ‚klassische‘ cGMP-,Targets‘ bekannt, deren Beteiligung in der Schmerzverarbeitung aber noch nicht geklärt ist. Diese sind zum einen zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle (cyclic nucleotide-gated (CNG) channels, CNG-Kanäle), die durch Bindung von zyklischen Nukleotiden öffnen, und die die elektrische Spannung in Photorezeptoren und in olfaktorischen Neuronen generieren. Zum anderen sind es Hyperpolarisations-aktivierte zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels, HCN-Kanäle), die durch Hyperpolarisierung von Membranen aktiviert werden, und die z.B. als Taktgeber des Herzens fungieren (Craven und Zagotta, 2006). HCN-Kanäle sind in Neuronen der Spinalganglien exprimiert und dort an der Generierung ektooper Nervenimpulse während neuropathischer Schmerzen beteiligt (Brown et al., 2004; Jiang et al., 2008). Die dritte Gruppe bekannter cGMP-,Targets‘ ist die der Phosphodiesterasen (PDE), die zyklische Nukleotide hydrolysieren und somit abbauen.

1.5.3. **Kolokalisation von cGMP-produzierenden Enzymen und cGMP- ,Targets‘**

Ein wichtiger pronozizeptiver Mechanismus wird durch die Aktivierung der cGKI in primär afferenten Neuronen vermittelt, welches in einer verstärkten Ausschüttung von Glutamat resultiert und nachgeschaltete nozizeptive Neurone im Rückenmark aktiviert. In primär afferenten Neuronen wird die cGKI infolge einer GC-B-vermittelten cGMP-Produktion aktiviert, wobei das natriuretische Peptid CNP den endogenen Liganden der GC-B darstellt (Kishimoto et al., 2008; Schmidtko et al., 2008a; Schmidt et al., 2009). Pronozizeptive cGMP-Effekte werden ebenfalls durch die NO-abhängige Aktivierung der NO-GC vermittelt. Es ist aber anzumerken, dass die NO-GC in verschiedenen Zelltypen des Rückenmarks exprimiert wird, z.B. in NK1-Rezeptor-positiven Projektionsneuronen in Lamina I des Hinterhorns, in inhibitorischen Interneuronen in Laminae II und III als auch in Satellitenzellen, die die Zellkörper von primär afferenten Neuronen umgeben (Schmidtko et al., 2008a). Interessanterweise ist die NO-GC in Spinalganglien, im Gegensatz zu vielen anderen Geweben, nicht mit der cGKI kolokalisiert, und auch im Rückenmark sind beide nur teilweise kolokalisiert, was darauf hindeutet, dass cGKI-unabhängige cGMP-,Targets‘ an der nozizeptiven Verarbeitung beteiligt sind (Schmidtko et al., 2008a).

Zurzeit ist noch ungeklärt, ob die NO-GC-vermittelte cGMP-Produktion in den verschiedenen Zelltypen in pronozizeptiven Effekten resultiert. Es wird vermutet, dass cGMP zumindest in NK1-R-positiven Projektionsneuronen in Lamina I seine pronozizeptiven Effekte ausübt. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Langzeit-Potenzierung (LTP) an Synapsen zwischen C-Fasern und Projektionsneuronen in Lamina I NO-abhängig ist (Ikeda et al., 2006), und dass das Fehlen dieser Neurone inflammatorische und neuropathische Schmerzen erheblich mildert (Mantyh et al., 1997; Nichols et al., 1999; Khasabov et al., 2002). Interessanterweise existieren widersprüchliche Meinungen dazu, dass NO-Donoren und cGMP-Analoga neben ihren bekannten pronozizeptiven Effekten auch antinozizeptive Effekte aufweisen. Unter anderem milderte die intrathekale Applikation von cGMP-Analoga das nozizeptive Verhalten in inflammatorischen Schmerzmodellen (Iwamoto und Marion, 1994), und die Behandlung von Rückenmarksschnitten der Ratte mit verschiedenen NO-Donoren oder einem cGMP-Analogen inhibierte die neuronale Aktivität in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns (Pehl und Schmid, 1997). Ebenso konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, dass die intrathekale Applikation von cGMP-Analoga sowohl eine Hyperalgesie als auch eine Schmerzhemmung, abhängig von der eingesetzten Dosis, verursachen konnte (Tegeder et al., 2002, 2004; Schmidtko et al., 2008b). Die antinozizeptiven Effekte von cGMP-Analoga konnten auch nicht durch gleichzeitige Applikation eines cGKI-Inhibitors antagonisiert werden und traten ebenfalls in cGKI^{-/-}-Mäusen auf. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass cGMP gegensätzliche Effekte in

der Schmerzverarbeitung ausübt: zum einen die Generierung der Hyperalgesie durch Aktivierung der cGKI, zum anderen eine Inhibition der nozizeptiven Transmission durch Aktivierung cGKI-unabhängiger Mechanismen. Es könnte also weitere cGMP-,Targets' geben, die ebenfalls eine Rolle in der Schmerzverarbeitung spielen und mit der NO-GC funktionell gekoppelt sind. Eine Beteiligung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanälen ist somit denkbar und soll daher in dieser Arbeit eingehender untersucht werden.

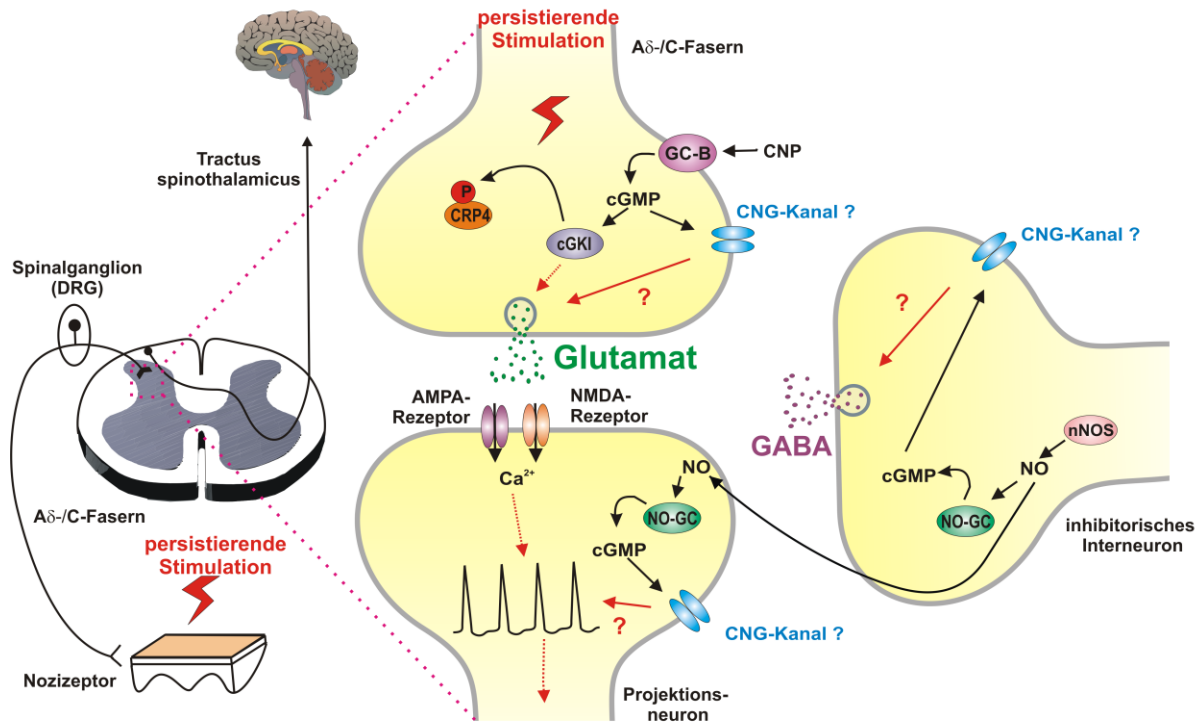


Abbildung 4. Übersicht der cGMP-vermittelten Signalwege in den Spinalganglien und im Rückenmark. Die roten Fragezeichen markieren noch ungeklärte Mechanismen, während die blauen Fragezeichen den noch unbekanntem Expressionsort von CNG-Kanälen in diesen Geweben markieren. cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CNG-Kanal: cyclic nucleotide-gated channel, CNP: C-type natriuretic peptide, CRP4: Cysteine-rich protein 4, GC-B: Guanylatzyklase B, nNOS: neuronale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, NO-GC: NO-sensitive Guanylatzyklase, P: Phosphatrest

1.6. CNG-Kanäle

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte (CNG-) Kanäle sind Ionenkanäle, die durch direkte Bindung von cGMP oder cAMP aktiviert werden und die in der Signaltransduktion von Photorezeptoren in der Retina und von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) der Riechschleimhaut eine zentrale Rolle spielen. Zyklische Nukleotide aktivieren CNG-Kanäle durch Bindung an deren cyclic nucleotide-binding domain (CNBD), eine Domäne, die in

vielen Proteinen, darunter die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al., 1999; Taylor et al., 2005) und dem cAMP-regulierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Epac (Bos, 2006), konserviert ist. In Vertebraten sind drei Unterfamilien von Kationenkanälen mit CNBD-Domäne bekannt: die CNG-Kanäle, die HCN-Kanäle und die Eag-like K⁺-Kanäle (Kaupp und Seifert, 2002; Hofmann et al., 2005; Craven und Zagotta, 2006).

CNG-Kanäle leiten als nicht-selektive Kationenkanäle bevorzugt monovalente Kationen (Na⁺- und K⁺-Ionen) aber auch divalente Ca²⁺-Ionen (Kaupp und Seifert, 2002) und sind ausschließlich Liganden-gesteuert. Sie werden durch eine kontinuierliche Anwesenheit zyklischer Nukleotide nicht desensibilisiert, sondern unterliegen einer negativen feedback-Hemmung unter Mitwirkung von Ca²⁺/Calmodulin (Bradley et al., 2005; Pifferi et al., 2006). Außerdem findet eine Modulation durch Phosphorylierung statt (Kaupp und Seifert, 2002). Diese Kanäle sind in Vertebraten, aber auch in einigen nicht-Vertebraten wie *D. melanogaster* und *C. elegans* zu finden. Neben ihrer Existenz in Photorezeptoren und olfaktorischen Neuronen konnten CNG-Kanäle ebenfalls in verschiedenen Hirnregionen (Kingston et al., 1996; Bradley et al., 1997; Strijbos et al., 1999) sowie in nicht-neuronalen Geweben wie u.a. Herz (Ruiz et al., 1996), Niere (Biel et al., 1994), Lunge (Qiu et al., 2000), endokrinen Gewebe (Vitalis et al., 2000), Aorta (Biel et al., 1993), Testis (Biel et al., 1994) und Spermien (Wiesner et al., 1998) nachgewiesen werden (Reviews: (Kaupp und Seifert, 2002; Craven und Zagotta, 2006; Biel und Michalakis, 2009).

CNG-Kanäle werden gebildet aus vier Untereinheiten, die um eine zentrale Pore angeordnet sind (Abbildung 5 B) (Higgins et al., 2002). Bisher wurden in Säugetieren sechs homologe CNG-Kanal-Untereinheiten identifiziert (Kaupp et al., 1989; Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990; Chen et al., 1993; Biel et al., 1994; Bradley et al., 1994; Körschen et al., 1995; Sautter et al., 1998; Gerstner et al., 2000), darunter 4 A-Untereinheiten (CNGA1, CNGA2, CNGA3 und CNGA4) und 2 B-Untereinheiten (CNGB1 und CNGB3). Die Untereinheiten CNGA1, CNGA2 und CNGA3 sind funktionelle Untereinheiten, während die Untereinheiten CNGA4, CNGB1 und CNGB3 eine modulatorische Rolle einnehmen. Die Zusammensetzung der Untereinheiten in den Photorezeptoren der Retina und in den olfaktorischen Neuronen variiert und ist auf die jeweilige physiologische Funktion des Gewebes zugeschnitten (siehe Kapitel 1.6.1 und 1.6.4). Funktionelle Eigenschaften des Kanals, wie Ligandensensitivität und -selektivität, die Leitfähigkeit bestimmter Ionen und das ‚Gating‘, werden durch diese Zusammensetzung bestimmt. Topologisch sind CNG-Kanäle aus sechs Transmembrandomänen (S1 - S6), einer ‚Pore-loop-Domäne‘ zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne, intrazellulären N- und C-terminalen Regionen und der C-terminalen CNBD aufgebaut (Abbildung 5 A). Die CNBD ist über den C-Linker mit der sechsten Transmembrandomäne verbunden. Die S4-Domäne beinhaltet eine Sequenz positiv geladener Aminosäuren, den sogenannten Spannungssensor (‚voltage-sensor motif‘) (Kaupp

und Seifert, 2002). Drei Domänen sind an der Aktivierung des Kanals beteiligt: das ‚channel gate‘, welches am distalen Ende der Transmembrandomäne sechs lokalisiert ist (Jiang et al., 2002; Giorgetti et al., 2005), die CNBD (Kaupp et al., 1989; Zagotta et al., 2003) und der C-Linker, der die Bindung zyklischer Nukleotide mit dem ‚channel gate‘ verlinkt (Zong et al., 1998; Paoletti et al., 1999; Sunderman und Zagotta, 1999a, 1999b). Native CNG-Kanäle sind immer aus A- und B-Untereinheiten aufgebaut.

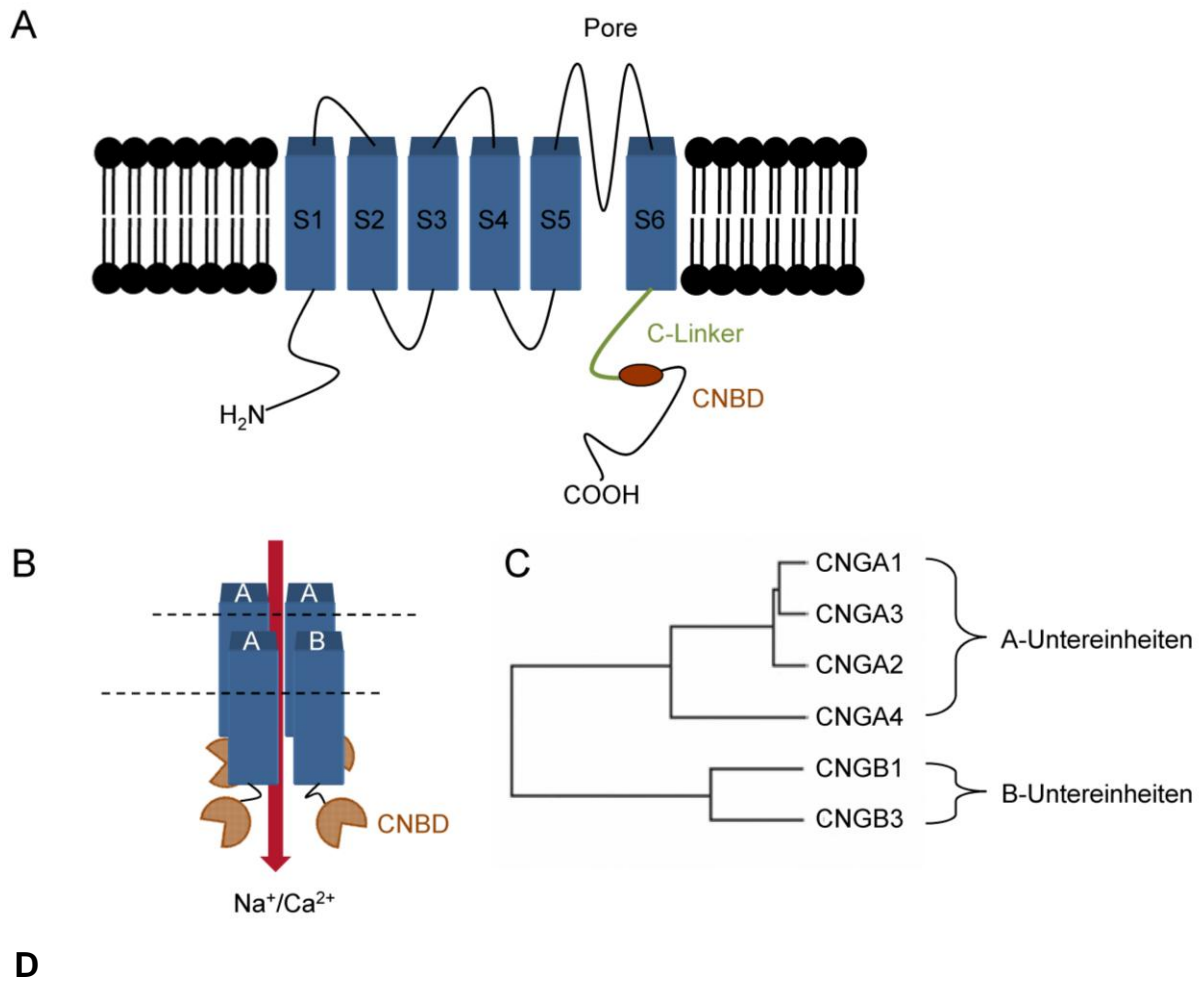


Abbildung 5. Struktureller Aufbau und evolutionäre Beziehungen von CNG-Kanälen. A. Vereinfachte Darstellung der Membrantopologie von CNG-Kanal-Untereinheiten. CNBD: cyclic nucleotide-binding domain, S1 - S6: Transmembrandomänen. B. Vereinfachtes Kanalmodell aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit. Adaptiert aus Hüttl (2004). C. Phylogenetischer Stammbaum der CNG-Kanal-Untereinheiten. Adaptiert aus Biel und Michalakakis (2009). D. Zusammensetzung der CNG-Kanäle in den Photorezeptoren und in olfaktorischen Rezeptorneuronen. B1a und B1b sind Spleißvarianten der Untereinheit CNGB1.

1.6.1. Signaltransduktion in Photorezeptoren

In Vertebraten existieren zwei verschiedene Photorezeptortypen: Stäbchen, die verantwortlich sind für das Sehen bei geringer Lichtintensität (Hell-Dunkel-Sehen) und Zapfen, die das Sehen bei hohen Lichtintensitäten und das Farbsehen vermitteln. Beim Menschen gibt es drei verschiedene Typen von Zapfen, die für die unterschiedlichen Wellenlängen des Farbspektrums verantwortlich sind (blauer, grüner und roter Bereich). In beiden Photorezeptorsystemen wird die Signaltransduktion an CNG-Kanälen in der Plasmamembran der Außensegmente durch cGMP vermittelt. In der Dunkelheit liegt der CNG-Kanal aufgrund hoher cGMP-Konzentrationen in seiner offenen Konformation vor. cGMP wird hier von zwei verschiedenen partikulären Guanylatzyklasen, GC-E und GC-F, gebildet (Yang et al., 1995; Pugh et al., 1997). Der folgende Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen („dark current“) führt zur Depolarisierung der Zelle und der Ausschüttung des Transmitters Glutamat. Die Absorption von Licht aktiviert Rhodopsin, welches seinerseits das G-Protein Transducin, und dessen α -Untereinheit die Phosphodiesterase 6 aktiviert (G-Protein-gekoppelte Signalkaskade), die cGMP zu 5'-GMP hydrolysiert und zum Schließen des Kanals führt (Abbildung 6). Daraufhin hyperpolarisiert der Photorezeptor und stoppt die Ausschüttung von Glutamat. Ca^{2+} -Ionen reduzieren außerdem, durch Bindung an Ca^{2+} -abhängige Proteine wie Calmodulin, die Sensitivität des CNG-Kanals für cGMP. Die zytosolisch vorliegenden Ca^{2+} -Ionen werden durch einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -Austauscher wieder aus der Zelle befördert (Hodgkin et al., 1985; Yau und Nakatani, 1985; Cervetto et al., 1989; Schnetkamp, 2004). In Photorezeptoren wird cGMP als Ligand gegenüber cAMP stark bevorzugt (Kaupp und Seifert, 2002).

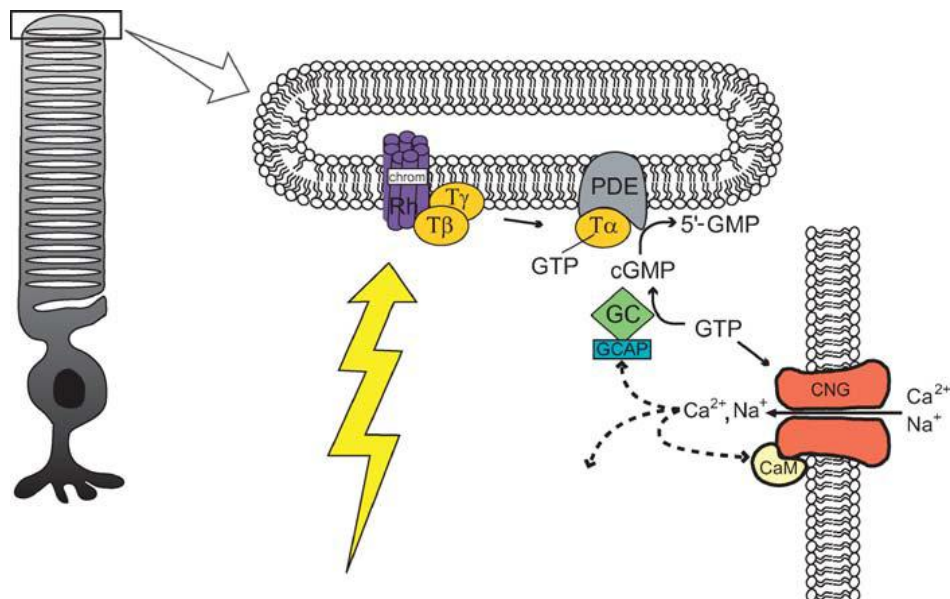


Abbildung 6. Signaltransduktion in Stäbchen-Photorezeptoren. In der Vergrößerung ist die Phototransduktionskaskade in der Diskmembran des Außensegments der Stäbchenzelle dargestellt. Adaptiert aus Craven und Zagotta (2006). CaM: Calmodulin, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CNG: cyclic nucleotide-gated channel, GC: Guanylatzyklase, GCAP: Guanylatzyklase-aktivierendes Protein, 5'-GMP: 5'-Guanosinmonophosphat, GTP: Guanosin-triphosphat, PDE: Phosphodiesterase, Rh: Rhodopsin, T: Transducin

1.6.2. CNG-Kanal-Untereinheiten in Stäbchen-Photorezeptoren

CNGA1

Mutationen im CNGA1-Gen sind für die Krankheit Retinitis pigmentosa (RP) verantwortlich. Hierbei handelt es sich um eine überwiegend erblich bedingte progressive Degeneration der Photorezeptoren der Retina (Kennan et al., 2005), die mit den Stäbchen beginnt. Symptome sind Nachtblindheit, Einschränkung des peripheren Gesichtsfeldes und Pigmenteinlagerungen in der Retina (Kalloniatis und Fletcher, 2004). Letztendlich ist eine vollkommene Erblindung die Folge. Inzwischen sind über 30 Gene bekannt, deren Defekt eine RP auslösen kann. Mutationen im CNGA1-Gen führen zu einer autosomal-rezessiven Form der RP (Dryja et al., 1995), die nur zu 1 % aller Fälle beitragen.

CNGB1a

Das CNGB1-Gen besteht aus 33 Exons, welche für verschiedene Spleißvarianten kodieren. Stäbchen exprimieren eine Isoform mit einer Größe von 240 kDa (CNGB1a), die einen langen zytosolischen N-Terminus enthält. Dieser kann auch als separates zytosolisches Protein (Glutamic acid rich protein, GARP) translatiert werden (Sugimoto et al., 1991; Chen et al., 1993; Körschen et al., 1995). Olfaktorische Neurone exprimieren eine weitere Isoform

mit einer Größe von 120 kDa (CNGB1b), die den GARP-Teil nicht enthält (Sautter et al., 1998; Bönigk et al., 1999). Mutationen in der CNBD-Region des CNGB1-Gens können ebenfalls zu einer Retinitis pigmentosa führen (Bareil et al., 2001).

CNGB1^{-/-}-Mäuse wurden durch Deletion des Exons 26, welches für die Porenregion und die Transmembrandomäne 6 kodiert, generiert (Hüttl et al., 2005). Dieser Knock-out deckt alle CNGB1-Spleißvarianten ab. Die CNGB1^{-/-}-Mäuse zeigen sowohl visuelle als auch olfaktorische Defizite. Visuell weisen die Tiere eine progressive Degeneration der Retina auf, wobei in erster Linie die Stäbchen betroffen sind. In einem Alter von sechs Monaten folgt die Degeneration der Zapfen, so dass die Maus im Alter von 12 Monaten erblindet ist (Biel und Michalakakis, 2009). CNGB1^{-/-}-Mäuse sind fertil, aber kleiner in ihrer Körpergröße und weisen ein reduziertes Körpergewicht auf. Dieses ist durch die eingeschränkte olfaktorische Wahrnehmung und der damit erschwerten Nahrungsaufnahme (schlechteres Auffinden der Milchzitzen der Mutter) zu erklären. Außerdem ist eine häufigere postnatale Mortalität zu erkennen (Hüttl et al., 2005).

1.6.3. CNG-Kanal-Untereinheiten in Zapfen-Photorezeptoren

CNGA3

Mutationen im CNGA3-Gen führen zu einer Achromatopsie (totale Farbenblindheit oder Stäbchen-Monochromasie) (Kohl et al., 1998). Diese Krankheit der Retina wird autosomal-rezessiv vererbt und die Betroffenen können nur Kontraste (hell-dunkel) wahrnehmen, leiden unter mangelnder Sehschärfe, Überempfindlichkeit gegenüber hellem Licht (Photophobie) und einem unwillkürlichen Augenzittern (Nystagmus). Die Retina enthält keine funktionierenden Zapfen (Sharpe et al., 1999). Im CNGA3-Gen sind ungefähr 50 Mutationen bekannt, die für eine Achromatopsie verantwortlich sind (Wissinger et al., 2001; Eksandh et al., 2002; Johnson et al., 2004; Kellner et al., 2004; Michaelides et al., 2004; Nishiguchi et al., 2005; Varsányi et al., 2005). Daneben wurden ebenfalls mehrere Spleißvarianten des CNGA3-Gens identifiziert (Biel et al., 1996; Bönigk et al., 1996, 1999; Wiesner et al., 1998; Timpe et al., 1999).

CNGA3^{-/-}-Mäuse zeigen die gleichen Symptome wie die einer humanen Achromatopsie (Biel et al., 1999), mit der Ausnahme, dass die Sehschärfe nicht beeinträchtigt ist (Schmucker et al., 2005). Es besteht ein kompletter Verlust der Zapfen-Funktion, wohingegen die Stäbchen funktionell und strukturell vollkommen intakt sind. CNGA3^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig, fertil und weisen einen normalen Habitus und ein normales Körpergewicht auf (Biel et al., 1999).

CNGB3

Mutationen im CNGB3-Gen führen ebenfalls zu einer Achromatopsie. 40 - 50 % der Betroffenen weisen eine Mutation in diesem Gen auf (Ding et al., 2009). CNGB3^{-/-}-Mäuse zeigen ebenfalls die gleichen Symptome einer humanen Achromatopsie (Ding et al., 2009).

1.6.4. Signaltransduktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen

Es sind mehrere chemo-sensorische Systeme im olfaktorischen System bekannt: die Riechschleimhaut (olfaktorisches Epithel, main olfactory epithelium, MOE), das Vomeronasalorgan (VNO), das Septal Organ (von Masera (SOM)) und das Grüneberg Ganglion (GG) (Ma, 2007; Zufall und Munger, 2010). Olfaktorische Rezeptorneurone des MOE und des SOM verwenden CNG-Kanäle für ihre Signaltransduktion. Aus jedem olfaktorischen Rezeptorneuron ragen Zilien, die spezielle Geruchsrezeptoren tragen, in die Riechschleimhaut hinein. Die dortige Bindung eines Duftmoleküls an seinen Rezeptor (Buck und Axel, 1991) aktiviert über das olfaktorische G-Protein (G_{olf}) eine Adenylatzyklase in den Zilien (Bakalyar und Reed, 1990; Wong et al., 2000), welches zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und zum Öffnen des CNG-Kanals führt (G-Protein-gekoppelte Signalkaskade, Abbildung 7). Es kommt zu einem Einstrom von Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen (Nakamura und Gold, 1987; Frings et al., 1995). Der Ca^{2+} -Einstrom führt zu einer Depolarisierung der Zelle, Transmitterausschüttung und zur Aktivierung eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^{-} -Kanals, der Cl^{-} -Ionen aus der Zelle schleust und somit die Membran weiter depolarisiert (Kleene und Gesteland, 1991; Kurahashi und Yau, 1993; Lowe und Gold, 1993). cAMP wird von der Phosphodiesterase 1C2 hydrolysiert. Die CNG-Kanäle in olfaktorischen Rezeptorneuronen reagieren gleichermaßen auf cAMP und cGMP als Liganden (Kaupp und Seifert, 2002).

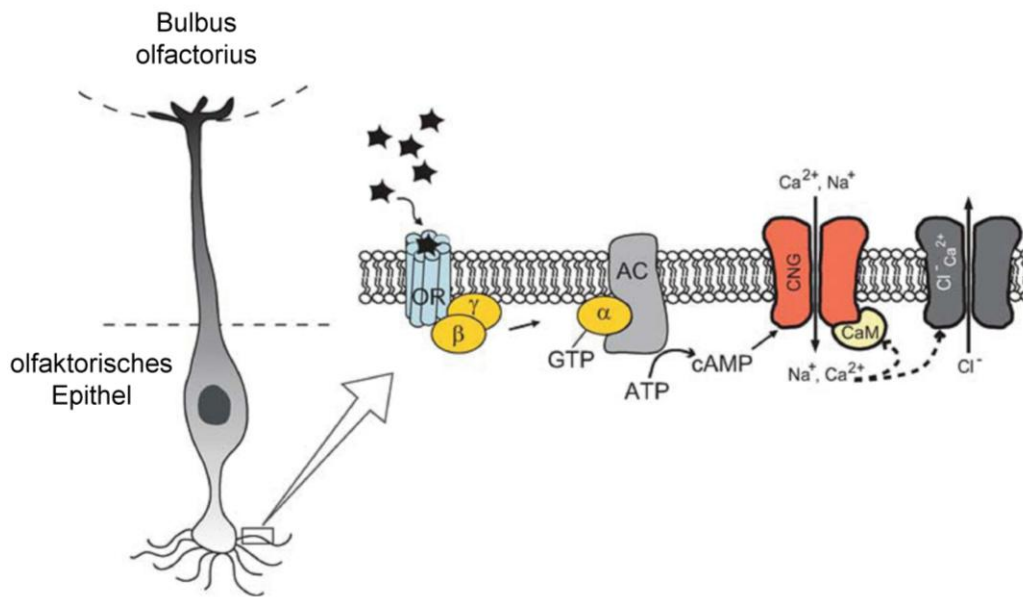


Abbildung 7. Olfaktorische Signaltransduktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen der Rienschleimhaut. In der Vergrößerung ist die olfaktorische Transduktionskaskade in den Zilien dargestellt. Adaptiert aus Craven und Zagotta (2006). AC: Adenylatzyklase, ATP: Adenosintri-phosphat, CaM: Calmodulin, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CNG; cyclic nucleotide-gated channel, GTP: Guanosintri-phosphat, OR: olfaktorischer Rezeptor, α , β , γ : Untereinheiten des olfaktorischen G-Proteins

1.6.5. CNG-Kanal-Untereinheiten in olfaktorischen Rezeptorneuronen

CNGA2

CNGA2 ist im olfaktorischen System nur im olfaktorischen Epithel lokalisiert. Das CNGA2-Gen ist als einziges CNG-Kanal kodierende Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert. Mutationen dieses Gens im humanen Genom sind noch nicht bekannt.

Bisher wurden vier CNGA2^{-/-}-Mauslinien generiert (Brunet et al., 1996; Baker et al., 1999; Zheng und Zagotta, 2000; Zhao und Reed, 2001). Auch CNGA2^{-/-}-Mäuse weisen eine erhöhte postnatale Mortalität aufgrund der fehlenden olfaktorischen Wahrnehmung auf. Sie leiden unter dem vollständigen Fehlen des Geruchssinns (Anosmie). CNGA2 ist zudem für die normale Ausprägung des olfaktorischen Epithels und des Bulbus olfactorius notwendig (Baker et al., 1999). CNGA2^{-/-}-Mäuse zeigen zudem Defizite in ihrem Sexual- und Aggressionsverhalten (Mandiyan et al., 2005).

CNGA4

CNGA4^{-/-}-Mäuse sind fertil und zeigen keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten (Munger et al., 2001; Kelliher et al., 2003). Das olfaktorische Epithel und der Bulbus

olfactorius sind ebenfalls normal entwickelt, während die Geruchsadaptation eingeschränkt ist (Munger et al., 2001; Kelliher et al., 2003).

CNGB1b

Olfaktorische Neurone exprimieren die Isoform CNGB1b mit einer Größe von 120 kDa, die den GARP-Teil nicht enthält (siehe 1.6.2). CNGB1^{-/-}-Mäuse, denen sowohl die visuelle CNGB1a- als auch die olfaktorische CNGB1b-Isoform fehlt, entwickeln ebenfalls eine Einschränkung der olfaktorischen Wahrnehmung (Michalakis et al., 2006). Auch in diesen Mäusen ist die Geruchsadaptation beeinträchtigt.

1.7. Zielsetzungen dieser Arbeit

Bei anhaltenden Schmerzen wird im Rückenmark cGMP gebildet, welches zur Sensibilisierung des nozizeptiven Systems beiträgt. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass cGMP auch über andere, als die bisher bekannten Mechanismen die Schmerzverarbeitung modulieren kann. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob CNG-Kanäle im nozizeptiven System lokalisiert sind und ‚schmerzrelevante‘ cGMP-Effekte vermitteln.

Die wichtigsten zu untersuchenden Aspekte sind:

- Charakterisierung der Expression von CNG-Kanal-Untereinheiten in den ‚schmerzrelevanten‘ Geweben Rückenmark und Spinalganglien
- Identifikation der CNG-Kanal-exprimierenden Zelltypen
- Untersuchung einer möglichen Beteiligung von CNG-Kanälen in der cGMP-vermittelten Schmerzverarbeitung in vivo
- Untersuchung der funktionellen Relevanz der Untereinheiten CNGA3 und CNGB1 in der Schmerzverarbeitung durch Charakterisierung des Schmerzverhaltens von CNGA3^{-/-}- und CNGB1^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute, inflammatorische und neuropathische Schmerzen

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle Verhaltensversuche wurden mit CNGA3^{-/-}-Mäusen, CNGB1^{-/-}-Mäusen und den entsprechenden Littermate Wildtyp-Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Sowohl die CNGA3^{-/-}-Mäuse als auch die CNGB1^{-/-}-Mäuse wurden von Prof. Dr. Martin Biel und Dr. Stylianos Michalakis (Department Pharmazie, Pharmakologie für Naturwissenschaften, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren die Mäuse 6 - 10 Wochen alt und wurden über mehr als 10 Generationen auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Vor dem eigentlichen Verhaltenstest konnten sich die Tiere an den Untersuchungsraum gewöhnen. Der Untersucher war bezüglich des Genotyps der Tiere geblindet. Für Gewebeuntersuchungen wurden zusätzlich auch kommerziell bezogene C57BL/6-Mäuse (Harlan Winkelmann) eingesetzt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22 ± 0,5°C; 12 h-Hell-Dunkelzyklus) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente sind von der zuständigen Tierethikkommission (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt worden.

2.2. Überprüfung der Motorik

Tierversuche sind unumgänglich, um neue und klinisch relevante Einsichten in die Mechanismen des Schmerzes und in die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zu bekommen. Da Tiere ihre Schmerzen nicht mitteilen können, bedarf es der Beobachtung physiologischer und motorischer Verhaltensweisen, um das Ausmaß des Schmerzes einschätzen zu können (z.B. Zurückziehen oder Lecken einer Pfote). Daher ist vor Durchführung sämtlicher Schmerzmodelle die Überprüfung der intakten Motorik der Tiere notwendig. Zudem sollte Stress vor und während der Untersuchungen vermieden werden, da Verhaltensversuche für diesen Faktor sehr anfällig sind.

2.2.1. Rotarod-Test

Mit dem Rotarod-Test wird die motorische Koordination der Versuchstiere untersucht. Hierzu werden die Mäuse auf einen rotierenden Stab gesetzt und müssen sich auf diesem vorwärts bewegen. Die Zeit bis zum Herunterfallen (Latenzzeit) vom rotierenden Stab wird bestimmt.

Tiere mit einer motorischen Einschränkung fallen früher herunter. Nur Mäuse ohne motorische Auffälligkeiten können in die nozizeptiven Verhaltenstests eingeschlossen werden, da in diesen der Schmerz in Form von motorischen Reaktionen gemessen wird.

Zur Untersuchung wurde ein Rotarod Treadmill für Mäuse (Ugo Basile) mit einer konstanten Geschwindigkeit von 32 rpm verwendet. Alle Mäuse hatten am Vortag des Experiments drei Übungseinheiten. Die Latenzzeit entsprach dem Mittelwert aus fünf Messungen. Der Cutoff-Wert wurde auf 120 s gesetzt.

2.3. Nozizeptive Tiermodelle

2.3.1. Tailflick-Test

In diesem Test, der erstmals von D'Amour und Smith (1941) beschrieben wurde, wird durch einen auf den Schwanz der Maus gerichteten thermischen Stimulus ein spinal vermittelter Reflex ausgelöst. Die Latenzzeit bis zum Wegziehen des Schwanzes von der Wärmequelle wird gemessen. Der Tailflick-Test ist ein Modell für eine akute thermische Nozizeption.

Die Maus wurde locker in einem Baumwolltuch fixiert, der Schwanz leicht gedehnt und die Mitte des Schwanzes von unten mit einem Wärmestrahle definierter Intensität (Plantar Test, Intensität: 55, Ugo Basile) stimuliert. Die Latenzzeit wurde aus dem Mittelwert von drei Messungen gebildet, wobei zwischen den einzelnen Messungen eine 5minütige Pause lag. Der Cutoff-Wert wurde auf 10 s gesetzt, um eine Gewebeschädigung auszuschließen.

2.3.2. Hotplate-Test

Der Hotplate-Test wurde von Eddy und Leimbach (1953) beschrieben und stellt ein Modell für akute thermische Nozizeption dar. Dieser Test misst das Schmerzverhalten bestehend aus Lecken und Schütteln der Hinterpfoten oder Hochspringen als Reaktion auf eine warme Metallplatte. Dem nozizeptiven Verhalten liegen sowohl spinale als auch supraspinale Mechanismen zugrunde.

Die Maus wurde auf eine, von einem Plexiglaszylinder (20 cm Durchmesser, 18 cm Höhe) umgebene, beheizte Metallplatte (Hot Plate, Ugo Basile) gesetzt. Die gewählten Temperaturen betragen 50°C, 52°C und 54°C. Die Zeit zwischen dem Setzen auf die Platte und dem Lecken oder Schütteln der Hinterpfoten oder dem Hochspringen von der Platte wurde gemessen. Die Cutoff-Werte lagen bei 60 s (50°C), 40 s (52°C) bzw. 20 s (54°C), um Gewebeschädigungen zu vermeiden. Nach Zeigen einer der genannten Reaktionen oder dem Erreichen des entsprechenden Cutoff-Wertes wurde die Maus unmittelbar von der

warmen Platte gehoben. Jedes Tier wurde nur einmal gemessen, da wiederholte Messungen zu Änderungen der Latenzzeit führen können (Mogil et al., 1999).

2.3.3. Formalin-Test

Der Formalin-Test wurde erstmals von Dubuisson und Dennis (1977) an Ratten beschrieben, und später für die Anwendung in Mäusen modifiziert (Hunskaar et al., 1985; Murray et al., 1988). Dieser Test misst das Verhalten auf die subkutane Injektion einer verdünnten Formaldehydlösung („Formalin“), die den Mäusen in die dorsale Seite einer Hinterpfote injiziert wird. Diese Injektion ruft eine spontane nozizeptive Reaktion in Form von Lecken, Beißen und Schütteln der entsprechenden Pfote hervor, welche wiederum in zwei Phasen eingeteilt werden kann: eine ‚frühe‘ Phase 1 setzt unmittelbar nach der Injektion ein und hält für 5 - 10 min an. Nach einer kurzen Ruhephase ohne offensichtliche Schmerzreaktion des Tieres beginnt die zweite, ‚späte‘ Phase ca. 15 - 60 min nach der Formalininjektion. Der Phase 1 liegt eine direkte Stimulation peripherer Nozizeptoren zugrunde, insbesondere der A δ -Fasern. Hingegen spielt bei der Phase 2 neben der Nozizeptor-Stimulation auch eine Entzündung der Pfote und weitere zentrale Veränderungen eine Rolle, welches in einer anhaltenden Aktivierung von C-Fasern resultiert (Coderre et al., 1990; Tjølsen et al., 1992). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einige Mausstämme eine über Phase 2 hinaus andauernde Schmerzreaktion bis zu 120 min nach Formalininjektion zeigen (Kim et al., 1999; Wei et al., 2001; Porro et al., 2003; Huang et al., 2006). Das Schmerzverhalten in dieser Phase 3 ist, verglichen mit der Phase 2, abgeschwächt, was auf eine erhöhte Aktivität inhibitorischer Neurone bei anhaltender nozizeptiver Stimulation zurückgeführt werden könnte. Somit dient der Formalin-Test als ein Tiermodell, in dem gleichermaßen akute und tonische, inflammatorische Schmerzen untersucht werden können.

Vor der Untersuchung wurde die Maus für ca. 30 min zur Gewöhnung in einen Plexiglaszylinder (20 cm Durchmesser, 18 cm Höhe) gesetzt, in dem auch der eigentliche Test stattfand. Zur nozizeptiven Stimulation wurden der Maus 15 μ l einer 5 %igen Formaldehydlösung subkutan in die dorsale Seite der rechten Hinterpfote injiziert und die Maus zurück in den Zylinder gesetzt. Unmittelbar nach der Injektion wurde die Maus für einen Zeitraum von 80 min beobachtet und mit einer Stoppuhr in Intervallen von 5 min die Zeit gemessen, die die Maus mit dem Lecken der betroffenen Hinterpfote (Leckzeit) zubrachte. Die Phasen wurden wie folgt definiert: Phase 1: 1-10 min, Phase 2: 11-60 min und Phase 3: 61-80 min nach Injektion.

2.3.4. Zymosan-induzierte mechanische und thermische Hyperalgesie

Zymosan A ist ein Kohlenhydrat aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* und ruft nach Injektion in eine Hinterpfote eine Entzündung und eine Hyperalgesie auf mechanische und thermische Stimuli hervor. Dieser Test wurde erstmals von Meller und Gebhart (1997) in Ratten beschrieben. In der verwendeten Konzentration ruft die subkutane Injektion von Zymosan A in die Plantarseite einer Hinterpfote im Gegensatz zur Formalininjektion keine Spontanreaktion in Form von Lecken oder Schütteln der betroffenen Pfote hervor. Vielmehr findet infolge der Entzündung eine progrediente Sensibilisierung auf mechanische und thermische Reize statt. Die Messung des Ausmaßes der Hyperalgesie erfolgt durch definierte mechanische oder thermische Reizung der Zymosan-injizierten Hinterpfote. Als Schmerzreaktion auf den mechanischen bzw. thermischen Stimulus wird das Wegziehen der betroffenen Pfote gewertet. Dieser Test stellt somit ein Modell für tonische, inflammatorische Schmerzen dar, die charakterisiert sind durch Hyperalgesie und Pfotenödem.

a) mechanische Hyperalgesie

Die zu untersuchenden Mäuse wurden in ein Gestell mit einem Boden aus kleinmaschigem Draht gesetzt und dort für zwei Stunden eingewöhnt. Nach dieser Eingewöhnungszeit wurden die Mäuse zunächst unbehandelt gemessen (‚Baseline‘). Die Messungen erfolgten mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile), mit dem durch einen dünnen, stumpfen Stab (2 mm Durchmesser) ein definierter Druck von unten auf die Plantarseite der Hinterpfote ausgeübt werden kann (0 - 5 g ansteigend bis 10 s, dann konstant 5 g bis die Maus eine Schmerzreaktion durch Wegziehen der Hinterpfote zeigt). Nach maximal 20 s wurde die Messung beendet.

Am eigentlichen Versuchstag wurde den Tieren 15 µl einer Zymosan A-Lösung (5 mg/ml in 0,1 M PBS, pH 7,4) subkutan in die Plantarseite der rechten Hinterpfote injiziert. Anschließend wurde die Latenzzeit beider Hinterpfoten bis zum Wegziehen der Pfote 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 und 48 h nach Injektion bestimmt. Pro Tier und Pfote wurden zu allen Zeitpunkten ca. 5 - 6 Messwerte genommen und daraus der Mittelwert berechnet. Zwischen den einzelnen Messungen an einem Tier wurde eine Pause von mindestens 10 s eingelegt.

b) thermische Hyperalgesie

Die Mäuse wurden in kleine Plexiglas-Kammern auf eine beheizte Glasplatte (32°C) gesetzt und dort für eine Stunde eingewöhnt. Zur Bestimmung der ‚Baseline‘ wurde die Plantarseite beider Hinterpfoten mit der mobilen Wärmequelle des Plantar Analgesia Meters (IITC Life Science) nach der Methode von Hargreaves et al. (1988) bestrahlt (Suchstrahlintensität: 5, Stimulusintensität: 15), bis die Pfote kräftig weggezogen wurde. Die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote wurde gemessen. Falls keine Reaktion der Maus erfolgte, wurde der

Wärmestimulus nach 30 s beendet. Die Messung der thermischen Hyperalgesie erfolgte dann nach Injektion von 15 µl Zymosan A (5 mg/ml in sterilem PBS) in die Plantarseite der rechten Hinterpfote 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 und 48 h nach Injektion. Der Mittelwert aus 3 - 4 Messungen pro Tier und Pfote wurde für jeden Zeitpunkt berechnet.

2.3.5. SNI-Modell für neuropathische Schmerzen

Neuropathische Schmerzen wurden im ‚Spared Nerve Injury‘-Modell (SNI-Modell) nach Decosterd und Woolf (2000) untersucht, welches in Ratten etabliert, aber später für Mäuse adaptiert wurde (Bourquin et al., 2006). In diesem Modell werden in einer Hinterpfote zwei der drei Äste des Nervus ischiadicus (Nervus peroneus communis und Nervus tibialis) durchtrennt, während der dritte Ast (Nervus suralis) intakt bleibt. Dieser Eingriff führt zu einer lang anhaltenden Allodynie im vom Nervus suralis versorgten Hautareal der Pfote.

Die Mäuse wurden in eine Isofluran-Carbogen-Narkose gelegt und der Nervus peroneus communis und der Nervus tibialis mit einem Faden abgebunden und distal davon durchgeschnitten. Die Messung der mechanischen Allodynie erfolgte im lateralen Teil der Hinterpfote mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer an den Tagen 1, 4, 7, 10, 15, 22 und 28 nach der SNI-Operation. Da neuropathische Schmerzen häufig zudem mit einer Kälteallodynie verbunden sind, wurde diese ebenfalls untersucht. Hierzu wurden die Tiere auf eine auf 10°C gekühlte Platte (Solid State Heat/cold Plate, Teca) gesetzt und die Latenzzeit bis zum Erkennen einer Reaktion (Schütteln, Lecken oder Anheben der operierten Hinterpfote) gemessen. Der Cutoff-Wert wurde auf 60 s gesetzt. Die Messung erfolgte an den Tagen 8, 10, 14, 22 und 27 nach der SNI-Operation.

2.3.6. Intrathekale Applikation von Prüfsubstanzen

Um Substanzen direkt in den subarachnoidealen Liquorraum injizieren zu können, wurden den Mäusen vor Versuchsbeginn intrathekale (i.t.) Katheter implantiert. Hierzu wurde ein Katheter durch Einschieben von 0,5 cm eines schmalen Polytetrafluorethylen-Schlauchs (OD 0,2 mm, ID 0,1 mm, 1 cm Länge, SUBL-60, Braintree Scientific) in einen größeren Polyethylen-Schlauch (OD 0,61 mm, ID 0,28 mm, 7 cm Länge, neolab) und Verkleben mit Cyanoacrylat (Stabiloplast Akzelerator, Renfert) hergestellt. Um Beschädigungen und Verstopfungen des Katheters auszuschließen, wurde dieser mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) gespült. Für die Implantation des Katheters wurden die Mäuse mit Isofluran-Carbogen narkotisiert. Ein ca. 2 cm langer longitudinaler Schnitt durch die Haut auf Höhe des Beckengürtels erlaubte den Zugang zur Wirbelsäule. Diese wurde vorsichtig von

den Muskeln getrennt um den Processus spinosus des Lumbalwirbels L5 freizulegen und ihn abzutrennen. Das Intervertebral-Ligament zwischen L5 und L6 wurde mit einer Curette zur Seite geschoben, um die Dura mater zu erreichen und sie mit einer Kanüle (27 Gauge) zu punktieren. Daraufhin konnte das schmale Ende des Katheters (0,5 cm Länge) vorsichtig zwischen den Wirbelkörpern durch die Dura mater in den Subarachnoidealraum geschoben werden. Die Penetration der Dura mater konnte durch eine spontane Bewegung des Schwanzes oder der Hinterextremitäten, sowie durch einen Rückfluss von Zerebrospinalflüssigkeit verifiziert werden. Das Loch in der Dura mater wurde anschließend mit Cyanoacrylat verschlossen und das untere Ende des Katheters an der Wirbelsäule fixiert. Das obere Ende des Katheters wurde unter der Haut Richtung Nacken und durch einen kleinen Schnitt nach außen gezogen und dort ebenfalls fixiert (Abbildung 8). Alle Einschnitte in Muskeln und Haut wurden vernäht und geklammert, und das offene Ende des Katheters anschließend durch kurze Erhitzung mit einem Feuerzeug verschmolzen. Nach der Implantation der Katheter wurden die Tiere einzeln in Käfige gesetzt und konnten sich für ca. 2 - 3 Tage regenerieren. Nur Mäuse ohne neurologische Ausfälle wurden für die anschließenden Experimente eingesetzt.

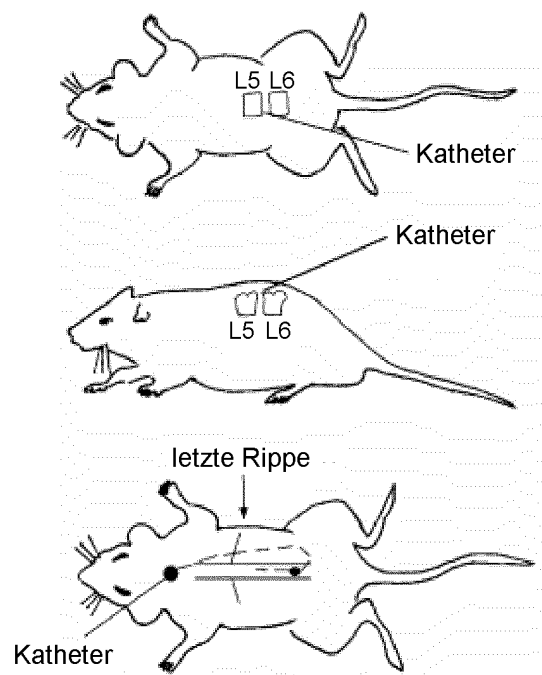


Abbildung 8. Implantation eines intrathekalen Katheters. Das eine Ende des Katheters wird zwischen den Wirbelkörpern L5 und L6 in den subarachnoidealen Liquorraum geschoben, während das zur Applikation offene Ende unter der Haut Richtung Nacken gezogen und dort fixiert wird. Adaptiert aus Wu et al. (2004).

Mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer wurde 4 Tage nach der Katheterimplantation die mechanische Schmerzschwelle an der Plantarseite der Hinterpfoten bestimmt. Nach Bestimmung der Basalwerte wurden folgende Substanzen intrathekal appliziert:

Name	Hersteller	Dosis	Wirkung
8-pCPT-cGMP	Biolog	20 nmol	cGKI-Aktivator
Rp-8-pCPT-cGMPS	Biolog	20 nmol	cGKI-Inhibitor
CNP	Merck	200 ng	GC-B-Aktivator
NOC-5	Axxora	10 µg	NO-Donor
L-cis-Diltiazem	Enzo	125 µg	CNG-Kanal-Inhibitor
NaCl, 0,9 %	Braun		Vehikel

Tabelle 1. Übersicht über die intrathekal applizierten Substanzen.

Alle Substanzen wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gelöst und in einem Volumen von 2 µl gefolgt von 4 bzw. 4,5 µl ACSF zur Spülung des Totraumvolumens intrathekal appliziert. Nach Injektion der Substanzen wurde mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfoten über einen Zeitraum von 75 min bestimmt. Die Messzeitpunkte waren 10, 20, 30, 45, 60 und 75 min nach Applikation. Nach Injektion von NOC-5 wurde die Latenzzeit über einen Zeitraum von 90 min gemessen. Dabei waren die Messzeitpunkte 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min nach Injektion. Nach Ende des Versuches wurden die Mäuse getötet und die Katheterposition durch Injektion von Trypanblau verifiziert. Nur Tiere, die eine Blaufärbung des lumbalen Rückenmarks und damit einen korrekt sitzenden Katheter aufwiesen, wurden in die Auswertung einbezogen.

2.4. Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie kann die Lokalisation von Proteinen im Gewebe mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Affinität eines Antikörpers gegen ein Epitop des untersuchten Proteins (Antigen-Antikörper-Reaktion). Der gegen das Epitop gerichtete Antikörper wird als Primärantikörper bezeichnet. Zur Detektion wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Methode verwendet, bei der der Primärantikörper von einem zweiten Antikörper erkannt wird. Dieser sogenannte Sekundärantikörper ist entweder direkt fluoreszenz-markiert und sorgt für ein Fluoreszenzsignal am Ort der Proteinexpression oder ist Enzym-gekoppelt und sorgt über einen Verstärkerschritt für ein Fluoreszenzsignal

am Ort der Proteinexpression und in der unmittelbaren Umgebung (Tyramide Signal Amplification-System).

2.4.1. Gewebepreparation

Die Mäuse wurden mit Isofluran oder CO₂ tief narkotisiert, anschließend das Herz punktiert und mit 0,9 % NaCl und nachfolgend 4 % Paraformaldehyd (PFA, in 0,1 M sterilem PBS, pH 7,4) perfundiert. Der lumbale Bereich des Rückenmarks (L4 - L6) und die lumbalen Spinalganglien (L1 - L6) wurden zügig entnommen und im Falle des Rückenmarks für 2,5 h in 4 % PFA postfixiert. Die Gewebe wurden dann für 2 - 3 h in 20 % Sucrose und anschließend über Nacht in 30 % Sucrose (beides in 0,1 M PBS, pH 7,4) dehydriert. Rückenmark und Spinalganglien wurden in Tissue-Molds (Sakura Finetek) in Einfriermedium (Jung Einbettmedium, Leica Microsystems) auf Trockeneis eingebettet, im Kryotom (Leica) in 16 µm dicke Schnitte geschnitten, auf Superfrost Plus Objektträger (Gerhard Menzel GmbH) gezogen und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.4.2. Konventionelle Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 3 x 5 min in PBS gewaschen, gefolgt von einer 5minütigen Permeabilisierung in PBSTx (0,1 % Triton X-100 in PBS) und einer Inkubation in Blockingpuffer (3 % bovines Serumalbumin (BSA) + 10 % normal goat serum (NGS) in PBSTx) für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht in 3 % BSA/PBS bei 4°C. Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Primärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
GFAP	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich
NeuN	Maus	1:1000	Millipore
Substanz P	Ratte	1:200	BD Biosciences

Tabelle 2. In der immunhistochemischen Färbung verwendete Primärantikörper.

Nach einem erneuten Waschschrift für 3 x 10 min in PBS folgte die Inkubation mit den Spezies-spezifischen Alexa Fluor 488 (AF488)-konjugierten bzw. Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern in PBS für 2 h bei RT.

Sekundärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
Anti-Kaninchen-AF488	Ziege	1:800	Invitrogen
Anti-Maus-Cy3	Schaf	1:800	Sigma-Aldrich
Anti-Ratte-Cy3	Ziege	1:800	Invitrogen

Tabelle 3. In der immunhistochemischen Färbung verwendete fluoreszierende Sekundärantikörper.

Einige Schnitte wurden nur mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten *Griffonia simplicifolia* Isolectin B4 (IB4, in PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBS wurden die Gewebeschnitte in Fluoromount-G (SouthernBiotech) eingedeckt.

2.4.3. Immunhistochemie mit dem Tyramide Signal Amplification (TSA)-System

Mit Hilfe der TSA-Methode kann eine, im Vergleich zur ‚konventionellen‘ immunhistochemischen Färbung, höhere Detektionssensitivität erzielt werden (Wang et al., 1999). Dieses System beinhaltet einen Verstärkerschritt (Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertes Streptavidin) und erlaubt, dass mehrere Substratmoleküle von der HRP umgesetzt werden können, und so ein Fluoreszenzsignal am Ort der Antikörperbindung und in der unmittelbaren Umgebung generiert wird. Infolgedessen werden eine größere Sensitivität und eine bessere Auflösung des Fluoreszenzsignals erreicht. Auch bei schwach exprimierten Proteinen kann somit ein scharfes Signal im Gewebe detektiert werden.

Der in der Immunhistochemie eingesetzte Primärantikörper wird von einem biotinierten Sekundärantikörper gebunden, der seinerseits von HRP-gekoppeltem Streptavidin erkannt wird. Die HRP generiert aus ihrem Substrat Tyramid unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reaktive Tyamidradikale, die kovalent an elektronenreiche Reste (z.B. Tyrosin) im Gewebe binden. Da die Tyamidradikale nur eine kurze Halbwertszeit besitzen, können sie nur in der unmittelbaren Umgebung der HRP an Tyrosinreste binden und dort ein rotes Fluoreszenzsignal hervorrufen (Abbildung 9).

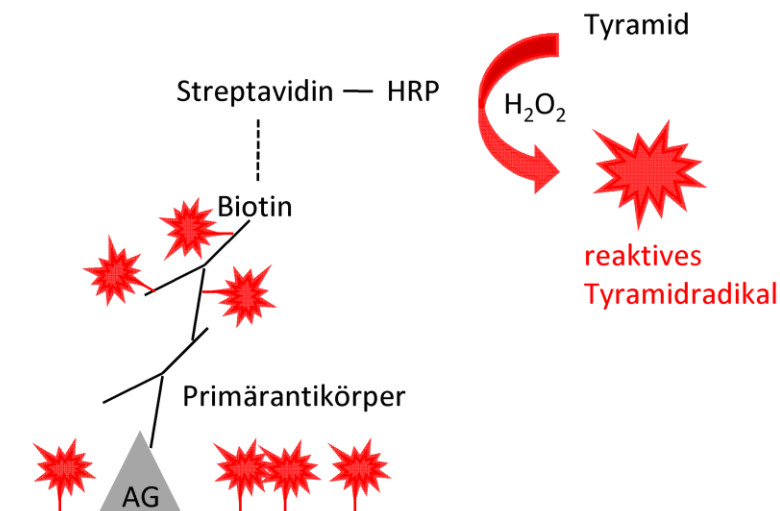


Abbildung 9. Prinzip der Tyramide Signal Amplification-Methode. Adaptiert aus Wang et al. (1999). AG: Antigen, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, HRP: Meerrettichperoxidase

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 3 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 10 min in PBSTx permeabilisiert. Anschließend folgte eine 30minütige Blockierung mit Blocking Reagent (0,5 % in PBS) des TSA Cyanine 3 Systems (Perkin Elmer) bei RT. Über Nacht wurden die Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper in Blocking Reagent bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift für 3 x 5 min in PBS folgte die Inkubation mit dem biotinierten Sekundärantikörper (1:100 in PBS, Invitrogen) für 60 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS schloss sich die Inkubation mit dem HRP-konjugiertem Streptavidin (1:100 in PBS, TSA Cyanine 3 System) für 30 min bei RT an. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min in PBS erfolgte die Inkubation mit dem HRP-Substrat Tyramid (1:100 in Amplification Diluent, TSA Cyanine 3 System) für 3 - 10 min bei RT und unter Lichtausschluss. Die Fluoreszenzfärbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Waschen in PBS abgestoppt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in Fluoromount-G eingedeckt. Als Negativkontrolle wurden die Gewebeschnitte ohne den Primärantikörper inkubiert.

Für eine Doppelfärbung mit zelltypspezifischen Markerproteinen fand nach der Inkubation mit dem biotinierten Sekundärantikörper ein Waschschrift für 3 x 5 min in PBS und eine weitere Inkubation mit dem Primärantikörper gegen das Markerprotein für 2 h in PBS bei RT statt. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min in PBS folgte die Inkubation mit den Spezies-spezifischen grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpern bzw. die Inkubation mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten *Griffonia simplicifolia* IB4 für 2 h in PBS bei RT. Anschließend schlossen sich die Inkubation mit dem HRP-konjugiertem Streptavidin (1:100 in PBS) für 30 min bei RT und die Inkubation mit dem HRP-Substrat Tyramid (1:100 in Amplification Diluent) für 3 - 10 min bei RT und unter Lichtausschluss an.

Primärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
CNGB1	Kaninchen	1:1000	Prof. Biel, München
NeuN	Maus	1:1000	Millipore
Substanz P	Ratte	1:200	BD Biosciences

Tabelle 4. In der immunhistochemischen Färbung mit dem TSA-System verwendete Primärantikörper.

Sekundärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus-AF488	Ziege	1:800	Invitrogen
Anti-Ratte-AF488	Ziege	1:800	Invitrogen

Tabelle 5. In der immunhistochemischen Färbung mit dem TSA-System verwendete Sekundärantikörper.

2.4.4. Detektion

Bilder der immunhistochemischen Färbungen wurden aufgenommen mit einem Axio Observer.Z1-Mikroskop (Zeiss), ausgestattet mit einer monochromen CCD-Kamera (AxioCam MRm, Zeiss), einem Zeiss ApoTome und der AxioVision 4.7.2-Software. Das ApoTome dient der Erstellung überstrahlungsfreier optischer Schnitte von Fluoreszenzpräparaten. Die Fluoreszenzsignale wurden mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern aufgenommen. Mit Hilfe der Software konnten doppelt gefärbte Schnitte übereinander gelegt werden. Die Bearbeitung von Helligkeit und Kontrast fand mit der Adobe Photoshop CS-Software statt.

2.5. In situ-Hybridisierung

Mit der In situ-Hybridisierung wird mRNA in der Zelle detektiert, um so die gewebs- oder zelltypspezifische Expression zu untersuchen. Hierfür wird eine markierte RNA-Sonde verwendet, die gegen die zu untersuchende mRNA gerichtet ist. Die eingesetzten Gewebeschnitte werden zuerst mit Paraformaldehyd fixiert, um die Morphologie des Gewebes zu erhalten. Die anschließende Prähybridisierung erfolgt, um eine störende Hintergrundfärbung zu minimieren. Die Prähybridisierungslösung enthält alle Komponenten, die auch die Hybridisierungslösung beinhaltet, mit Ausnahme der RNA-Sonde. Während der Hybridisierung bindet die RNA-Sonde an ihre komplementäre mRNA im Gewebe. Zahlreiche Faktoren, wie die Temperatur, der pH-Wert, die Konzentration monovalenter Kationen und die Anwesenheit organischer Lösungsmittel (Formamid) beeinflussen die Hybridisierung. Die

Detektion der gebundenen Sonde erfolgte indirekt durch Bindung markierter Antikörper an das Digoxigenin der Sonde. Im Fall der Durchlichtmikroskopie diente das Chromogen BM Purple als Substrat für die an den anti-Digoxigenin-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP). Dort, wo die Sonde im Gewebe gebunden hat, war eine Blaufärbung erkennbar. Die für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Färbung beinhaltete einen Verstärkerschritt. Der anti-Digoxigenin-Antikörper war Biotin-markiert und wurde wiederum von Streptavidin, seinerseits konjugiert mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP), gebunden. Als Substrat für die HRP diente der Farbstoff Tyramid. Dort, wo die Sonde im Gewebe gebunden hat, sowie in der unmittelbaren Umgebung, konnte ein rotes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Abbildung 10) (siehe Kapitel 2.4.3).

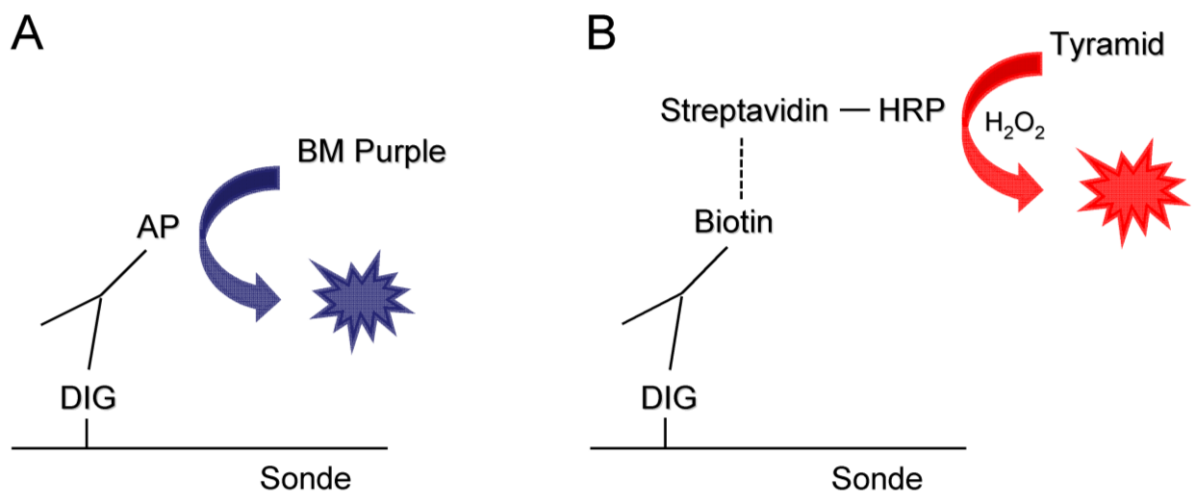


Abbildung 10. Detektion der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde im Gewebe mit A. BM Purple für die Durchlichtmikroskopie oder mit B. Tyramid für die Fluoreszenzmikroskopie. AP: Alkalische Phosphatase, DIG: Digoxigenin, HRP: Meerrettichperoxidase

2.5.1. Generierung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Aus dem Lumbalmark (L4 - L6) wurde mit Hilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kits (Qiagen) die RNA isoliert. 0,5 μ g der RNA wurden mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) und den Primern 5'-cca aga ggc tgt gga aac at-3' und 5'-gga gcg ttc atg ttg gaa at-3' (BioSpring) nach Anleitung des Herstellers revers transkribiert in ein cDNA-Fragment der Länge 520 bp, welches dem Sequenzbereich 844 - 1363 der CNGA3-mRNA (Accession Nummer: NM_009918) entspricht. Darüber hinaus wurde mit dem Primerpaar 5'-cag ttc cgg aag gta acc aa-3' und 5'-ctg tca ggt gag aag cca ca-3' (BioSpring) ein zweites cDNA-Fragment der Länge 767 bp hergestellt, das dem Sequenzbereich 1410 - 2176 der CNGA3-mRNA entspricht.

Das verwendete PCR-Programm lautete wie folgt:

	30 min bei 50°C (reverse Transkription)
	15 min bei 95°C (PCR-Aktivierung)
40 Zyklen mit:	50 s bei 94°C (Denaturierung)
	45 s bei 58°C (Annealing)
	45 s bei 72°C (Elongation)
	10 min bei 72°C (finale Elongation)

Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, nach Überprüfung der Laufhöhe ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen) extrahiert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers kloniert, in One Shot TOP10 chemisch kompetente *E.coli*-Zellen (Invitrogen) transformiert und unter Ampicillin-Selektion bei 37°C über Nacht amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde dann mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt. Um zu überprüfen, ob sich das korrekte Fragment im Vektor befindet, wurde dieses in einem EcoRI-Verdau (New England Biolabs) über zwei Stunden bei 37°C aus dem Vektor geschnitten und der Verdau erneut in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Verifizierung der SONDENSEQUENZ mittels Sequenzierung der Plasmid-DNA (LGC Genomics) wurde diese in zwei Ansätzen mit den Restriktionsenzymen NotI bzw. Pml (New England Biolabs) für 2 - 3 h bei 37°C geschnitten, um in der anschließenden In vitro-Transkription eine Antisense- und eine Sense-Sonde generieren zu können. Die verdaute DNA wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt, und Digoxigenin-markierte Antisense- und Sense RNA-Sonden durch In vitro-Transkription mit einer T3- bzw. T7-Polymerase hergestellt (Roche). Die RNA-Sonden wurden in EDTA/LiCl gefällt, resuspendiert, für 5 min bei 55°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2. In situ-Hybridisierung

Während der gesamten Durchführung wurde besonders darauf geachtet, dass alle Schritte möglichst RNase-frei durchgeführt werden. Die Gewebeschnitte (Gewebepräparation siehe Abschnitt 2.4.1) wurden zunächst 3 x 5 min in PBS gewaschen, gefolgt von einer 5minütigen Fixierung in 4 % PFA (in 0,1 M sterilem PBS, pH 7,4) und drei erneuten PBS-Waschschritten für jeweils 10 min. Anschließend fand zum Blocken unspezifischer Bindungen eine Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer für 1,5 - 2 h bei 65°C statt, gefolgt von der eigentlichen Hybridisierung mit der CNGA3-Antisense- bzw. Sense-Sonde ebenfalls in

Hybridisierungspuffer über zwei Nächte bei 65°C. Die Sonden wurden vor der Gabe auf die Gewebeschnitte für 10 min bei 80°C denaturiert und in einer Konzentration von 600 ng/µl eingesetzt. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschritte, um ungebundene und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen: 1 h in 0,2 x SSC bei 65°C, 30 min in 0,2 x SSC bei 65°C, 10 min in 0,2x SSC bei RT und 10 min in PBS bei RT. Anschließend wurde für 1 - 2 h in 1 % Blocking reagent (Roche, in Maleinsäurepuffer, pH 7,5) geblockt, um eine Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Detektion erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden:

a) In situ-Hybridisierung ohne anschließende Immunhistochemie (Durchlichtfärbung)

Über Nacht und bei 4°C erfolgte die Inkubation mit einem an die Alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:1000, Roche) in 1 % Blocking reagent. Nach der Antikörper-Inkubation wurde 3 x 15 min in PBS, 1 x 15 min in PBSTween (0,1 % Tween 20 in PBS) und 2 x 10 min in Alkalische Phosphatase-Puffer gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit BM Purple (Roche), einem Substrat der Alkalischen Phosphatase, lichtgeschützt und bei RT, bis sich bei den mit der Antisense-Sonde inkubierten Schnitten eine klare Blaufärbung des Gewebes zeigte. Die Inkubation dauerte zwischen 4 und 11 h. Die Färbung wurde durch zweimaliges Waschen für jeweils 10 min in PBSTween und dreimaligem Waschen für 5 min in PBS gestoppt, und die Gewebeschnitte mit Fluoromount-G eingedeckt.

b) In situ-Hybridisierung mit anschließender Immunhistochemie (Fluoreszenzfärbung)

Ebenfalls über Nacht und bei 4°C erfolgte die Inkubation mit einem an Biotin-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:500, Abcam) in 1 % Blocking reagent (in Maleinsäurepuffer, pH 7,5). Nach der Antikörper-Inkubation wurde 3 x 10 min in PBS und 1 x 10 min in 0,1 % PBSTween gewaschen und die Gewebeschnitte anschließend mit HRP-konjugiertem Streptavidin (1:100 in PBS, TSA Cyanine 3 System) für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min in PBS erfolgte die Inkubation mit dem HRP-Substrat Tyramid (1:100 in Amplification Diluent, TSA Cyanine 3 System) für 3 - 10 min bei RT und unter Lichtausschluss. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte unter Mikroskopkontrolle und wurde durch Waschen in PBS abgestoppt. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt.

Die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper erfolgte in 0,1 % PBSTween über 3 Nächte bei 4°C. Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Primärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
GAD 65/67	Kaninchen	1:250	Millipore
GFAP	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich
Iba1	Kaninchen	1:250	Wako
NeuN	Maus	1:500	Millipore
NO-GC β1	Kaninchen	1:100	Prof. Friebe, Würzburg

Tabelle 6. In der an die in situ-Hybridisierung angeschlossenen immunhistochemischen Färbung eingesetzte Primärantikörper.

Es folgte ein erneuter Waschschrift für 3 x 5 min in PBS. Da Tyramid in der In situ-Hybridisierung ein rot-fluoreszierendes Signal an der Sondenbindestelle erzeugt, erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Spezies-spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörpern für 2 h in PBS bei RT. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS wurden die Gewebeschnitte in Fluoromount-G eingedeckt.

Sekundärantikörper	Host	Konzentration	Hersteller
Anti-Kaninchen-AF488	Ziege	1:800	Invitrogen
Anti-Maus-AF488	Ziege	1:800	Invitrogen

Tabelle 7. Zur Detektion der Primärantikörper in der Immunhistochemie eingesetzte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper.

<u>Hybridisierungspuffer</u>	50 % 5 x 5 x 500 µg/ml 250 µg/ml	Formamid SSC Denhardt's herring sperm DNA yeast tRNA RNase-freies Wasser
<u>Maleinsäurepuffer</u>	0,12 M 0,15 M ad	Maleinsäure NaCl 500 ml Millipore-H ₂ O Einstellen auf pH 7,5 mit NaOH
<u>20 x SSC</u>	3 M 0,3 M ad	NaCl Trinatrium-Citrat · 2 H ₂ O 1000 ml Millipore-H ₂ O Einstellen auf pH 7,0 mit HCl

<u>Alkalische Phosphatase-Puffer</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
	0,12 %	Levamisol
	0,2 %	Tween 20
<u>20x PBS</u>	200 g	NaCl
	5 g	KCl
	35,4 g	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	5 g	KH ₂ PO ₄
	ad	1000 ml Millipore-H ₂ O

Alle Puffer, mit Ausnahme des Hybridisierungspuffers, wurden autoklaviert oder sterilfiltriert, um RNase-freie Bedingungen zu schaffen.

2.5.3. Detektion

Bilder der In situ-Hybridisierung wurden, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, mit einem Axio Observer.Z1-Mikroskop aufgenommen. BM Purple-gefärbte Schnitte wurden unter Durchlicht aufgenommen.

2.6. RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) kann in vitro die Transkription von Genen nachgewiesen werden. Hierzu wird aus der zu untersuchenden RNA mittels einer Reversen Transkriptase-Reaktion zunächst eine cDNA (komplementäre DNA) hergestellt und diese dann als Template für eine PCR verwendet. Das Template wird in der PCR mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), spezifischen Primerpaaren, den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten und in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen in mehreren Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation exponentiell amplifiziert.

2.6.1. Gewebepreparation

Neben Mäusen ohne Behandlung wurde einigen Mäusen als inflammatorischer Stimulus 15 µl Zymosan A (10 mg/ml in PBS, pH 7,4) subkutan in eine Hinterpfote injiziert. Die Mäuse wurden durch CO₂-Begasung getötet, durch Punktion des Herzens entblutet und anschließend das Lumbalmark (L4 - L6), die Spinalganglien (L1 - L6) und die Augen entnommen. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur

Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Das Rückenmarksgewebe wurde mit Hilfe eines Mixer Mill MM 400 (Retsch) homogenisiert und die RNA mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Durch Inkubation mit DNaseI (Qiagen) konnte störende DNA eliminiert werden.

Die RNA aus den Spinalganglien und den Retinae wurde mit dem Tri-Reagenz und Chloroform nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert. Die Retinae wurden vor der Aufarbeitung aus beiden Augen präpariert und ebenso wie die Spinalganglien mit Hilfe eines Handhomogenisators in 200 µl Tri-Reagenz unter Eiskühlung homogenisiert. Nach einer weiteren Zugabe von 200 µl Tri-Reagenz fand eine Inkubation für 10 min bei RT statt. Nach Zugabe von 80 µl Chloroform, Mischen und einer erneuten 10minütigen Inkubation bei RT wurde für 15 min bei 12200 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte eine Phasenauffrennung beobachtet werden: in der oberen, wässrigen Phase war die RNA angereichert, während sich Proteine in der unteren Phenol-Phase und die DNA sich in der Interphase befand. Die RNA-enhaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und durch Zugabe von 200 µl Isopropanol in einer 10minütigen Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation bei 12200 g für 8 min und bei 4°C gefällt. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 250 µl 75 %igem Ethanol gewaschen, anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf) bei 30°C getrocknet und in 15 µl RNase-freiem Wasser (Nuclease-free water, Qiagen) resuspendiert.

Für die Real-time quantitative PCR wurden die Spinalganglien mit Hilfe des Mixer Mill MM 400 homogenisiert und die gesamte RNA mit dem RNAqueous-Micro Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers isoliert. Durch Inkubation mit DNaseI konnte potentiell störende DNA erneut eliminiert werden. Schließlich wurde mit einem NanoDrop-Spektralphotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific) die RNA-Konzentration bestimmt.

<u>Tri-Reagenz</u>	800 mM	Guanidiniumthiocyanat
	400 mM	Ammoniumthiocyanat
	0,1 mM	Natriumacetat
	5 %	Glycerin
	ad	1000 ml Millipore-H ₂ O
		Einstellen auf pH 5 mit HAc
	1 kg	geschmolzenes Phenol
	ad	2,6 l Millipore-H ₂ O

2.6.2. Konventionelle RT-PCR

Von der aus dem Rückenmark, den Spinalganglien und der Retina isolierten RNA wurden 0,5 µg mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) und den Primern 5'-tgc acg act ctc ccg gaa gta ca-3' und 5'-acc gga taa ccc gag tct cca ag-3' (BioSpring) nach Anleitung des Herstellers

revers transkribiert und amplifiziert. Das gebildete Fragment besaß eine Länge von 284 bp, welches dem Sequenzbereich 1172 - 1455 der CNGA3-mRNA (Accession Nummer: NM_009918) entspricht. Das PCR-Programm lautete wie folgt:

35 Zyklen mit:

- 30 min bei 50°C (reverse Transkription)
- 15 min bei 95°C (PCR-Aktivierung)
- 50 s bei 94°C (Denaturierung)
- 45 s bei 57,5°C (Annealing)
- 45 s bei 72°C (Elongation)
- 10 min bei 72°C (finale Elongation)

2.6.3. Real-time quantitative PCR

Die Real-time quantitative PCR (RTq-PCR) ist eine Weiterentwicklung der RT-PCR, die eine genauere Quantifizierung der RNA ermöglicht. Hierbei wurde die TaqMan-Methode verwendet, bei der die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen erfolgt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Für jedes untersuchte Gen wurde ein kommerziell erhältlicher 20 x TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) verwendet, welcher aus genspezifischen Primern und einer FAM-markierten MGB-Sonde besteht. Diese TaqMan-Sonde wiederum ist ein kurzes Oligonukleotid, welches an seinem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) FAM, der als Reporter fungiert, und an seinem 3'-Ende den nicht-fluoreszierenden Quencher-Farbstoff (NFQ) sowie den MGB-Teil (Minor groove binder) gebunden hat. Solange die Sonde intakt ist, minimiert das Quencher-Fluorochrom die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms. Bindet die Sonde aber spezifisch innerhalb des durch die genspezifischen Primer festgelegten PCR-Produktes an ihre komplementäre Sequenz, können durch die *Taq*-Polymerase Nukleotide an die Primer gehängt werden. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird zudem die TaqMan-Sonde von der DNA gelöst und Quencher und Reporter voneinander separiert (Abbildung 11). Die nun vom Reporter-Fluorochrom emittierte Energie kann gemessen werden und ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Das zugrundeliegende Prinzip ist das des Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanzenergietransfers (FRET). Der Vorteil eines nicht-fluoreszierenden Quenchers ist ein reduziertes Hintergrundsignal, welches eine präzisere Quantifizierung ermöglicht. Der MGB-Teil der Sonde stabilisiert die Hybridisierung der Sonde an ihre komplementäre Sequenz und erhöht die Schmelztemperatur.

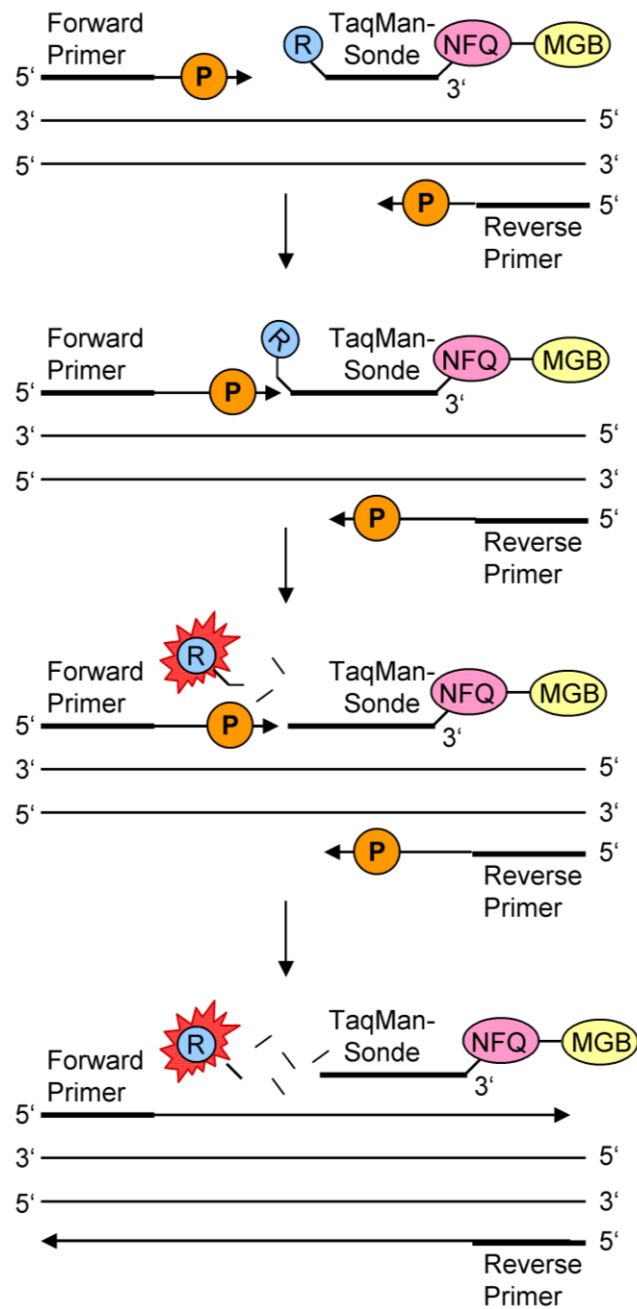


Abbildung 11. Prinzip der Real-time quantitativen PCR mit einer TaqMan-Sonde. MGB: minor groove binder, NFQ: non-fluorescent quencher, P: *Taq*-Polymerase, R: Reporter. Adaptiert aus TaqMan Gene Expression Assays Protocol, Applied Biosystems (2008).

200 ng der gesamten RNA, isoliert aus Rückenmark, Spinalganglien oder Retina, wurden für die Synthese der cDNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte mit dem Verso cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) wie folgt:

<u>20 µl-Ansatz</u>	200 ng	RNA
	4 µl	5 x Synthesis Buffer
	2 µl	dNTP-Mix
	1 µl	Hexamer-Primer
	1 µl	Verso Enzyme-Mix
	1 µl	RT-Enhancer
	ad 20 µl	RNase-freies H ₂ O

mit folgendem PCR-Programm:

30 min bei 42°C (cDNA-Synthese)
2 min bei 95°C (Inaktivierung)

Die cDNA konnte bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Folgende Tabelle listet alle verwendeten TaqMan Gene Expression Assays auf:

Gen	Accession Nummer	Assay ID	Größe des PCR-Fragments
CNGA1	NM_007723	Mm00833234_m1	76 bp
CNGA2	NM_007724	Mm00432614_m1	85 bp
CNGA3	NM_009918	Mm00802288_m1	69 bp
CNGA4	NM_001033317	Mm01278645_m1	96 bp
CNGB1	BC045114 (a)	Mm01249077_m1	76 bp
	BC046523 (b)		
CNGB3	NM_013927	Mm00489232_m1	101 bp
18S rRNA	X03205	4310893E	187 bp
β-Aktin	NM_007393.3	Mm00607939_s1	115 bp
GAPDH	NM_008084.2	Mm99999915_g1	107 bp

Tabelle 8. In der Real-time quantitativen PCR verwendete TaqMan Gene Expression Assays.

Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

<u>10 µl-Ansatz</u>	0,5 µl	20 x TaqMan Gene Expression Assay
	3,5 µl	RNase-freies H ₂ O
	1 µl	cDNA
	5 µl	2 x TaqMan Master-Mix

Jede cDNA wurde in einer Zwei- bzw. Dreifachbestimmung gemessen. In die sogenannte ‚no template control‘ wurde Wasser anstelle der cDNA pipettiert, um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen. Als endogene Kontrolle diente die 18S ribosomale RNA. Um in diesen Messungen ebenfalls eine Linearität zu erhalten, wurde die cDNA hierfür 1:10 verdünnt. Als weitere endogene Kontrollen wurden β-Aktin und GAPDH eingesetzt.

<u>10 µl-Ansatz</u>	0,52 µl	18S rRNA
	3,48 µl	RNase-freies H ₂ O
	1 µl	cDNA (1:10)
	5 µl	2 x TaqMan Master-Mix

Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die Real-time quantitative PCR mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet:

	10 min bei 95°C (PCR-Aktivierung)
40 Zyklen mit:	15 s bei 95°C (Denaturierung)
	1 min bei 60°C (Amplifizierung)

2.6.3.1. Quantifizierung der Real-time quantitativen PCR

Die relative Quantifizierung der Expression der CNG-Kanaluntereinheiten erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Bei Experimenten mit Rückenmark wurde als endogene Kontrolle die Expression der 18S ribosomalen RNA verwendet. Diese wird benötigt, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Die Expression der 18S ribosomalen RNA verhielt sich unter allen Bedingungen konstant, wie Kontrollexperimente mit den ‚Housekeeping Genes‘ β-Aktin und GAPDH zeigten. Als endogene Kontrolle bei Experimenten mit Spinalganglien dienten β-Aktin und GAPDH.

Zur Berechnung der in den Proben vorhandenen relativen Mengen der mRNA wurde die Amplifikation des Zielgens (CNG-Kanal-Untereinheiten) und des Referenzgens (endogene Kontrolle) gleichzeitig gemessen. Der Zeitpunkt der exponentiellen Phase der PCR wird

gekennzeichnet durch den C_T -Wert (Cycle threshold), der den Zyklus beschreibt, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. In der semi-logarithmischen Darstellung der Amplifikation ergibt sich der C_T -Wert aus dem Schnittpunkt des Fluoreszenzsignals mit einer in die lineare Phase der exponentiellen Amplifikation gelegten horizontalen Linie („Threshold“) (Abbildung 12). An den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale verschiedener Proben mit der horizontalen Linie liegt die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche aktuelle DNA-Menge vor. Die Schnittpunkte stellen die C_T -Werte der unterschiedlichen Proben dar, die vom Gerät ausgegeben werden. Die Berechnung der Expression des Zielgens im Verhältnis zu der des Referenzgens erfolgte nach folgenden Formeln:

Normierung auf die endogene Kontrolle:

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

Diese Berechnung wird durchgeführt für alle behandelten und unbehandelten Proben:

$$(a) \Delta C_T(\text{behandelte Probe}) - \Delta C_T(\text{unbehandelte Probe}) = \Delta \Delta C_T$$

Allgemein gilt während der logarithmischen Phase der PCR-Amplifizierung:

$$X_n = X_0 \cdot E^n$$

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

An den Schnittpunkten zweier Fluoreszenzsignale mit der horizontalen Linie gilt:

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

Beim Vergleich der Fluoreszenzsignale einer behandelten Probe mit einer unbehandelten Probe gilt entsprechend für die Schnittpunkte:

$$\begin{aligned} X_{n(\text{behandelte Probe})} &= X_{n(\text{unbehandelte Probe})} \\ \rightarrow X_{0(\text{behandelte Probe})} \cdot E^{n(\text{behandelte Probe})} &= X_{0(\text{unbehandelte Probe})} \cdot E^{n(\text{unbehandelte Probe})} \\ \rightarrow X_{0(\text{behandelte Probe})} / X_{0(\text{unbehandelte Probe})} &= E^{n(\text{unbehandelte Probe})} / E^{n(\text{behandelte Probe})} \\ &= E^{n(\text{unbehandelte Probe}) - n(\text{behandelte Probe})} \end{aligned}$$

Die relative DNA-Ausgangsmenge eines Zielgens Z (CNG-Kanal-Untereinheiten) einer Probe im Vergleich zu einem Referenzgen R (endogene Kontrolle) lässt sich dann aus der Zykluszahl n am Schnittpunkt mit der horizontalen Linie wie folgt berechnen:

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

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

Wenn allgemein die Effizienz $E = 2$ (maximale Effizienz) gesetzt wird, gilt:

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

Einsetzen der C_T -Werte (aus Formel (a)) in die hergeleitete Formel ergibt:

$$Z / R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Diese Formel gibt die n -fache Expression des Zielgens nach einer bestimmten Behandlung bezogen auf das Referenzgen wider.

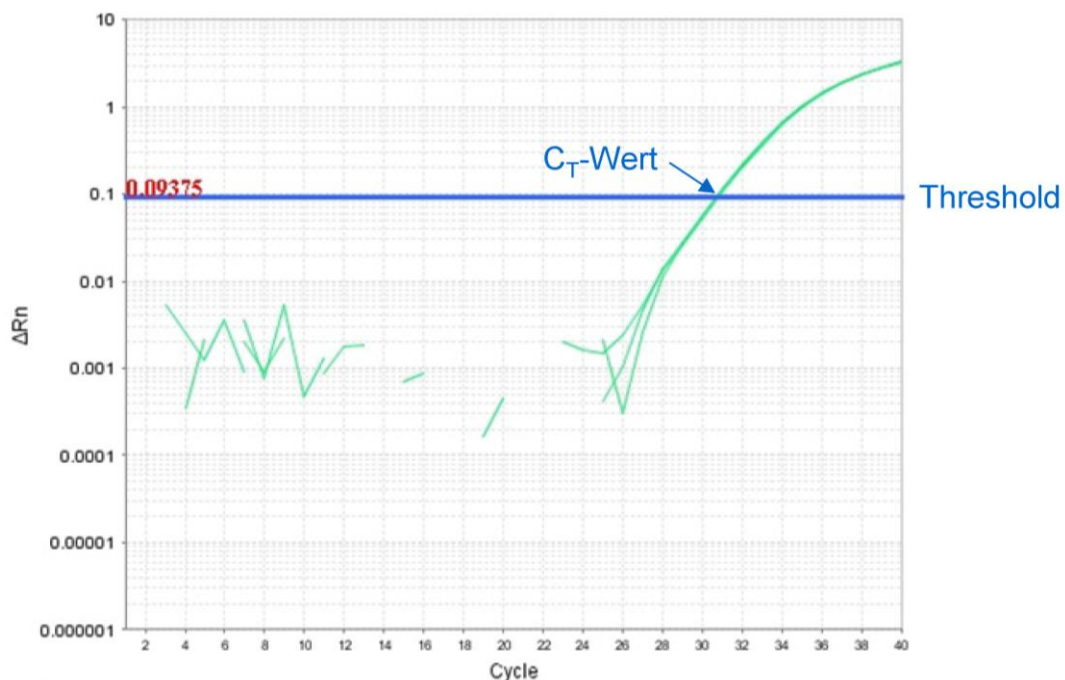


Abbildung 12. Quantifizierung der RTq-PCR. Gezeigt ist das Fluoreszenzsignal von CNGA3, gemessen in Dreifachbestimmung in der Retina. Der Schnittpunkt des Fluoreszenzsignals mit dem Threshold gibt den C_T -Wert wider, den man auf der x-Achse ablesen kann. Die Darstellung erfolgte semi-logarithmisch.

2.6.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikation wurden die RT-PCR-Produkte in einem 2 %igen Agarosegel bzw. im Falle der RTq-PCR-Produkte in einem 3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde Low Melting Point (LMP)-Agarose zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente eingesetzt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TBE-Puffer gelöst und das Gel in eine Gelkammer (Bio-Rad) gegossen. Nach vollständigem Erhärten wurden die PCR-Produkte mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Ein DNA-Marker (peqlab) diente später zum Größenabgleich des amplifizierten Fragments. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 60 bzw. 90 min. Das Gel wurde für 15 min in einem Ethidiumbromidbad (4 µg/ml) inkubiert und anschließend mittels eines UV-Meters (Gel Doc Geldokumentationssystem und QuantityOne-Software, Bio-Rad) detektiert.

<u>10 x TBE-Puffer</u>	108 g	Trizma Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	ad	1000 ml VE-H ₂ O
<u>6 x DNA-Ladepuffer</u>	30 %	Glycerin
	0,25 %	Bromphenolblau

2.7. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS Statistics 17.0 für Windows XP durchgeführt. Mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test wurde untersucht, ob die Daten innerhalb einer Gruppe einer Normalverteilung folgen. Normal verteilte Daten wurden mit dem Student's t-Test oder der einfaktoriellen ANOVA, gefolgt vom Fisher Post-hoc Test analysiert. Diese Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Latenzzeiten im Rotarod Test wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht und sind dargestellt als Median und Interquartilsabstand. In allen statistischen Tests wurde ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

2.8. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
ACSF	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ammoniumthiocyanat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Blocking reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Carbogen	Linde Gas, Pullach
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
CO ₂ (Kohlendioxid)	Linde Gas, Pullach
Denhardt's Solution Lyophilized Powder	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Deoxyribonucleic acid from herring sperm	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Formalin (10 % Formaldehyd)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Isofluran	Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Lithiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Low Melting Point-Agarose	Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Maleinsäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
Normal goat serum	Invitrogen, Camarillo, CA, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS ohne Calcium & Magnesium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
RNaseZap	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ribonucleic acid, transfer from baker's yeast	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Sucrose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
2 x TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tetramisol-Hydrochlorid (Levamisol)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Trinatrium-Citrat · 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zymosan A	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

3. Ergebnisse

3.1. Expression der CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark

Bis heute wurden sechs CNG-Kanal-Untereinheiten (CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4, CNGB1 und CNGB3) in verschiedenen Geweben von Säugetieren identifiziert. Um festzustellen, ob und welche CNG-Kanal-Untereinheiten in ‚schmerzrelevantem‘ Gewebe basal exprimiert werden, wurde eine Real-time quantitative PCR mit Rückenmarksgewebe von C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Wie in Abbildung 13 A gezeigt, konnten fünf CNG-Kanal-Untereinheiten (CNGA2, CNGA3, CNGA4, CNGB1 und CNGB3) auf mRNA-Ebene im Rückenmark detektiert werden.

Um ‚schmerzrelevante‘ CNG-Kanal-Untereinheiten identifizieren zu können, wurde die Expression aller im Rückenmark vorhandenen Untereinheiten nach Injektion des proinflammatorisch wirkenden Hefeextraktes Zymosan A in eine Hinterpfote zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Nach diesem inflammatorischen Stimulus trat nur bei der CNGA3-Untereinheit eine Regulation der RNA-Expression im Rückenmark auf (Abbildung 13 B). 4 h und 8 h nach Zymosaningjektion wurde CNGA3 signifikant stärker exprimiert als in unstimuliertem Gewebe, wobei das Maximum 8 h nach Injektion erreicht war. 24 h nach Zymosaningjektion nahm die CNGA3-Expression wieder ab. Die übrigen CNG-Kanal-Untereinheiten wiesen keine Regulation nach Zymosaningjektion auf. Zur Überprüfung wurden sämtliche PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Es konnte jeweils ein PCR-Produkt auf der erwarteten Höhe ausgemacht werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass insbesondere CNGA3 in die Schmerzverarbeitung im Rückenmark involviert sein könnte.

Es wurde ebenfalls die Expression der CNGA3-Untereinheit im Rückenmark auf Proteinebene untersucht. Angewandte Techniken waren zum einen der Western Blot mit unterschiedlichen Aufarbeitungsprotokollen des Gewebes sowie unterschiedlichen Antikörpern zur Detektion. Zum anderen kam die Immunhistochemie mit unterschiedlich fixierten Gewebeschnitten, kombiniert mit dem sogenannten ‚Antigen-Retrieval‘ zur Demaskierung des eventuell im Rahmen der PFA-Fixierung veränderten Epitops (in 0,01 M Citratpuffer, pH 6 in der Mikrowelle; in 0,01 M Citratpuffer, pH 6 bei 65°C im Wasserbad; mit 50 % Ethanol) und ebenfalls mehreren Antikörpern zur Detektion zum Einsatz. Trotz des Einsatzes dieser Methoden war es jedoch nicht möglich, das CNGA3-Protein im Rückenmark zu detektieren (siehe Diskussion).

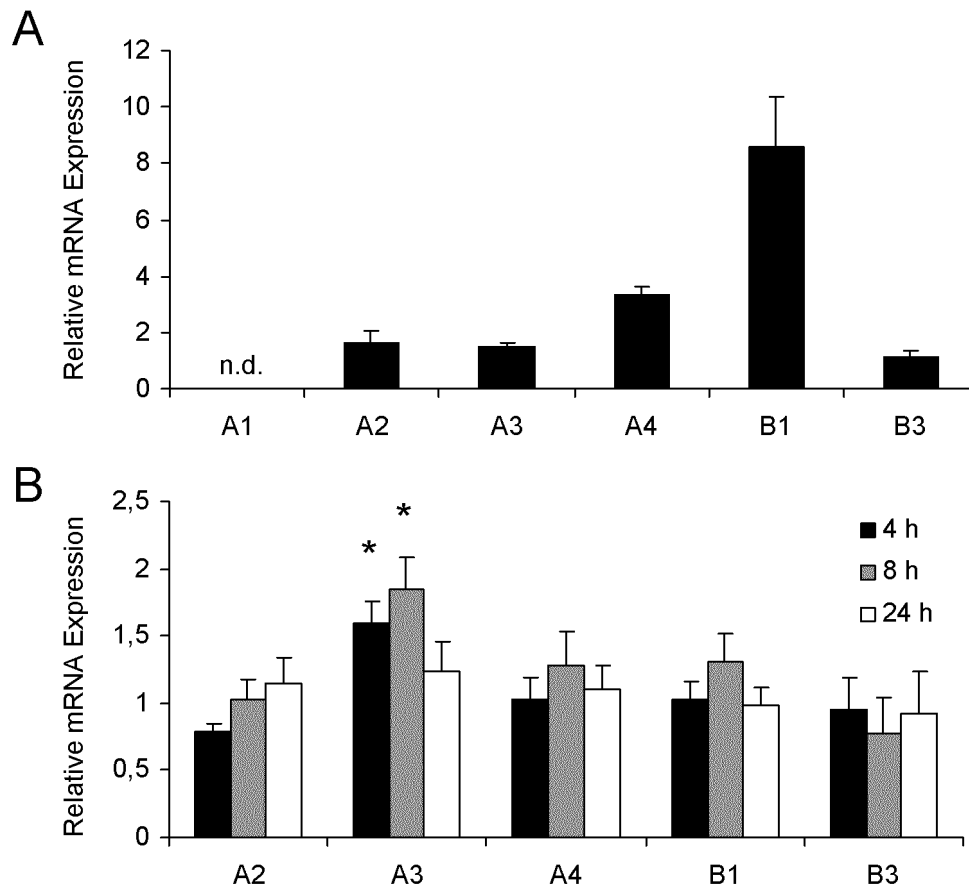


Abbildung 13. mRNA-Expression von CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark der Maus basal und nach einem nozizeptiven Stimulus. A. Basale relative mRNA-Expression aller bekannten CNG-Kanal-Untereinheiten. Die Expression wurde berechnet als relative Expression bezogen auf die ubiquitär vorhandene 18S rRNA; $n = 5$. n.d.: nicht detektiert. B. Relative mRNA-Expression der im Rückenmark vorhandenen CNG-Kanal-Untereinheiten nach nozizeptiver Reizung der Hinterpfote mittels Zymosaninjektion. Die gewählten Zeitpunkte waren 4 h, 8 h und 24 h nach Injektion von Zymosan. Als Bezug diente hier die relative Expression in unstimuliertem Rückenmark (auf 1 gesetzt); * $p < 0,05$, $n = 5 - 6$.

3.2. Gewebeexpression der Untereinheit CNGA3

3.2.1. Vergleich der Expression von CNGA3 in Rückenmark, Spinalganglien und Retina

Zur Abschätzung der relativen Expression von CNGA3 im Gewebe wurde zunächst mittels konventioneller RT-PCR die Expression im Rückenmark, in den Spinalganglien und in der Retina miteinander verglichen. Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte die CNGA3-mRNA in allen drei untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wobei die Expression, wie erwartet, am stärksten in der Retina ausfiel. Im Rückenmark war die Expression stärker als in den Spinalganglien ausgeprägt. In den entsprechenden Geweben einer CNGA3^{-/-}-Maus waren

keine Banden erkennbar. Dieses Primerpaar war also in der Lage, zwischen Wildtyp- und CNGA3^{-/-}-Gewebe zu unterscheiden und bestätigte somit, dass es sich bei den beobachteten Banden in den Wildtyp-Geweben tatsächlich um CNGA3 handelte.

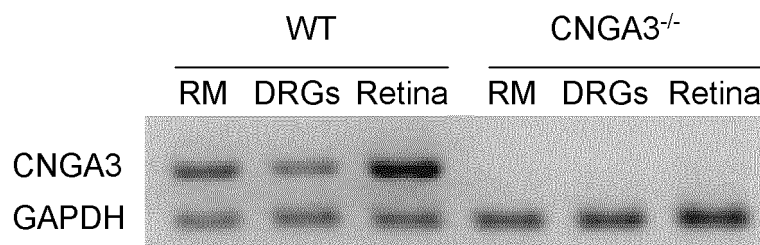


Abbildung 14. CNGA3-mRNA-Expression im Rückenmark, in den Spinalganglien und in der Retina von CNGA3^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. Die Größe der PCR-Produkte betrug, wie erwartet, 284 bp (CNGA3) bzw. 223 bp (GAPDH). DRGs: Spinalganglien, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, RM: Rückenmark, WT: Wildtyp

Mittels Real-time quantitativer PCR wurde anschließend die relative Expression von CNGA3 im Rückenmark, in den Spinalganglien und in der Retina quantifiziert (Abbildung 15).

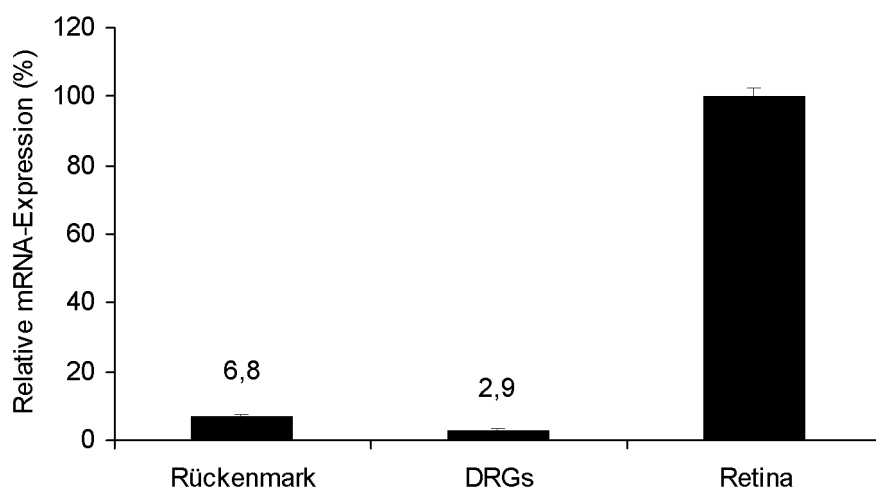


Abbildung 15. Quantifizierung der CNGA3-mRNA-Expression in Rückenmark, Spinalganglien und Retina von C57BL/6-Mäusen. Die Real-time quantitative PCR erfolgte mit einem Taqman Gene Expression Assay. Die CNGA3-Expression in der Retina wurde auf 100 % gesetzt; n = 4 Tiere.

3.2.2. Lokalisation von CNGA3 im Rückenmark

Mittels In situ-Hybridisierung wurde die Lokalisation von CNGA3 im Rückenmark genauer untersucht. Mit einer CNGA3-mRNA komplementären Digoxigenin-markierten RNA-Sonde (Antisense-Sonde) wurde CNGA3 in der grauen Substanz des Rückenmarks mit einer

deutlichen Betonung des Hinterhorns detektiert (Abbildung 16 A). Mit einer an einen anderen Sequenzbereich der CNGA3-mRNA bindenden Sonde wurde das gleiche Expressionsmuster, wenn auch etwas schwächer gefärbt, ersichtlich (Abbildung 16 C). Als Kontrolle für die spezifische Bindung an die CNGA3-mRNA diente in beiden Fällen eine Sense-Sonde, die dieselbe Sequenz wie die CNGA3-mRNA aufwies, und daher nicht an diese binden konnte (Abbildung 16 B und D).

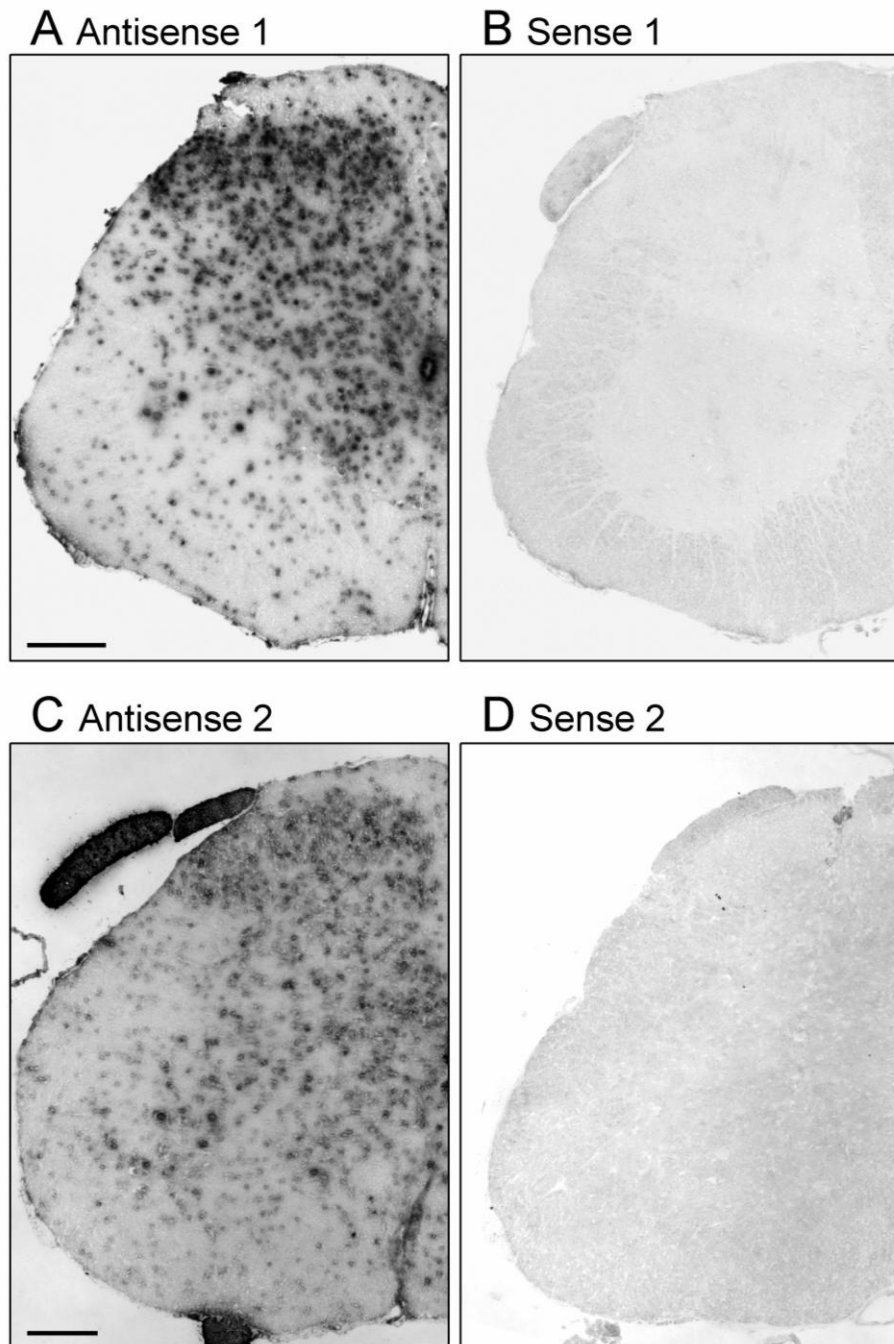


Abbildung 16. In situ-Hybridisierung mit zwei verschiedenen Digoxigenin-markierten CNGA3-Sonden im Rückenmark der Maus. Die Detektion erfolgte mit einem Substrat der Alkalischen Phosphatase (BM Purple). A, C. Färbung mit den Antisense-Sonden. B, D. Kontrollfärbung mit den Sense-Sonden. Maßstab: 200 µm

Mit Hilfe einer der In situ-Hybridisierung nachgeschalteten Immunhistochemie mit zelltypspezifischen Markern wurde die CNGA3-Expression im Hinterhorn näher charakterisiert. Hierzu wurde die in der In situ-Hybridisierung gebundene Sonde mit einem rot-fluoreszierenden Farbstoff (Tyramid) detektiert. Interessanterweise konnte mit dem neuronalen Marker NeuN, welcher an die Kernmembran bindet, in vielen Neuronen eine Kolokalisation mit der CNGA3-mRNA ausgemacht werden (Abbildung 17 A - C). Neuronen, die CNGA3 exprimieren, zeigen in Abbildung 17 C eine gelbliche Färbung. In der Doppelfärbung mit GAD 65/67, einem Marker für inhibitorische Neurone, lag die CNGA3-mRNA oft in der Nähe dieses inhibitorischen Proteins vor (Abbildung 17 D - F). CNGA3 scheint also von inhibitorischen Neuronen exprimiert zu werden. Eine Kolokalisation der CNGA3-mRNA mit GFAP, einem Marker für Astrozyten (Abbildung 17 G - I) und Iba1, einem Marker für Mikroglia (Abbildung 17 J - L) konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass CNGA3 im Rückenmark der Maus ausschließlich neuronal mit einer deutlichen Betonung des Hinterhorns exprimiert wird. Möglicherweise sind die CNGA3-exprimierenden Neurone inhibitorische Neurone.

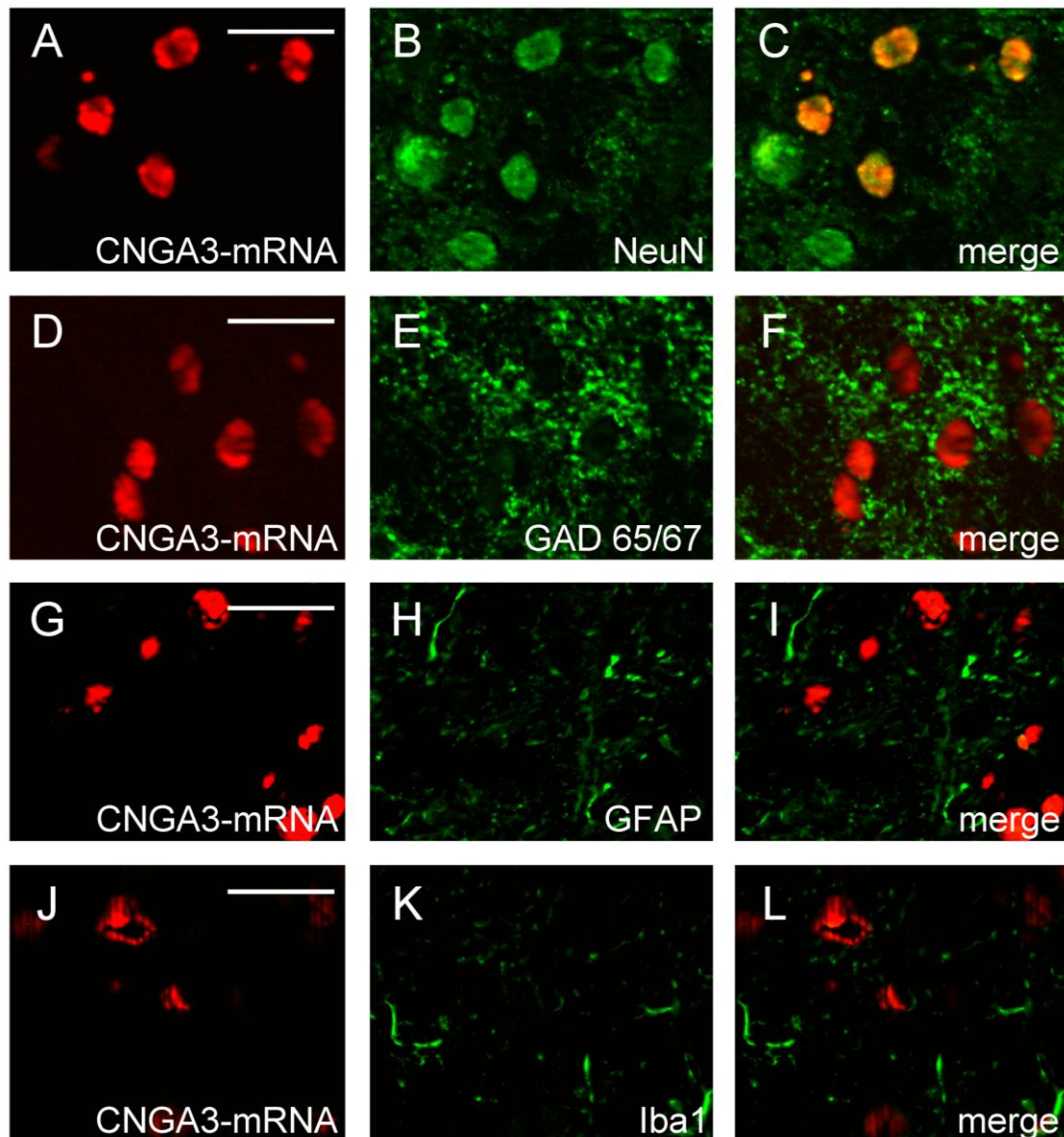


Abbildung 17. In situ-Hybridisierung der CNGA3-mRNA und nachgeschaltete Immunhistochemie im Hinterhorn des Rückenmarks. A, D, G, J. In situ-Hybridisierung mit der CNGA3-Antisense-Sonde. Die Färbung wurde mit Tyramid, einem rot-fluoreszierenden Substrat der Horseradish peroxidase, erzeugt. B, E, H, K. Immunhistochemie mit verschiedenen Markerproteinen und grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpern. C, F, I, L. Übereinanderlagerung der CNGA3-mRNA mit dem jeweiligen Markerprotein (merge). Eine Kolo-kalisation ist gelb dargestellt. Maßstab: 20 μ m

3.2.3. CNGA3-Expression in Spinalganglien nach nozizeptiver Stimulation

Da CNGA3 auch in Spinalganglien exprimiert wird (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15), wurde die Expression nach Injektion von Zymosan A in eine Hinterpfote mittels RTq-PCR untersucht. Die CNGA3-mRNA wurde 4 h, 8 h und 24 h nach Zymosaninjektion signifikant höher in den Spinalganglien exprimiert als in unstimuliertem Gewebe (Abbildung 18).

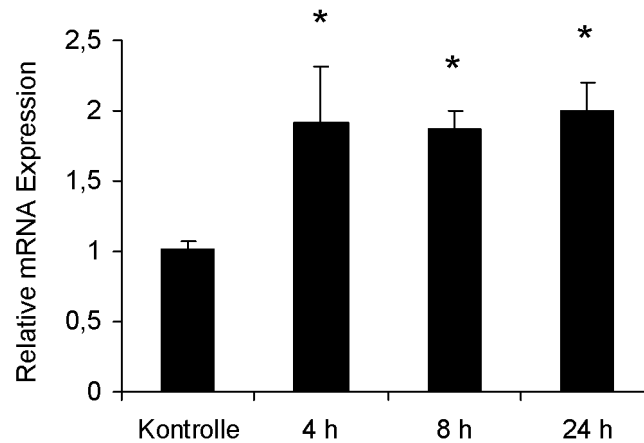


Abbildung 18. Relative mRNA-Expression der CNG-Kanal-Untereinheit CNGA3 in Spinalganglien von C57BL/6-Mäusen nach nozizeptiver Reizung der Hinterpfote mittels Zymosaninjektion. Die gewählten Zeitpunkte waren 4 h, 8 h und 24 h nach Injektion von Zymosan A. Als Bezug diente die relative Expression in unstimulierten Spinalganglien (Kontrolle, auf 1 gesetzt); * $p < 0,05$, $n = 5$.

3.2.4. Lokalisation von CNGA3 in Spinalganglien

Aufgrund der in der RTq-PCR ersichtlichen Expression von CNGA3 in den Spinalganglien, wurde mit diesem Gewebe ebenfalls eine In situ-Hybridisierung durchgeführt. Mit der Antisense-Sonde konnte die CNGA3-mRNA in den Spinalganglien ausschließlich nicht-neuronal nachgewiesen werden (Abbildung 19 A). Als Kontrolle diente erneut die Sense-Sonde, die nicht binden konnte und daher keine Färbung hervorbrachte (Abbildung 19 B). In einer der In situ-Hybridisierung nachgeschalteten Immunhistochemie mit der löslichen Guanylatzyklase (NO-GC) konnte deren Lokalisation in Satellitenzellen, welche die Neuronen umgeben, bestätigt werden (Abbildung 19 D). In der Doppelfärbung lag die CNGA3-mRNA häufig in der Nähe der NO-GC vor (Abbildung 19 E). Möglicherweise wird CNGA3 in den Spinalganglien ebenfalls in den Satellitenzellen exprimiert, jedoch ist auch eine Expression in weiteren nicht-neuronalen Strukturen denkbar.

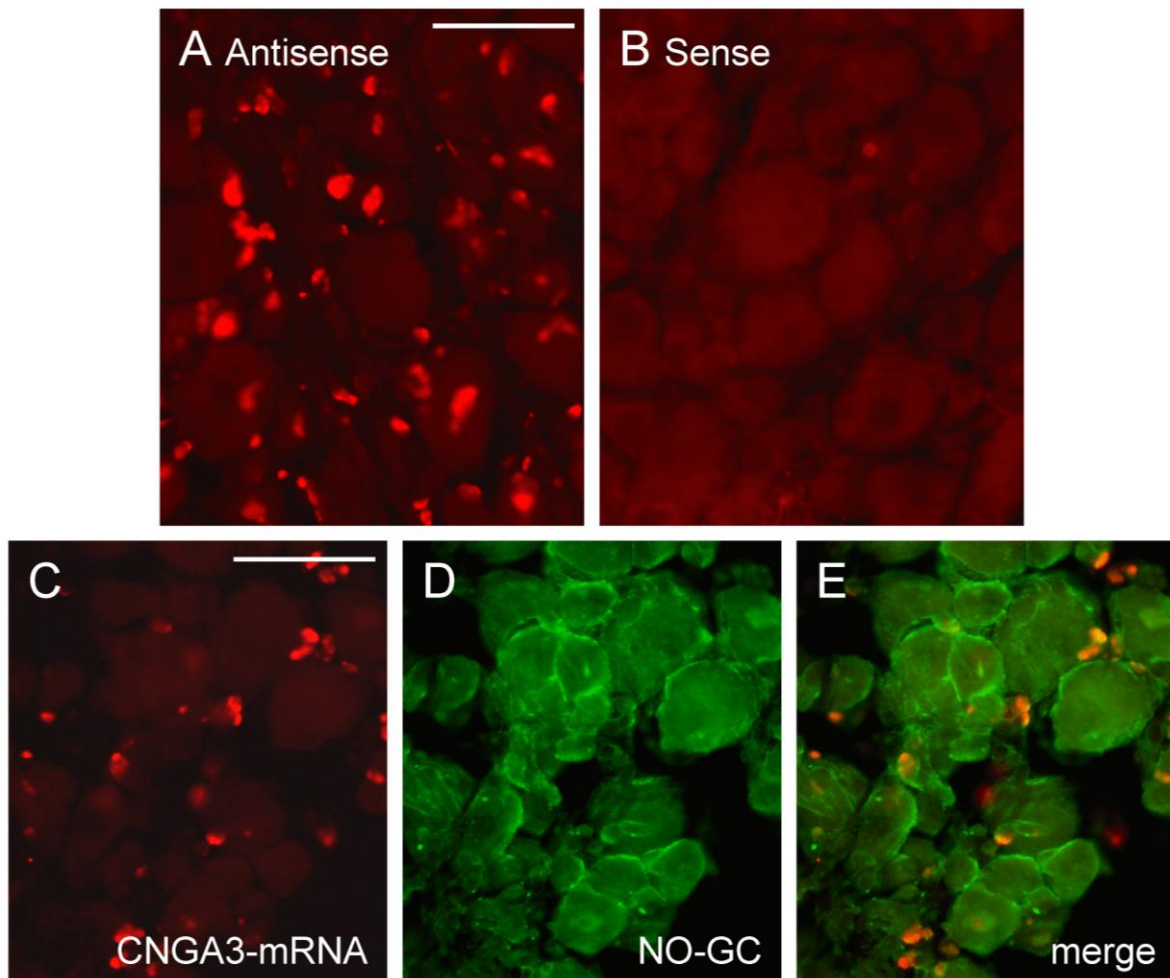


Abbildung 19. In situ-Hybridisierung in Spinalganglien der Maus. A, B. In situ-Hybridisierung mit einer Antisense- bzw. Sense-Sonde gegen CNGA3. Die Färbung wurde mit dem HRP-Substrat Tyramid erzeugt. C - E. In situ-Hybridisierung der CNGA3-mRNA mit nachgeschalteter Immunhistochemie gegen die NO-GC. D. Immunhistochemische Färbung der NO-GC mit einem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper. E. Übereinanderlagerung der CNGA3-mRNA und der NO-GC (merge). Maßstab: 50 µm

3.3. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen

Um die Bedeutung von CNGA3 für die Schmerzverarbeitung in vivo beurteilen zu können, wurde das Schmerzverhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute, inflammatorische und neuropathische Schmerzen charakterisiert. Homozygote CNGA3^{-/-}-Mäuse sind gesund, fertil, in ihrem Habitus nicht von den entsprechenden Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden und weisen eine normale Lebenserwartung auf (Biel et al., 1999). Aufgrund der Deletion im CNGA3-Gen zeigen diese Mäuse allerdings einen zunächst funktionellen und später auch strukturellen Verlust von Zapfen in der Retina. Daher ist das Farbsehen dieser Mäuse eingeschränkt (Biel et al., 1999).

3.3.1. Morphologie des Rückenmarks

Die Morphologie und Größe des Rückenmarks der *CNGA3*^{-/-}-Mäuse weisen verglichen mit Wildtyp-Mäusen keine Abnormalitäten auf (Abbildung 20). Ebenfalls ist die Verteilung von nozizeptiv thermorezeptiven und nozizeptiv mechanorezeptiven primär afferenten C-Fasern in Laminae I und II des Hinterhorns des *CNGA3*^{-/-}-Rückenmarks nicht verändert, wie in Abbildung 20 A und B anhand der Färbungen mit den C-Faser-Markern Substanz P und IB4 gezeigt. Auch die Verteilung der Neuronen und Astrozyten weist in beiden Genotypen keine Unterschiede auf, wie in Abbildung 20 C und D anhand der Färbungen mit den Markern NeuN und GFAP ersichtlich.

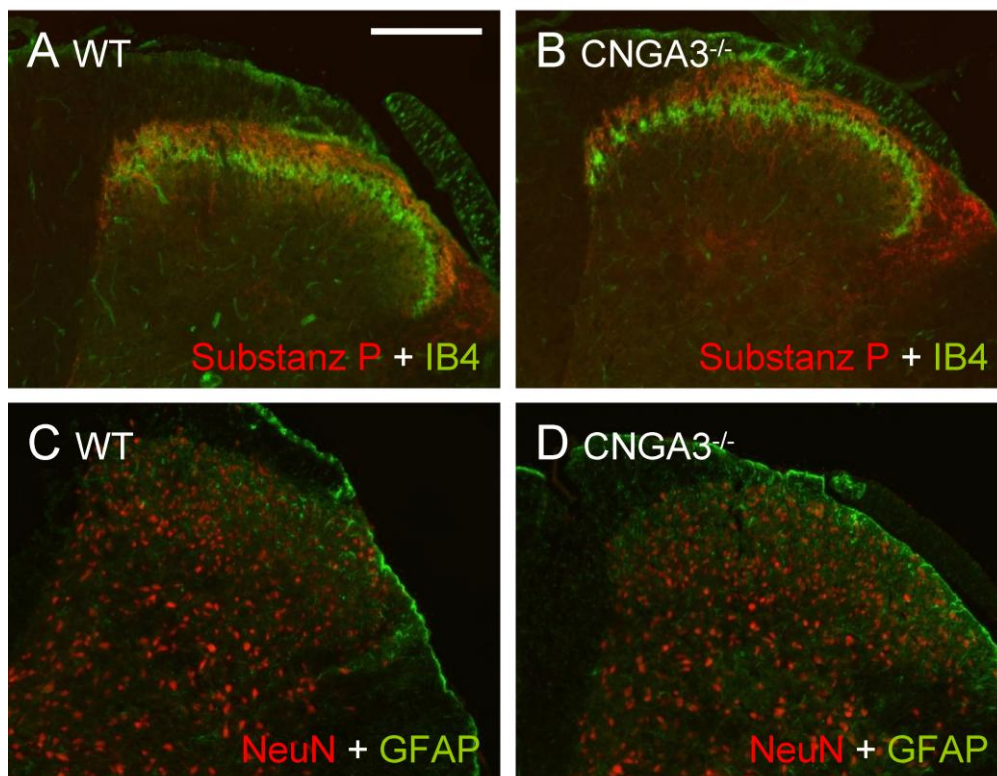


Abbildung 20. Immunhistochemie mit zelltypspezifischen Markern im Hinterhorn des Rückenmarks von *CNGA3*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. A, B. Immunhistochemie mit Substanz P, welches in peptidergen C-Faser-Terminals in Lamina I und der äußeren Lamina II exprimiert wird und IB4, das an nicht-peptiderge C-Faser-Terminals in der inneren Lamina II bindet. C, D. Immunhistochemie mit dem neuronalen Marker NeuN und GFAP, einem Marker für Astrozyten. Maßstab: 200 µm

3.3.2. Expression anderer CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark

Eine mögliche kompensatorische Hochregulation anderer CNG-Kanal-Untereinheiten im *CNGA3*^{-/-}-Rückenmark wurde ebenfalls untersucht. Es konnte aber festgestellt werden, dass

sich die relative mRNA-Expression aller anderen Untereinheiten im $CNGA3^{-/-}$ -Rückenmark nicht signifikant von der im entsprechenden Wildtyp-Gewebe unterschied (Abbildung 21).

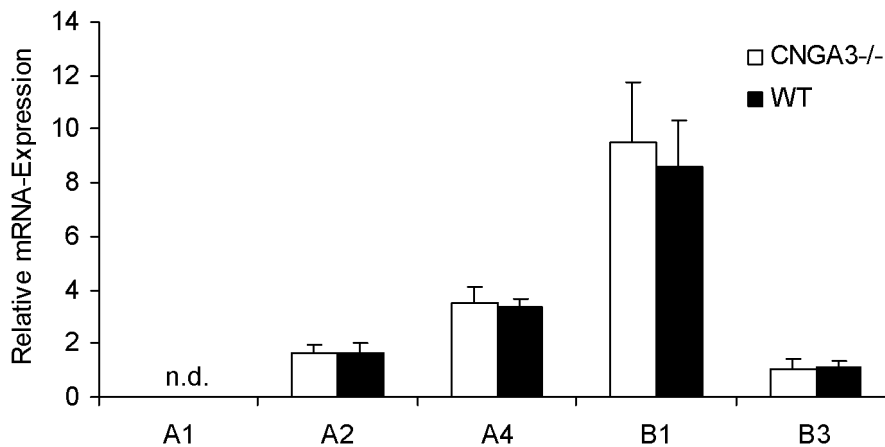


Abbildung 21. Relative mRNA-Expression der CNG-Kanal-Untereinheiten im Rückenmark von $CNGA3^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen. Die Expression wurde berechnet als relative Expression bezogen auf die ubiquitär vorhandene 18S rRNA; n = 5. n.d.: nicht detektiert

3.3.3. Motorische Koordination von $CNGA3^{-/-}$ -Mäusen

Voraussetzung für die Auswertung aller Verhaltensversuche ist eine uneingeschränkte Motorik der Tiere, da als Schmerzreaktion in allen Tests eine motorische Reaktion der Pfote gewertet wird. Daher wurde die motorische Koordination von $CNGA3^{-/-}$ -Mäusen im Rotarod-Test untersucht. $CNGA3^{-/-}$ -Mäuse zeigten keine motorischen Einschränkungen (Abbildung 22).

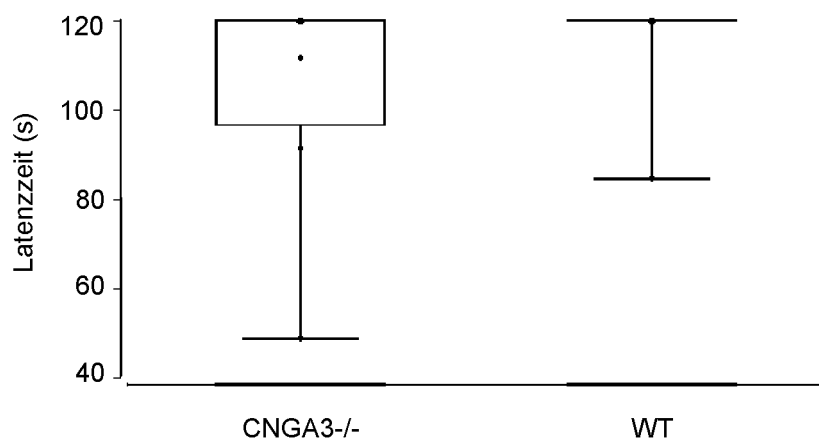


Abbildung 22. Rotarod-Test zur Untersuchung der motorischen Koordination von $CNGA3^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt ist der Median der Latenzzeit (mit dem Interquartilsabstand) bis zum Fallen der Maus von einem rotierenden Stab in Form eines Boxplots. Der Cutoff-Wert lag bei 120 s; n = 8.

3.3.4. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute Schmerzen

Zur Charakterisierung des akuten nozizeptiven Verhaltens von CNGA3^{-/-}-Mäusen wurde deren Reaktion in Modellen für akute thermische und akute mechanische Schmerzen getestet. Als Modelle wurden verwendet:

- Der Hotplate-Test als Modell für akute thermische Nozizeption, bei dem die Latenzzeit bis zum Auftreten einer Reaktion (Lecken oder Schütteln der Hinterpfoten oder Hochspringen) gemessen wurde. Die gewählten Temperaturen betragen 50°C, 52°C und 54°C (Abbildung 23 A).
- Der Tailflick-Test als zweites Modell für akute thermische Nozizeption, bei dem die Latenzzeit bis zum Wegziehen des Schwanzes von einer Wärmequelle gemessen wurde (Abbildung 23 B).
- Der Dynamic Plantar-Test als Modell für akute mechanische Nozizeption, bei dem die Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Hinterpfoten nach einem automatisierten mechanischen Stimulus gemessen wurden (Abbildung 23 C).

In allen durchgeführten Tests für akute Nozizeption konnten keine signifikanten Unterschiede in den Latenzzeiten von CNGA3^{-/-}-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Dieses lässt den Schluss zu, dass die unmittelbare Reaktion auf akute thermische und mechanische Reize in CNGA3^{-/-}-Mäusen intakt ist.

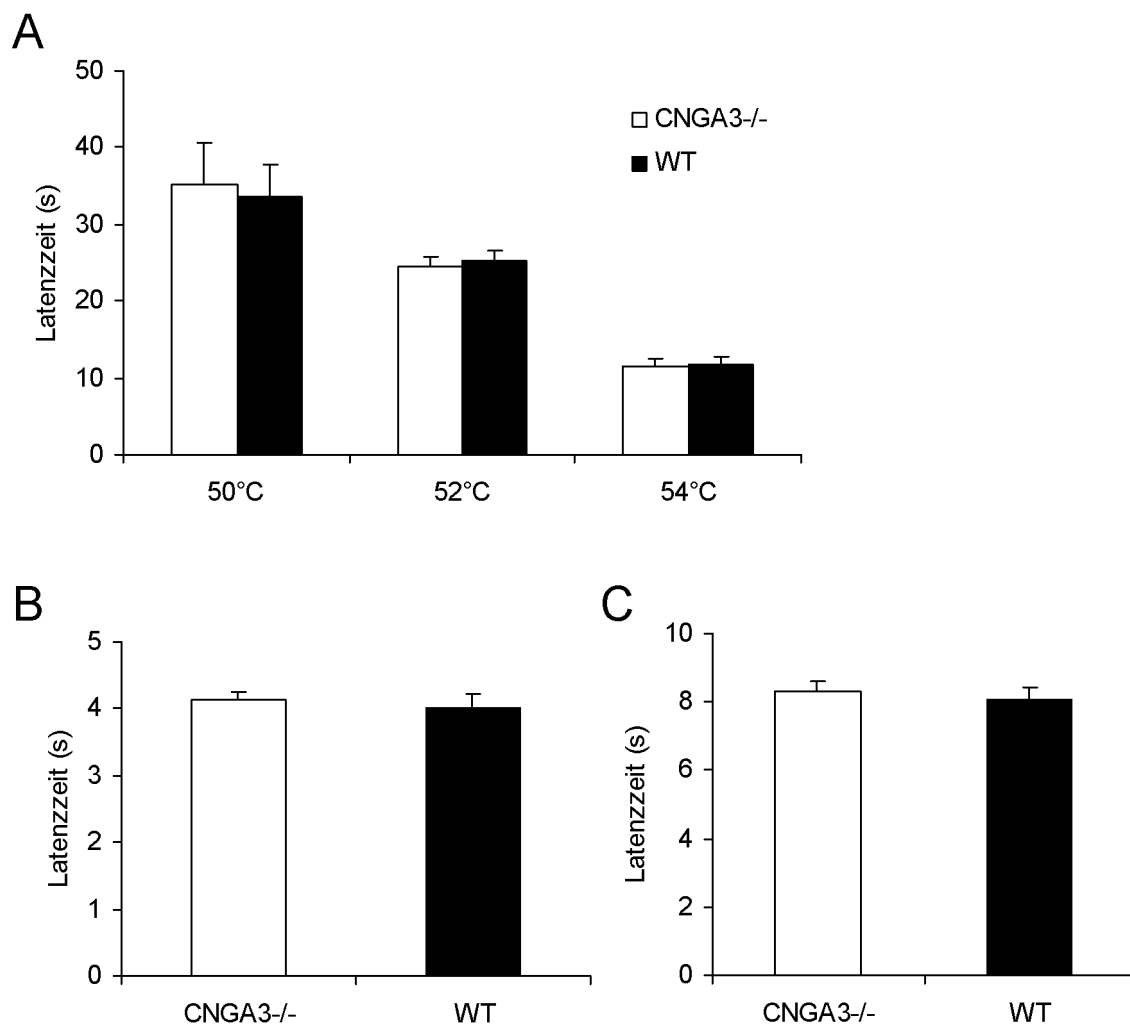


Abbildung 23. Modelle zur Messung des akuten nozizeptiven Verhaltens von CNGA3^{-/-}-Mäusen. A. Hotplate-Test zur Bestimmung der akuten thermischen Nozizeption. Dargestellt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten (in Sekunden) bis zum Auftreten einer Reaktion in den Hinterpfoten bei den Temperaturen 50°C, 52°C und 54°C. Die Cutoff-Werte betragen 60 s, 40 s bzw. 20 s; n = 8 (50°C) bzw. 16 (52°C und 54°C). B. Tailflick-Test zur Bestimmung der akuten thermischen Nozizeption. Gezeigt sind die Mittelwerte der Latenzzeit (in Sekunden) bis zum Auftreten des spinalen Reflexes, der zum Wegziehen des Schwanzes von einer Wärmequelle führt. Der Cutoff-Wert lag bei 10 s; n = 8. C. Dynamic Plantar-Test zur Bestimmung der akuten mechanischen Nozizeption. Gezeigt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten (in Sekunden) bis zum Auftreten einer Reaktion in den Hinterpfoten nach einem automatisierten mechanischen Stimulus. Der Cutoff-Wert lag bei 20 s; n = 16. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.

3.3.5. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen in Modellen für inflammatorische Schmerzen (Hyperalgesie)

Das Verhalten der CNGA3^{-/-}-Mäuse in Modellen für inflammatorische Schmerzen wurde mit Hilfe des Formalin-Tests und der Zymosan-induzierten Hyperalgesie untersucht. Im Formalin-Test resultierte die Injektion von 5 % Formalin in eine Hinterpfote in dem typischen

phasischen Verlauf der Leckzeit (Abbildung 24 A). In Phase 1 (0 - 10 min), die aus der direkten Aktivierung TRPA1-exprimierender Nozizeptoren resultiert (McNamara et al., 2007), zeigten die CNGA3^{-/-}-Mäuse aufgrund der längeren Leckzeit tendenziell ein verstärktes nozizeptives Verhalten, was aber nicht signifikant war. Auch in Phase 2 (11 - 60 min), bei der neben der Nozizeptor-Aktivierung Sensibilisierungsvorgänge im Rückenmark auftreten (Vardeh et al., 2009), war das Leckverhalten beider Genotypen sehr ähnlich. Da nach Ende der zweiten Phase das Lecken der CNGA3^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht verstärkt war, wurden die Beobachtungen bis 80 min nach Formalininjektion fortgesetzt. Interessanterweise konnte eine dritte Phase des Pfotenleckens (61 - 80 min) bei den CNGA3^{-/-}-Mäusen entdeckt werden, die in den Wildtyp-Mäusen nicht auftrat. Die statistische Auswertung zeigte in Phase 3 einen signifikanten Unterschied im Leckverhalten beider Genotypen (Abbildung 24 B).

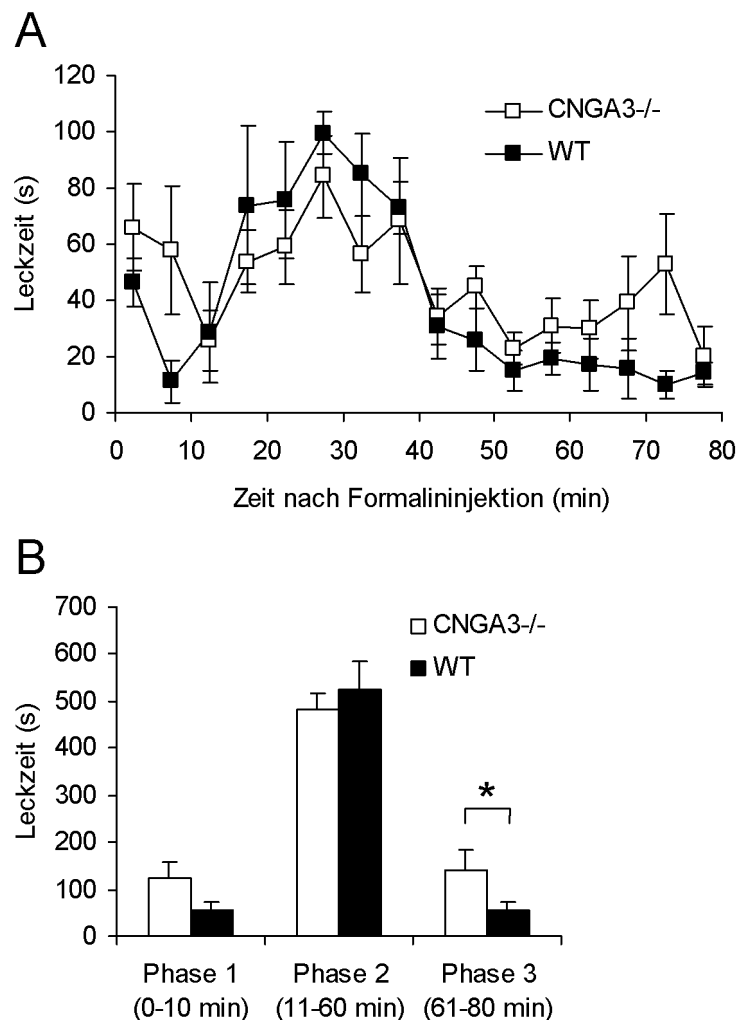


Abbildung 24. Formalin-Test mit CNGA3^{-/-}-Mäusen. A. Zeitverlauf des Leckverhaltens der Formalin-injizierten Pfote dargestellt als Mittelwert der Leckzeit (in Sekunden) ± SEM in Intervallen von 5 min. B. Summe der Leckzeit in Phase 1 (0 - 10 min), Phase 2 (11 - 60 min) und Phase 3 (61 - 80 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; *p < 0,05, n = 9 (CNGA3^{-/-}) bzw. 7 (WT).

In einem zweiten Modell für inflammatorische Schmerzen wurde das Ausmaß der mechanischen Hyperalgesie nach Injektion von Zymosan A in eine Hinterpfote untersucht (Meller und Gebhart, 1997). Die Injektion dieses proinflammatorischen Stimulus ruft im Gegensatz zur Formalininjektion keine direkte Schmerzreaktion hervor, sondern äußert sich in einer zunehmenden Sensibilisierung gegenüber mechanischen und thermischen Reizen. Die mechanische Hyperalgesie der CNGA3^{-/-}- und der Wildtyp-Mäuse entwickelte sich in den ersten 4 h nach Zymosaninjektion zunächst gleich. Während zwischen 5 h und 8 h nach Injektion das Ausmaß der mechanischen Hyperalgesie in den Wildtyp-Tieren nahezu konstant blieb, zeigten die CNGA3^{-/-}-Mäuse signifikant niedrigere Latenzzeiten und somit eine verstärkte mechanische Hyperalgesie. Ungefähr 48 h nach der Zymosaninjektion erreichten die Latenzzeiten beider Genotypen wieder Basalwerte (Abbildung 25).

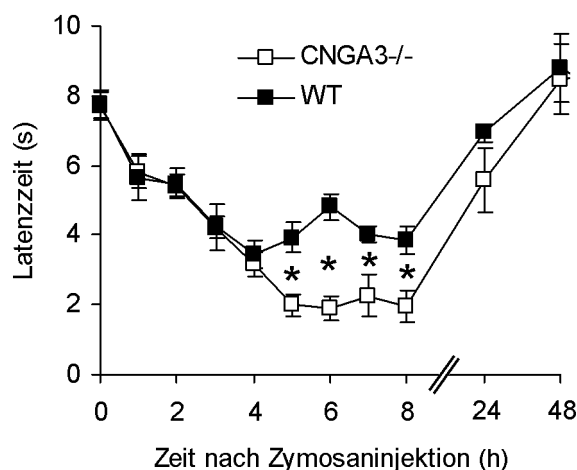


Abbildung 25. Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie von CNGA3^{-/-}-Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach einem automatisierten mechanischen Stimulus dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p < 0,05, n = 8.

Darüber hinaus wurde die thermische Hyperalgesie nach Zymosaninjektion bestimmt. Die thermische Hyperalgesie entwickelte sich in der ersten Stunde nach Zymosaninjektion zunächst etwas schneller in den Wildtyp-Mäusen, zeigte ab der zweiten Stunde dann aber über den gesamten Messzeitraum in beiden Genotypen das gleiche Ausmaß. 48 h nach Injektion erreichten die Messwerte erneut das ‚Baselinenniveau‘. Es konnte zwischen CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der thermischen Hyperalgesie festgestellt werden (Abbildung 26). Zusammenfassend lassen diese Daten vermuten, dass CNGA3 eine inhibitorische Funktion in der Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen haben könnte.

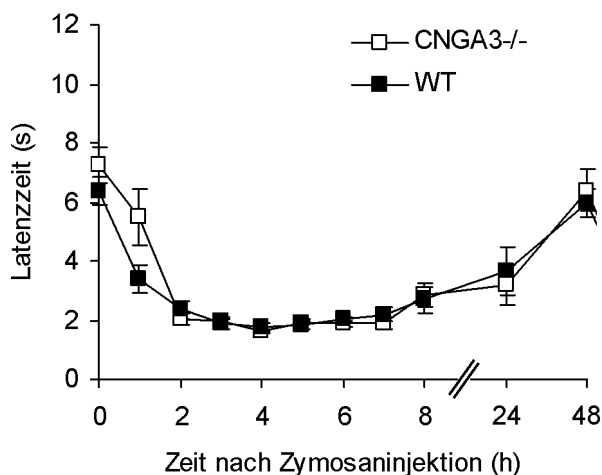


Abbildung 26. Zymosan-induzierte thermische Hyperalgesie von CNGA3^{-/-}-Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach einem automatisierten thermischen Stimulus dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 8 (CNGA3^{-/-}) bzw. 7 (WT).

3.3.6. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Applikation von cGMP-Analoga

Um zu klären, ob CNGA3 an der cGMP-vermittelten Schmerzverarbeitung im Rückenmark funktionell beteiligt ist, wurde das nozizeptive Verhalten von CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach intrathekaler Applikation von CNG-Kanal-aktivierenden cGMP-Analoga untersucht. Da die kommerziell erhältlichen cGMP-Analoga auch die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) beeinflussen, welche eine wichtige Rolle in der Schmerzverarbeitung im Rückenmark spielt (Schmidtke et al., 2003; Tegeder et al., 2004), wurden zwei Analoga ausgewählt, die die cGKI in unterschiedlicher Weise modulieren: zum einen 8-pCPT-cGMP, welches ein Aktivator von CNG-Kanälen und der cGKI ist, zum anderen Rp-8-pCPT-cGMPS, welches CNG-Kanäle aktiviert, die cGKI-Aktivität aber inhibiert (Kramer und Tibbs, 1996). Die Applikation von 8-pCPT-cGMP (20 nmol i.t.) rief eine mechanische Allodynie in CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen hervor (Abbildung 27 A). Diese war in den CNGA3^{-/-}-Mäusen allerdings verstärkt und hielt verglichen mit den Wildtyp-Mäusen länger an. In der statistischen Auswertung konnte 20 min nach Applikation ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen ausgemacht werden. Ungefähr 60 min nach i.t. Injektion war die mechanische Allodynie wieder aufgehoben.

Die intrathekale Applikation von Rp-8-pCPT-cGMPS (20 nmol) erzeugte in den Wildtyp-Mäusen keine mechanische Allodynie, die Latenzzeiten hielten sich während des gesamten Beobachtungszeitraums auf ‚Baselinenniveau‘. Die CNGA3^{-/-}-Mäuse entwickelten jedoch eine mechanische Allodynie, die verglichen mit den Wildtyp-Mäusen 10 min nach Applikation signifikant ausgeprägt war (Abbildung 27 B).

Die intrathekale Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) rief, wie erwartet, in beiden Genotypen keine mechanische Allodynie hervor. Die Latenzzeiten von CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen hielten sich über den gesamten Messzeitraum auf ‚Baseliniveau‘ (Abbildung 27 C). Dieses diente als Negativkontrolle, um auszuschließen, dass der Katheter oder die Applikation an sich die beobachteten Effekte verursachten. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass CNGA3 bei der cGMP-vermittelten Schmerzverarbeitung im Rückenmark eine inhibitorische Funktion einnimmt.

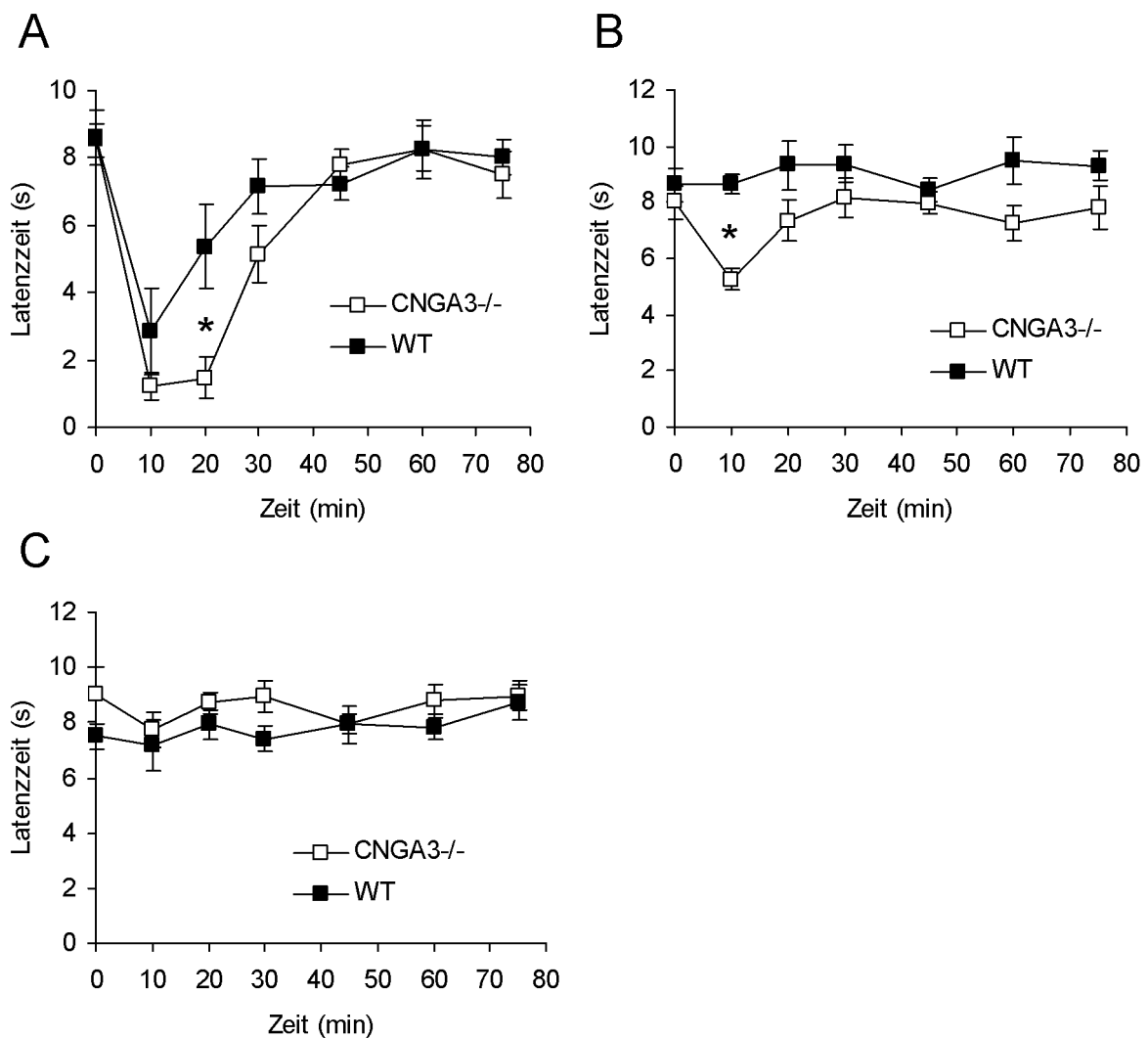


Abbildung 27. Mechanische Allodynie von CNGA3^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Applikation von cGMP-Analoga. A. Zeitverlauf der durch i.t. Injektion von 8-pCPT-cGMP induzierten mechanischen Allodynie. Es wurden 20 nmol appliziert; *p < 0,05, n = 6 (CNGA3^{-/-}) bzw. 8 (WT). B. Zeitverlauf der durch i.t. Injektion von Rp-8-pCPT-cGMPS induzierten mechanischen Allodynie. Es wurden ebenfalls 20 nmol appliziert; *p < 0,05, n = 5 (CNGA3^{-/-}) bzw. 6 (WT). C. Zeitverlauf nach Applikation der Negativkontrolle NaCl; n = 9. Alle Latenzzeiten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

3.3.7. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Applikation von NOC-5 und CNP

cGMP kann im Rückenmark von zwei unterschiedlichen Guanylatzyklasen produziert werden. Zum einen durch die partikuläre Guanylatzyklase GC-B, deren Ligand das natriuretische Peptid CNP ist, zum anderen durch die NO-sensitive Guanylatzyklase NO-GC, welche durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird. Zur Überprüfung einer funktionellen Kopplung von CNGA3 mit diesen Guanylatzyklasen wurde das nozizeptive Verhalten von CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach intrathekaler Applikation von CNP und dem NO-Donor NOC-5 untersucht.

Die Injektion von CNP (200 ng i.t.) erzeugte in CNGA3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen gleichermaßen eine mechanische Allodynie (Abbildung 28 A). Zwischen den beiden Genotypen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Latenzzeiten ausgemacht werden. Ungefähr 30 min nach Applikation waren die ‚Baselinewerte‘ wieder erreicht.

Die intrathekale Applikation von NOC-5 (10 µg i.t.) rief in beiden Genotypen ebenfalls eine mechanische Allodynie hervor, die jedoch in den CNGA3^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt war (Abbildung 28 B). Die statistische Auswertung zeigte signifikant unterschiedliche Latenzzeiten 30 min und 60 min nach NOC-5-Applikation. Nach ungefähr 90 min kehrten die Latenzzeiten auf ‚Baseliniveau‘ zurück. Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass CNGA3 im Rückenmark mit der NO-sensitiven Guanylatzyklase NO-GC funktionell gekoppelt ist.

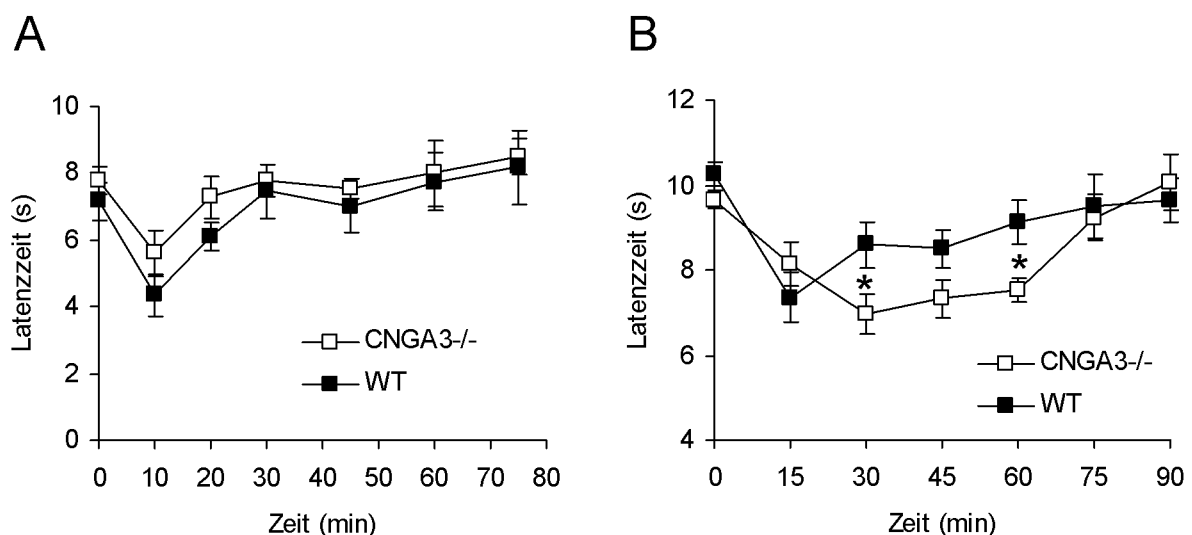


Abbildung 28. Intrathekale Applikation von cGMP-Modulatoren bei CNGA3^{-/-}-Mäusen A. Zeitverlauf der mechanischen Allodynie nach intrathekaler Injektion des GC-B-Liganden CNP (200 ng); n = 8 (CNGA3^{-/-}) bzw. 9 (WT). B. Zeitverlauf der mechanischen Allodynie nach i.t. Injektion des NO-Donors NOC-5 (10 µg); *p < 0,05, n = 7 (CNGA3^{-/-}) bzw. 8 (WT). Alle Latenzzeiten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

3.3.8. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen in einem Modell für neuropathische Schmerzen

Das Verhalten der CNGA3^{-/-}-Mäuse bei neuropathischen Schmerzen wurde im Spared nerve injury (SNI)-Modell untersucht (Decosterd und Woolf, 2000). Hierbei wurde die Ausprägung einer durch SNI induzierten mechanischen Allodynie und einer Kälteallodynie betrachtet. Über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen entwickelte sich die mechanische Allodynie in der betroffenen Hinterpfote der CNGA3^{-/-}- und der Wildtyp-Mäuse gleichermaßen (Abbildung 29 A). Durch die SNI-Operation wurde auch eine Kälteallodynie hervorgerufen, deren Ausmaß sich in beiden Genotypen jedoch ebenfalls nicht unterschied (Abbildung 29 B). Die Kälteallodynie entwickelte sich gegen Ende des Beobachtungszeitraums nahezu auf ‚Baseliniveau‘ zurück. CNGA3 scheint demnach nicht in die Entwicklung neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung involviert zu sein.

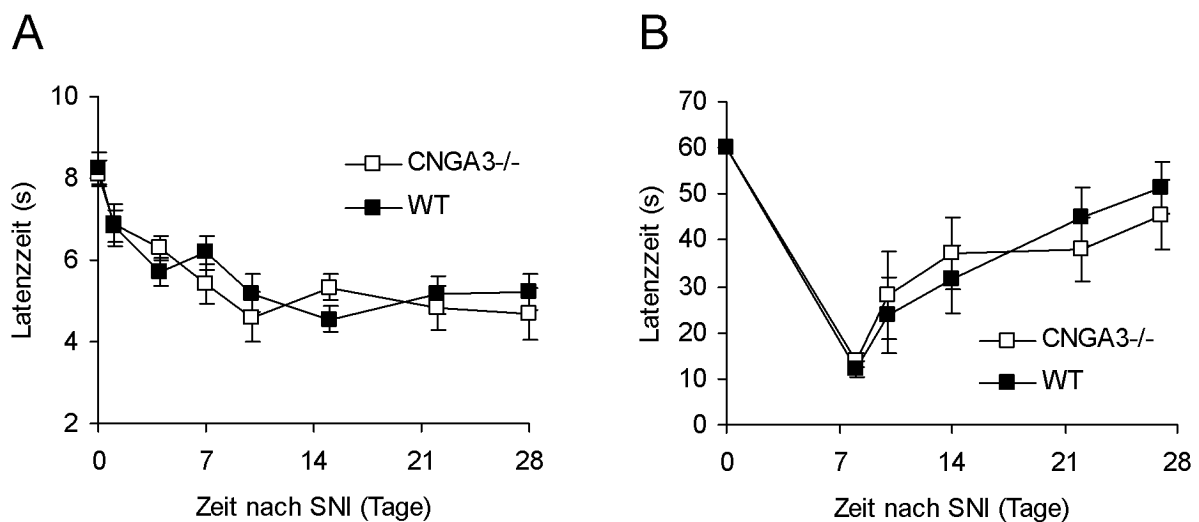


Abbildung 29. Nozizeptives Verhalten von CNGA3^{-/-}-Mäusen im SNI-Modell für neuropathische Schmerzen. A. Zeitverlauf der mechanischen Allodynie nach automatisierter mechanischer Stimulation der Hinterpfoten über 28 Tage. Gezeigt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten bis zum Wegziehen der Hinterpfote \pm SEM; n = 8. B. Zeitverlauf der Entwicklung einer Kälteallodynie über 28 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der Latenzzeiten \pm SEM bis zum Auftreten einer Reaktion in der SNI-operierten Hinterpfote auf einer 10°C kalten Platte. Der Cutoff-Wert lag bei 60 s; n = 8.

3.4. Gewebeexpression der Untereinheit CNGB1

3.4.1. Vergleich der Expression von CNGB1 in Rückenmark, Spinalganglien und Retina

Da CNGB1 im Rückenmark die im Vergleich zu den anderen CNG-Kanal-Untereinheiten höchsten basalen mRNA-Konzentrationen aufwies (vgl. Abbildung 13 A), wurde auch CNGB1 hinsichtlich einer Beteiligung an der Schmerzverarbeitung näher untersucht. Mit Hilfe der RTq-PCR wurde die CNGB1-Expression in Rückenmark und Spinalganglien, sowie der Retina als Referenzgewebe quantifiziert (Abbildung 30).

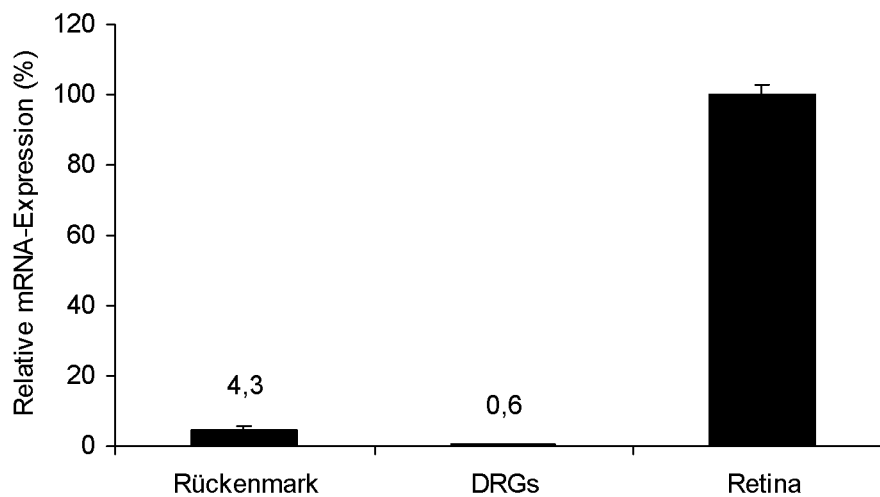


Abbildung 30. Quantifizierung der CNGB1-mRNA-Expression in Rückenmark, Spinalganglien und Retina von C57BL/6-Mäusen. Die Real-time quantitative PCR erfolgte mit einem Taqman Gene Expression Assay. Die CNGB1-Expression in der Retina wurde auf 100 % gesetzt; n = 4 Tiere.

3.4.2. Lokalisation von CNGB1 im Rückenmark

Mittels immunhistochemischer Methoden wurde die Lokalisation von CNGB1 im Rückenmark eingehender untersucht. Mit einem gegen CNGB1-gerichteten Antikörper und der TSA-Methode konnte CNGB1 in der grauen Substanz des Rückenmarks mit einer deutlichen Betonung des Hinterhorns detektiert werden. Im Hinterhorn lag CNGB1 sowohl punktuell als auch diffus verteilt in Laminae I bis III vor (Abbildung 31 A). Als Kontrolle für die spezifische Bindung des CNGB1-Antikörpers diente ein Rückenmarksschnitt, der nicht mit dem CNGB1-Antikörper inkubiert wurde und daher keine Färbung aufweisen konnte (Abbildung 31 B).

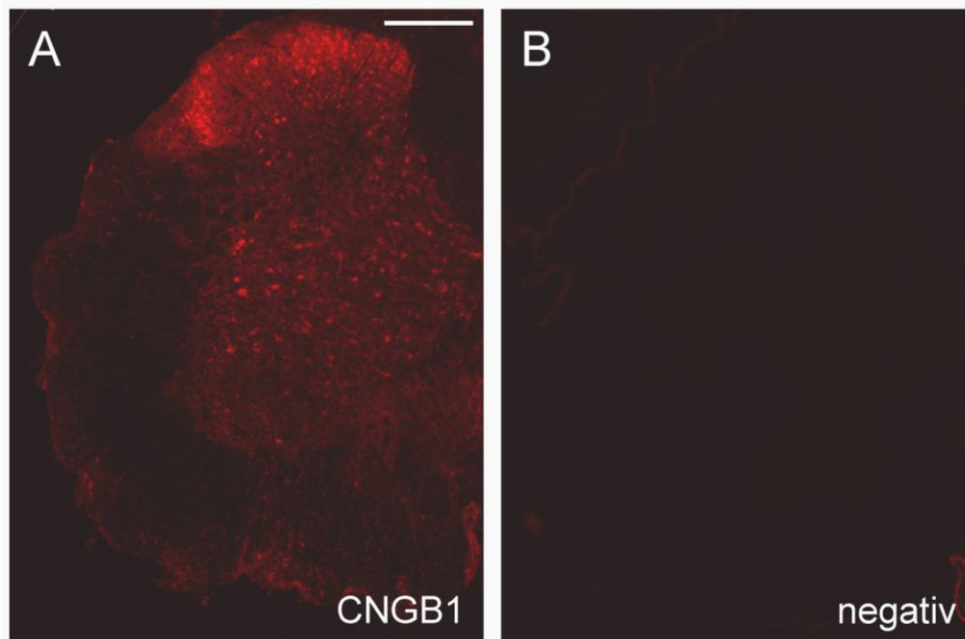


Abbildung 31. Immunhistochemie von CNGB1 im Rückenmark der Maus. A. Immunhistochemie mit einem gegen CNGB1-gerichteten Primärantikörper. Die Färbung erfolgte mit Tyramid, dem im Rahmen der TSA-Methode verwendeten rot-fluoreszierenden Substrat der HRP. B. Kontrollfärbung ohne den Primärantikörper. Maßstab: 200 μ m

Im Rahmen einer Doppelfärbung mit zelltypspezifischen Markern wurde die CNGB1-Expression im Hinterhorn näher charakterisiert. Hierzu wurden das CNGB1-Protein mit dem rot-fluoreszierenden Tyramid und die Markerproteine mit grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpern detektiert. Mit dem neuronalen Marker NeuN konnte in vielen Neuronen eine Kolokalisation mit CNGB1 ausgemacht werden (Abbildung 32 A - C). Neuronen, die CNGB1 exprimieren, zeigen in Abbildung 32 C eine gelbe Färbung. In der Doppelfärbung mit IB4, einem Marker für nicht-peptiderge C-Faser-Terminals in der inneren Lamina II, lag keine Kolokalisation mit CNGB1 vor (Abbildung 32 D - F), jedoch wäre es aufgrund der Nähe der Lokalisationen möglich, dass die nicht-peptidergen C-Faser-Terminals Synapsen mit CNGB1-exprimierenden Neuronen ausbilden (Abbildung 32 F). Eine Kolokalisation von CNGB1 mit Substanz P, welches in peptidergen C-Faser-Terminals in Lamina I und der äußeren Lamina II exprimiert wird, konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abbildung 32 G - I). Doch auch hier wäre ein synaptischer Kontakt zwischen peptidergen C-Faser-Terminals und CNGB1-exprimierenden Neuronen denkbar (Abbildung 32 I). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass CNGB1 im Rückenmark der Maus u.a. neuronal mit einer deutlichen Betonung des Hinterhorns exprimiert wird.

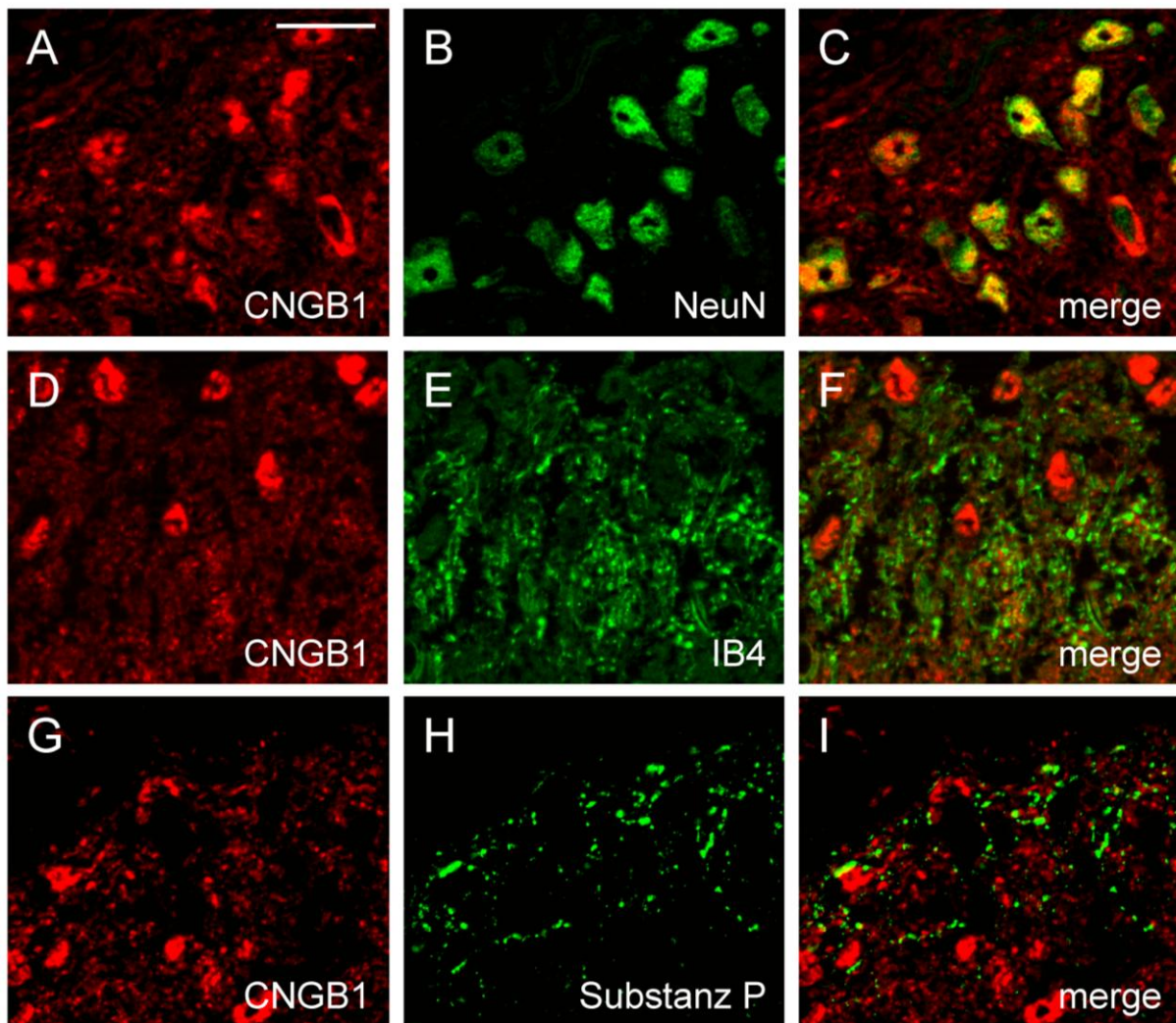


Abbildung 32. Immunhistochemie von CNGB1 im Hinterhorn des Rückenmarks. A, D, G. Immunhistochemie mit einem gegen CNGB1-gerichteten Primärantikörper. Die Färbung wurde mit Tyramid, einem rot-fluoreszierenden Substrat der Horseradish peroxidase, erzeugt. B, E, H. Immunhistochemie mit verschiedenen Markerproteinen und grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpern. C, F, I. Übereinanderlagerung von CNGB1 mit dem jeweiligen Markerprotein (merge). Eine Kolokalisation ist gelb dargestellt. Maßstab: 20 μ m

3.4.3. CNGB1-Expression in Spinalganglien nach nozizeptiver Stimulation

Ebenfalls wurde die Expression der CNG-Kanal-Untereinheit CNGB1 in den Spinalganglien nach Injektion von Zymosan A in eine Hinterpfote mittels RTq-PCR untersucht. CNGB1 wies 8 h und 24 h nach Zymosaninjektion eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den Spinalganglien verglichen mit unstimuliertem Gewebe auf (Abbildung 33).

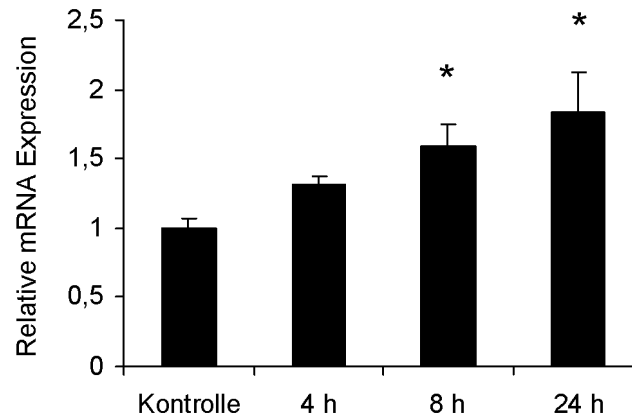


Abbildung 33. Relative mRNA-Expression der CNG-Kanal-Untereinheit CNGB1 in Spinalganglien von C57BL/6-Mäusen nach einem inflammatorischen Stimulus. Die gewählten Zeitpunkte waren 4 h, 8 h und 24 h nach Injektion von Zymosan A in eine Hinterpfote. Als Bezug diente die relative Expression in unstimulierten Spinalganglien (Kontrolle, auf 1 gesetzt); * $p < 0,05$, $n = 3$.

3.5. Nozizeptives Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen

3.5.1. Motorische Koordination von CNGB1^{-/-}-Mäusen

CNGB1^{-/-}-Mäuse zeigten im Rotarod-Test keine motorischen Einschränkungen (Abbildung 34).

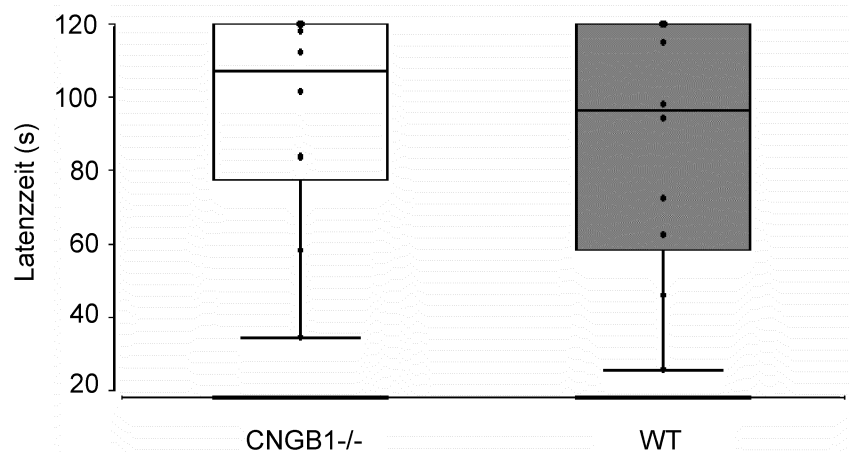


Abbildung 34. Rotarod-Test zur Untersuchung der motorischen Koordination von CNGB1^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der Median der Latenzzeit (mit dem Interquartilsabstand) bis zum Fallen der Maus von einem rotierenden Stab in Form eines Boxplots. Der Cutoff-Wert lag bei 120 s; $n = 10$.

3.5.2. Nozizeptives Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen in Modellen für inflammatorische Schmerzen

Im Formalin-Test resultierte die Injektion von 5 % Formalin in eine Hinterpfote in dem typischen phasischen Verlauf des Pfotenleckens. In der durch akute Nozizeptorstimulation hervorgerufenen Phase 1 (0 - 10 min) zeigten die CNGB1^{-/-}-Mäuse eine signifikant längere Leckzeit als die Wildtyp-Mäuse (Abbildung 35 A). Demgegenüber war in Phase 2 (11 -60 min) das Leckverhalten beider Genotypen sehr ähnlich. Auch mit dieser Mauslinie wurde der Formalin-Test über einen längeren Messzeitraum durchgeführt. Die dritte Phase des Pfotenleckens (61 - 80 min) fiel bei den CNGB1^{-/-}- und den Wildtyp-Mäusen als Ruhephase aus, in der das Leckverhalten sehr reduziert war. Allerdings konnte bei CNGB1^{-/-}-Mäusen eine weitere, vierte Phase (81 - 110 min) beobachtet werden. In dieser zeigten die CNGB1^{-/-}-Mäuse eine signifikant erhöhte Leckzeit verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 35 B). Somit könnte die Untereinheit CNGB1 eine inhibitorische Funktion bei der Verarbeitung akuter Schmerzen besitzen.

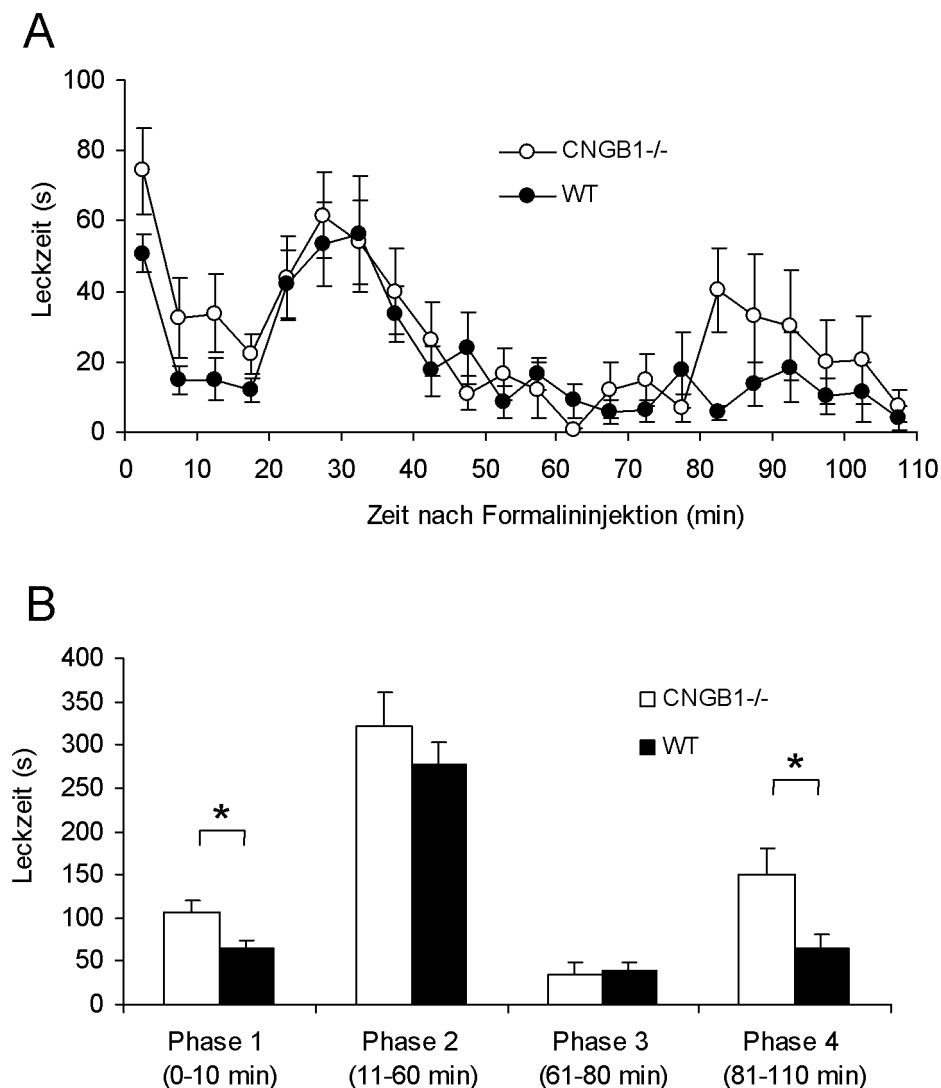


Abbildung 35. Formalin-Test mit CNGB1^{-/-}-Mäusen. A. Zeitverlauf des Leckverhaltens der Formalin-injizierten Pfote. B. Summe der Leckzeit in Phase 1 (0 - 10 min), Phase 2 (11 - 60 min), Phase 3 (61 - 80 min) und Phase 4 (81 - 110 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, $n = 8$.

In einem zweiten Modell für inflammatorische Schmerzen wurde das Ausmaß der mechanischen Hyperalgesie nach Injektion von Zymosan A in eine Hinterpfote untersucht (Meller und Gebhart, 1997). Da CNGB1^{-/-} und die entsprechenden Wildtyp-Mäuse in diesem Modell vor der Zymosaningektion unterschiedliche Basalwerte aufwiesen, wurden die gemessenen Latenzzeiten hier als Differenz zur ‚Baseline‘ dargestellt. Die mechanische Hyperalgesie der CNGB1^{-/-} und der Wildtyp-Mäuse entwickelte sich in den ersten 3 h nach Zymosaningektion nahezu gleich. Während zwischen 4 h und 8 h nach Injektion das Ausmaß der mechanischen Hyperalgesie in den Wildtyp-Tieren nahezu konstant blieb, zeigten die CNGB1^{-/-}-Mäuse etwas niedrigere Latenzzeiten, welche sich aber nicht signifikant von denen der Wildtyp-Mäuse unterschieden. Ungefähr 48 h nach Injektion erreichten die Latenzzeiten beider Genotypen wieder Basalwerte (Abbildung 36). In unabhängigen Messungen der

basalen Latenzzeiten konnten keine Unterschiede zwischen CNGB1^{-/-}-Mäusen (7,99 s) und Wildtyp-Mäusen (7,79 s) ausgemacht werden.

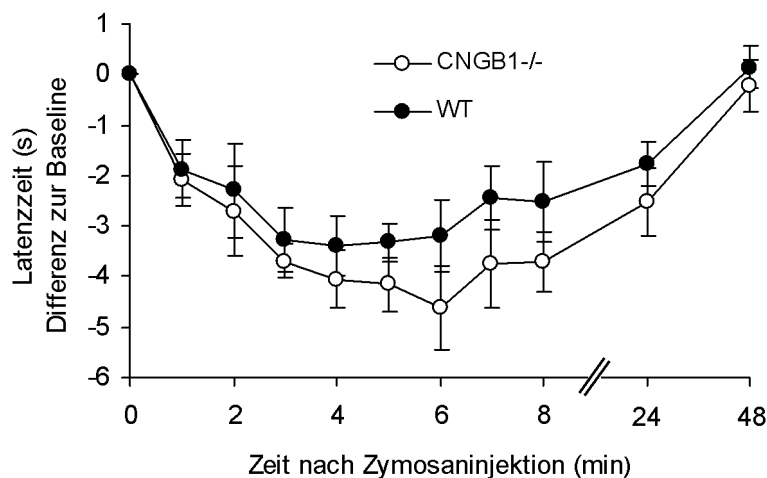


Abbildung 36. Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie bei CNGB1^{-/-}-Mäusen. Zeitverlauf der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach einem automatisierten mechanischen Stimulus dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 8.

3.5.3. Nozizeptives Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Applikation eines cGMP-Analogons

Um die Rolle von CNGB1 im cGMP-vermittelten Signalweg der Schmerzverarbeitung im Rückenmark zu untersuchen, wurde das nozizeptive Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Injektion des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP charakterisiert. Die Applikation von 8-pCPT-cGMP (20 nmol i.t.) rief eine mechanische Allodynie in CNGB1^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen hervor. Diese war in den CNGB1^{-/-}-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt und hielt verglichen mit den Wildtyp-Mäusen auch länger an (Abbildung 37). In der statistischen Auswertung konnte 10 min, 20 min und 30 min nach Applikation ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen ausgemacht werden. Ungefähr 60 min nach i.t. Injektion erreichten die Latenzzeiten wieder ‚Baselinenniveau‘. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass CNGB1 bei der cGMP-vermittelten Schmerzverarbeitung eine inhibitorische Funktion einnimmt.

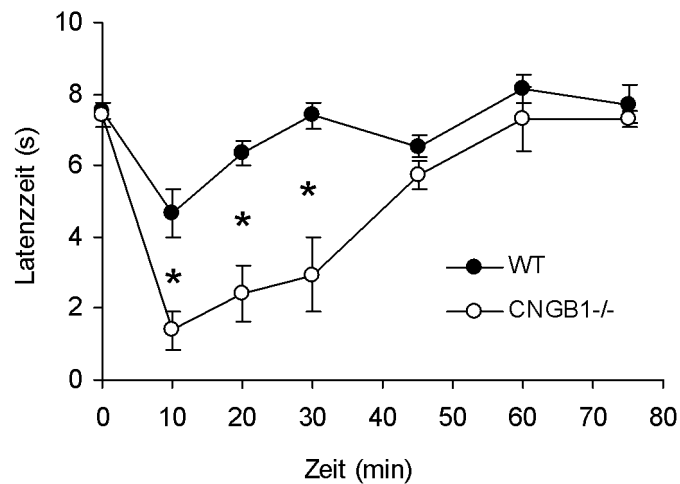


Abbildung 37. Zeitverlauf der mechanischen Allodynie von CNGB1^{-/-}-Mäusen nach intrathekaler Injektion von 8-pCPT-cGMP. Es wurden 20 nmol appliziert. Alle Latenzzeiten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * $p < 0,05$, $n = 3$ (CNGB1^{-/-}) bzw. 7 (WT).

3.6. Nozizeptives Verhalten von Wildtyp-Mäusen nach intrathekaler Applikation eines CNG-Kanal-Inhibitors

L-cis-Diltiazem ist ein Inhibitor von CNG-Kanälen und wurde C57BL/6-Mäusen intrathekal appliziert. Diese Injektion löste schon in kleinen Konzentrationen von L-cis-Diltiazem (125 μg i.t.) starke motorische Störungen bzw. Lähmungserscheinungen aus. Da aber eine intakte Motorik für die Durchführung von nozizeptiven Tests unbedingt gewährleistet sein muss, wurde dieser Versuch abgebrochen. Es kann demnach keine Aussage über das nozizeptive Verhalten von C57BL/6-Mäusen nach Applikation des CNG-Kanal-Inhibitors L-cis-Diltiazem gemacht werden.

4. Diskussion

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass NO und cGMP im Hinterhorn des Rückenmarks bei der Sensibilisierung des nozizeptiven Systems im Rahmen von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen eine wichtige Rolle spielen (Garry et al., 1994; Luo und Cizkova, 2000; Tao et al., 2000; Schmidtko et al., 2008a, 2009). Ein wichtiger Effektor der cGMP-vermittelten Schmerzsensibilisierung ist die cGKI, die insbesondere in primär afferenten Neuronen exprimiert wird (Qian et al., 1996). In Studien mit cGKI-Inhibitoren und cGKI^{-/-}-Mäusen wurde beobachtet, dass die Hemmung bzw. der Verlust von cGKI zu einem reduzierten nozizeptiven Verhalten in Modellen für inflammatorische Schmerzen führt (Tao et al., 2000; Schmidtko et al., 2003; Tegeder et al., 2004). Demzufolge ist eine Aktivierung der cGKI im nozizeptiven System offenbar mit pronozizeptiven Effekten verbunden. Daneben gibt es jedoch auch Hinweise auf eine cGKI-unabhängige Beeinflussung der Schmerzsensibilisierung durch cGMP (Tegeder et al., 2002; Schmidtko et al., 2008a, 2009). Die Mechanismen dieser cGKI-unabhängigen cGMP-Effekte im nozizeptiven System sind jedoch bisher nur unzureichend untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CNG-Kanäle ein ‚Target‘ cGMP-vermittelter Effekte im nozizeptiven System darstellen könnten. CNG-Kanäle spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von Photorezeptoren und olfaktorischen Rezeptorneuronen (Biel und Michalakakis, 2009). Zusätzlich konnten CNG-Kanäle in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Gehirn, Herz, Niere, Spermien und endokrinem Gewebe gefunden werden. Die funktionelle Rolle der CNG-Kanäle in diesen Geweben ist aber größtenteils noch ungeklärt (Kaupp und Seifert, 2002).

In dieser Arbeit konnten mittels Real-time quantitativer PCR erstmalig fünf der sechs bekannten CNG-Kanal-Untereinheiten auf RNA-Ebene im Rückenmark und zwei CNG-Kanal-Untereinheiten in den Spinalganglien der Maus detektiert werden. Aufgrund der Beobachtung, dass eine durch Zymosaninjektion hervorgerufene nozizeptive Stimulation der Hinterpfote zu einer Hochregulation der CNGA3-Expression im Rückenmark und in den Spinalganglien sowie zu einer Hochregulation der CNGB1-Expression in den Spinalganglien führte, wurde die Rolle dieser Untereinheiten in der Schmerzverarbeitung eingehender untersucht.

4.1. CNGA3 als ‚Target‘ der cGMP-vermittelten Nozizeption

Die zelluläre Lokalisation von CNGA3 im Rückenmark wurde mittels In situ-Hybridisierung charakterisiert. Aufgrund der stärkeren Detektion der CNGA3-mRNA im Hinterhorn (Abbildung 16 A und C), wurde von einer erhöhten CNGA3-Expression in diesem ‚schmerzrelevanten‘ Bereich ausgegangen, und dieser für alle weiteren Betrachtungen herangezogen.

Eine spezifische Detektion des CNGA3-Proteins war trotz des Einsatzes vier verschiedener CNGA3-Antikörper (Biel et al. (1999), Alomone labs, Biomol, Lifespan Biosciences), verschiedener Fixierungen und immunhistochemischer Färbeprotokolle inklusive unterschiedlicher Methoden der Antigendemaskierung (in 0,01 M Citratpuffer, pH 6 in der Mikrowelle; in 0,01 M Citratpuffer, pH 6 bei 65°C im Wasserbad; mit 50 % Ethanol) nicht möglich. Das sogenannte ‚Antigen-Retrieval‘ sollte die im Rahmen der PFA-Fixierung im Gewebe gebildeten Protein-Quervernetzungen wieder aufbrechen, und somit ein möglicherweise verändertes Epitop für einen Antikörper wieder ‚sichtbar‘ gemacht werden. Ebenfalls wurde versucht, aus jungen Mäusen (im Alter von ca. 14 Tagen) den gesamten Wirbelkanal inklusive des Rückenmarks und der Spinalganglien unfixiert zu entnehmen, in Isopentan schockzugefrieren und mit dem Knochen im Kryotom zu schneiden. Ziel dieser Technik sollte eine möglichst schnelle Gewebeentnahme sein, um einer Degradation des CNGA3-Proteins vorzubeugen. Dennoch führte auch diese Technik nicht zum erfolgreichen Nachweis von CNGA3 auf Proteinebene.

Der von Prof. Dr. Martin Biel und Dr. Stylianos Michalakis generierte und zur Verfügung gestellte CNGA3-Antikörper (Biel et al., 1999) zeigte in immunhistochemischen Färbungen der Retina von Wildtyp-Mäusen ein spezifisches Signal in den äußeren Segmenten der Zapfen-Photorezeptoren. Als Kontrolle diente Retina-Gewebe von CNGA3^{-/-}-Mäusen, welches keine Färbung hervorbrachte. Im Rückenmark und in Spinalganglien von Wildtyp-Mäusen hingegen war es nicht möglich, das CNGA3-Protein spezifisch nachzuweisen. Eine mögliche Ursache ist die geringe Expression der CNGA3-mRNA in Rückenmark und Spinalganglien verglichen mit den Zapfen der Retina (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15), so dass vermutlich auch das CNGA3-Protein in viel geringerem Maße vorliegt. Da CNG-Kanäle Membranproteine und daher schlecht aus der Membran zu solubilisieren sind bzw. die Epitope aufgrund sterischer Hinderung trotz des ‚Antigen-Retrievals‘ möglicherweise nicht gut für einen Antikörper zugänglich sind, könnte dieses ebenfalls den fehlenden Erfolg einer Detektion von CNGA3 auf Proteinebene erklären. Zusätzlich erschwert wahrscheinlich das aus verschiedenen Zelltypen aufgebaute, dicht gepackte Hinterhorn des Rückenmarks den Zugang des Antikörpers zu seinem Epitop. Mit einem weiteren CNGA3-Antikörper (Alomone labs) konnten Kruse et al. (2006) in Western Blot-Experimenten eine Expression

des CNGA3-Proteins in der Arteria cerebri media, der Arteria basilaris und dem Ganglion trigeminale des trigeminovaskulären Systems der Ratte nachweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mit dem genannten CNGA3-Antikörper Western Blot-Banden in Wildtyp-Gewebe der Retina, aber ebenso in CNGA3^{-/-}-Gewebe beobachtet werden. Eine immunhistochemische Färbung brachte ebenfalls ein Signal in Rückenmark und Spinalganglien von Wildtyp- und CNGA3^{-/-}-Mäusen hervor. Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieser CNGA3-Antikörper unspezifisch bindet und Kruse et al. dieses aufgrund einer mangelnden Negativkontrolle (CNGA3^{-/-}-Gewebe) nicht feststellen konnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf RNA-Ebene eine Expression von CNGA3 im Rückenmark in Neuronen und nicht in Gliazellen hin, da CNGA3 mit NeuN kolokalisiert ist, einem Marker von neuronalen Nuclei und Perykarien (Wolf et al., 1996). Die CNGA3-mRNA konnte darüber hinaus in der Nähe des zytosolischen Proteins GAD 65/67, welches von inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird, detektiert werden (siehe Abbildung 17 F). Dieses weist auf eine Expression von CNGA3 in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks hin. Folglich kann spekuliert werden, dass das in inhibitorischen Interneuronen produzierte cGMP CNG-Kanäle, aufgebaut aus mindestens einer CNGA3-Untereinheit, aktivieren könnte. Eine direkte Kolokalisation konnte in diesem Fall nicht gezeigt werden, da es keine Überlappung der aus dem Kern austretenden CNGA3-mRNA und dem zytosolischen Protein GAD 65/67 gibt. Insgesamt sind die Aussagen zur Kolokalisation der CNGA3-mRNA mit den genannten Markerproteinen kritisch zu betrachten, da eine der immunhistochemischen Färbung vorangegangene In situ-Hybridisierung die Gewebeintegrität negativ beeinflussen kann.

Strukturell scheint CNGA3 im Rückenmark nicht essentiell zu sein, da die Morphologie sowie die Größe des Rückenmarks von CNGA3^{-/-}-Mäusen und auch die Verteilung nozizeptiv thermorezeptiver und nozizeptiv mechanorezeptiver primärer afferenter C-Fasern in Laminae I und II des Hinterhorns sowie die Verteilung der Neurone und Astrozyten sich nicht von den Wildtyp-Mäusen unterschied. Dieses konnte mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen mit gängigen Markerproteinen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 20). Alle anderen im Rückenmark von Wildtyp-Mäusen nachgewiesenen CNG-Kanal-Untereinheiten (CNGA2, CNGA4, CNGB1 und CNGB3) werden im Rückenmark von CNGA3^{-/-}-Mäusen gleichermaßen exprimiert, es findet also keine kompensatorische Hochregulation statt (siehe Abbildung 21). Demnach scheint die Untereinheit CNGA3 eine Bedeutung zu haben, die nicht durch andere Untereinheiten ersetzt werden kann. CNGA2 als einzige andere im Rückenmark exprimierte funktionelle Untereinheit übernimmt daher wahrscheinlich andere Aufgaben bzw. könnte auch einen Komplex mit CNGA3 zu einem funktionsfähigen Ionenkanal bilden. Im Falle eines CNGA3-Knockouts ist CNGA2 jedoch nicht in der Lage, weiterhin die vollständige Funktion dieses Ionenkanals zu gewährleisten. Bisher sind jedoch noch keine physiologischen CNG-

Kanäle, aufgebaut aus zwei funktionellen Untereinheiten, beschrieben worden (Biel und Michalakakis, 2009).

Um die zelluläre Lokalisation von CNGA3 in den Spinalganglien zu untersuchen, wurde ebenfalls die In situ-Hybridisierung verwendet. CNGA3 scheint in den Spinalganglien nicht neuronal exprimiert zu sein, sondern möglicherweise in Satellitenzellen, kolokalisiert mit der NO-GC. Dass die NO-GC in Spinalganglien in Satellitenzellen und in anderen nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert wird, konnte bereits von Schmidtke et al. (2008a) gezeigt werden. Eine Beteiligung am ‚Signalling‘ zwischen Neuronen und Satellitenzellen in Spinalganglien wäre denkbar. Es gibt Hinweise, dass Satellitenzellen in den Spinalganglien ebenfalls an der Schmerzverarbeitung beteiligt sind (Scholz und Woolf, 2007). Satellitenzellen setzen nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP den Tumornekrosefaktor α frei, welcher die Erregbarkeit von Neuronen in den Spinalganglien erhöht (Zhang et al., 2007). P2X7^{-/-}-Mäuse entwickeln kein nozizeptives Verhalten nach Nervenschädigung. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die CNGA3-mRNA nach einem inflammatorischen Stimulus punktuell ‚geballt‘ im Spinalganglion vorliegt. Eine Tendenz hierfür ist in Abbildung 19 C und E zu erkennen. Diese In situ-Hybridisierung mit der nachgeschalteten immunhistochemischen Färbung wurde mit Spinalganglien-Gewebeschnitten von Zymosan-behandelten Mäusen durchgeführt. Ledda et al. (2009) konnten zeigen, dass Satellitenzellen in Spinalganglien nach einem inflammatorischen Stimulus vermehrt Gap Junctions zu anderen Satellitenzellen und zu Neuronen ausbilden und somit strukturelle Veränderungen auftreten. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass Satellitenzellen auf einen nozizeptiven Stimulus reagieren, über strukturelle Veränderungen das ‚Signalling‘ in den Spinalganglien beeinflussen und sich somit an der Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen beteiligen. Jedoch ist auch eine Expression von CNGA3 in weiteren nicht-neuronalen Strukturen möglich, beispielsweise in Perizyten oder glatten Muskelzellen.

In den akuten nozizeptiven Verhaltenstests (Hotplate-Test, Tailflick-Test, mechanische Stimulation einer unbehandelten Hinterpfote) zeigten CNGA3^{-/-}-Mäuse vergleichbare Schmerzreaktionen wie die entsprechenden Wildtyp-Mäuse. Auch das Verhalten bei neuropathischen Schmerzen war in beiden Genotypen ähnlich, so dass vermutet werden kann, dass CNGA3 nicht zur Entwicklung akuter Schmerzen bzw. der Hypersensitivität infolge einer Nervenschädigung beiträgt. Trotzdem konnten neuropathische Schmerzen nach intrathekalen Injektionen von NO-GC-Inhibitoren reduziert werden und waren in NO-GC^{-/-}-Mäusen weniger stark ausgeprägt (Song et al., 2006; Schmidtke et al., 2008a). Daher bleibt zu klären, welches ‚Target‘ die NO- und cGMP-abhängigen Effekte während neuropathischer Schmerzen vermittelt.

Anders als bei akuten und neuropathischen Schmerzen zeigten CNGA3^{-/-}-Mäuse nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote ein nozizeptives Verhalten, welches sich von den Wildtyp-Mäusen unterschied. Überraschenderweise war die mechanische Hypersensitivität in den CNGA3^{-/-}-Mäusen erhöht. Dieses bedeutet, dass CNGA3 normalerweise die mechanische Hypersensitivität während inflammatorischer Schmerzen unterdrücken, also eine inhibitorische Funktion einnehmen könnte. Diese Hypothese wird gestützt von der Beobachtung, dass CNGA3^{-/-}-Mäuse eine verstärkte mechanische Allodynie nach intrathekaler Injektion der cGMP-Analoga 8-pCPT-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMPS entwickeln. Es ist bekannt, dass 8-pCPT-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMPS als Agonisten an CNG-Kanälen des Photorezeptors fungieren. 8-pCPT-cGMP ist jedoch ein deutlich potenterer Agonist an CNG-Kanälen als Rp-8-pCPT-cGMPS (Wei et al., 1998) und zudem ebenfalls ein Agonist der cGKI. Durch intrathekale Applikation von 8-pCPT-cGMP wird offenbar mit der cGKI ein pronozizeptiver Signalweg und mit der Aktivierung von CNG-Kanälen gleichzeitig ein antinozizeptiver Signalweg angeschaltet. Die Wirkungen dieser beiden gegensätzlichen Wege gleichen sich in Wildtyp-Mäusen nahezu aus, wobei mit der cGKI ein starker pronozizeptiver Weg aktiviert und daher trotzdem noch eine Allodynie generiert wird. In CNGA3^{-/-}-Mäusen ist der antinozizeptive Signalweg nicht funktionsfähig, während der pronozizeptive cGKI-Signalweg aktiv ist. CNGA3^{-/-}-Mäuse entwickeln daher eine erhöhte mechanische Allodynie. Rp-8-pCPT-cGMPS ist ebenfalls ein Agonist an CNG-Kanälen, aber ein Inhibitor der cGKI. Da in Wildtyp-Mäusen der pronozizeptive Signalweg inhibiert ist, der inhibitorische Signalweg aber aktiv ist, wird praktisch keine Allodynie generiert. Die CNGA3^{-/-}-Mäuse entwickeln aufgrund des nicht funktionsfähigen antinozizeptiven Signalweges eine geringe Allodynie, die offenbar durch andere Signalwege als über die cGKI vermittelt wird. Demnach scheint CNGA3 inhibitorisch in die cGMP-vermittelte Schmerzweiterleitung während inflammatorischer Schmerzen involviert zu sein.

Da verschiedene cGMP-produzierende Guanylatzyklasen in unterschiedlichen Zellen des nozizeptiven Systems vorhanden sind (Schmidtko et al., 2009), wurde auch untersucht, mit welcher Guanylatzyklase CNGA3 funktionell gekoppelt ist. In primär afferenten Neuronen wird cGMP durch die partikuläre Guanylatzyklase GC-B gebildet, wobei das natriuretische Peptid CNP den endogenen Liganden der GC-B darstellt (Kishimoto et al., 2008; Schmidtko et al., 2008a; Schmidt et al., 2009). cGMP wird ebenfalls durch NO-abhängige Aktivierung der NO-GC gebildet, welche in NK1-Rezeptor-positiven Projektionsneuronen in Lamina I des Hinterhorns, in inhibitorischen Interneuronen in Laminae II und III sowie in Satellitenzellen, die die Zellkörper von primär afferenten Neuronen umgeben, exprimiert wird (Schmidtko et al., 2008a). Die Beobachtung, dass CNGA3^{-/-}-Mäuse nach i.t. Injektion des NO-Donors NOC-5, nicht jedoch nach i.t. Injektion von CNP, eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

verstärkte mechanische Allodynie entwickelten, lässt darauf schließen, dass CNGA3 mit der NO-GC funktionell gekoppelt ist. Aus früheren Experimenten (Schmidtke et al., 2008a) ist bekannt, dass die NO-GC ein ähnliches Expressionsmuster verglichen mit der CNGA3-Untereinheit aufweist, nämlich in GABAergen inhibitorischen Interneuronen in Laminae II und III des Rückenmarks sowie in Satellitenzellen in Spinalganglien. Demnach würde eine funktionelle Kopplung der NO-GC mit der CNGA3-Untereinheit anatomisch gesehen auch möglich sein. Das von der NO-GC produzierte cGMP würde also in diesen beiden Zelltypen CNG-Kanäle, aufgebaut aus mindestens einer CNGA3-Untereinheit, aktivieren, welche dann eine inhibitorische Wirkung einnehmen. Dafür spricht ebenfalls das ähnliche Verhalten von NO-GC^{-/-}- und CNGA3^{-/-}-Mäusen in den nozizeptiven Verhaltenstests. Beide Genotypen zeigen, verglichen mit ihren Wildtyp-Littermates, keine Beeinträchtigung der Weiterleitung akuter nozizeptiver Stimuli. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass NO als Aktivator des NO-GC/CNGA3-Signalweges bei der Generierung von akuten Schmerzen nicht beteiligt ist. CNGA3^{-/-}- und NO-GC^{-/-}-Mäuse weisen beide jedoch Effekte in inflammatorischen Schmerzmodellen (Formalin-Test, Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie) auf. Im Modell der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie sind die Effekte sogar im gleichen Zeitfenster, nämlich 5 - 8 Stunden nach Injektion von Zymosan, zu erkennen. Das Verhalten der CNGA3^{-/-}- und NO-GC^{-/-}-Mäuse fällt in den inflammatorischen Schmerzmodellen jedoch gegensätzlich aus, da die NO-GC im Rückenmark außerdem noch in NK1-Rezeptor-positiven Projektionsneuronen in Lamina I lokalisiert ist, welche für die Weiterleitung nozizeptiver Stimuli vom Rückenmark ins Gehirn verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass das durch die NO-GC produzierte cGMP in NK1R-positiven Projektionsneuronen pronozizeptive Effekte ausübt, wobei das ‚Target‘ dieses Signalweges noch nicht bekannt ist. Es könnte vermutet werden, dass das ‚Target‘ der NO-GC in NK1R-positiven Projektionsneuronen auch die cGKI ist. Daher wäre es interessant, in zukünftigen Studien die Lokalisation und Funktion der cGKI in Rückenmarksneuronen, und dort insbesondere in NK1R-positiven Projektionsneuronen, zu untersuchen. Allerdings könnten durch diesen Signalweg noch nicht die NO- und cGMP-abhängigen Effekte während neuropathischer Schmerzen erklärt werden, da vermutlich cGKI^{-/-}-Mäuse keinen Phänotyp nach Nervenschädigung aufweisen. Die NO-GC-vermittelte cGMP-Produktion resultiert in unterschiedlichen Zelltypen, abhängig vom Effektor-Molekül, also in pro- oder antinozizeptiven Effekten.

Neben dem bekannten CNP/NPR-B/cGKI-Signalweg, der in primär afferenten Neuronen eine Schmerzverstärkung hervorruft, konnten Zhang et al. (2010) in primär afferenten Neuronen ebenfalls einen inhibitorischen Signalweg nachweisen, der über das natriuretische Peptid BNP und dessen Rezeptor GC-A cGMP-abhängig eine Hemmung der inflammatorischen Schmerzweiterleitung hervorruft. Die Expression von BNP und der GC-A wird nach einem

inflammatorischen Stimulus hochreguliert, welches über die Aktivierung der cGKI und einer Glutamat-abhängigen Öffnung von BK_{Ca}-Kanälen zu einer reduzierten Erregbarkeit kleiner Spinalganglien-Neurone führt. Hierdurch wird ersichtlich, dass viele an der nozizeptiven Weiterleitung beteiligte Signalwege in Abhängigkeit vom ‚Targetmolekül‘, sogar in der gleichen Zellpopulation pro- und antinozizeptive Effekte hervorrufen können.

In früheren Untersuchungen wurde ebenfalls gezeigt, dass die Langzeit-Potenzierung (LTP) an Synapsen zwischen C-Fasern und Projektionsneuronen in Lamina I NO-abhängig ist (Ikeda et al., 2006), und dass das Fehlen dieser Neurone inflammatorische und neuropathische Schmerzen erheblich mildert (Mantyh et al., 1997; Nichols et al., 1999; Khasabov et al., 2002). Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das von der NO-GC produzierte cGMP antinozizeptive Effekte in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks und in Satellitenzellen in Spinalganglien hervorruft, die durch Aktivierung von CNGA3 vermittelt werden.

Interessanterweise haben Studien gezeigt, dass NO-Donoren und cGMP-Analoga neben ihren bekannten pronozizeptiven Effekten auch antinozizeptive Effekte erzielen können. Unter anderem hemmte die intrathekale Applikation von cGMP-Analoga das nozizeptive Verhalten in inflammatorischen Schmerzmodellen (Iwamoto und Marion, 1994), und die Behandlung von Rückenmarksschnitten der Ratte mit verschiedenen NO-Donoren oder einem cGMP-Analogen inhibierte die neuronale Aktivität in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns (Pehl und Schmid, 1997). Ebenso wurde beschrieben, dass die intrathekale Applikation von cGMP-Analoga sowohl eine Hyperalgesie als auch eine Antinozizeption, abhängig von der eingesetzten Dosis, verursachen kann (Tegeder et al., 2002, 2004; Schmidtko et al., 2008b). Interessanterweise konnten die antinozizeptiven Effekte von cGMP-Analoga nicht durch gleichzeitige Applikation eines cGKI-Inhibitors antagonisiert werden und traten ebenfalls bei cGKI^{-/-}-Mäusen auf. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass cGMP tatsächlich gegensätzliche Effekte in der Schmerzverarbeitung ausübt: zum einen die Generierung der Hyperalgesie durch Aktivierung der cGKI, zum anderen eine Inhibition der nozizeptiven Transmission durch Aktivierung cGKI-unabhängiger Mechanismen. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass CNGA3 die inhibitorischen Effekte von cGMP vermittelt. Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass (a) CNG-Kanäle, aufgebaut aus zwei CNGA3-Untereinheiten in den Zapfen der Retina durch mikromolare Konzentrationen von cGMP aktiviert werden, (b) die Aktivierung von CNG-Kanälen in einem Einstrom an Na⁺- und Ca²⁺-Ionen und einer nachfolgenden Depolarisierung der Plasmamembran resultiert (Kaupp und Seifert, 2002; Biel, 2009) und (c) hier gezeigt wird, dass CNGA3 in inhibitorischen Neuronen exprimiert sein könnte, ist es wahrscheinlich, dass die cGMP-vermittelte Aktivierung von CNG-Kanälen in inhibitorischen Interneuronen in einer Freisetzung von GABA resultiert, welches dann die

Schmerzverarbeitung hemmt. Demzufolge sind bei der Applikation von NO-Donoren oder cGMP-Analoga mehrere Faktoren, wie die Dosis, der Applikationsweg und die Selektivität bezüglich cGKI und/oder CNG-Kanälen entscheidend dafür, ob pro- oder antinozizeptive Effekte hervorgerufen werden.

Aufgrund der nach Zymosaninjektion erhöhten mechanischen Hyperalgesie in CNGA3^{-/-}-Mäusen wurde ebenfalls die Zymosan-induzierte thermische Hyperalgesie in diesen Mäusen untersucht. Verglichen mit den Wildtyp-Mäusen entwickelten CNGA3^{-/-}-Mäuse aber keine erhöhte thermische Hyperalgesie. Nozizeptive mechanische Stimuli werden von nicht-peptidergen, IB4-positiven primär afferenten Neuronen vermittelt, während für die Transmission nozizeptiv thermischer Stimuli die peptidergen, CGRP- und Substanz P-positiven primär afferenten Neurone zuständig sind (Cavanaugh et al., 2009). Unterschiedliche Subpopulationen von primär afferenten C-Fasern sind also für die Transmission nozizeptiver mechanischer bzw. thermischer Stimuli verantwortlich. Der Knockout von CNGA3 betrifft also scheinbar nur die nicht-peptiderge Subpopulation der C-Fasern. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass IB4-positive, jedoch nicht die peptidergen primär afferenten Neurone, Synapsen mit inhibitorischen Interneuronen (sog. Inselzellen) in Lamina II des Rückenmarks ausbilden (Morris et al., 2004). Dieses könnte erklären, warum CNGA3^{-/-}-Mäuse eine verstärkte mechanische, aber keine erhöhte thermische Hyperalgesie entwickeln.

Zusätzlich zu der verstärkten Hyperalgesie im Modell der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie zeigten die CNGA3^{-/-}-Mäuse auch eine späte, dritte Phase mit gesteigertem Leckverhalten im Formalin-Test (61 - 80 min nach Injektion). Phase 1 und 2 hingegen unterschieden sich nicht signifikant von denen der Wildtyp-Mäuse. In den meisten Studien, die einen Formalin-Test beinhalten, wird das Leckverhalten nur bis zu einer Stunde nach Formalininjektion gemessen. Infolgedessen sind die der Phase 3 zugrundeliegenden Mechanismen bisher wenig untersucht worden (Kim et al., 1999). Es wird vermutet, dass Aktivitätsänderungen in Netzwerken des Vorderhirns das Auftreten und den Ablauf des durch die zentrale Sensibilisierung induzierten nozizeptiven Verhaltens in Phase 2 kontrollieren. Die abgeschwächte Reaktion in Phase 3, verglichen mit Phase 2, könnte die Folge einer gesteigerten Aktivität inhibitorischer Neurone des Vorderhirns während anhaltender nozizeptiver Stimulation primärer afferenter Fasern sein (Porro et al., 2003; Huang et al., 2006). In einer aktuellen Studie mit CRP4^{-/-}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass neben supraspinalen Mechanismen ebenfalls spinale Mechanismen zur Hemmung des nozizeptiven Verhaltens während der Phase 3 des Formalin-Tests beitragen (Schmidtko et al., 2008b). Dieses konnte aufgrund der inhibitorischen Wirkung von CRP4 während inflammatorischer Hyperalgesie und dessen Lokalisation in Spinalganglien und Rückenmark, jedoch nicht in supraspinalen Arealen, gefolgert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen

vermuten, dass CNGA3 in die Abschwächung der Formalin-induzierten nozizeptiven Reaktion in Phase 3 involviert sein könnte. Es bedarf aber noch einiger Untersuchungen, um die der Phase 3 zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine inhibitorische Funktion der CNG-Kanal-Untereinheit CNGA3 in der Entwicklung der Hyperalgesie während inflammatorischer Schmerzen hin. Die Lokalisation von CNGA3 und mögliche Mechanismen sind in Abbildung 38 zusammengefasst.

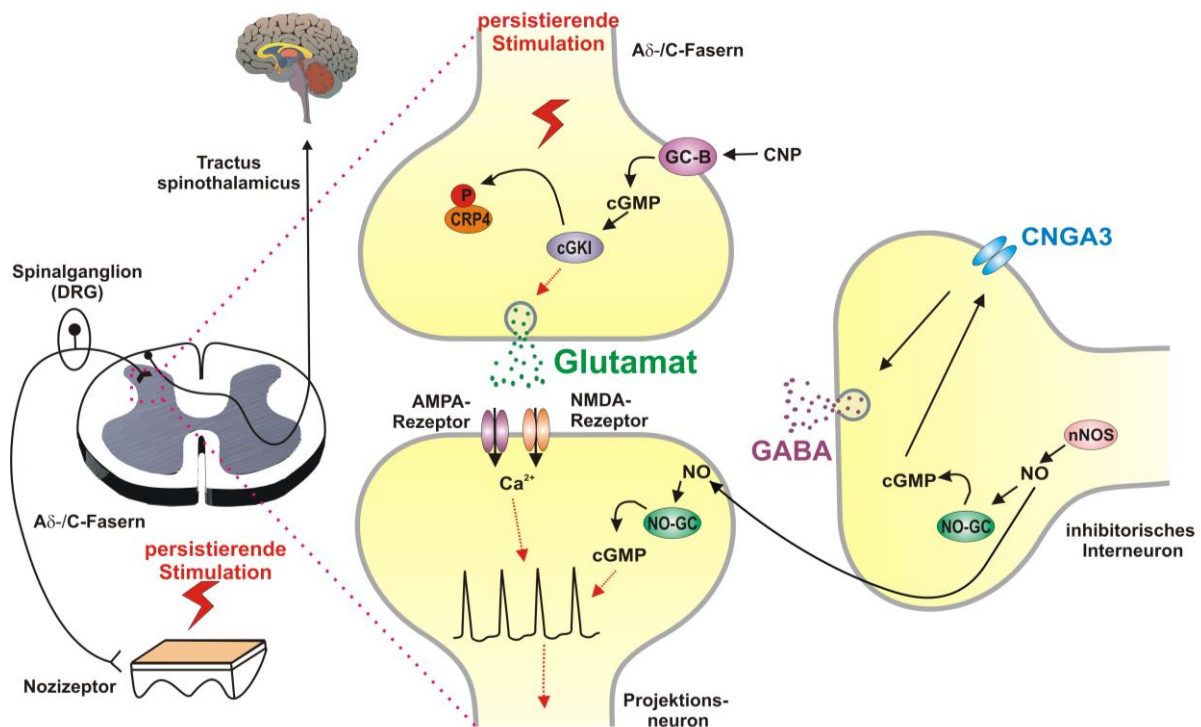


Abbildung 38. Lokalisation von CNGA3 im Rückenmark. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultierende Übersicht der cGMP-vermittelten Signalwege in den Spinalganglien und im Rückenmark mit hypothetischer Lokalisation der CNG-Kanal-Untereinheit CNGA3 in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks. cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CNP: C-type natriuretic peptide, CRP4: Cysteine-rich protein 4, GABA: γ -Aminobuttersäure, GC-B: Guanylatzyklase B, nNOS: neuronale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, NO-GC: NO-sensitive Guanylatzyklase, P: Phosphatrest

4.2. CNGB1 als ‚Target‘ der cGMP-vermittelten Nozizeption

Die zelluläre Lokalisation von CNGB1 im Rückenmark wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Die Detektion des CNGB1-Proteins war mittels des Tyramide Signal Amplification-Systems möglich. CNGB1 wird im Rückenmark voraussichtlich in Neuronen exprimiert, wie die Kolo-kalisation mit dem neuronalen Marker NeuN zeigt (siehe Abbildung 32 C). Zudem wird CNGB1 noch diffus in Laminae I bis III im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert, weist jedoch keine Kolo-kalisation mit IB4, einem Marker für nicht-peptiderge C-Faser-Terminale in der inneren Lamina II und Substanz P, welches in peptidergen C-Faser-Terminale in Lamina I und der äußeren Lamina II exprimiert wird, auf. Aufgrund der Nähe von CNGB1-exprimierenden Neuronen und den C-Faser-Terminale der primär afferenten Neurone wäre jedoch die Ausbildung synaptischer Kontakte zwischen diesen Zellen möglich.

Die Expression von CNGB1 im Rückenmark konnte mit Hilfe der Real-time quantitativen PCR auf mRNA-Ebene bestätigt werden (siehe Abbildung 30). Auf mRNA-Ebene war ebenfalls eine geringe CNGB1-Expression in den Spinalganglien ersichtlich, jedoch liegt in den Spinalganglien wahrscheinlich zu wenig CNGB1-Protein vor, um es mit der immunhistochemischen Färbung detektieren zu können. Nach Zymosaninjektion in eine Hinterpfote der Maus konnte jedoch eine Hochregulation der CNGB1-mRNA in den Spinalganglien detektiert werden (vgl. Abbildung 33). Diese CNG-Kanal-Untereinheit könnte also trotz ihrer geringen basalen Expression in Spinalganglien in der Schmerzverarbeitung von Relevanz sein.

Im Formalin-Test zur Messung inflammatorischer Schmerzen zeigten CNGB1^{-/-}-Mäuse eine späte vierte Phase (81 - 110 min) des Pfotenleckens. In Phase 3 wiesen CNGB1^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse ein sehr reduziertes Leckverhalten auf. In Phase 1 und Phase 4 entwickelten die CNGB1^{-/-}-Mäuse eine signifikant erhöhte Leckzeit. Die Phase 2 bildete sich in beiden Genotypen gleichermaßen aus (siehe Abbildung 35). Die abgeschwächte Reaktion in Phase 3, verglichen mit Phase 2, wäre erneut als Folge einer gesteigerten Aktivität inhibitorischer Neurone des Vorderhirns während anhaltender nozizeptiver Stimulation primärer afferenter Fasern erklärbar (Porro et al., 2003; Huang et al., 2006). Die CNG-Kanal-Untereinheit CNGB1 könnte in eine späte, verzögerte Abschwächung der Formalin-induzierten nozizeptiven Reaktion in Phase 3 involviert sein. Jedoch bedarf es auch hier noch einiger Untersuchungen, um die der Phase 3 und 4 zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Die signifikant erhöhte Leckzeit von CNGB1^{-/-}-Mäusen in Phase 1, welche durch eine akute Nozizeptorstimulation hervorgerufen wird, spiegelte sich auch in den unterschiedlichen basalen Latenzzeiten zwischen CNGB1^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Modell der Zymosan-induzierten mechanischen Hyperalgesie wieder. Das akute nozizeptive

Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen müsste mit einer größeren Anzahl an Tieren noch eingehender untersucht werden.

Da CNGB1^{-/-}-Mäuse tendenziell ein verstärktes nozizeptives Verhalten verglichen mit den Wildtyp-Mäusen zeigten, könnte CNGB1 ebenfalls eine inhibitorische Funktion in der Schmerzverarbeitung einnehmen. Dieses konnte durch die intrathekale Applikation eines cGMP-Analogons bestätigt werden. Nach i.t. Injektion von 8-pCPT-cGMP entwickelten CNGB1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine verstärkte mechanische Allodynie. 8-pCPT-cGMP, als Agonist von CNG-Kanälen und der cGKI, aktiviert mit der cGKI einen pronozizeptiven Signalweg und mit der Aktivierung von CNG-Kanälen gleichzeitig einen antinozizeptiven Signalweg. In Wildtyp-Mäusen gleichen sich diese gegensätzlichen Wirkungen nahezu aus, wobei mit der cGKI ein starker pronozizeptiver Weg aktiviert und daher trotzdem noch eine Allodynie generiert wird. In CNGB1^{-/-}-Mäusen ist der antinozizeptive Signalweg ausgeschaltet, während der pronozizeptive cGKI-Signalweg aktiv ist. CNGB1^{-/-}-Mäuse entwickeln daher eine verstärkte mechanische Allodynie. CNGB1 scheint also in die cGMP-abhängige Schmerzverarbeitung involviert zu sein.

Ob die CNG-Kanal-Untereinheit CNGB1 tatsächlich cGMP-abhängig in die Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen oder eher in die Entwicklung akuter oder neuropathischer Schmerzen involviert ist, muss noch detaillierter geklärt werden. Das nozizeptive Verhalten von CNGB1^{-/-}-Mäusen in Modellen für neuropathische Schmerzen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Aufgrund der Ergebnisse des Formalin-Tests und der verstärkten mechanischen Allodynie von CNGB1^{-/-}-Mäusen nach i.t. Injektion eines cGMP-Analogons könnte CNGB1 aber auch, möglicherweise zusammen mit CNGA3, in die Verarbeitung inflammatorischer Schmerzen involviert sein. Dafür würde auch die neuronale Expression beider CNG-Kanal-Untereinheiten im Hinterhorn des Rückenmarks sprechen. Eine Lokalisation von CNGB1 in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks wäre daher unbedingt zu untersuchen. Die im Gegensatz zu CNGA3^{-/-}-Mäusen nicht so prägnanten Ergebnisse aus den Schmerzmodellen mit CNGB1^{-/-}-Mäusen könnten dadurch zu erklären sein, dass es sich bei CNGB1 nur um eine modulatorische Untereinheit handelt, während CNGA3 eine funktionelle Untereinheit darstellt (Biel und Michalakis, 2009).

Da CNG-Kanäle aus vier Untereinheiten aufgebaut sind, stellt sich nun die Frage, ob im Rückenmark und in den Spinalganglien ein homomerer CNGA3-Kanal aktiv ist, oder ob CNGA3 mit den anderen während dieser Arbeit identifizierten Untereinheiten, möglicherweise mit CNGB1, heteromere Kanäle bildet (siehe Abbildung 39). Es ist bekannt, dass CNGA3 in heterologen Expressionssystemen in Abwesenheit anderer CNG-Kanal-Untereinheiten funktionelle Kanäle ausbilden kann (Weyand et al., 1994). In Photorezeptoren und olfaktorischen Rezeptorneuronen aber sind CNG-Kanäle Heteromere und daher aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Biel und Michalakis, 2009). Denkbar wäre auch

eine Kollokalisierung von CNGB1 mit der weiteren im Rückenmark exprimierten funktionellen Untereinheit CNGA2. Ferner bleibt zu untersuchen, ob weitere CNG-Kanal-Untereinheiten in die Verarbeitung von Schmerzen involviert sind und pro- oder antinozizeptive cGMP-Effekte vermitteln.

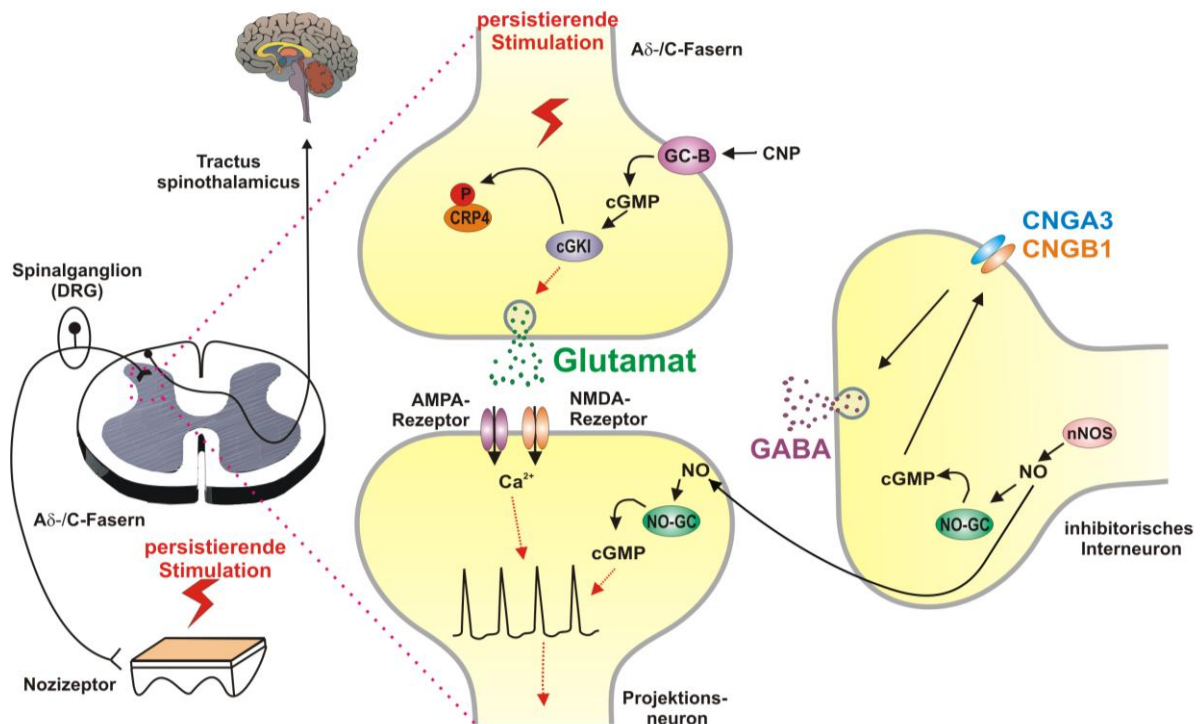


Abbildung 39. Lokalisation von CNGA3 und CNGB1 im Rückenmark. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultierende Übersicht der cGMP-vermittelten Signalwege in den Spinalganglien und im Rückenmark mit hypothetischer Lokalisation der CNG-Kanal-Untereinheiten CNGA3 und CNGB1 in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks. cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CNP: C-type natriuretic peptide, CRP4: Cysteine-rich protein 4, GABA: γ -Aminobuttersäure, GC-B: Guanylatzyklase B, nNOS: neuronale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, NO-GC: NO-sensitive Guanylatzyklase, P: Phosphatrest

4.3. Therapiemöglichkeiten

Wie bereits eingangs erwähnt, spielen NO- und cGMP-abhängige Signalwege eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung infolge inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen. Daraus wurde geschlossen, dass eine pharmakologische Hemmung der NO- und cGMP-vermittelten Signalwege potentiell eine neue Möglichkeit sein könnte, sowohl inflammatorische als auch neuropathische Schmerzen zu therapieren. Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit scheint zudem auch eine Aktivierung endogener schmerzhemmender Systeme eine neue Therapieoption zu sein.

Ein längst etabliertes, über den NO/cGMP-Signalweg wirkendes Arzneimittel ist Sildenafil (Viagra®), welches bei erektiler Dysfunktion eingesetzt wird. Als selektiver Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase 5 (PDE 5) blockiert dieses den Abbau von cGMP in den den Schwellkörper des Penis versorgenden Blutgefäßen. Der resultierende erhöhte Blutspiegel an cGMP führt zu einer Verstärkung der gefäßerweiternden Wirkung von NO.

Ein neues analgetisches Prinzip könnte daher die Entwicklung eines selektiven Inhibitors der für den cGMP-Abbau in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks verantwortlichen Phosphodiesterase sein. Durch die resultierende erhöhte cGMP-Konzentration könnten dann vermehrt CNG-Kanäle aktiviert werden, welche eine inhibitorische Wirkung einnehmen. Daher wäre es spannend, in zukünftigen Studien die entsprechende Phosphodiesterase in inhibitorischen Interneuronen des Rückenmarks zu identifizieren.

Ein weiteres Prinzip, nämlich die gezielte Aktivierung endogener schmerzhemmender Mechanismen, wäre auch für die CNG-Kanäle der inhibitorischen Interneurone denkbar. Es bedürfte der Entwicklung eines Wirkstoffes, der spezifisch die CNGA3-Untereinheit von CNG-Kanälen aktiviert und folglich inflammatorische Schmerzen reduziert. Eine Aktivierung der CNG-Kanäle wurde im Rahmen dieser Arbeit mit zwei verschiedenen cGMP-Analoga erreicht. Diese hatten allerdings immer auch einen Effekt auf die cGMP-abhängige Proteinkinase I, waren also nicht spezifisch für CNG-Kanäle. Diese könnten demnach nicht zur Entwicklung eines therapeutisch wirksamen CNG-Kanal-Aktivators beitragen, da durch die gleichzeitige Beeinflussung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I erhebliche Nebenwirkungen zu erwarten wären. Weitere Untersuchungen in vivo könnten mit dem ebenfalls kommerziell erhältlichen cGMP-Analogen 8-Fluo-cGMP (Biolog) durchgeführt werden. Eine ähnliche Verbindung wurde als der wirksamste CNG-Kanal-Aktivator beschrieben (Tanaka et al., 1989; Koutalos et al., 1995). Sollte eine spezifische Wirkung nur an CNG-Kanälen vorliegen, könnte dieses cGMP-Analagon bei der Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren CNG-Kanal-Aktivators weiterhelfen. Eine spezifische Wirkung, ohne gleichzeitige Beeinflussung anderer ‚Targets‘, ist therapeutisch besonders wichtig, um mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen auszuschließen bzw. zu minimieren.

5. Zusammenfassung

Bei anhaltenden Schmerzen wird im Rückenmark zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet, welches zur zentralen Sensibilisierung des nozizeptiven Systems beiträgt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle (CNG-Kanäle) im nozizeptiven System exprimiert werden und Effektoren der cGMP-vermittelten Schmerzverarbeitung darstellen könnten. Im Rahmen der Untersuchungen wurden insbesondere die CNG-Kanal-Untereinheiten CNGA3 und CNGB1 als potentielle cGMP-„Targets“ in der Schmerzverarbeitung identifiziert. Die Expression von CNGA3 wird infolge einer nozizeptiven Stimulation der Hinterpfote der Maus im Rückenmark und in den Spinalganglien hochreguliert. Mittels In situ-Hybridisierung konnte eine neuronale Lokalisation von CNGA3 in inhibitorischen Interneuronen im Hinterhorn des Rückenmarks detektiert werden, wohingegen CNGA3 in den Spinalganglien nicht-neuronal exprimiert wird. Überraschenderweise wiesen Mäuse mit einem CNGA3-Knockout (CNGA3^{-/-}-Mäuse) ein gesteigertes nozizeptives Verhalten in Modellen für inflammatorische Schmerzen auf, während ihr Verhalten in Modellen für akute und neuropathische Schmerzen normal ausfiel. Zudem entwickelten CNGA3^{-/-}-Mäuse nach intrathekaler Applikation von cGMP-Analoga oder NO-Donoren eine verstärkte Allodynie. Die CNG-Kanal-Untereinheit CNGB1 wird ebenfalls in Rückenmark und Spinalganglien exprimiert. Im Rückenmark wird die CNGB1-Expression infolge eines nozizeptiven Stimulus der Hinterpfote nicht reguliert, während in den Spinalganglien eine Hochregulation stattfindet. Mit immunhistochemischen Färbungen konnte CNGB1 in Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks, aber auch diffus verteilt in Laminae I bis III des Hinterhorns lokalisiert werden. Auch Mäuse mit einem CNGB1-Knockout (CNGB1^{-/-}-Mäuse) zeigten ein gesteigertes nozizeptives Verhalten in einem Modell für inflammatorische Schmerzen und entwickelten außerdem eine verstärkte Allodynie nach i.t. Injektion eines cGMP-Analogons. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CNGA3 und CNGB1 als „Targets“ des cGMP-vermittelten Signalweges im Rückenmark in inhibitorischer Weise zur zentralen Sensibilisierung während inflammatorischer Schmerzen beitragen. Eine spezifische pharmakologische Aktivierung von CNG-Kanälen im Rückenmark könnte potentiell eine neue Möglichkeit sein, inflammatorische Schmerzen zu hemmen.

6. Abkürzungsverzeichnis

5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
8-pCPT-cGMP	8- (4- Chlorophenylthio) guanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate
AC	Adenylatzyklase
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid (künstliche Zerebrospinalflüssigkeit)
AF488	Alexa Fluor 488
AG	Antigen
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BK _{Ca} -Kanal	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal
BNP	Brain natriuretic peptide
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
Ca ²⁺	Kalziumion
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I (auch PKG-I, Proteinkinase G-I)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
Cl ⁻	Chloridion
CNBD	Cyclic nucleotide-binding domain
CNG	Cyclic nucleotide-gated
CNP	C-type natriuretic peptide
CO ₂	Kohlendioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP4	Cysteine-rich protein 4
C _T	Cycle threshold
Cy3	Cyanin 3
Dig	Digoxigenin

<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRGs	Dorsal root ganglia (Spinalganglien)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP2-R	Prostaglandin E2-Rezeptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanzenergietransfer
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD 65/67	Glutamat-Decarboxylase (Isoformen 65 kDa & 67 kDa)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARP	Glutamic acid rich protein
GC	Guanylatzyklase (auch NPR, natriuretic peptide receptor)
GCAP	Guanylatzyklase-aktivierendes Protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GG	Grüneberg Ganglion
GlyR α 3	α 3-Untereinheit des Glycinrezeptors
G _{olf}	olfaktorisches G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Proton, Wasserstoffion
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IB4	Isolectin B4
Iba1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
ID	inner diameter (innerer Durchmesser)
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
i.t.	intrathekal
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L1 - L6	Lumbalmark
LiCl	Lithiumchlorid
LTP	Langzeit-Potenzierung
M	Mol
MAP	Mitogen-activated protein
Mg ²⁺	Magnesiumion
MGB	Minor groove binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGlu-R	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
MOE	Main olfactory epithelium (olfaktorisches Epithel)
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na ⁺	Natriumion
NaCl	physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
n.d.	nicht detektiert
NeuN	Nuclear neuronal protein
NFQ	nicht -fluoreszierender Quencher-Farbstoff
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal goat serum (Ziegenserum)
NK1R	Neurokinin 1-Rezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOC-5	1-Hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene
NO-GC	NO-sensitive Guanylatzyklase (auch sGC, soluble guanylyl cyclase)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
OD	outer diameter (äußerer Durchmesser)
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	Olfactory receptor neuron (olfaktorisches Rezeptorneuron)
P	Phosphatrest
P	<i>Taq</i> -Polymerase

PAG	periaquäduktales Grau
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBSTween	PBS mit 0,1 % Tween 20
PBSTx	PBS mit 0,1 % Triton-X 100
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
pH	Potentia hydrogenii
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
R	Reporter
R	Rezeptor
Rh	Rhodopsin
RM	Rückenmark
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP	Retinitis pigmentosa
Rp-8-pCPT-cGMPS	8- (4- Chlorophenylthio) guanosine- 3', 5'- cyclic monophosphorothioate, Rp- isomer
rpm	Rounds per minute (Runden pro Minute)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RTq-PCR	Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion
RVM	rostromediale Medulla
s	Sekunde
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SNI	Spared nerve injury
SOM	Septal Organ von Masera
SSC	Saline sodium citrate (Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer)
T	Transducin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	Transforming growth factor-β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α

TrkB-R	Tyrosinkinase B-Rezeptor
tRNA	transfer ribonucleic acid
TRPA1	Transient receptor potential cation channel, member A1
TSA	Tyramide Signal Amplification
UV	Ultraviolett
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
VNO	Vomeronasalorgan
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Abbadie, C., Lindia, J. A., Cumiskey, A. M., Peterson, L. B., Mudgett, J. S., Bayne, E. K., DeMartino, J. A., MacIntyre, D. E., und Forrest, M. J. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 7947-7952.
- Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S. R., und Kimura, H. (1991). Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol* 306, 382-392.
- Applied Biosystems (2008). TaqMan Gene Expression Assays Protocol.
- Bakalyar, H. A., und Reed, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250, 1403-1406.
- Baker, H., Cummings, D. M., Munger, S. D., Margolis, J. W., Franzen, L., Reed, R. R., und Margolis, F. L. (1999). Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *J. Neurosci* 19, 9313-9321.
- Bareil, C., Hamel, C. P., Delague, V., Arnaud, B., Demaille, J., und Claustres, M. (2001). Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum. Genet* 108, 328-334.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., und Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
- Baumgärtner, U. (2010). [Nociceptive system : Nociceptors, fiber types, spinal pathways, and projection areas]. *Schmerz* 24, 105-113.
- Bennett, G. J., und Mayer, D. J. (1979). Inhibition of spinal cord interneurons by narcotic microinjection and focal electrical stimulation in the periaqueductal central gray matter. *Brain Res* 172, 243-257.
- Bernardi, P. S., Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H., und Rustioni, A. (1995). Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J. Neurosci* 15, 1363-1371.
- Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Dascal, N., Kaupp, U. B., und Hofmann, F. (1993). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett* 329, 134-138.
- Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E., und Hofmann, F. (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 7553-7557.
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 3505-3509.

- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A., und Hofmann, F. (1996). Molecular cloning and expression of the Modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J. Biol. Chem* 271, 6349-6355.
- Biel, M. (2009). Cyclic Nucleotide-regulated Cation Channels. *J Biol Chem* 284, 9017-21.
- Biel, M., und Michalakakis, S. (2009). Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol*, 111-36.
- Boettger, M. K., Uceyler, N., Zelenka, M., Schmitt, A., Reif, A., Chen, Y., und Sommer, C. (2007). Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain* 11, 810-818.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G. V., Kaupp, U. B., und Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci* 19, 5332-5347.
- Bönigk, W., Müller, F., Middendorff, R., Weyand, I., und Kaupp, U. B. (1996). Two alternatively spliced forms of the cGMP-gated channel alpha-subunit from cone photoreceptor are expressed in the chick pineal organ. *J. Neurosci* 16, 7458-7468.
- Bos, J. L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci* 31, 680-686.
- Bourquin, A., Süveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A. C., Spahn, D. R., und Decosterd, I. (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122, 14.e1-14.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H. A., und Zinn, K. (1994). Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 8890-8894.
- Bradley, J., Zhang, Y., Bakin, R., Lester, H. A., Ronnett, G. V., und Zinn, K. (1997). Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J. Neurosci* 17, 1993-2005.
- Bradley, J., Reisert, J., und Frings, S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol* 15, 343-349.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., und Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.
- Brown, S. M., Dubin, A. E., und Chaplan, S. R. (2004). The role of pacemaker currents in neuropathic pain. *Pain Pract* 4, 182-193.
- Brunet, L. J., Gold, G. H., und Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17, 681-693.
- Buck, L., und Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.

- Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I., und Anderson, D. J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 9075-9080.
- Cervero, F., und Laird, J. (1991). One Pain or Many Pains? *News Physiol Sci* 6, 268-273.
- Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R. J., Robinson, D. W., und McNaughton, P. A. (1989). Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* 337, 740-743.
- Chen, T. Y., Peng, Y. W., Dhallan, R. S., Ahamed, B., Reed, R. R., und Yau, K. W. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362, 764-767.
- Chomczynski, P., und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162, 156-159.
- Chu, Y., Guan, Y., Skinner, J., Raja, S. N., Johns, R. A., und Tao, Y. (2005). Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain* 119, 113-123.
- Coderre, T. J., Vaccarino, A. L., und Melzack, R. (1990). Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535, 155-158.
- Craven, K. B., und Zagotta, W. N. (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol* 68, 375-401.
- D'Amour, F. E., und Smith, D. L. (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharm. Exp. Ther.* 72, 74-79.
- Decosterd, I., und Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.
- Deutsche Gesellschaft zum Studium des Schmerzes e.V. (DGSS) (2010).
- Deutsche Schmerzilfe e.V. (2010).
- Deutsche Schmerzliga e.V. (2010).
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A., und Reed, R. R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347, 184-187.
- Ding, J., und Weinberg, R. J. (2006). Localization of soluble guanylyl cyclase in the superficial dorsal horn. *J. Comp. Neurol* 495, 668-678.
- Ding, X., Harry, C. S., Umino, Y., Matveev, A. V., Fliesler, S. J., und Barlow, R. B. (2009). Impaired cone function and cone degeneration resulting from CNGB3 deficiency: down-regulation of CNGA3 biosynthesis as a potential mechanism. *Hum. Mol. Genet* 18, 4770-4780.
- D'Mello, R., und Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101, 8-16.

- Dorf, M. E., Berman, M. A., Tanabe, S., Heesen, M., und Luo, Y. (2000). Astrocytes express functional chemokine receptors. *J. Neuroimmunol* 111, 109-121.
- Dryja, T. P., Finn, J. T., Peng, Y. W., McGee, T. L., Berson, E. L., und Yau, K. W. (1995). Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 10177-10181.
- Dubuisson, D., und Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.
- Echeverry, S., Shi, X. Q., und Zhang, J. (2008). Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 135, 37-47.
- Eddy, N. B., und Leimbach, D. (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 107, 385-393.
- Eksandh, L., Kohl, S., und Wissinger, B. (2002). Clinical features of achromatopsia in Swedish patients with defined genotypes. *Ophthalmic Genet* 23, 109-120.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A., und Koesling, D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 7699-7704.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M., und Kaupp, U. B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15, 169-179.
- Garry, M. G., Abraham, E., Hargreaves, K. M., und Aanonsen, L. M. (1994). Intrathecal injection of cell-permeable analogs of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate produces hyperalgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol* 260, 129-131.
- Gerstner, A., Zong, X., Hofmann, F., und Biel, M. (2000). Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J Neurosci* 20, 1324-32.
- Giorgetti, A., Nair, A. V., Codega, P., Torre, V., und Carloni, P. (2005). Structural basis of gating of CNG channels. *FEBS Lett* 579, 1968-1972.
- Guan, Y., Yaster, M., Raja, S. N., und Tao, Y. (2007). Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain* 3, 29.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., und Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., et al. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.
- Henrich, M., Hoffmann, K., König, P., Gruss, M., Fischbach, T., Gödecke, A., Hempelmann, G., und Kummer, W. (2002). Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Mol. Cell. Neurosci* 20, 307-322.

- Herdegen, T., Rüdiger, S., Mayer, B., Bravo, R., und Zimmermann, M. (1994). Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Brain Res. Mol. Brain Res* 22, 245-258.
- Higgins, M. K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, G. F. X., und Kaupp, U. B. (2002). Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains. *EMBO J* 21, 2087-2094.
- Hodgkin, A. L., McNaughton, P. A., und Nunn, B. J. (1985). The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathway in toad rods. *J. Physiol. (Lond.)* 358, 447-468.
- Hofmann, F., Biel, M., und Kaupp, U. B. (2005). International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacol. Rev* 57, 455-462.
- Huang, J., Chang, J., Woodward, D. J., Baccalá, L. A., Han, J., Wang, J., und Luo, F. (2006). Dynamic neuronal responses in cortical and thalamic areas during different phases of formalin test in rats. *Exp. Neurol* 200, 124-134.
- Hunskar, S., Fasmer, O. B., und Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods* 14, 69-76.
- Hüttl, S. (2004). Untersuchungen zur physiologischen Rolle von B-Untereinheiten zyklonukleotid-aktivierter Kationenkanäle anhand einer CNGB1-defizienten Mauslinie. Available at: <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/4325/> [Zugegriffen Mai 25, 2010].
- Hüttl, S., Michalakis, S., Seeliger, M., Luo, D., Acar, N., Geiger, H., Hudl, K., Mader, R., Haverkamp, S., Moser, M., et al. (2005). Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. *J Neurosci* 25, 130-8.
- Ikeda, H., Kusudo, K., und Murase, K. (2006). Nitric oxide-dependent long-term potentiation revealed by real-time imaging of nitric oxide production and neuronal excitation in the dorsal horn of rat spinal cord slices. *Eur. J. Neurosci* 23, 1939-1943.
- Iwamoto, E. T., und Marion, L. (1994). Pharmacological evidence that nitric oxide mediates the antinociception produced by muscarinic agonists in the rostral ventral medulla of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 269, 699-708.
- Ji, G., Zhang, Y., Ma, F., Cao, X., und Wu, G. (2002). Inhibitory effects of intrathecally administered interleukin-1beta on carrageenan-induced hyperalgesia and spinal c-Fos expression in rats. *Neurosci. Lett* 328, 137-140.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., und MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515-522.
- Jiang, Y., Sun, Q., Tu, H., und Wan, Y. (2008). Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. *Neurochem. Res* 33, 1979-1989.
- Jin, S., Zhuang, Z., Woolf, C. J., und Ji, R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J. Neurosci* 23, 4017-4022.

- Johns, R. A. (2000). Expression and action of cyclic GMP-dependent protein kinase I α in inflammatory hyperalgesia in rat spinal cord. *Neuroscience* 95, 525-533.
- Johnson, S., Michaelides, M., Aligianis, I. A., Ainsworth, J. R., Mollon, J. D., Maher, E. R., Moore, A. T., und Hunt, D. M. (2004). Achromatopsia caused by novel mutations in both CNGA3 and CNGB3. *J. Med. Genet* 41, e20.
- Jones, T. L., und Sorkin, L. S. (2005). Activated PKA and PKC, but not CaMKII α , are required for AMPA/Kainate-mediated pain behavior in the thermal stimulus model. *Pain* 117, 259-270.
- Julius, D., und Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Kalloniatis, M., und Fletcher, E. L. (2004). Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clin Exp Optom* 87, 65-80.
- Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M., und Noguchi, K. (2006). Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *J. Neurosci* 26, 8680-8690.
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H., und Hirose, T. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342, 762-766.
- Kaupp, U. B., und Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824.
- Kawasaki, Y., Kohno, T., Zhuang, Z., Brenner, G. J., Wang, H., Van Der Meer, C., Befort, K., Woolf, C. J., und Ji, R. (2004). Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J. Neurosci* 24, 8310-8321.
- Kelliher, K. R., Ziesmann, J., Munger, S. D., Reed, R. R., und Zufall, F. (2003). Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 4299-4304.
- Kellner, U., Wissinger, B., Kohl, S., Kraus, H., und Foerster, M. H. (2004). [Molecular genetic findings in patients with congenital cone dysfunction. Mutations in the CNGA3, CNGB3, or GNAT2 genes]. *Ophthalmologe* 101, 830-835.
- Kennan, A., Aherne, A., und Humphries, P. (2005). Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet* 21, 103-110.
- Khasabov, S. G., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Peters, C. M., Mantyh, P. W., und Simone, D. A. (2002). Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J. Neurosci* 22, 9086-9098.
- Kim, D., Kim, M. A., Cho, I., Kim, M. S., Lee, S., Jo, E., Choi, S., Park, K., Kim, J. S., Akira, S., et al. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J. Biol. Chem* 282, 14975-14983.

- Kim, S. J., Calejesan, A. A., Li, P., Wei, F., und Zhuo, M. (1999). Sex differences in late behavioral response to subcutaneous formalin injection in mice. *Brain Res* 829, 185-189.
- Kingston, P. A., Zufall, F., und Barnstable, C. J. (1996). Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 10440-10445.
- Kishimoto, I., Tokudome, T., Horio, T., Soeki, T., Chusho, H., Nakao, K., und Kangawa, K. (2008). C-type natriuretic peptide is a Schwann cell-derived factor for development and function of sensory neurones. *J. Neuroendocrinol* 20, 1213-1223.
- Kleene, S. J., und Gesteland, R. C. (1991). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci* 11, 3624-3629.
- Kohl, S., Marx, T., Giddings, I., Jägle, H., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Sharpe, L. T., und Wissinger, B. (1998). Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat. Genet* 19, 257-259.
- Körschen, H. G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dosé, A., und Godde, M. (1995). A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* 15, 627-636.
- Koutalos, Y., Brown, R. L., Karpen, J. W., und Yau, K. W. (1995). Diffusion coefficient of the cyclic GMP analog 8-(fluoresceiny)thioguanosine 3',5' cyclic monophosphate in the salamander rod outer segment. *Biophys. J* 69, 2163-2167.
- Kramer, R. H., und Tibbs, G. R. (1996). Antagonists of cyclic nucleotide-gated channels and molecular mapping of their site of action. *J. Neurosci* 16, 1285-1293.
- Kruse, L. S., Sandholdt, N. T. H., Gammeltoft, S., Olesen, J., und Kruuse, C. (2006). Phosphodiesterase 3 and 5 and cyclic nucleotide-gated ion channel expression in rat trigeminovascular system. *Neurosci Lett* 404, 202-7.
- Kurahashi, T., und Yau, K. W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363, 71-74.
- Laing, I., Todd, A. J., Heizmann, C. W., und Schmidt, H. H. (1994). Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61, 123-132.
- Ledda, M., Blum, E., De Palo, S., und Hanani, M. (2009). Augmentation in gap junction-mediated cell coupling in dorsal root ganglia following sciatic nerve neuritis in the mouse. *Neuroscience* 164, 1538-1545.
- Light, A. R., und Kavookjian, A. M. (1988). Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *J. Comp. Neurol* 267, 172-189.
- Lowe, G., und Gold, G. H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366, 283-286.

- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D., und Kaupp, U. B. (1990). Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett* 270, 24-29.
- Luo, Z. D., Chaplan, S. R., Scott, B. P., Cizkova, D., Calcutt, N. A., und Yaksh, T. L. (1999). Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J. Neurosci* 19, 9201-9208.
- Luo, Z. D., und Cizkova, D. (2000). The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain* 4, 459-466.
- Ma, M. (2007). Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 42, 463-480.
- Mabuchi, T., Shintani, N., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Hashimoto, H., Muratani, T., Minami, T., Baba, A., und Ito, S. (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *J. Neurosci* 24, 7283-7291.
- Maihöfner, C., Euchenhofer, C., Tegeder, I., Beck, K. F., Pfeilschifter, J., und Geisslinger, G. (2000). Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci. Lett* 290, 71-75.
- Mandiyani, V. S., Coats, J. K., und Shah, N. M. (2005). Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat. Neurosci* 8, 1660-1662.
- Mantyh, P. W., Rogers, S. D., Honore, P., Allen, B. J., Ghilardi, J. R., Li, J., Daughters, R. S., Lappi, D. A., Wiley, R. G., und Simone, D. A. (1997). Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278, 275-279.
- Martucci, C., Trovato, A. E., Costa, B., Borsani, E., Franchi, S., Magnaghi, V., Panerai, A. E., Rodella, L. F., Valsecchi, A. E., Sacerdote, P., et al. (2008). The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain* 137, 81-95.
- McMahon, S. (2006). *Wall and Melzack's textbook of pain* 5. Aufl. (Oxford: Elsevier).
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 13525-13530.
- Meller, S. T., und Gebhart, G. F. (1997). Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain* 1, 43-52.
- Michaelides, M., Hunt, D. M., und Moore, A. T. (2004). The cone dysfunction syndromes. *Br J Ophthalmol* 88, 291-297.
- Michalakis, S., Reisert, J., Geiger, H., Wetzelsch, C., Zong, X., Bradley, J., Spehr, M., Hüttl, S., Gerstner, A., Pfeifer, A., et al. (2006). Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping. *J Biol Chem* 281, 35156-66.

- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., et al. (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80, 67-82.
- Morris, R., Cheunsuang, O., Stewart, A., und Maxwell, D. (2004). Spinal dorsal horn neurone targets for nociceptive primary afferents: do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level. *Brain Res. Brain Res. Rev* 46, 173-190.
- Munger, S. D., Lane, A. P., Zhong, H., Leinders-Zufall, T., Yau, K. W., Zufall, F., und Reed, R. R. (2001). Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca²⁺-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science* 294, 2172-2175.
- Murray, C. W., Porreca, F., und Cowan, A. (1988). Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J Pharmacol Methods* 20, 175-186.
- Mutschler Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie (2008). 9. Aufl. (Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft).
- Nakamura, T., und Gold, G. H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442-444.
- Nichols, M. L., Allen, B. J., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Honore, P., Luger, N. M., Finke, M. P., Li, J., Lappi, D. A., Simone, D. A., et al. (1999). Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 286, 1558-1561.
- Nishiguchi, K. M., Sandberg, M. A., Gorji, N., Berson, E. L., und Dryja, T. P. (2005). Cone cGMP-gated channel mutations and clinical findings in patients with achromatopsia, macular degeneration, and other hereditary cone diseases. *Hum. Mutat* 25, 248-258.
- Paoletti, P., Young, E. C., und Siegelbaum, S. A. (1999). C-Linker of cyclic nucleotide-gated channels controls coupling of ligand binding to channel gating. *J. Gen. Physiol* 113, 17-34.
- Pehl, U., und Schmid, H. A. (1997). Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. *Neuroscience* 77, 563-573.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 135, 105-149.
- Pifferi, S., Boccaccio, A., und Menini, A. (2006). Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett* 580, 2853-9.
- Porro, C. A., Cavazzuti, M., Lui, F., Giuliani, D., Pellegrini, M., und Baraldi, P. (2003). Independent time courses of supraspinal nociceptive activity and spinally mediated behavior during tonic pain. *Pain* 104, 291-301.
- Pugh, E. N., Duda, T., Sitaramayya, A., und Sharma, R. K. (1997). Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Biosci. Rep* 17, 429-473.

- Qian, Y., Chao, D. S., Santillano, D. R., Cornwell, T. L., Nairn, A. C., Greengard, P., Lincoln, T. M., und Bredt, D. S. (1996). cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci* 16, 3130-8.
- Qiu, W., Laheri, A., Leung, S., und Guggino, S. E. (2000). Hormones increase mRNA of cyclic-nucleotide-gated cation channels in airway epithelia. *Pflugers Arch* 441, 69-77.
- Ruiz, M. L., London, B., und Nadal-Ginard, B. (1996). Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart. *J. Mol. Cell. Cardiol* 28, 1453-1461.
- Ruscheweyh, R., Goralczyk, A., Wunderbaldinger, G., Schober, A., und Sandkühler, J. (2006). Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons. *Neuroscience* 141, 977-988.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F., und Biel, M. (1998). An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4696-701.
- Schmidt, H., Stonkute, A., Jüttner, R., Koesling, D., Friebe, A., und Rathjen, F. G. (2009). C-type natriuretic peptide (CNP) is a bifurcation factor for sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 16847-16852.
- Schmidtko, A. (2008). Cysteine-rich protein 2: \line A substrate of cGMP-dependent protein kinase I in nociceptive processing. Available at: <http://lbsopac.rz.uni-frankfurt.de/DB=30/SET=3/TTL=1/CMD?ACT=SRCHA&IKT=6015&DB=30&SRT=YO P&TRM=ppn:+2040111116>.
- Schmidtko, A., Gao, W., König, P., Heine, S., Motterlini, R., Ruth, P., Schlossmann, J., Koesling, D., Niederberger, E., Tegeder, I., et al. (2008a). cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. *J Neurosci* 28, 8568-76.
- Schmidtko, A., Gao, W., Sausbier, M., Rauhmeier, I., Sausbier, U., Niederberger, E., Scholich, K., Huber, A., Neuhuber, W., Allescher, H., et al. (2008b). Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain. *J Neurosci* 28, 1320-30.
- Schmidtko, A., Ruth, P., Geisslinger, G., und Tegeder, I. (2003). Inhibition of cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation. *Nitric Oxide* 8, 89-94.
- Schmidtko, A., Tegeder, I., und Geisslinger, G. (2009). No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci* 32, 339-346.
- Schmucker, C., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M., und Schaeffel, F. (2005). Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 46, 398-407.
- Schnetkamp, P. P. M. (2004). The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflugers Arch* 447, 683-688.
- Scholz, J., und Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1062-7.

- Scholz, J., und Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci* 10, 1361-1368.
- Sharpe, L. T., Stockman, A., Jägle, H., Knau, H., und Nathans, J. (1999). L, M and L-M hybrid cone photopigments in man: deriving lambda max from flicker photometric spectral sensitivities. *Vision Res* 39, 3513-3525.
- Song, X., Wang, Z., Gan, Q., und Walters, E. T. (2006). cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression. *J. Neurophysiol* 95, 479-492.
- Sorkin, L. S., McAdoo, D. J., und Willis, W. D. (1993). Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Res* 618, 95-108.
- Spike, R. C., Todd, A. J., und Johnston, H. M. (1993). Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol* 335, 320-333.
- Strijbos, P. J., Pratt, G. D., Khan, S., Charles, I. G., und Garthwaite, J. (1999). Molecular characterization and in situ localization of a full-length cyclic nucleotide-gated channel in rat brain. *Eur. J. Neurosci* 11, 4463-4467.
- Sugimoto, Y., Yatsunami, K., Tsujimoto, M., Khorana, H. G., und Ichikawa, A. (1991). The amino acid sequence of a glutamic acid-rich protein from bovine retina as deduced from the cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 3116-3119.
- Sunderman, E. R., und Zagotta, W. N. (1999a). Mechanism of allosteric modulation of rod cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol* 113, 601-620.
- Sunderman, E. R., und Zagotta, W. N. (1999b). Sequence of events underlying the allosteric transition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol* 113, 621-640.
- Sung, Y. J., Chiu, D. T. W., und Ambron, R. T. (2006). Activation and retrograde transport of protein kinase G in rat nociceptive neurons after nerve injury and inflammation. *Neuroscience* 141, 697-709.
- Svensson, C. I., Fitzsimmons, B., Azizi, S., Powell, H. C., Hua, X., und Yaksh, T. L. (2005). Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. *J. Neurochem* 92, 1508-1520.
- Tanaka, J. C., Eccleston, J. F., und Furman, R. E. (1989). Photoreceptor channel activation by nucleotide derivatives. *Biochemistry* 28, 2776-2784.
- Tanga, F. Y., Nutile-McMenemy, N., und DeLeo, J. A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 5856-5861.
- Tao, F., Tao, Y., Zhao, C., Doré, S., Liaw, W., Raja, S. N., und Johns, R. A. (2004). Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience* 128, 421-430.
- Tao, Y. X., Hassan, A., Haddad, E., und Johns, R. A. (2000). Expression and action of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha in inflammatory hyperalgesia in rat spinal cord. *Neuroscience* 95, 525-533.

- Taylor, S. S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N. M., Yang, J., Wu, J., und Anand, G. S. (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 25-37.
- Tegeder, I., Del Turco, D., Schmidtko, A., Sausbier, M., Feil, R., Hofmann, F., Deller, T., Ruth, P., und Geisslinger, G. (2004). Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3253-7.
- Tegeder, I., Schmidtko, A., Niederberger, E., Ruth, P., und Geisslinger, G. (2002). Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett* 332, 146-50.
- Timpe, L. C., Jin, K. L., Puelles, L., und Rubenstein, J. L. (1999). Cyclic nucleotide-gated cation channel expression in embryonic chick brain. *Brain Res. Mol. Brain Res* 66, 175-178.
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., und Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.
- Todd, A. J., Watt, C., Spike, R. C., und Sieghart, W. (1996). Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci* 16, 974-982.
- Trinchieri, G., und Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol* 7, 179-190.
- Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Rustioni, A., und Schmidt, H. H. (1992). Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci. Lett* 148, 6-10.
- Vardeh, D., Wang, D., Costigan, M., Lazarus, M., Saper, C. B., Woolf, C. J., Fitzgerald, G. A., und Samad, T. A. (2009). COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J. Clin. Invest* 119, 287-294.
- Varsányi, B., Wissinger, B., Kohl, S., Koeppen, K., und Farkas, A. (2005). Clinical and genetic features of Hungarian achromatopsia patients. *Mol. Vis* 11, 996-1001.
- Verge, G. M., Milligan, E. D., Maier, S. F., Watkins, L. R., Naeve, G. S., und Foster, A. C. (2004). Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur. J. Neurosci* 20, 1150-1160.
- Vitalis, E. A., Costantin, J. L., Tsai, P. S., Sakakibara, H., Paruthiyil, S., Iiri, T., Martini, J. F., Taga, M., Choi, A. L., Charles, A. C., et al. (2000). Role of the cAMP signaling pathway in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 1861-1866.
- Wang, G., Achim, C. L., Hamilton, R. L., Wiley, C. A., und Soontornniyomkij, V. (1999). Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods* 18, 459-464.
- Watkins, L. R., und Maier, S. F. (2000). The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol* 51, 29-57.
- Wei, F., Wang, G. D., Kerchner, G. A., Kim, S. J., Xu, H. M., Chen, Z. F., und Zhuo, M. (2001). Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat. Neurosci* 4, 164-169.

- Wei, J. Y., Cohen, E. D., Genieser, H. G., und Barnstable, C. J. (1998). Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Mol. Neurosci* 10, 53-64.
- Weissbuch Schmerz : eine Bestandsaufnahme der Versorgungssituation von Patienten mit chronischem Schmerz in Deutschland (2008). (Stuttgart: Thieme).
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H., und Kaupp, U. B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368, 859-863.
- White, F. A., Bhangoo, S. K., und Miller, R. J. (2005). Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 4, 834-844.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B., und Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J. Cell Biol* 142, 473-484.
- Winkelstein, B. A., Rutkowski, M. D., Sweitzer, S. M., Pahl, J. L., und DeLeo, J. A. (2001). Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J. Comp. Neurol* 439, 127-139.
- Wissinger, B., Gamer, D., Jägle, H., Giorda, R., Marx, T., Mayer, S., Tippmann, S., Broghammer, M., Jurklies, B., Rosenberg, T., et al. (2001). CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am. J. Hum. Genet* 69, 722-737.
- Wolf, H. K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P. K., Pietsch, T., Wiestler, O. D., und Blümcke, I. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem* 44, 1167-1171.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., und Storm, D. R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487-497.
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306, 686-688.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 140, 441-51.
- Wu, W., Xu, X., und Hao, J. (2004). Chronic lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in mice. *J. Neurosci. Methods* 133, 65-69.
- Yang, R. B., Foster, D. C., Garbers, D. L., und Fülle, H. J. (1995). Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 602-606.
- Yau, K. W., und Nakatani, K. (1985). Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. *Nature* 313, 579-582.
- Yonehara, N., Takemura, M., Yoshimura, M., Iwase, K., Seo, H. G., Taniguchi, N., und Shigenaga, Y. (1997). Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. *Jpn. J. Pharmacol* 75, 327-335.

- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R., und Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* *425*, 200-205.
- Zeilhofer, H. U., Studler, B., Arabadzisz, D., Schweizer, C., Ahmadi, S., Layh, B., Bösl, M. R., und Fritschy, J. (2005). Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J. Comp. Neurol* *482*, 123-141.
- Zhang, F., Liu, X., Gong, L., Yao, J., Li, K., Li, Z., Lin, L., Lu, Y., Xiao, H., Bao, L., et al. (2010). Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons. *J. Neurosci* *30*, 10927-10938.
- Zhang, J., und De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem* *97*, 772-783.
- Zhang, X., Chen, Y., Wang, C., und Huang, L. M. (2007). Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 9864-9869.
- Zhang, X., Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Bredt, D., Synder, S. H., und Hökfelt, T. (1993). Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol* *335*, 563-575.
- Zhao, H., und Reed, R. R. (2001). X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell* *104*, 651-660.
- Zheng, J., und Zagotta, W. N. (2000). Gating rearrangements in cyclic nucleotide-gated channels revealed by patch-clamp fluorometry. *Neuron* *28*, 369-374.
- Zhuang, Z., Gerner, P., Woolf, C. J., und Ji, R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* *114*, 149-159.
- Zong, X., Zucker, H., Hofmann, F., und Biel, M. (1998). Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J* *17*, 353-362.
- Zufall, F., und Munger, S. D. (2010). Receptor guanylyl cyclases in mammalian olfactory function. *Mol. Cell. Biochem* *334*, 191-197.

8. Anhang

8.1. Veröffentlichungen

Doege K., Heine S., Jensen I., Jelkmann W., Metzen E.

Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact.

Blood, 2005 Oct 1;106(7): 2311-7

Schmidtko A., Gao W., König P., Heine S., Motterlini R., Ruth P., Schlossmann J., Koesling D., Niederberger E., Tegeder I., Friebe A., Geisslinger G.

cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain using targets different from cGMP-dependent protein kinase I.

J. Neurosci. 2008 Aug 20;28(34): 8568-76

Heine S., Michalakis S., Kallenborn-Gerhardt W., Lu R., Weiland J., Del Turco D., Deller T., Tegeder I., Biel M., Geisslinger G., Schmidtko A.

CNGA3: A target of spinal NO/cGMP signaling and modulator of inflammatory pain hypersensitivity.

submitted

8.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Sandra Heine
Am Fort Gonsenheim 51a
55122 Mainz

geboren am 11.02.1982 in Celle
ledig

Schulbildung

1988 - 1992	Grundschule Garßen, Celle
1992 - 1994	Orientierungsstufe Vorwerk, Celle
1994 - 2001	Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium Celle Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

2001 - 2004	Universität zu Lübeck, Studium der Molekularen Biotechnologie Bachelorarbeit im Institut für Physiologie Leiter: Prof. Dr. W. Jelkmann, Betreuer: Prof. Dr. E. Metzen Thema: Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 nach Hemmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs Abschluss: Bachelor of Science
2004 - 2007	Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Studium der Biomedizin Masterarbeit im Institut für Rechtsmedizin Leiter: Prof. Dr. Dr. R. Urban, Betreuer: Dr. J. Röhrich Thema: Systematische Untersuchung neuer Festphasenextraktionsmethoden in der Drogenanalytik Abschluss: Master of Science
2007 - 2010	Goethe-Universität Frankfurt am Main, Promotionsstudium Naturwissenschaftliche Doktorarbeit im Institut für Klinische Pharmakologie Leiter: Prof. Dr. Dr. G. Geisslinger, Betreuer: PD Dr. Dr. A. Schmidtke im Rahmen eines Stipendiums des Graduiertenkollegs FIRST Thema: Charakterisierung der Expression und Funktion von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen im nozizeptiven System

Berufliche Erfahrungen

seit Juni 2010	Drug Safety Manager / Medical Advisor bei der Chemischen Fabrik Kreussler & Co. GmbH (Sparte Pharma), Wiesbaden
----------------	---