

Die Rolle der Epoxyeicosatriensäuren (EETs) bei der nozizeptiven Verarbeitung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Marco Sisignano

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2011

(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

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

Datum der Disputation: 23. Mai 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schmerzformen.....	1
1.2 Periphere Sensibilisierung	3
1.2.1 “Transient receptor potential” (TRP)-Kanäle	4
1.2.1.1 TRPV1	6
1.2.1.2 TRPV4	8
1.2.1.3 TRPA1	9
1.3 Zentrale Sensibilisierung	12
1.4 Epoxyeicosatriensäuren (EETs)	14
1.4.1 Synthese der EETs	14
1.4.2 Biologische Wirkungen der EETs und der löslichen Epoxidhydrolase (sEH)	16
1.4.3 Physiologische Relevanz der EETs bei der Schmerzverarbeitung	17
1.5 Fragestellung / Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Lösungen und Puffer	22
2.1.3 Zellkulturmedien –und Supplemente	23
2.1.4 Laborgeräte	24
2.1.5 Verwendete Plasmide	25
2.1.6 Antikörper	26
2.1.6.1 Western Blot	26
2.1.6.2 Immunhistochemie (IHC) / Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK)	27

2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellbiologische Methoden	28
2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.2.1.2 Kultivierung und LPS-Stimulation von RAW-264.7- Makrophagen	28
2.2.1.3 Präparation und Kultivierung adulter Dorsalwurzelganglien (DRGs)	29
2.2.1.4 Transiente Transfektion von HeLa-, HEK-, oder N1E-115- Zellen mit (m)TRPA1, (h)TRPA1 oder (h)TRPV4	29
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.2.1 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	30
2.2.2.2 Western-Blot	30
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.1 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese	31
2.2.3.3 Plasmidrestriktion – und Sequenzierung	32
2.2.4 Calcium-Imaging	32
2.2.5 Immunochemische Methoden Methoden	33
2.2.5.1 Anfertigen von Kryo-Gewebsschnitten / Immunhistochemie ..	33
2.2.5.2 Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK)	34
2.2.6 Analytische Methoden	35
2.2.6.1 Messung der Epoxyeicosatriensäuren und Dihydroxyeicosatriensäuren mittels LC-MS/MS.....	35
2.2.6.1.1 Extraktion der Lipide	35
2.2.6.1.2 Messung	35
2.2.6.2 Messung der CGRP-Freisetzung aus Ischiasnerven mittels Enzyme-immuno-assay (EIA)	36

2.2.7 Tiermodelle	36
2.2.7.1 Versuchstiere	36
2.2.7.2 Hot-Plate- und Cold-Plate-Test	37
2.2.7.3 Tailflick-Test	37
2.2.7.4 Dynamic-Plantar-Test	37
2.2.7.5 Radiant-Heat-Test	38
2.2.7.6 Formalin-Test	38
2.2.8 Statistische Auswertung	39
3. Ergebnisse	40
3.1 sEH-abhängige Effekte von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) bei der nozizeptiven Verarbeitung	40
3.1.1 Nozizeptives Verhalten sEH-defizienter Mäuse	40
3.1.1.1 Akuter Hitze- und Kälteschmerz	40
3.1.1.2 Zymosan- und formalin-induzierter pathophysiologischer Schmerz	42
3.1.2 EET-Konzentrationen basal und bei inflammatorischen Schmerzen ...	45
3.1.2.1 EET-Konzentrationen im Plasma und in Dorsalwurzel- ganglien von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen	45
3.1.2.2. EET-Konzentrationen im Pfotenödem, Dorsalwurzelganglien und Dosalhorn bei Inflammatorischen Schmerzen	46
3.1.2.3 Freisetzung von EETs nach Stimulation adulter DRGs mit Arachidonsäure, Cytokinen, Bradykinin und Paclitaxel	49
3.1.3 Expression der sEH in L4-L6-Dorsalwurzelganglien und Pfoten	51
3.1.3.1 Immunhistochemie und Multi-Epitop-Ligand-Kartographie- (MELK) Analyse adulter L4-L6-DRGs und Pfoten von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen	51

3.1.3.2 Regulation der sEH-Expression in DRGs im Entzündungsverlauf	53
3.1.4 Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in adulten DRG- Neuronen durch 8,9-, 11,12- und 14,15-EET	55
3.1.5 Sensibilisierung der capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 8,9- 11,12- und 14,15-EET	57
3.1.6 Messung der CGRP-Freisetzung aus Ischiasnerven nach Inhibition der sEH mit t-AUCB und nach Stimulation mit 8,9-EET	58
3.1.7 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp-Mäusen nach Injektion von 8,9-, 11,12 – oder 14,15-EET (i. plantar)	60
3.1.7.1 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes	60
3.1.7.1 Ermittlung des thermischen Schwellenwertes	62
3.2 Die Rolle von 5,6-Epoxyeicosatriensäure (5,6-EET) bei der nozizeptiven Verarbeitung	63
3.2.1 5,6-EET—Konzentrationen in Pfoten, Ischiasnerven und L4-L6-DRGs bei akutem Schmerz	63
3.2.2 5,6-EET—Konzentrationen in Pfoten, Ischiasnerven und L4-L6-DRGs bei inflammatorischem Schmerz	65
3.2.3 Freisetzung von 5,6-EET in kultivierten DRGs	66
3.2.4 Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in adulten DRG-Neuronen nach Stimulation mit 5,6-EET	67
3.2.4.1 <i>in vitro</i> -Stabilität von 5,6-EET	68
3.2.4.2 Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET-vermittelten Calcium-Einströme in Wildtyp-DRG-Neuronen	69
3.2.4.3 Rolle der TRP-Kanäle bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom	69
3.2.4.4 Rolle von TRPV4 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom	71

3.2.4.5 Rolle von TRPV1 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom	72
3.2.4.6 Rolle von TRPA1 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom	74
3.2.4.7 Änderung der intrazellulären Calcium- Konzentrationen in TRPA1-transfizierten Zellen nach Stimulation mit 5,6-EET	77
3.2.4.8 Untersuchung der molekularen Aktivierung von TRPA1 durch 5,6-EET unter Verwendung von TRPA1-Aktivierungsmutanten	80
3.2.5 Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 5,6-EET	82
3.2.6 Messung der „calcitonin-gene-related peptide“ (CGRP)-Freisetzung aus Ischiasnerven nach 5,6-EET-Stimulation	83
3.2.7 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp- und TRPA1-defizienten Mäusen nach 5,6-EET-Injektion	85
3.2.7.1 Akut-Schmerz-Test	85
3.2.7.2 Ermittlung der mechanischen Schmerzschwelle nach Injektion von 5,6-EET	86
3.2.7.3 Nozizeptives Verhalten TRPA1-defizienter Mäuse	89
4. Diskussion	91
4.1 Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) als Zielprotein bei Schmerz	92
4.2 5,6-EET als pronozizeptiver Lipidmediator bei Akutschmerz	94
4.3 TRPA1 und TRPV1 als Zielproteine für Analgetika	99

Zusammenfassung	103
Abkürzungsverzeichnis	104
Abbildungsverzeichnis	106
Literaturverzeichnis	110
Anhang	120
Publikationen	i
Posterpräsentationen und Vorträge	iii
Danksagung	iv
Lebenslauf	v

1. Einleitung

1.1. Schmerzformen

Schmerz ist eine komplexe Sinneswahrnehmung, die bei mechanischer, thermischer oder chemischer Stimulation entsteht. Unter physiologischen Bedingungen dient Schmerz als Warnung und Schutz vor Schädigungen des Gewebes. Dieser so genannte physiologische Nozizeptorschmerz ist hilfreich und erwünscht, da er benötigt wird, um mit der Umwelt zu interagieren, ohne körperlichen Schaden zu nehmen. Der physiologische Nozizeptorschmerz beginnt mit einem noxischen Reiz, der thermischer, mechanischer oder chemischer Natur sein kann und die Aktivierung von peripheren Nervenendigungen, so genannten Nozizeptoren, zur Folge hat. Der Reiz überschreitet dabei einen Schwellenwert und löst eine Potentialänderung des Nozizeptors aus. Diese Potentialänderung führt zur Öffnung spannungsgesteuerter Ionenkanäle und es bilden sich Aktionspotentiale, die den Reiz über afferente, unmyelinisierte C- oder leicht myelinisierte A_δ-Fasern zunächst zu den Dorsalwurzelganglien (DRG) und schließlich zu der ersten synaptischen Verschaltung im Dorsalhorn (in den Laminae I und II) des Rückenmarks leiten. Von dort wird der „Schmerzreiz“ über Hirnstamm und Thalamus zum somatosensorischen Cortex geleitet, wo er anhand seiner Stärke und Ausprägung beurteilt wird (sensorisch – diskriminative Komponente). Darüber hinaus gelangt der „Schmerzreiz“ ebenfalls zum limbischen System, wo er affektiv bewertet wird (Abb. 1.1) ^{1,2}.

Bei Entzündungen kann es zur zweiten Schmerzform, dem so genannten pathophysiologischen Nozizeptorschmerz, kommen. Der pathophysiologische Nozizeptorschmerz ist persistierend und bedarf der Therapie, da bei dieser Schmerzform zwei Phänomene verstärkter Schmerzwahrnehmung auftreten können, eine Hyperalgesie und eine Allodynie. Eine Hyperalgesie ist eine verstärkte Schmerzwahrnehmung auf einen noxischen Reiz. Unter einer Allodynie versteht man eine Schmerzwahrnehmung auf Reize, welche normalerweise nicht schmerzhaft sind (z. B. Berührung: taktile Allodynie). Bei entzündlichen Schmerzen wird der Schwellenwert, der zum Auslösen des Schmerzreizes führt, abgesenkt. Dies geschieht durch endogene Schmerzmediatoren, welche bei Entzündungen von Immunzellen freigesetzt werden ³.

Neben dem physiologischen und dem pathophysiologischen Nozizeptorschmerz gibt es einen dritten Schmerztyp, den so genannten neuropathischen Schmerz. Diese, bis heute schwer therapierbare, chronische Schmerzform, entsteht meist durch Läsionen oder mechanische Schädigungen, wie etwa Quetschungen, von Nervengewebe. Verletzte C-Fasern können mit ektopischen Entladungen reagieren, und Verletzungen von A β -Fasern führen zu Aussprossen von Neuriten aus den verletzten Regionen. Diese starke Aktivität verletzter Nervenfasern kann eine Neuverknüpfung und Projektion auf nozizeptive Neurone zur Folge haben. Dadurch können nozizeptive Neurone z. B. bereits durch leichte mechanische Reize aktiviert werden ⁴. Als physiologische Konsequenz kann dies bedeuten, dass selbst normale und ungefährliche mechanische oder thermische Reize wie Berührungen oder kühle Temperaturen zu starken Schmerzen führen, oder bereits Schmerzen ohne Reizung wahrgenommen werden. Tatsächlich sind die Ausbildungen von taktilen Allodynien häufig vorkommende Symptome bei Neuropathien. Neuropathien können auch als Folge von Diabetes mellitus oder durch Behandlung mit Zytostatika wie Paclitaxel, Vincristin oder Cisplatin auftreten ⁵. Die zeitliche Verlängerung und Verstärkung des Schmerzes bei pathophysiologischen Nozizeptorschmerzen und neuropathischen Schmerzen ist auf periphere und zentrale Sensibilisierungen zurückzuführen, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

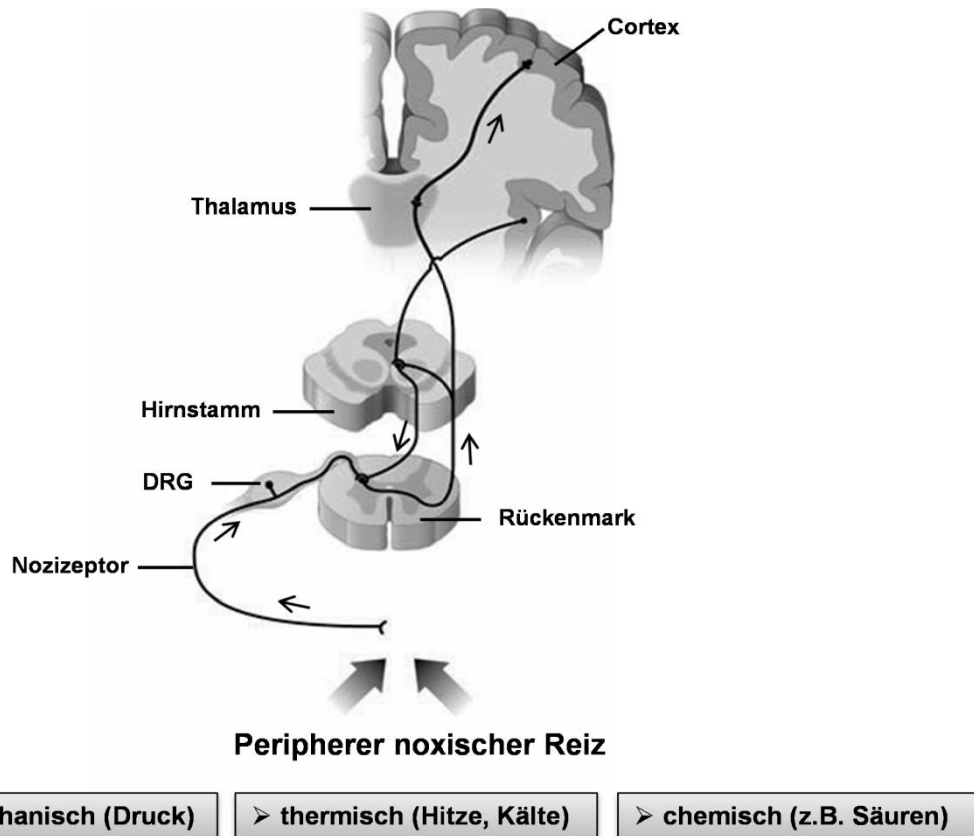


Abb.1.1: **Stationen der Schmerzverarbeitung.** „Schmerzreize“ werden bei Überschreitung eines Schwellenwertes von peripheren Nervenendigungen wahrgenommen (unten), und durch Nozizeptoren zu den Dorsalwurzelganglien (DRG) und zur ersten synaptischen Verschaltung im Dorsalhorn (Laminae I und II) des Rückenmarks weitergeleitet. Von dort aus gelangt der Schmerzreiz über Hirnstamm und Thalamus zum somatosensorischen Cortex (modifiziert nach Costigan, Scholz und Woolf, 2009⁵).

1.2 Periphere Sensibilisierung

Eine periphere Sensibilisierung entsteht durch Absenkung des Schwellenwertes zur Anregung von Nozizeptoren. Dieser ist bei pathophysiologischen Nozizeptorschmerzen und neuropathischen Schmerzen abgesenkt und es kommt zu Hyperalgesien und Allodynien, da bereits nicht noxische Reize als schmerzhaft wahrgenommen werden. Am Mechanismus der peripheren Sensibilisierung sind im Wesentlichen Ionenkanäle (z.B. TRP-Kanäle) beteiligt, welche noxische Reize aus der Umwelt in elektrische Reize umwandeln^{6,7}. Unmittelbar nach einer Gewebeschädigung werden ATP und Protonen freigesetzt. ATP aktiviert den Purinrezeptor P2X3 und Protonen aktivieren den „transient receptor potential vanilloid1“-Rezeptor (TRPV1)^{8,9}. Die Aktivierung der beiden Rezeptoren führt zu Calcium-Einstrom und zu Depolarisation des Nozizeptors, wodurch

Aktionspotentiale entstehen können. Neben der direkten Aktivierung von Nozizeptoren, kommt es bei Gewebsschädigung auch zur Sensibilisierung von Nozizeptoren.

Bei einer entzündlichen Schmerzreaktion (pathophysiologischer Nozizeptorschmerz) wandern Immunzellen in das geschädigte Gewebe ein (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen), die proinflammatorische Substanzen, wie Bradykinin, Histamin, Leukotrien B₄ und Prostaglandine, sowie Zytokine, wie TNF- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6 freisetzen¹⁰⁻¹². Diese proinflammatorischen Substanzen binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren des Nozizeptors und verursachen die Aktivierung von Proteinkinasen der PKC-Familie (vorwiegend durch Bradykinin und Histamin) und PKA-Familie (vorwiegend durch Prostaglandine)¹³⁻¹⁵. Dies führt zu Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten auf der cytosolischen Seite von TRP-Kanälen, was eine Sensibilisierung und Absenkung des Schwellenwerts des Kanals bewirkt^{13,16-18}. Somit kommt es bereits bei einer nicht noxischen Stimulation des Kanals zu Calcium-Einstrom, zu Depolarisation der Membran und zur Ausbildung von Aktionspotentialen.

Die essentielle Funktion von TRP-Kanälen bei der Verarbeitung nozizeptiver Information sowie ihre Beteiligung an Sensibilisierungsprozessen, rücken diese Kanäle in den Fokus der Schmerzforschung. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene schmerzrelevante TRP-Kanäle vorgestellt und ihre Beteiligung an der Verarbeitung nozizeptiver Information und an Sensibilisierungsprozessen wird erläutert.

1.2.1 TRP-Kanäle

TRP-Kanäle sind unselektive Kationenkanäle, die aus sechs Transmembrandomänen und mehreren N-terminalen Ankyrin-Repeats bestehen. Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne liegt die kationenpermeable Pore. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich bei den TRP-Kanälen auf der cytosolischen Seite. Die Abkürzung TRP steht für „transient receptor potential“ und stammt von einer *Drosophila*-Mutante, deren Lichtrezeptoren im Auge transient auf helles Licht reagierten, und nicht, wie üblich, anhaltend¹⁹. In den letzten zehn Jahren konnte gezeigt werden, dass TRP-Kanäle in Säugern essentielle Funktionen bei der Wahrnehmung von mechanischen und thermischen Reizen erfüllen⁷ und zur Ausprägung von Hyperalgesien und somit zu verstärkter Schmerz Wahrnehmung beitragen können^{17,18}. Diese Eigenschaften machen TRP-Kanäle zu potentiellen Zielproteinen für Analgetika in den Bereichen Entzündungs- und neuropathischen Schmerzen²⁰. Im Folgenden sind die schmerzrelevanten TRP-Kanäle gezeigt:

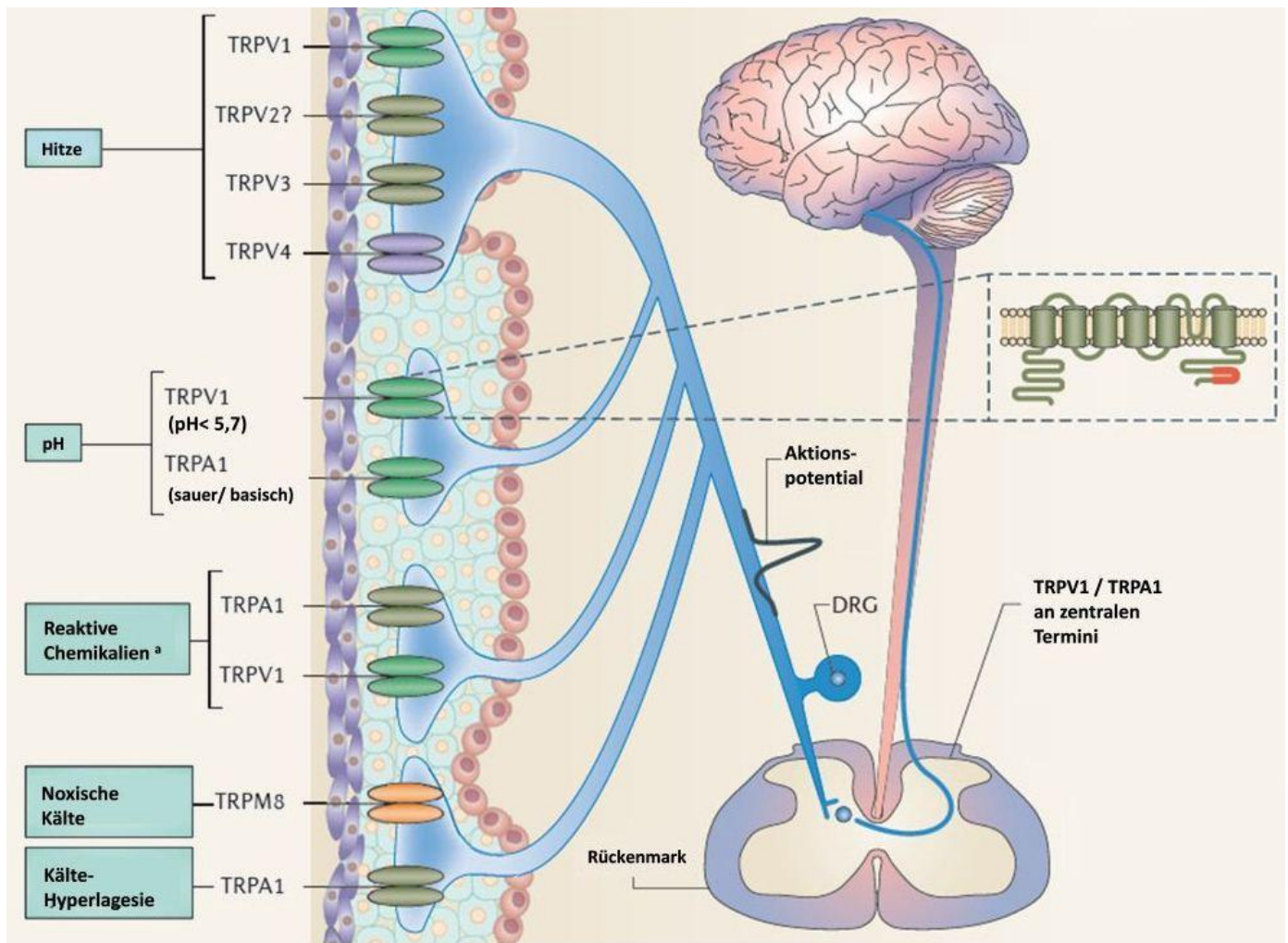


Abb 1.2: **schmerzrelevante TRP-Kanäle.** TRP-Kanäle dienen als Transduktoren für Hitze (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4), Kälte (TRPM8, TRPA1) und Änderungen des pH (TRPV1, TRPA1). TRPV1 und TRPA1 werden zudem durch reaktive chemische Liganden aktiviert.

Aktivatoren für TRPV1 sind: Capsaicin, Anandamid, 9-HODE, 13-HODE, Campher, Resiniferatoxin (RTX) und Stickstoffmonoxid (NO)²¹⁻²⁴. Zudem kann der Kanal durch PKC, PKA und CaMKII-Phosphorylierung sensibilisiert werden^{12,25,26}.

Aktivatoren für TRPA1 sind zahlreiche elektrophile Agonisten: darunter reizende Substanzen, wie Acrolein, Allicin Allylisothiocyanat, Formalin, Phytochemikalien, wie Carvacrol, Thymol, Zimtaldehyd, Isovalleral, Alkaloide, wie Nicotin, Analgetika, wie Propofol, Lidocain, Isofluran, sowie endogene Substanzen, wie 4-Hydroxynonenal, PGA_2 , PGJ_2 und 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 , NO und Wasserstoffperoxid (H_2O_2)²⁷⁻³⁷. TRPA1 kann auch durch mechanische Stimulation aktiviert werden und durch PKA-Phosphorylierung, Bradykinin und PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) sensibilisiert werden³⁸⁻⁴¹.

Aktivierung von TRP-Kanälen führt zu Calcium-Einstrom und kann die Ausbildung von Aktionspotentialen zur Folge haben. In der rechten Box ist die *in silico* prognostizierte Struktur von TRPV1 gezeigt. Die Vanilloid-Bindestelle in der C-terminalen Domäne ist in rot markiert. (modifiziert nach Moran *et al.*, Nat Rev Drug Discov, 2011²⁰).

1.2.1.1 TRPV1

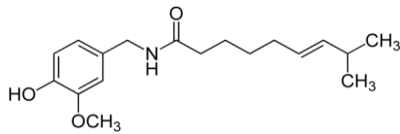
Der am besten charakterisierte TRP-Kanal, TRPV1, kann durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden, wie z.B. durch Hitze ($> 42^{\circ}\text{C}$), Protonen ($\text{pH} < 5,7$) und zahlreiche Substanzen, darunter das Endocannabinoid Anandamid, aber auch Capsaicin, einem Alkaloid der Chilischote (*Capsicum sp.*). Zudem wurden bereits oxidierte Lipide als endogene TRPV1-Agonisten identifiziert (9-HODE; 9-Hydroxy-10E, 12Z-Octadecadiensäure, und 13-HODE). Diese Linolsäurederivate werden bei Hitzeeinwirkung in epidermalen Hautzellen gebildet und freigesetzt und tragen durch Aktivierung TRPV1-positiver afferenter Nervenfasern zur thermischen Hyperalgesie bei²¹. Neben der direkten Aktivierung des TRPV1, gibt es auch die Möglichkeit der indirekten Modulation über Phosphorylierung von drei Serin-Resten auf der cytosolischen Seite durch die Proteinkinasen PKC, PKA und Calmodulin (CaM)-Kinase II^{12,25,26}. Dies führt zu einer Sensibilisierung des Kanals, was eine Absenkung des Schwellenwerts zur Aktivierung zur Folge hat³⁵. In jüngster Zeit konnte zudem beobachtet werden, dass eine Ligandenbindung oder eine Phosphorylierung des C-terminalen Ser₈₀₀ durch PKC ϵ zur Dilatation der kationenpermeablen Pore führt. Die Erweiterung der Pore hat eine Verschiebung der Ionenpräferenz von Na^+ zu Ca^{2+} zur Folge und führt so zum selektiven Einstrom von Ca^{2+} -Ionen oder größeren kationischen Molekülen⁴².

TRPV1 wird in primär afferenten sensorischen Neuronen der Dorsalwurzelganglien exprimiert. TRPV1-positive Neurone bilden unmyelinisierte C-Fasern oder leicht myelinisierte A δ -Fasern aus und exprimieren die pronozizeptiven Peptide Substanz P und CGRP (calcitonin gene related peptide)^{17,43}. Bei Stimulation öffnet sich der Kanal und lässt Calciumionen einströmen. Dies verursacht eine Depolarisierung des Membranpotentials und kann bei Erreichen eines Schwellenwertes zu Aktionspotentialen führen. Darüber hinaus werden durch TRPV1-Stimulierung die pronozizeptiven Peptide CGRP und Substanz P freigesetzt, die wiederum an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und Proteinkinasen aktivieren, was zu neurogener Entzündung führt^{44,45}. Aus diesem Grund sind TRPV1-Antagonisten für die Schmerztherapie interessant, da sie die Calciumeinströme und indirekt auch die Bildung einer neurogenen Entzündung hemmen. Die Entwicklung von TRPV1-Antagonisten befindet sich in einem fortgeschrittenen Stadium. Einige TRPV1-Antagonisten wurden bereits in klinischen Studien getestet (SB-705498, GSK, Phase II; AZD 1386, AstraZeneca, Phase II)^{17,46}.

Allerdings wurde bei Gabe von TRPV1-Antagonisten Hyperthermie als Nebenwirkung beobachtet, die in Einzelfällen zu einer Erhöhung der Körpertemperatur bis zu 3°C führte^{47,48}. Als Folge dieser Beobachtungen wurden die klinischen Studien mehrerer selektiver und sehr potenter TRPV1-Antagonisten, wie AMG 517, nach Phase I abgebrochen⁴⁹. Möglicherweise kann Hyperthermie als Nebenwirkung durch eine zweite Generation von TRPV1-Antagonisten mit kürzerer Halbwertszeit, höherer Wasserlöslichkeit reduziert werden, da diese Substanzen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können und nur die periphere Population von TRPV1 hemmen⁴⁷.

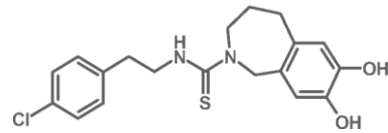
Doch auch TRPV1-Agonisten haben therapeutisches Potential, da eine übermäßige Stimulierung den Kanal desensibilisiert und somit die pronozizeptive Aktivität des Kanals verringert⁵⁰. Capsaicin als Hautpflaster angewendet, zeigte beispielsweise eine analgetische Aktivität bei HIV-assoziiertem distal-sensorischer Polyneuropathie⁵¹. Bei der topischen Anwendung von Capsaicin-Hautpflastern, kommt es zu einer „Defunktionalisierung“ des Nozizeptors. Es wird vermutet, dass durch die Überstimulierung des TRPV1 und den dadurch vermittelten übermäßigen Calcium-Einstrom das Membranpotential des Nozizeptors gestört wird und es zudem zu Dysfunktion der Mitochondrien kommt⁵². Die starke Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch stetige TRPV1-Aktivierung kann auch die Hemmung der Proteinsynthese und die Depolymerisierung von Komponenten des Zytoskeletts, wie etwa Microtubuli, zur Folge haben⁵³. Dadurch ist der Nozizeptor nicht mehr in der Lage, ein nozizeptives Signal zu registrieren und an das zentrale Nervensystem weiterzuleiten, was eine Analgesie zur Folge hat. Mittlerweile werden Capsaicin-Hautpflaster bei neuropathischen Schmerzen klinisch eingesetzt⁵⁴.

TRPV1-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte thermische Hyperalgesie unter pathophysiologischen Bedingungen. Zudem ist die Schmerzantwort auf akute thermische Stimuli in TRPV1^{-/-}-Mäusen reduziert, doch die Antwort auf mechanische Stimuli zeigt keine Abweichungen vom Wildtyp⁴³.



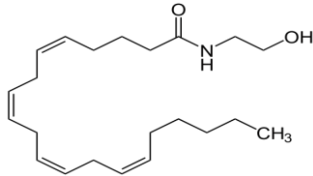
Capsaicin

EC₅₀: 0,4 μM



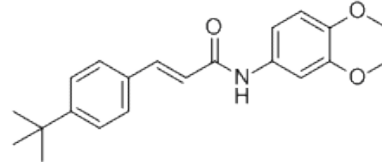
Capsazepin

IC₅₀: 296 nM



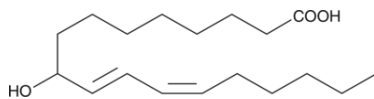
Anandamid

EC₅₀: 1 μM



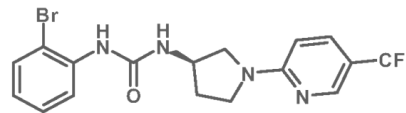
AMG 9810

IC₅₀: 25 nM



9-HODE

EC₅₀: 0,3 μM



SB-705498

IC₅₀: 5 nM

Abb. 1.3: **TRPV1-Agonisten**

Gezeigt sind die Strukturen des exogenen TRPV1-Agonisten Capsaicin (dem Alkaloid aus *Capsicum sp.*), sowie der endogenen TRPV1-Agonisten Anandamid und 9-HODE mit ihren jeweiligen EC₅₀-Werten (den halbmaximalen effektiven Konzentrationen) ^{21,23,24}.

Abb. 1.4: **TRPV1-Antagonisten**

Gezeigt sind die Strukturen von Capsazepin, dem ersten entwickelten TRPV1-Antagonisten sowie dem in dieser Arbeit verwendeten AMG9810 und SB-705498 mit ihren jeweiligen IC₅₀-Werten (den halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen) ^{55,56}.

1.2.1.2 TRPV4

Wie TRPV1 gehört auch TRPV4 zur Unterfamilie der „vanilloid“ TRP-Kanäle. TRPV4 wird durch osmotischen Stress (Hypotonizität) und mechanische Stimulationen aktiviert, aber auch durch Temperaturen über 25°C ^{22,57}. Zu den Agonisten zählt der Phorbol-Ester 4α-PDD (4α-Phorbol-12,13-Didecanoat), sowie der Arachidonsäuremetabolit 5,6-Epoxyeicosatriensäure (5,6-EET) ⁵⁸⁻⁶⁰.

TRPV4 wird in sensorischen Neuronen der Dorsalwurzelganglien exprimiert und kann dort durch PGE₂, Serotonin, aber auch PKA, PKCε und den „Protease-activated receptor-2“ (PAR-2) sensibilisiert werden^{61,62}, was zu mechanischer Hyperalgesie und durch erhöhte Freisetzung von Substanz P und CGRP zu einer neurogenen Entzündung führen^{22,61}.

Auch bei chronischem Schmerz scheint TRPV4 eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte in einem neuropathischen Schmerzmodell in der Ratte die durch Paclitaxel induzierte mechanische Hyperalgesie durch Injektion von TRPV4-Antisense Oligonukleotiden erheblich reduziert werden⁶³. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TRPV4-abhängige paclitaxel-induzierte mechanische Hyperalgesie durch den Integrin/Src-Tyrosin-Kinase-Weg vermittelt wird⁶³⁻⁶⁵.

TRPV4-defiziente Mäuse weisen eine veränderte Temperaturpräferenz gegenüber Wildtyp-Mäusen auf. Sie bevorzugen wärmere Temperaturen (34°C), als die Kontrolltiere (30°C)⁶⁶. Zudem konnte in TRPV4-defizienten Mäusen keine entzündungsinduzierte mechanische oder osmotische Hyperalgesie beobachtet werden⁶². Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die durch Paclitaxel oder Vincristin induzierte mechanische Hyperalgesie in TRPV4-defizienten Mäusen stark verringert war⁶⁷.

1.2.1.3 TRPA1

Ein weiterer interessanter TRP-Kanal für die Schmerzforschung ist der TRPA1. Er unterscheidet sich strukturell von den anderen TRP-Kanälen, da er 15 N-terminale Ankyrin-Repeats besitzt. Die übrigen TRP-Kanäle verfügen nur über je zwei bis sechs N-terminale Ankyrin-Repeats¹⁸. TRPA1 wird ebenfalls in sensorischen Neuronen der Spinalganglien exprimiert. In immunhistologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass TRPA1 und TRPV1 in diesen Neuronen größtenteils koexprimiert sind³⁸. TRPA1 wird durch zahlreiche Substanzen aktiviert, die als scharf oder stechend wahrgenommen werden. Auch der Formalin-induzierte Schmerz wird durch die Aktivierung von TRPA1 verursacht⁶⁸. Mittlerweile sind über 100 exogene, strukturell sehr variable TRPA1-Agonisten bekannt. Diese erstaunliche strukturelle Vielfalt lässt darauf schließen, dass es für TRPA1-Agonisten keine definierte Bindetasche gibt, wie etwa die Vanilloid-Bindestelle am TRPV1. Kürzlich wurde berichtet, dass die TRPA1-Aktivierung durch kovalente Modifizierung von Cystein-Resten an der N-terminalen, cytosolischen Domäne

des Kanals geschieht. Werden diese Cysteine durch andere Aminosäuren ausgetauscht, kann der Kanal nicht mehr durch Allylisothiocyanat (AITC) aktiviert werden ⁶⁹. Tatsächlich ist der überwiegende Teil der TRPA1-Agonisten elektrophil und in der Lage kovalente Wechselwirkungen und Michael-Addukte mit Cysteinen einzugehen ³².

Bislang sind allerdings nur wenige endogene TRPA1-Agonisten bekannt. Die bisher identifizierten endogenen TRPA1-Agonisten sind vorwiegend oxidierte Lipide, wie 4-Hydroxynonenal und die Cyclopentone PGA_2 , PGJ_2 und 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 , die ebenfalls elektrophile Eigenschaften besitzen. Doch auch H_2O_2 und NO sind endogene TRPA1-Agonisten ^{36,37}.

Ähnlich wie bei TRPV1 löst eine Aktivierung des TRPA1 eine Verschiebung der Ionenpräferenz zu größeren und divalenten Kationen aus. Es kommt zum Einstrom von Calcium, zur Depolarisation der Membran und zur Freisetzung von Substanz P und CGRP ²⁷. Auch Sensibilisierungsprozesse des TRPA1 sind bekannt. So wird die Bradykinin-vermittelte Sensibilisierung von TRPA1 durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) ausgelöst, die PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in DAG (Diacylglycerol) und IP_3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) spaltet ⁴⁰.

Allerdings ist bislang unklar, welche Rolle der TRPA1 bei der Wahrnehmung von Kälte hat. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass TRPA1 durch niedrige Temperaturen aktiviert werden kann. Doch in diesen Studien wurde meist nicht zwischen noxischem Kälteschmerz und Kälte-Hyperalgesie differenziert ^{38,39}. Einer neuen Studie zufolge wird der Kanal durch kühle Temperaturen um 10°C , nicht jedoch durch noxische Kälte unterhalb von 4°C aktiviert. Somit wird TRPA1 momentan mit Kälte-Hyperalgesie in Verbindung gebracht und nicht mit akutem Kälteschmerz ⁴¹.

Darüber hinaus tritt TRPA1 verstärkt in peripheren Nervenendigungen des respiratorischen Systems auf. Dort wird TRPA1 durch Oxidantien und elektrophile Substanzen aktiviert, was zu respiratorischer Depression und neurogener Inflammation führt ⁷⁰. Aus diesem Grund werden TRPA1-Antagonisten als vielversprechende Therapeutika zur Behandlung von Asthma oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) betrachtet ^{35,71}.

Da die Relevanz des TRPA1 bei der Verarbeitung nozizeptiver Information erst vor wenigen Jahren erkannt wurde, sind TRPA1-Antagonisten bislang noch nicht in klinischen Studien getestet worden. Doch einige TRPA1-Antagonisten, darunter das in dieser Arbeit verwendete HC-030031, zeigten bereits vielversprechende Effekte in präklinischen Studien. So konnte der durch Acrolein verursachte Hustenreiz in Säugern durch HC-030031 inhibiert werden ^{72,73}.

Kürzlich wurde berichtet, dass eine genetische Mutation im TRPA1-Gen zu einer verstärkten Schmerzwahrnehmung führen kann. Dabei wurden Personen untersucht, die unter dem so genannten familiären episodischen Schmerzsyndrom (FEPS) leiden, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, die in Kolumbien und Südamerika verbreitet ist. Bei Haplotyp-Analysen der Patienten wurde eine Punktmutation im Exon 22 des TRPA1-Gens entdeckt, die einen Austausch des Asparagins-855 zu einem Serin zur Folge hat. Diese Mutation führt zu einer fünffachen Verstärkung des einwärtsgerichteten Stroms bei TRPA1-Aktivierung, und somit zu erheblicher Potenzierung der TRPA1-vermittelten Schmerzwahrnehmung⁷⁴. Aufgrund der verstärkten TRPA1-abhängigen Schmerzwahrnehmung wären TRPA1-Antagonisten als Analgetika für diese Patienten besonders vielversprechend⁷⁵.

TRPA1-defiziente Mäuse zeigen eine drastisch reduzierte Formalin-Sensitivität⁶⁹. Zudem ist die Reaktion von TRPA1^{-/-}-DRG-Neuronen (Calcium-Einstrom) nach Zugabe von Allylisothiocyanat und 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ stark abgeschwächt³⁷. Darüber hinaus weisen TRPA1-defiziente Mäuse eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber kalten Temperaturen und mechanischer Stimulation auf⁷⁶ und auch die senfö- und bradykinin-vermittelte mechanische Hyperalgesie ist in TRPA1-defizienten Mäusen signifikant reduziert²⁷. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde zudem berichtet, dass die capsaicin-induzierte neurogene Entzündung durch intrathekale Injektion eines TRPA1-Antagonisten reduziert werden kann⁷⁷. Dies zeigt, dass der zentral exprimierte TRPA1 nach peripherer Stimulation und nozizeptiver Aktivität zu neurogener Entzündung und zentraler Sensibilisierung beiträgt, wobei der Mechanismus bislang unklar ist.

1. Einleitung

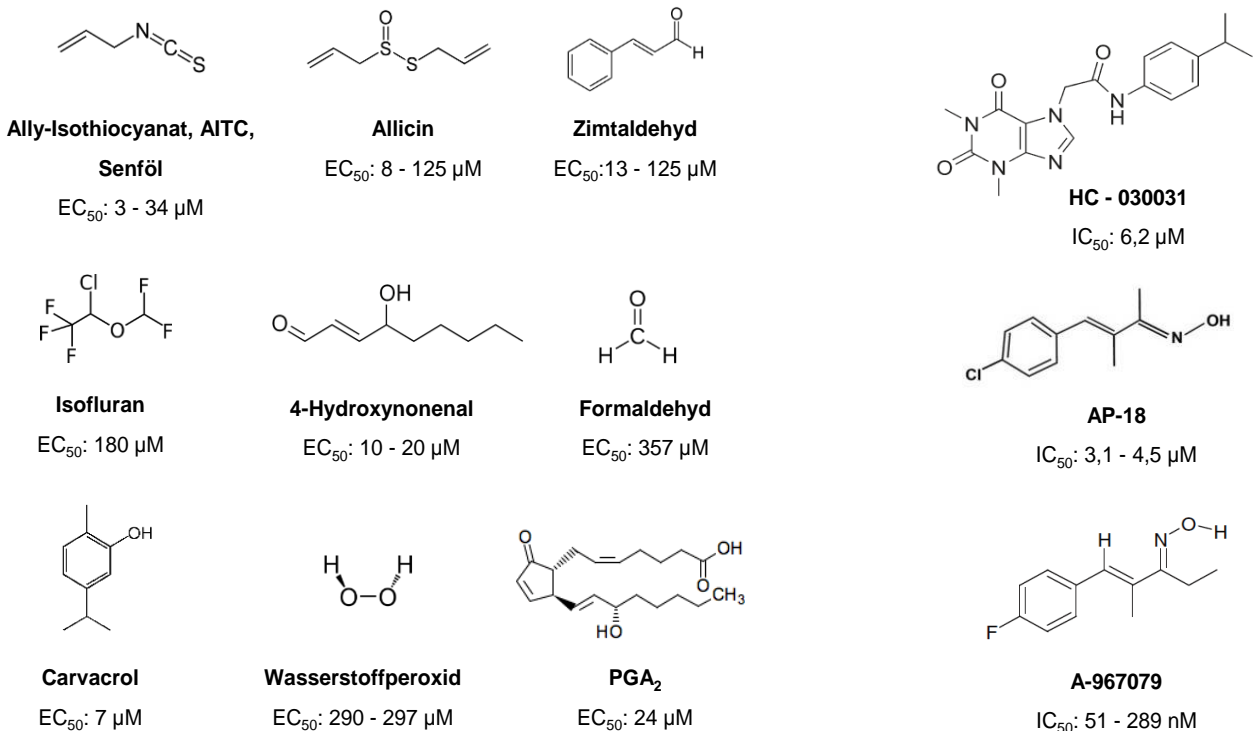


Abb. 1.4: **ausgewählte TRPA1-Agonisten**

Gezeigt sind die Strukturen einiger TRPA1-Agonisten mit ihren jeweiligen EC₅₀-Werten. Darunter sind die als stechend wahrgenommenen Substanzen Allyl-Isouthiocyanat, Allicin, Formalin und Wasserstoffperoxid. Auch sekundäre Pflanzenstoffe wie Carvacrol und Zimtaldehyd sind TRPA1-Agonisten sowie das Inhalationsangetikum Isofluran. Zu den endogenen TRPA1-Agonisten gehören 4-Hydroxynonenal und das oxidierte Lipid Prostaglandin A₂^{32,35}.

Abb. 1.5: **TRPA1-Antagonisten**

Gezeigt sind die Strukturen der selektiven TRPA1-Antagonisten AP-18 und A-967079 sowie dem in dieser Arbeit verwendeten HC-030031 mit ihren jeweiligen IC₅₀-Werten³².

1.3 Zentrale Sensibilisierung

Der Begriff „zentrale Sensibilisierung“ beschreibt ein Phänomen, das durch Aktivierung von Nozizeptoren bei der ersten synaptischen Verschaltung im Dorsalhorn des Rückenmarks auftritt, und zur Verstärkung, zeitlichen Verlängerung oder räumlichen Ausdehnung des peripheren Signals führt. Ein Beispiel für die physiologische Auswirkung einer zentralen Sensibilisierung ist, dass es bei Entzündungen nicht nur am unmittelbaren Entzündungsort, sondern auch in umliegenden Regionen zu einem gesteigerten Schmerzempfinden kommt. Diese so genannte sekundäre Hyperalgesie wird durch zentrale Sensibilisierung ausgelöst^{78,79}.

Die Verstärkung des peripheren Signals kommt durch synaptische Veränderungen zustande, die durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. In einer frühen Phase zentraler Sensibilisierung führt verstärkte neuronale Aktivität postsynaptisch zu Phosphorylierung und Translokation von ionotropen N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren zur synaptischen Membran. NMDA-Rezeptoren und AMPA-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-Rezeptoren werden von Glutamat aktiviert, das bei neuronaler Aktivität ebenfalls verstärkt freigesetzt wird. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat ist normalerweise durch Magnesiumionen blockiert. Doch durch Depolarisierung der Membran, die beispielsweise durch wiederholte Schmerzfaseraktivität zustande kommt, wird die Blockade der Magnesiumionen aufgehoben und der NMDA-Rezeptor kann leichter durch Glutamat aktiviert werden. Aktivierung des NMDA- und AMPA-Rezeptors führt zu Calciumeinstrom, was eine weitere Depolarisation der Membran auslösen kann. Durch die erhöhte Translokation der NMDA-Rezeptoren an die synaptische Membran, sowie die Aufhebung der Magnesiumblockade und die somit erleichterte Aktivierung des NMDA-Rezeptors, wird die postsynaptische Antwort auf den peripheren Stimulus erheblich verstärkt⁸⁰.

In der späteren Phase zentraler Sensibilisierung kommt es zu Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, was zur Expression proinflammatorischer Gene führt, deren Produkte, z.B. *COX-2*, *NK-1*, *FOS* und *JUN* zu einer Verstärkung und zeitlichen Verlängerung der neurogenen Inflammation beitragen⁸¹⁻⁸³, da Entzündungsmediatoren und Cytokine, wie TNF α , Bradykinin, NGF und PGE₂ freigesetzt werden. Diese Substanzen binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, welche die Aktivität von Proteinkinasen (PKA, PKC) und Phospholipasen (cPLA₂, PLC β , PLC γ) erhöhen^{40,84,85}.

Auch aktivitätsunabhängige synaptische Plastizität kann zu zentraler Sensibilisierung beitragen. Dazu gehören Änderungen von Gap Junctions in nozizeptiven Neuronen des Dorsalhorns, Änderungen des Membranpotentials sowie neuronale Interaktion mit Mikroglia und Astrozyten^{82,83,86-88}.

Diese zentralen Sensibilisierungsmechanismen führen zu höherer Erregbarkeit des Nozizeptors sowie zu Potenzierung und zeitlicher Verlängerung (Langzeitpotenzierung) des peripheren Signals. Überdies führen diese Mechanismen auch zu Schmerz-wahrnehmung bei harmlosen nicht noxischen Stimulationen und zu anhaltender Schmerz-wahrnehmung bei ausbleibender Stimulation^{79,89}.

1.4 Epoxyeicosatriensäuren (EETs)

1.4.1 Synthese der EETs

Arachidonsäure ist eine ubiquitäre, vierfach ungesättigte Fettsäure, die mit Phospholipiden verestert in der Zellmembran eingelagert ist und durch PLA₂-Aktivität freigesetzt wird ⁹⁰. Im Cytosol kann Arachidonsäure von drei verschiedenen Enzymfamilien oxidativ umgesetzt werden, den Cyclooxygenasen (COX), den Lipoxygenasen (LOX) und den Cytochrom-P₄₅₀-Epoxygenasen (CYP) ²².

CYP-Epoxygenasen sind unspezifische Monooxygenasen, die elementaren Sauerstoff mittels Cytochrom-P₄₅₀ aufspalten. Dabei wird ein Sauerstoffatom als Epoxid- oder Hydroxylgruppe auf das Substrat übertragen, und das andere zu H₂O reduziert. Epoxidgruppen können bei der Arachidonsäure nur an einer der vier Doppelbindungen gebildet werden. Daher entstehen bei der Epoxidation der Arachidonsäure über CYP-Epoxygenasen vier Regioisomere, die sich lediglich durch die Position der Epoxidgruppe unterscheiden, 5,6, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET. Für die EET-Synthese sind hauptsächlich die CYP-Unterfamilien 2C und 2J verantwortlich ⁹¹. Allerdings gibt es auch Berichte über EET-Synthese durch CYP-Epoxygenasen der Unterfamilien 1A, 3A und 2B ^{92,93}.

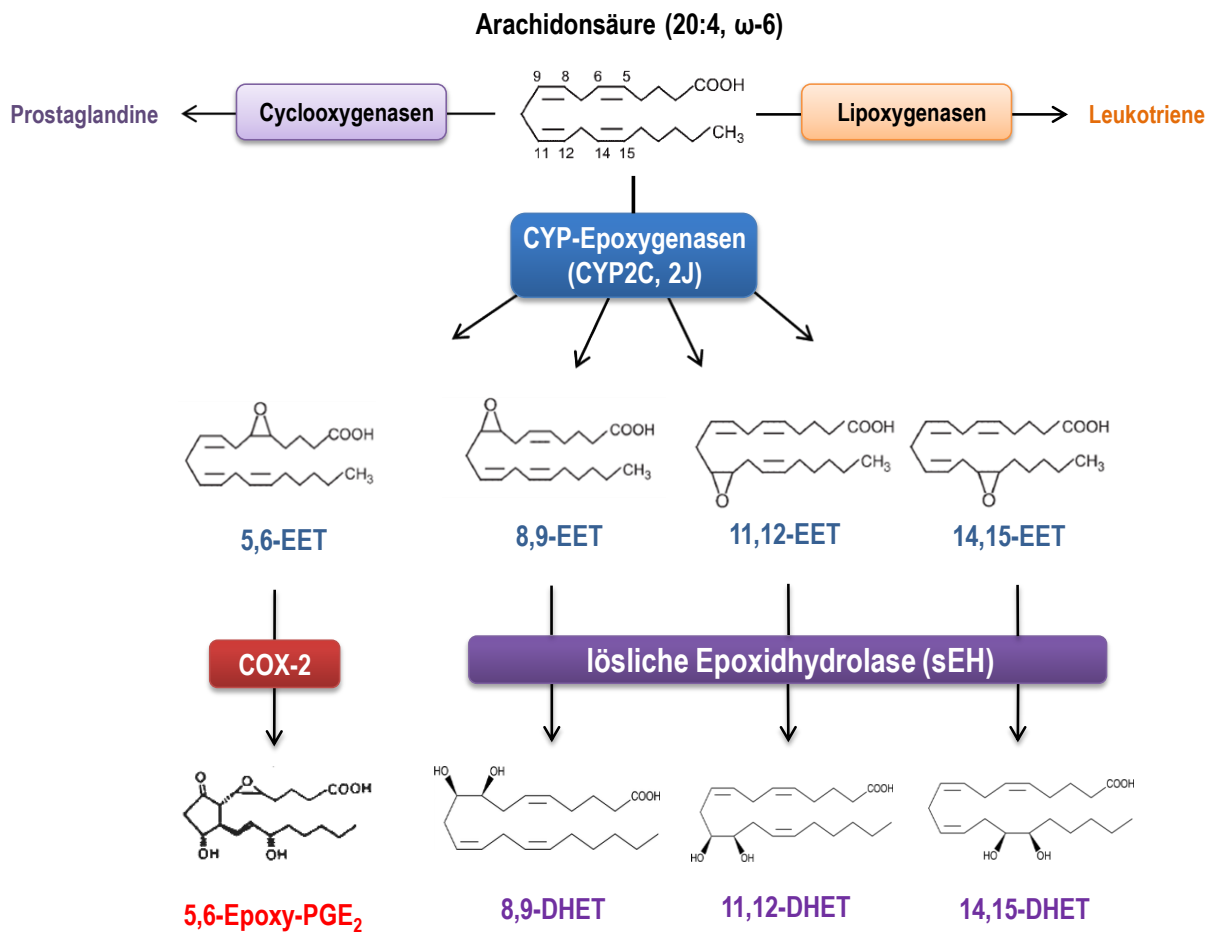


Abb. 1.6: **Synthese der Epoxyeicosatriensäuren aus Arachidonsäure und deren Metabolisierung durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2)** (modifiziert nach Spector, 2007 und Carrol *et al.*, 1993^{91,94})

Drei der vier EETs werden überwiegend von der löslichen Epoxid-Hydrolase (sEH) abgebaut (8,9-, 11,12-, und 14,15-EET). Die lösliche Epoxidhydrolase ist ein ubiquitäres Protein, das in der Zelle als Homodimer aus zwei identischen 62 kDa Monomeren vorliegt⁹⁵. Bei der Abbaureaktion der EETs wird Wasser angelagert und durch Hydrolyse werden zwei Hydroxylgruppen gebildet. Die Produkte dieser Reaktion werden als Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs) bezeichnet. Je nach Position der Hydroxylgruppen werden drei Regioisomere gebildet (8,9-, 11,12-, 14,15-DHET)⁹¹.

5,6-EET wird jedoch nur zu geringen Teilen über die sEH zu 5,6-DHET hydrolysiert und stattdessen überwiegend von COX-2 zu 5,6-Epoxy-PGE₂ umgesetzt⁹⁴. Biochemische Analysen der Metabolisierung von 5,6-EET durch die murine sEH ergaben einen K_m von 6 μM , was 5,6-EET zu einem schlechten Substrat für die sEH macht.

Den niedrigsten K_m und somit das beste Substrat für die sEH stellt 11,12-EET dar ($K_m = 0,6 \mu\text{M}$). Auch die Umsatzrate (V_{\max}) von 5,6-EET zu 5,6-DHET ist langsam, verglichen mit dem Umsatz von 14,15-EET zu 14,15-DHET und liegt um den Faktor 66 darunter (5,6-EET zu 5,6-DHET: $300 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 14,15-EET zu 14,15-DHET: $20000 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)⁹⁶.

1.4.2 Biologische Funktionen der EETs und der sEH

EETs besitzen einige interessante biologische Funktionen, die vorwiegend aus Untersuchungen des kardiovaskulären- und renalen Systems hervorgehen. EETs werden aus Zellen freigesetzt und besitzen sowohl autokrine als auch parakrine Signalwirkung⁹⁷. Zudem sind EETs als EDHF (endothelial derived hyperpolarization factor) beschrieben worden. Dabei wurde beobachtet, dass 11,12- und 14,15-EET $\text{Ca}_{(v)}$ -Kanäle (spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs) modulieren, und dass 11,12-EET über einen cAMP abhängigen Prozess in vaskulären glatten Muskelzellen BK_{Ca} -Kanäle (large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channels) öffnet⁹⁸. Dies führt zu Hyperpolarisation und schließlich zu Vasorelaxation und Vasodilation von Blutgefäßen⁹⁹. Aufgrund dieser vasodilatativen Eigenschaft der EETs, wird die sEH als neues therapeutisches Zielprotein zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen betrachtet¹⁰⁰, da sEH-Hemmung zu höheren EET-Konzentrationen im Plasma führt^{101,102}. Darüber hinaus werden den EETs durch Hemmung der cytokin-induzierten NF- κ B-Transkription anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen¹⁰³. Bei pharmakologischer Hemmung der sEH konnten zwei antihyperalgetische Effekte beobachtet werden: zum einen die verminderte Expression des COX-2-Gens, zum anderen, im Zusammenspiel mit cAMP, die Erhöhung der StARD1-Genexpression, was zur Bildung von Neurosteroiden führt¹⁰⁴. Zudem aktivieren EETs PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor). Dieser Rezeptor besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften und verringert in kultivierten Epithelzellen die NF- κ B-vermittelte Expression proinflammatorischer Substanzen, wie das vascular cell adhesion molecule, das intracellular adhesion molecule und Endothelin¹⁰⁵. 5,6-EET wird bei mechanischem oder hypotonischem Stress von vaskulären Endothelzellen in Lunge und Darm freigesetzt und aktiviert TRPV4-Kanäle¹⁰⁶.

1.4.3 Physiologische Relevanz der EETs bei der Schmerzverarbeitung

Einige Funktionen der EETs im kardiovaskulären und renalen Kontext sind auch relevant für die Schmerzverarbeitung und für Sensibilisierungsprozesse von Nozizeptoren. Dazu zählen insbesondere die auto- und parakrine Signalwirkung der EETs und ihre Eigenschaft intrazelluläre Ionenkonzentrationen durch Aktivierung von Kationenkanälen zu modulieren. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass CYP2J-Isoformen und die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) in Trigeminalganglien-(TG-) Neuronen exprimiert sind¹⁰⁷. Das bedeutet, dass EETs nicht nur in renalen und kardiovaskulären Geweben, sondern auch in Neuronen des Nervensystems zu finden sind. Eines der EETs, 5,6-EET, konnte bereits als TRPV4-Agonist identifiziert werden⁶⁰. Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von EETs an der nozizeptiven Verarbeitung sein, da den TRP-Ionenkanälen essentielle Funktionen bei der Schmerzwahrnehmung und bei der Entwicklung neurogener Entzündung zugeschrieben werden^{22,108-110}. Insbesondere über spezifische, endogene TRP-Agonisten und deren Funktion bei Schmerzprozessen ist bislang wenig bekannt.

1.5 Fragestellung / Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob EETs einen Einfluss auf die Verarbeitung nozizeptiver Information haben. Dazu soll geklärt werden, ob EETs endogene Agonisten für ligandengesteuerte Kationenkanäle (insbesondere TRP-Kanäle) sind, und diese direkt aktivieren oder modulieren (sensibilisieren oder desensibilisieren) können. Im ersten Teil der Arbeit wird die sEH und die von ihr metabolisierten EETs (8,9-, 11,12- und 14,15-EET) untersucht. Es stellt sich die Frage, ob sEH-defiziente Mäuse eine Beeinträchtigung im Schmerzverhalten aufweisen und falls ja, wodurch diese zustande kommen kann. Im Zuge dessen soll die Regulation der EET-Synthese –und Freisetzung unter pathophysiologischen Bedingungen analysiert werden. Aufgrund der bereits veröffentlichten Daten, welche die sEH als entzündungshemmend charakterisieren, wird der Fokus in diesem Teil der Arbeit auf inflammatorischen Schmerzmodellen liegen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll das durch COX-2 metabolisierte 5,6-EET getrennt untersucht werden, da für dieses Lipid bereits ein aktivierender Einfluss auf TRP-Kanäle postuliert wurde⁶⁰. Dabei soll die Regulation der 5,6-EET-Synthese –und Freisetzung untersucht werden. Zudem soll geklärt werden, ob 5,6-EET bei Schmerz durch Aktivierung von Nozizeptoren freigesetzt werden und durch TRP-Kanal-Aktivierung zu neurogener Entzündung und zentraler Sensibilisierung beitragen kann. Überdies soll der Einfluss von 5,6-EET auf die nozizeptive Verarbeitung anhand verschiedener Tiermodelle *in vivo* getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Stoff	Hersteller
(±) 5,6-DHET (-Dihydroxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 5,6-EET (-Epoxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 8,9-DHET (-Dihydroxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 8,9-EET (-Epoxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 11,12-DHET (-Dihydroxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 11,12-EET (-Epoxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 14,15-DHET (-Dihydroxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
(±) 14,15-EET (-Epoxyeicosatriensäure)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
Aceton	JT Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Allylisothiocyanat (PESTANAL®, Senföl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
AMG 9810 [2E-N-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-3-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-2-Propenamid]	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS (Ammonium-(I)-Persulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Arachidonsäure	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA
<i>Anemone sulcata</i> -Toxin II (ATX II)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Borax (Di-Natrium-(I)-Tetraborat)	Merck, Darmstadt
Bradykinin-Acetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	JT Baker, Deventer, Niederlande
BSA (Rinderserumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe
Calcium-(II)-chlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Calcium-Ionophor (Calcimycin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Capsaicin ((<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-6-nonensäureamid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Carvacrol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Celecoxib	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2. Material und Methoden

Collagenase Typ CLS IV	Biochrom AG, Berlin
Complete Freud's Adjuvant (CFA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatrium-(I)-hydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatrium-EDTA (-Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dispase	Roche, Grenzach-Wyhlen
EGTA (Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure 99% (v/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol 70% (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	JT Baker, Deventer, Niederlande
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Fura-2-AM (-acetoxymethylester)	Biotium, Hayward, CA, USA
GDNF (<i>glial</i> cell line derived neurotrophic factor)	AppliChem, Darmstadt
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HC-030031 (2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6- tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4- isopropylphenyl)acetamid	Tocris bioscience, Ellisville, MO, USA
Hefeextrakt	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol (2-Propanol) 100% (v/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kalium-(I)-chlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ketavet® (Ketamin)	Pfizer, Karlsruhe
Lipofectamin™ 2000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LPS (Lipopolysaccharid <i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesium-(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesium-(II)-sulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MES (2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol 100% (v/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MS-PPOH (N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)- benzolhexanamid)	Cayman, Ann Arbor, Mi, USA

Dinatrium-(I)-carbonat	AppliChem, Darmstadt
Natrium-(I)-chlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrium-(I)-gluconat	AppliChem, Darmstadt
Natrium-(I)-hydroxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NGF-7S (nerve growth factor)	AppliChem, Darmstadt
Paclitaxel (Taxol®)	Tocris bioscience, Ellisville, MO, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Phorbol-12,13-didecanoat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pluronic F-127	Biotium, Hayward, CA, USA
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rompun® (Xylazin)	Bayer, Leverkusen
Ruthenium Rot	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure, 37% (v/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfaphenazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tetraethylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TNF α (Ratte)	PeproTech, Umkirch
Trypton	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
t-AUCB (<i>trans</i> -4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoesäure)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Brandes, Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Uni Frankfurt
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton® X-100 (O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TurboFect™	Fermentas, St. Leon-Rot
Tween®-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zymosan A (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.2 Lösungen und Puffer

TN(T)-Puffer

100 mM NaCl
50 mM Tris
(0,1% (v/v) Tween 20)
ad. 1l aqua dest., pH 7,3

SIF-Puffer

107,8 mM NaCl
26,2 mM Na₂CO₃
3,5 mM KCl
1,5 mM CaCl₂ · 2 H₂O
0,7 mM MgSO₄ · 7 H₂O
9,6 mM Na⁺-Gluconat
5 mM D-Glucose
7,6 mM Saccharose
10 mM HEPES bzw. MES
begasen mit 95% O₂ und 5% CO₂,
pH auf 7,4 bzw. 5,2 (MES) einstellen,
ad. 1 l. aqua dest.

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
200 mM L-Glycin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,3

4x-Lämmli-Puffer

100 mM Tris
5% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerin
0,06% (v/v) Bromphenolblau
5% (v/v) β-Mercaptoethanol

Boratpuffer

50 mM Borsäure
23,6 mM Borax (Na-tetraborat)
ad. 100 ml aqua dest.,
pH 8,5 mit NaOH

SES (standard external solution) für Calcium-Imaging

145 mM NaCl
1,25 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
5 mM KCl
10 mM D-Glucose
10 mM HEPES
ad. 1l aqua dest., pH 7,3 mit NaOH

Lyse-Puffer

0,1 M HCl,
1% (v/v) Triton-X

SDS-Transferpuffer

50 mM Tris
190 mM L-Glycin
20% (v/v) Methanol
pH 8,3

Ponceau S-Färbelösung

0,5% (w/v) Ponceau S
3% (v/v) Eisessig

LB-Medium

1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
(1,8% (w/v) Agar)
pH 7,2, ad. 1 l. aqua dest., autoklavieren

FM-Medium für Glycerin-Stocks

60% LB-Medium (v/v)
40% Glycerin (v/v)

TE-Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0, autoklavieren

Saline f. Injektionen

0,9% (w/v) NaCl
autoklavieren

2.1.3 Zellkulturmedien –und Supplemente

Medium / Supplement	Hersteller
B27-Supplement	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DMEM GlutaMAX™	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 GlutaMAX™	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Gentamicin	<i>Bio Whittaker</i> Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien
HBSS	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Neurobasal™	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin G/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 GlutaMAX™	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA (0,05% v/v)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.4 Laborgeräte

Name / Hersteller	Verwendung
LC-MS/MS-System: API 4000 Triple Quadropol Tandem- Massenspektrometer, Applied Biosystems, Darmstadt	Messung der Epoxyeicosatriensäuren und der Dihydroxyeicosatriensäuren in Gewebe und Zellkulturproben.
Agilent 1100 HPLC, Agilent, Waldbronn	
HTC Pal Autosampler, Chromtech, Idstein	
Gemini NX C18 Säule und Vorsäule, Phenomex, Aschaffenburg	
Leica DMI4000 B Mikroskop, CTR 6500 HS, DFC360 FX – Kamera, Leica Microsystems, Wetzlar	Calcium-Imaging Messungen
Zeiss Axioskop 2 FS Plus, Carl Zeiss, Oberkochen	
Polychrome V, TILL Imago Kamera TILL Photonics, Gräfelfing	
Zeiss Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen	Immunhistologische Analysen
MELK (Multi-Epitop-Ligand-Karthographie)-Prototyp, Meltec, Magdeburg	Immunhistologische Analysen mit mehreren Epitopen

2.1.5 Verwendete Plasmide

Plasmid	Hintergrund	Selektionsmarker	Insert
FLAG-(m)TRPA1-IRES-GFP	pIRES	Ampicillin / Neomycin	<i>trpa1</i> (mm)
(h)TRPA1³⁵	pCDNA3.1(+)	Ampicillin / Neomycin	<i>trpa1</i> (hsa)
(h)TRPA1-3CK³⁵	pCDNA3.1(+)	Ampicillin / Neomycin	<i>trpa1</i> (l) Mutationen: C612S, C641S, C665S, K710R
(h)TRPA1-3CK-2C³⁵	pCDNA3.1(+)	Ampicillin / Neomycin	<i>trpa1</i> (l) Mutationen: C414S, C421S, C612S, C641S, C665S, K710R
(h)TRPV4-YFP¹¹¹	pCDNA3.1(+)	Ampicillin / Neomycin	<i>trpv4</i> (l)

Die (*h*)*trpa1*-Mutanten 3CK und 3CK-2C wurden freundlicherweise von Sven Jordt (Yale University, School of Pharmacology, New Haven) und Christian von Hehn (CHB, Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit-sEH (lösliche Epoxidhydrolase)	1 : 2000	Zur Verfügung gestellt von Prof. Brandes, Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Uni Frankfurt
Anti-Mouse-COX-2	1 : 500	Cayman, Ann Arbor USA
Anti-Mouse-HSP90	1 : 2000	Santa Cruz Biotechnol., Santa Cruz, USA
Anti-Mouse-ERK-2	1 : 500	Santa Cruz Biotechnol., Santa Cruz, USA

2.1.6.2 Immunhistochemie (IHC) / Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK)

Antikörper	Verdünnung		Hersteller
	IHC	MELK	
Anti-Rabbit-sEH (lösliche Epoxidhydrolase)	1 : 1000	----	s. o.
Anti-Mouse-NeuN (neuronale Nuclei)	1 : 1000	1 : 200	Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-Goat-CGRP (calcitonin gene related peptide)	1 : 1000	----	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Rabbit-TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1)	1 : 1000	----	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Mouse-NF-200 (Neurofilament 200)	----	1 : 100	AbD Serotec, Oxford, UK
IB4 (Isolectin B4)-FITC- Konjugat	----	1 : 100	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Anti-Rabbit-GFAP (glial fibrillary acidic protein)	----	1 : 100	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

HeLa-, HEK-293, N1E-115- oder CHO-Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und mit dem entsprechenden Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten, 500 xg) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Medium mit 50% FCS (v/v) und 20% DMSO (v/v) resuspendiert, und zu je 1 ml in Kryogefäße überführt. Nach langsamem Abkühlen der Zellen auf -80°C in Isopropanol, wurden die Kryogefäße für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen wurden die Zellen für 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C angewärmt und im entsprechenden Medium 1:15 verdünnt und ausplattiert.

2.2.1.2 Kultivierung und LPS-Stimulation von RAW-264.7-Makrophagen

Für die Kultivierung von RAW-264.7-Makrophagen wurden die Zellen in RPMI1640 GlutaMAX™-Medium mit 10% FCS (v/v), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin 100 µg/ml gegeben und bei 37 °C, 5% CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in Kulturschalen unterschiedlicher Größe angezogen. Die LPS-Stimulation erfolgte durch Zugabe von 5 µM LPS und verlief über einen Zeitraum von 15 Stunden¹¹². Danach wurden die Zellen durch Sonifizierung homogenisiert, und die Zelltrümmer wurden sedimentiert (5 Minuten, 10.000 xg). Der Überstand konnte für Immunoblot oder Lipidanalytik verwendet werden.

2.2.1.3 Präparation und Kultivierung adulter Dorsalwurzel-Ganglien (DRG)

Die DRGs wurden aus adulten männlichen Mäusen (Alter 6-8 Wochen) entnommen. Dafür wurden die Tiere mit CO₂ getötet. Während der Präparation wurden Nerven und Bindegewebe von den Ganglien abgetrennt. Daraufhin wurden die Ganglien in eiskühles HBSS überführt. Nach Sedimentierung (3 min, 1000 xg) wurden die Ganglien für 75 Minuten bei 37°C mit Collagenase/Dispase-Lösung inkubiert (500 U/ml Collagenase, 2.5 U/ml Dispase in Neurobasalmedium, dazu L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), B-27 und Gentamicin (50 µg/ml)). Danach wurden die Ganglien zweimal mit Waschmedium (Neurobasalmedium mit 10% FCS (v/v)) gewaschen und zentrifugiert (3 min, 1000 xg). Anschließend folgte eine zehnminütige Inkubation mit Trypsin-Lösung (Gibco). Nach Absaugen der Trypsin-Lösung wurden die Waschschrte wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in Waschmedium dissoziiert und entweder in 48-Well-Platten mit je 250 µl Neurobasalmedium gegeben, oder zu je 50 µl auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausplattiert (Ca-Imaging). Nach Ausplattieren auf Deckgläsern, wurden die Zellen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden entsprechende Mengen an Neurobasalmedium auf die Zellen gegeben, und die DRG-Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert (modifiziert nach Ji *et al.*, Neuron, 2002 ¹¹³)

2.2.1.4 Transiente Transfektion von HeLa- HEK- oder N1E-115-Zellen mit (h)TRPA1 oder (h)TRPV4

Alle drei Zelltypen (HeLa, HEK-293 und N1E-115) wurden in DMEM-Medium (Gibco) kultiviert, das mit Penicillin (100 U/ml; Gibco), Streptomycin (100 µg/ml; Gibco) und 10% FCS 10% (v/v) versehen war. Die Zellen wurden 1-2-mal passagiert und dann in 6-Well bis zu 90-95% Konfluenz angezogen. Für die Transfektion wurden pro 6-Well 1-2 µg Plasmid-DNA und 5 µl Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Nach 6-12 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 12-24 Stunden nach Transfektion auf Integration des Plasmids bzw. Expression des Proteins untersucht ⁷⁶.

Zur Sicherstellung der Funktionalität des Kanals wurden nach jeder Transfektion Calcium-Imaging-Messungen mit den GFP- oder YFP-positiven Zellen unter Verwendung des selektiven TRPA1-Agonisten Allylisothiocyanat bzw. des selektiven TRPV4-Agonisten 4 α -PDD durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 SDS-PAGE

Zellysate oder Proteinfractionen wurden in kochendem 1x-Lämmli-puffer geerntet und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Nacheinander wurden Trenn- und Sammelgel gegossen. Zuerst wurde das Trenngel in die Gießvorrichtung gegossen und mit Butanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel vorsichtig über das Trenngel gegossen. Danach wurden die Kämme in die Gießvorrichtung eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämme vorsichtig entfernt. Für die Elektrophorese wurden je 10-30 μ g Protein eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 – 100 V (Sammelgel) bzw. 120 – 150 V (Trenngel; modifiziert nach Schagger und Jagow, Anal Biochem, 1987¹¹⁴). Zur Identifizierung des Molekulargewichts wurden 5 μ l eines Proteinmarkers (peqGOLD Protein-Marker III, PEQLAB, Erlangen) in eine Geltasche gegeben.

2.2.2.2 Western Blot

Für die spezifische Identifizierung einzelner Proteine wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Dies geschah mithilfe einer Western-Blot-Apparatur (BioRad, München) bei einer Spannung von 100 V (1h). Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um sicherzustellen, dass die Proteine auf die Membran überführt wurden. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurde die Membran in TNT Lösung mit 5% Milchpulver (w/v) blockiert. Danach folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, der ebenfalls in TNT-Lösung mit 5% Milchpulver (w/v) verdünnt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben wurde. Dafür

wurde die Membran zusammen mit der Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt. Darauf folgten drei Waschschriffe, bei denen die Membran für jeweils fünf Minuten in TNT-Puffer gegeben wurde. Schließlich wurde die Membran für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert, der vorher in entsprechenden Verdünnungen in TNT-Puffer angesetzt wurde, und für die Detektion mit einer HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer wurden die ECL-Reagentien (Sigma) 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Lumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm detektiert (modifiziert nach Towbin *et al.*, PNAS, 1979¹¹⁵).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden 1-2 µg Plasmid-DNA zu 50 µl einer Zellsuspension kompetenter *E. coli*-Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen 10-30 Min auf Eis inkubiert. Nach einminütiger Inkubation der Zellen bei 45°C wurden 450 µl LB-Medium zur Zellsuspension gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation der Zellsuspension bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 7500xg sedimentiert und der Überstand wurde verworfen. Nachdem das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert wurde, konnte die Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker (Ampicillin 50 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml) in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert werden. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Platten am folgenden Tag nach gewachsenen Kolonien überprüft. Einzelkolonien wurden mittels Pipettenspitzen gepickt, und in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt¹¹⁶. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (peqlab GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben.

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Größenauftrennung von DNA. Verwendet wurden 1% Agarose-Gele (w/v) sowie Ethidiumbromid (1 µl einer 10 mg/ml Stammlösung pro 10 ml Agaroselösung).

Bei einer Temperatur von unter 60°C wurde die Lösung in eine Gießvorrichtung gegeben. Nach Abkühlen und Erstarrung wurden die Gele in Laufkammern gegeben, die mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt wurden. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x-Probenpuffer versetzt. Nachdem die Proben und der Größenstandard vorsichtig in die Geltaschen gegeben wurden, erfolgte die DNA-Auftrennung bei einer Spannung von 10-12 V/cm. Zuletzt wurden die Gele mittels einer Kamera unter UV-Licht dokumentiert (modifiziert nach Weber *et al.*, JBC, 1969¹¹⁷).

2.2.3.3 Plasmidrestriktion- und Sequenzierung

Die isolierten Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten (EcoRI, SmaI). Wiesen die dabei entstandenen Fragmente die vorausberechnete Größe auf, wurden die Klone in 400 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mithilfe des peqGOLD Xchange Plasmid Maxi-Kits (PEQLAB, Erlangen) nach Herstellerangaben. Je 1-2 µg des isolierten Plasmids wurden anschließend für die Sequenzierung zur Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) übersandt. Nach Abgleich der Plasmidsequenz mit der *in silico*-Sequenz und Übereinstimmung der Sequenzen konnte das Plasmid zur Transfektion verwendet werden.

2.2.4 Calcium-Imaging

Zur Echtzeitbestimmung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration von DRG-Neuronen wurden Kulturen aus Spinalganglien verwendet, die am Vortag präpariert und ausgesät wurden. Dafür wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern ausplattiert und vor der Messung mit dem „calciumselektiven“ Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM beladen (5 µM in Neurobasalmedium, dazu 1 µM Pluronic F-127) und für eine Stunde inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Medium wurden die Deckgläser in die Perfusionskammer des Fluoreszenzmikroskops überführt. Die extrazellulären Lösungen wurden mithilfe eines programmierbaren Perfusionssystems mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 2 ml pro Minute in die Perfusionskammer geleitet und von dort gleichmäßig abgesaugt, um eine

kontinuierliche Perfusion zu gewährleisten. Von den Stimulationssubstanzen wurden je nach Löslichkeit Stammlösungen in PBS, DMSO, Acetonitril oder Ethanol angesetzt. Diese wurden dann auf die gewünschte Endkonzentration mit extrazellulärer Lösung verdünnt. Die Fluoreszenzanregung der Zellen erfolgte abwechselnd bei 340 und 380 nm, und die Messung erfolgte je nach Messprotokoll über einen Zeitverlauf von 10 – 45 Minuten. Dabei wurden die Fluoreszenzemissionen bei 340 und 380 nm in Intervallen zu je zwei Sekunden von der Kamera aufgenommen. Zur Beobachtung der Fluoreszenzemission wurden Zeiss Achroplan-Wasserobjektive (10x 0,3 w Ph 1; 40x / 0,8 w), sowie Leica-Inversionsobjektive (N-Plan APO 10x / 0,25; HC-Plan 20x / 0,7) verwendet. Bei Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sinkt die Fluoreszenzemission bei 380 nm ab, während die Emission bei 340 nm steigt. Der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (F_{340} / F_{380}) ist proportional zur Calciumkonzentration¹¹⁸.

2.2.5 Immunochemische Methoden

2.2.5.1 Anfertigung von Kryoschnitten / Immunhistochemie

Zur Anfertigung von Kryo-Schnitten von Dorsalwurzelganglien-, Pfoten- oder Rückenmarksgewebe adulter Mäuse, wurden die Tiere zunächst mit CO₂ getötet und fixiert. Dabei wurden 20 ml 0,1 M NaCl-Lösung und danach 200 ml PFA-Lösung (4% PFA (w/v) in PBS) in den linken Ventrikel perfundiert. Zum Ausfluss der Lösungen wurde das rechte Atrium geöffnet. Nach der Fixierung wurde das Gewebe präpariert und zunächst für 1 Stunde in 10% Saccharose (w/v) inkubiert. Danach wurde das Gewebe für 24 Stunden in 20% Saccharose (w/v) und anschließend für weitere 24 Stunden in 30% Saccharose (w/v) inkubiert. Nach Einbetten des Gewebes in TFM (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Microsystems, Wetzlar), wurden das Gewebe bis zum Anfertigen der Schnitte bei -80°C gelagert. Die Kryoschnitte wurden mit einer Dicke von 10-18 µm mithilfe eines Kryotoms (Leica CM 3050S, Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt und auf einen Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) überführt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 0,1% Triton-X ((v/v) in PBS) permeabilisiert, um den Zugang zum Epitop zu erleichtern.

Für die Identifizierung spezifischer Proteine mittels Immunhistochemie wurden die Schnitte mit 5% Milchpulver ((w/v) in PBS) oder 3% BSA / PBS mit 10% Ziegen- oder Mausserum ((v/v) in PBS) blockiert. Danach folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, der in Blockierlösung verdünnt wurde. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (PBS +0,1% (v/v) Tween-20) für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte mit dem Zweitantikörper inkubiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen war (Alexa488 oder Cy3). Dafür wurde der Zweitantikörper 1:1000 in 1% BSA / PBST verdünnt, und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem dreimaligen Waschen für jeweils fünf Minuten mit PBST, wurden die Schnitte unter einem Deckglas mit einem Tropfen Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingebettet ¹¹⁹. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Kamera und Software aufgenommen (Zeiss Axio Observer.Z1-Mikroskop mit ApoTome, AxioCam MRm-Kamera, Carl Zeiss, Jena).

2.2.5.2 Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK)

Mit der MELK-Technologie können mehrere Proteine auf Gewebsschnitten oder in kultivierten Zellen mittels Fluoreszenzfärbung untersucht werden ^{120,121}. Dazu werden die Schnitte oder Zellen mit Antikörpern inkubiert, die am Epitop des Zielproteins binden. Diese Antikörper sind bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen (z. B. FITC), so dass kein Zweitantikörper benötigt wird. Das Fluoreszenzsignal des Antikörpers wird mit einer Kamera aufgenommen und anschließend durch Starklicht ausgebleicht. Der Vorgang kann mehrmals mit verschiedenen Antikörpern wiederholt werden. Die Fluoreszenzsignale können dann in Falschfarbenbildern dargestellt und übereinandergelegt werden. Nach jeder Inkubation mit den markierten Antikörpern (für je 15 Minuten in 1% BSA/PBS) wurde ein Phasenkontrastbild und danach ein Fluoreszenzbild aufgenommen, um anschließend eine Korrektur der Restfluoreszenz durchführen zu können.

2.2.6 Analytische Methoden

2.2.6.1 Messung der Epoxyeicosatriensäuren mittels LC-MS/MS

2.2.6.1.1 Extraktion der Lipide

Gewebeproben wurden vor der weiteren Extraktion zerkleinert. Dazu wurden zu jeder Probe sieben ZrO₂-Beads gegeben, und das Gewebe wurde mittels Schwingmühlen-Homogenisierung zerkleinert. Zu je 100-200 µl flüssiger Probe (Medium, Zellüberstände, Zell- oder Gewebelysate) wurden 600 µl Ethylacetat gegeben. Anschließend wurden 30 µl des Gemischs an internem Standard hinzugefügt, welches je 200 ng/ml der deuterierten Standards enthielt. Nach „Vortexen“ zur Vermischung der Probe mit der Extraktionslösung und anschließendem Abzentrifugieren (3 min, 10.000xg), wurde die obere, organische Phase (600 µl) abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Extraktion wiederholt und der Überstand wurde ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß gegeben (Σ 1200 µl). Im Anschluss daran wurde die gesamte organische Phase durch Erwärmen auf 45°C und stetiges Begasen mit N₂ entfernt, und die Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur Messung eingefroren. Parallel zu den Proben wurden Standards der jeweiligen Substanzen in einer Konzentrationsreihe von 0,1 – 250 ng/ml in der gleichen Weise extrahiert und bis zur Messung bei -80°C eingefroren.

2.2.6.1.2 Messung

Die extrahierten Lipide wurden in je 50 µl Methanol (50% (v/v)) aufgenommen. Je 30 µl wurden in die HPLC injiziert. Die Messung und Auswertung wurde von Herrn Carlo Angioni durchgeführt. Anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten und Fragmentmassen der Lipide konnten alle Epoxyeicosatriensäuren (5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET) und Dihydroxyeicosatriensäuren (-DHETs) detektiert werden¹²².

2.2.6.2 Messung der CGRP-Freisetzung aus Ischiasnerven mittels enzyme immuno-assay (EIA)

Für die Messung der CGRP-Freisetzung wurden adulte Mäuse unter CO₂-Atmosphäre getötet und die Ischiasnerven wurden präpariert. Dazu wurden die Nerven am Austrittspunkt aus dem lumbalen Plexus und am Verzweigungspunkt zum Nervus tibialis und Nervus peroneus communis abgetrennt und sofort in SIF-Puffer überführt. Das Experiment bestand aus vier Inkubationsschritten zu je fünf Minuten. Für die Stimulation der Nerven mit niedrigem pH, wurden die Nerven zunächst zweimal für fünf Minuten bei physiologischem pH inkubiert (SIF-Puffer, pH 7,4). Anschließend wurden die Nerven in 24-well Meshwells (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) überführt und für fünf Minuten mit SIF (pH 5,2) inkubiert. Danach wurden die Nerven erneut für fünf Minuten bei physiologischem pH (SIF, pH 7,4) inkubiert. Analog wurde für die Messung bei 47°C und bei Stimulation mit Allylthiocyanat (AITC) vorgegangen. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand (300 µl) abgenommen und für die Messung aufgearbeitet¹²³. Die CGRP-Messung wurde mithilfe des rat-CGRP-EIA-Kits (SPIbio, Paris, FR) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Hitzestimulation der Nerven und anschließende CGRP-Messung wurde von Dr. Michael Fischer (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Erlangen) durchgeführt¹²⁴.

2.2.7 Tiermodelle

2.2.7.1 Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten Mäuse wurden unter konstanter Temperatur (22 ± 0,5°C) und unter konstantem Tag-/Nachtzyklus gehalten. Sie wurden mit Trockenfutter und Wasser ad libitum versorgt. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt. Zur Vermeidung geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden für die Verhaltensversuche nur männliche Tiere verwendet. Darüber hinaus wurden alle Verhaltensversuche verblindet durchgeführt, so dass der Experimentator erst nach dem Versuch über Genotyp bzw. Behandlung informiert wurde. Bei den

Wildtypieren handelte es sich um männliche C57BL/6N Mäuse von Charles River (Sulzfeld), Harlan (Boxmeer, NL) oder Janvier (Le Geneset-Saint-Isle, FR).

2.2.7.2 Hot-Plate –und Cold-Plate-Test

Der Hot-Plate-Test für akuten Hitzeschmerz, sowie der Cold-Plate-Test für akuten Kälteschmerz wurden von Herrn Dr. Ovidiu Coste durchgeführt. Dafür wurden die Tiere auf eine beheizte oder gekühlte Platte gesetzt (52°C bzw. 4°C), bis eine nozizeptive Reaktion erkennbar war. Die Zeit vom Einsetzen des Tieres bis zur Reaktion wurde in Sekunden gemessen ¹²⁵.

2.2.7.3 Tailflick-Test

Der Tailflick-Test dient der Untersuchung des akuten Schmerzes. Dabei wird das mittlere Areal des Mäuseschwanzes mit einem Infrarot-Laser (IR-40) bestrahlt. Die Zeit, die bis zum Wegziehen des Schwanzes vergeht, wird automatisch gemessen. Nach 20 Sekunden ohne nozizeptive Reaktion der Tiere wurde das Experiment gestoppt. Für jedes Tier wurden drei Werte ermittelt. Zwischen den Messungen lagen Zeitintervalle von mindestens 20 Minuten, um eine Beeinträchtigung der Tiere durch vorige Messungen zu vermeiden ¹²⁶.

2.2.7.4 Dynamic-Plantar-Test

Zur Bestimmung des mechanischen Schwellenwertes wurden die Tiere auf ein Gitter gesetzt und vor dem Beginn der Versuche ca. 1 – 2 Stunden darauf belassen. Die Messung wurde mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Comerio, VA, Italien) durchgeführt. Dabei wurden die Hinterpfoten der Tiere mechanisch mit einem Stab stimuliert, der mit steigender Kraft gegen die Pfote drückte. Die Kraft stieg linear um 0,5 g / Sekunde an und hatte ihr Maximum nach 10 Sekunden bei 5 g.

Kam es zu einer nozizeptiven Reaktion, zog das Tier die Pfote zurück, und der Stab fiel herab. Die Latenzzeit bis zur Reaktion wurde automatisch in Sekunden gemessen. Konnte nach 20 Sekunden keine nozizeptive Reaktion beobachtet werden, wurde die Messung gestoppt. Es wurden je 20 µl einer 5 µM 5,6-EET-Lösung (in PBS), Zymosan-Lösung (12,5 mg / ml) oder Vehikel intraplantar in die linke Hinterpfote injiziert. Der mechanische Schwellenwert wurde in einem Zeitraum von 0,5 – 6h (5,6-EET) bzw. 1 – 96 h (Zymosan) nach Injektion ermittelt. Dabei wurden beide Pfoten jedes Tieres in Intervallen zu je 5 – 10 Minuten gemessen.

2.2.7.5 Radiant-Heat-Test / Hargreaves-Test

Für die Bestimmung des thermischen Schwellenwertes wurden die Tiere auf eine beheizbare Glasplatte gesetzt und zur Eingewöhnung 1 – 2 Stunden vor Beginn der Versuche darauf belassen. Die Messung erfolgte mit einem „Hargreaves apparatus“ (Ugo Basile, Comerio, VA, Italien). Die Hinterpfoten wurden mit einem fokussierten Lichtstrahl plantar angeleuchtet, was eine zunehmende Erwärmung der Pfote zur Folge hat. Kam es zu einer nozizeptiven Reaktion des Tiers durch Zurückziehen der Pfote, wurde die Latenzzeit automatisch gemessen. Nach 20 Sekunden ohne nozizeptive Reaktion wurde die Messung unterbrochen. Analog zum Dynamic Plantar Test wurden je 20 µl einer 5 µM 5,6-EET-Lösung (in PBS) oder Vehikel intraplantar in die linke Hinterpfote injiziert und beide Pfoten (behandelt und unbehandelt), wurden über einen Zeitraum von 0,5 – 6h in Intervallen zu je 5 – 10 Minute gemessen. Wird die Methode mit einer Zymosan-Injektion in die Hinterpfote und somit einem Entzündungsmodell kombiniert, so wird das Modell Hargreaves-Test genannt ¹²⁷.

2.2.7.6 Formalin-Test

Zur Untersuchung des Verhaltens bei akutem Schmerz wurde den Tieren je 20 µl einer 5%-Formalinlösung (v/v, in PBS), 5 µM 5,6-EET-Lösung (in PBS) oder Vehikel in die linke Hinterpfote injiziert. Daraufhin wurde die Zeit gemessen, in der die Tiere die behandelten Pfoten leckten, oder zurückzuckten. Diese Zeit wurde in Fünf-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 45 Minuten gemessen. Direkt nach der Injektion wurde mit der Messung begonnen ²⁶.

2.2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Rohdaten wurden Mittelwert und Standardfehler (SEM) zur Ermittlung der Streuung einzelner Stichproben berechnet. Bei gaußscher Normalverteilung der Datensätze wurden einzelne Gruppen mittels t-Test für ungepaarte Stichproben mit ungleichen Varianzen (heteroskedastischer t-Test) analysiert. Statistische Signifikanz wurde oberhalb eines Konfidenzintervalls von 95% erreicht. Zur statistischen Auswertung von Datensätzen mit nichtgaußscher Verteilung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (u-Test) verwendet. Die Rohdaten von Verhaltensversuchen wurden mittels zweifacher ANOVA mit anschließender Bonferroni-Postkorrektur ausgewertet. Dafür wurde die Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Dosis-Wirkungs-Kurven wurden ebenfalls mit GraphPad Prism 5 erstellt. Dabei wurde die Kurve aus mindestens sieben Einzelpunkten erstellt und mittels „non-linear-fit“ angepasst.

3. Ergebnisse

3.1 sEH-abhängige Effekte von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) bei der nozizeptiven Verarbeitung

3.1.1 Nozizeptives Verhalten sEH-defizienter Mäuse

Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) ist für den Abbau von drei der vier EETs verantwortlich¹²⁸. Pharmakologische Hemmung der sEH führt zu einer Akkumulation der von ihr metabolisierten EETs (8,9-, 11,12- 14,15-EET)^{102,129}, deren Eigenschaft Calcium- ($Ca_{(v)}$) und Kaliumkanäle (BK_{Ca}) zu aktivieren und zu modulieren, auch für die Aktivierung und Sensibilisierung von Nozizeptoren relevant sein könnte⁹⁸. Daher sollte zunächst ermittelt werden, ob sEH-defiziente Tiere einen Schmerzphänotyp aufweisen.

Für die Untersuchung der sEH bei der nozizeptiven Verarbeitung, wurden sEH-defiziente Mäuse verwendet, die freundlicherweise von Prof. R. Brandes (Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Goethe-Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden. Die Generierung dieses Stamms wurde bereits beschrieben¹⁰². Es wurden Verhaltensversuche mit sEH^{-/-}- und Wildtyp-Tieren durchgeführt, wobei nach Möglichkeit Tiere gleichen Alters und gleichen Geschlechts ausgewählt wurden. Zunächst wurde sichergestellt, dass die sEH-defizienten Mäuse keine motorischen Beeinträchtigungen haben. Danach wurden die Tiere in akuten und inflammatorischen Verhaltenstests bezüglich ihrer mechanischen und thermischen Schmerzschwellen untersucht und mit Wildtyp-Mäusen verglichen.

3.1.1.1 Akuter Hitze- und Kälteschmerz

Die sEH^{-/-}-Tiere wurden in akuten Schmerzmodellen auf ihre thermischen Schwellenwerte hin untersucht. Dafür wurden der Tail-Flick-, der Hot-Plate- und der Radiant Heat-Test eingesetzt. Beim Tail-Flick-Test wird der Schmerzreflex bei Hitzestimulation untersucht. Beim Hot-Plate-Test und beim Radiant-Heat-Test hingegen

spielt die bewusste Entscheidung der Maus eine größere Rolle. In den thermischen Akutschmerztests zeigten die sEH-defizienten Mäuse nur beim Hot-Plate-Test eine signifikant reduzierte Latenzzeit, bis es zur nozizeptiven Reaktion kam, während beim Tail-Flick-Test und beim Radiant-Heat-Test keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und sEH^{-/-}-Mäusen zu beobachten waren (Abb. 3.1.1).

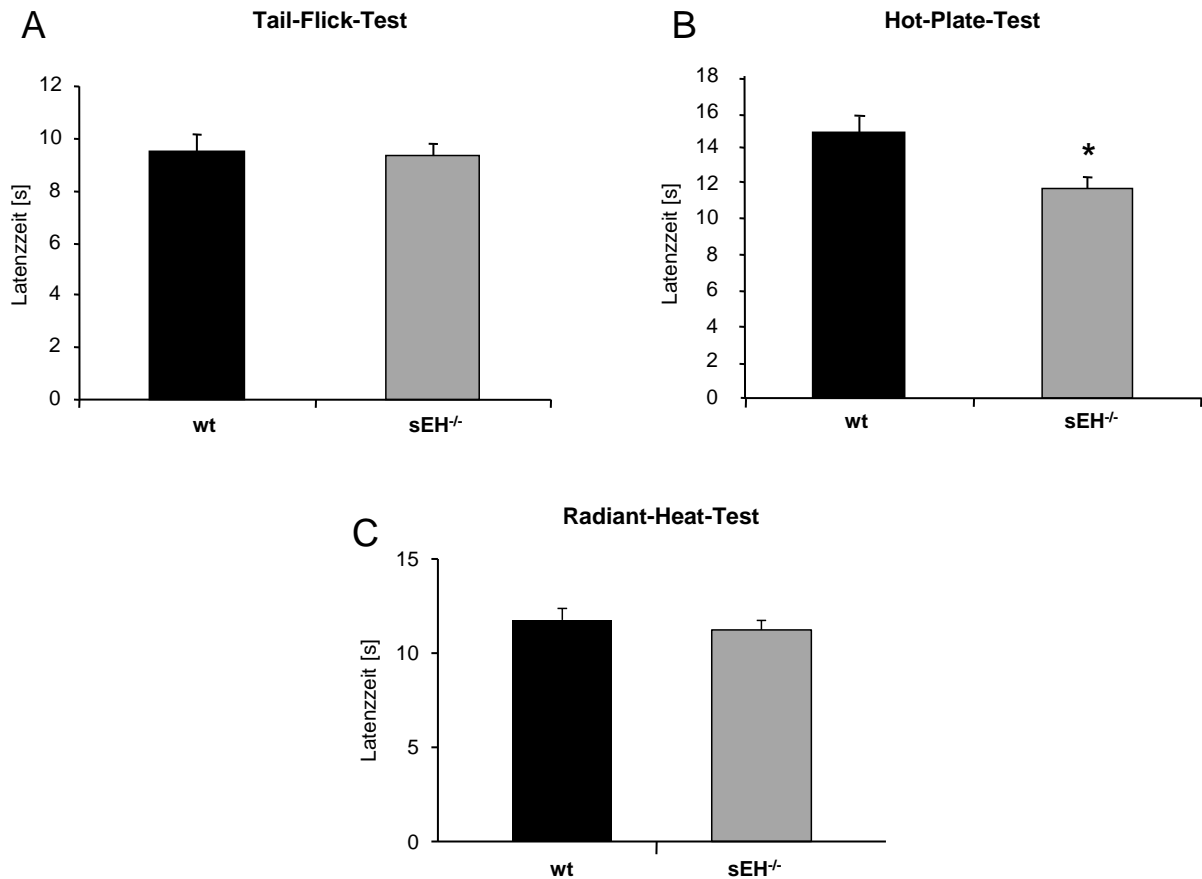


Abb. 3.1.1: **Nozizeptives Verhalten von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäusen auf akuten Hitzeschmerz.** (A) Tail-Flick-Test: Gemessen wurde die Zeit nach Erwärmung bis zum ruckartigen Zurückziehen des Schwanzes. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von acht Tieren. (B) Hot-Plate-Test. Die Tiere wurden auf eine erwärmte Platte gesetzt (52°C). Es wurde die Zeit gemessen, bis es zu einer nozizeptiven Reaktion kam. (C) Radiant Heat-Test. Gemessen wurde die Latenzzeit nach Hitzestimulus an die Hinterpfote. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von acht Tieren. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Die sEH-defizienten Tiere wurden ebenfalls auf akuten Kälteschmerz untersucht, und mit Wildtyp-Tieren verglichen. Dafür wurde der Cold-Plate-Test durchgeführt. Hierbei waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und sEH^{-/-}-Mäusen zu beobachten (Abb. 3.1.2).

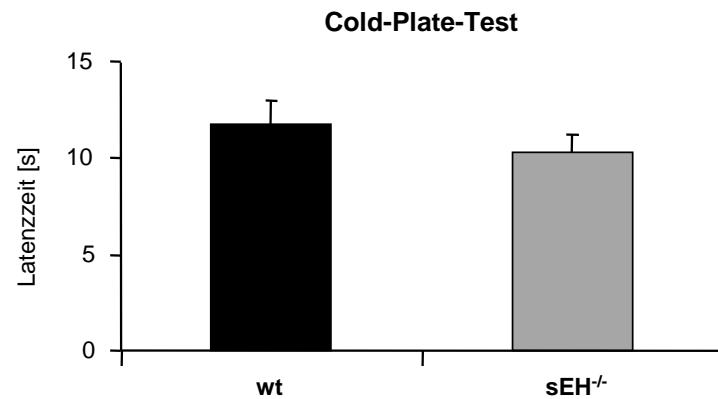


Abb. 3.1.2: **Nozizeptives Verhalten von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäuse auf akuten Kälteschmerz.** Die Tiere wurden auf eine gekühlte Metallplatte gesetzt (4°C). Gemessen wurde die Zeit, bis es zu einer nozizeptiven Reaktion kam. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von acht Tieren.

Die Resultate zeigen, dass nur beim Hot-Plate-Test eine niedrigere Schmerzschwelle ermittelt wurde, nicht aber bei den anderen Schmerztests. Dies deutet darauf hin, dass die Mäuse möglicherweise durch nervöses Verhalten geringere Latenzzeiten beim Hot-Plate-Test aufwiesen und nicht durch eine allgemein niedrigere thermische Schmerzschwelle.

3.1.1.2 Zymosan- und Formalin-induzierter inflammatorischer Schmerz

Neben den akuten Schmerztests wurde das Schmerzverhalten der sEH-defizienten Tiere unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht. Hierfür wurde den Tieren zunächst eine 5%-Formalinlösung (v/v) intraplantar in die linke Hinterpfote der Tiere injiziert. Dies löst eine Entzündung in der behandelten Pfote aus und führt zu inflammatorischen Schmerzen^{26,130}. Nach Injektion wurde der mechanische Schwellenwert zu den Zeitpunkten 4, 6, und 8 Stunden ermittelt. Dabei zeigten die sEH^{-/-}-Mäuse eine signifikant niedrigere mechanische Schmerzschwelle, als die Wildtyp-Tiere zu den Zeitpunkten 4 und 6 Stunden nach Injektion (Abb. 3.1.3).

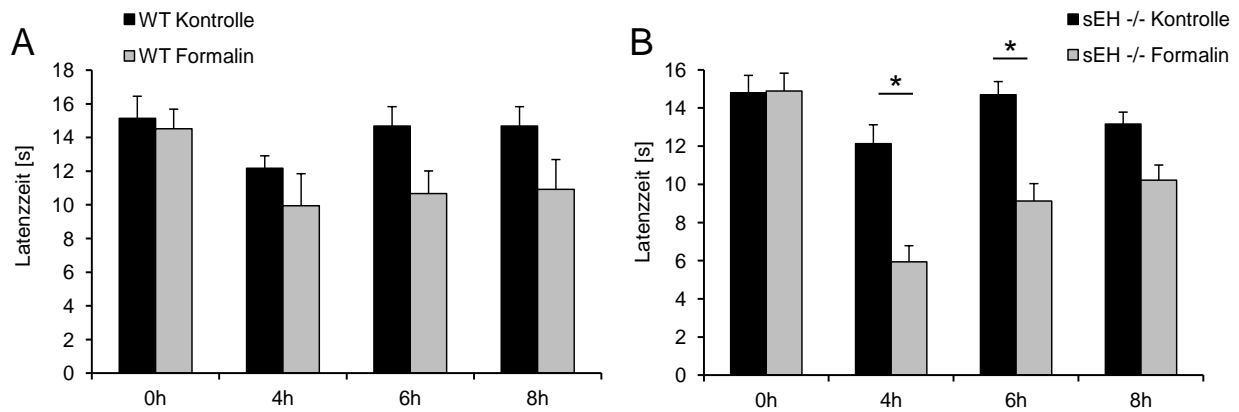


Abb. 3.1.3: **Mechanische Hyperalgesie von Wildtyp (wt, A) und sEH-defizienten Mäusen (B) bei Formalin-induziertem Entzündungsschmerz.** Je 20 μ l einer Formalinlösung (5% (v/v)) oder Vehikel wurde den Tieren in die linke Hinterpfote injiziert. 4, 6 und 8 Stunden nach Injektion wurde der mechanische Schwellenwert der Tiere ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 7-8 Tieren. * = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,05$.

Ein weiteres Tiermodell für Entzündungsschmerz ist das Zymosan-Modell. Zymosan ist ein Polysaccharid, das aus der Zellwand der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) isoliert wird, und nach Injektion zu einer Entzündung und entsprechenden inflammatorischen Schmerzen führt¹³¹. In diesem Modell wurde nach Injektion sowohl der mechanische, als auch der thermische Schwellenwert (Hargreaves-Test) ermittelt. Es wurden in jede Pfote 20 μ l einer 5 mg/ml Zymosan-Suspension (in PBS) oder Vehikel (PBS) injiziert und die mechanischen und thermischen Schwellenwerte wurden im Entzündungsverlauf verfolgt. Am Tag der Injektion wurde die mechanische und thermische Hyperalgesie zu Beginn der Entzündung (nach 1, 2 und 3 Stunden), sowie bei akuter Entzündung (nach 4, 6 und 8 Stunden) und bei Auflösung der Entzündung (nach 24 – 96 Stunden) ermittelt.

Es konnte beobachtet werden, dass die sEH^{-/-}-Mäuse eine signifikant niedrigere mechanische Schmerzschwelle 48 h und 96 h nach Zymosan-Injektion aufwiesen. Der thermische Schwellenwert hingegen zeigte keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und sEH^{-/-}-Mäusen im Entzündungsverlauf (Abb. 3.1.4).

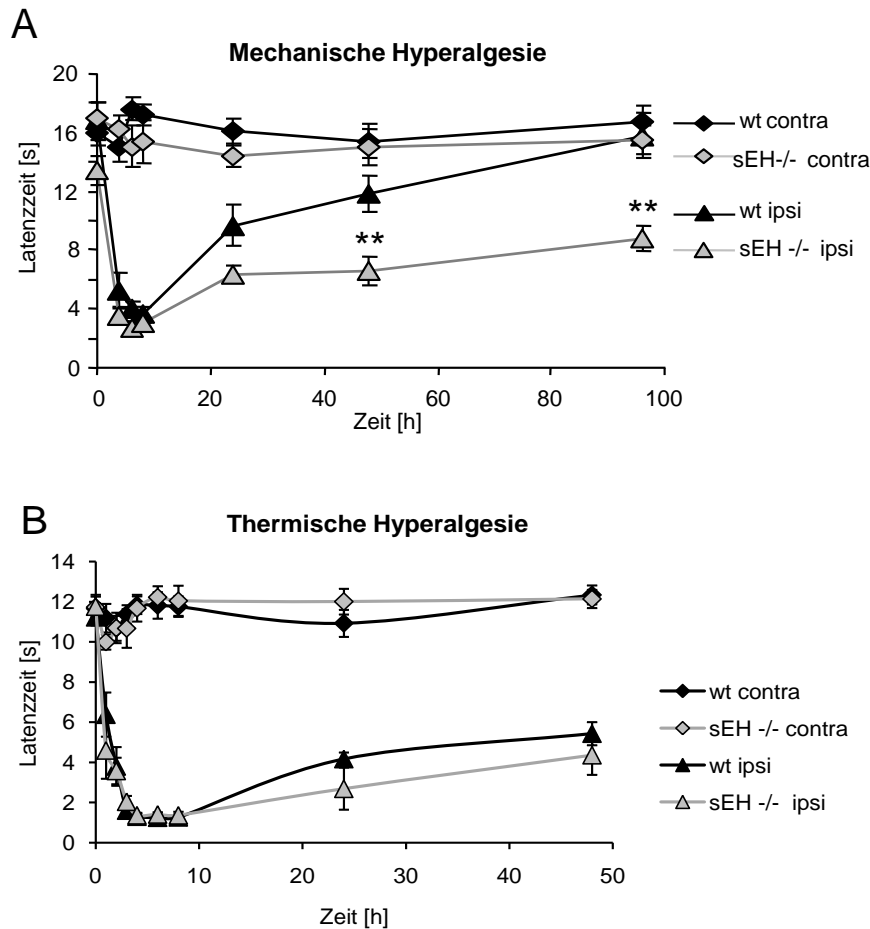


Abb. 3.1.4: **Mechanische Hyperalgesie (A) und thermische Hyperalgesie (B) von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäusen bei Zymosan-induziertem Entzündungsschmerz.** Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5-8 Tieren. ** = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,01$. Die Experimente aus 3.1.1 wurden von Dr. Ovidiu Coste (Klinische Pharmakologie, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt) durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse ein erhöhtes Schmerzempfinden nach mechanischer Stimulation bei sEH-defizienten Tieren vier bis sechs Stunden nach Formalin-induzierter Entzündung. Ebenso konnte ein erhöhtes Schmerzempfinden nach mechanischer Stimulation der sEH-defizienten Tiere in der späten Phase einer zymosan-induzierten Entzündung beobachtet werden. Die Auflösung der Entzündung und der damit verbundenen Schmerzen scheint bei den sEH-defizienten Tieren verspätet einzusetzen. Die thermischen Schwellenwerte der sEH-defizienten Tiere zeigen im Entzündungsverlauf keine Unterschiede zu den Wildtyp-Kontrollen. Dies bestätigt die Resultate der Akut-Hitzeschmerz-Versuche, bei denen in zwei von drei Tests kein Unterschied zwischen sEH-defizienten- und Wildtyp-Mäusen messbar war. Offenbar ist die thermische Schmerzschwelle der sEH-defizienten Mäuse nicht beeinträchtigt.

3.1.2 EET-Konzentrationen unter Kontrollbedingungen und bei inflammatorischen Schmerzen

3.1.2.1 EET-Konzentrationen im Plasma und in Dorsalwurzelganglien von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen

Nachdem eine erhöhte Sensibilität der sEH-defizienten Mäuse bei mechanischer Stimulation nach inflammatorischen Schmerzmodellen beobachtet wurde, sollten die EET-Konzentrationen von Wildtyp- und sEH-defizienten Tieren zunächst unbehandelt im Plasma ermittelt werden. Dafür wurde Plasma von je acht Tieren pro Gruppe gesammelt und daraus die Lipide extrahiert. Die EET-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen der von sEH metabolisierten EETs, 8,9- 11,12, und 14,15-EET, im Plasma der sEH^{-/-}-Mäuse wie erwartet signifikant erhöht waren. Die 5,6-EET-Konzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und sEH^{-/-}-Tieren (Abb. 3.1.5).

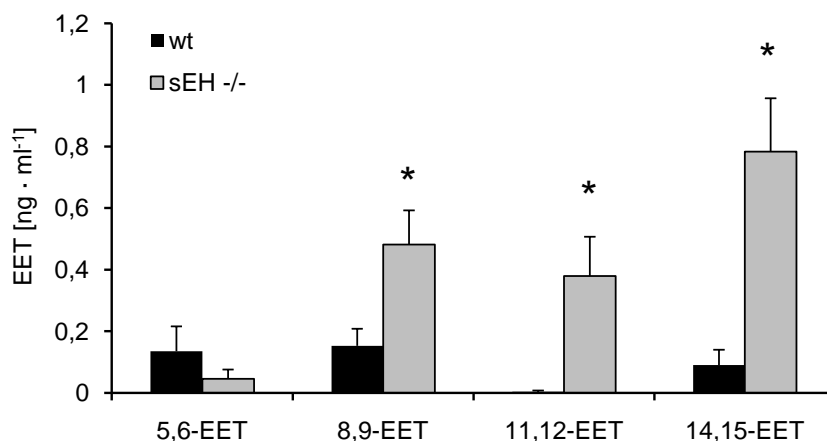


Abb. 3.1.5: **EET-Konzentrationen im Plasma von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen.** Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der Plasmakonzentrationen von jeweils acht Tieren pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Zudem wurden die basalen EET-Konzentrationen in Dorsalwurzelganglien (DRGs) von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen mittels LC-MS/MS bestimmt. Dabei konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Konzentrationen der von sEH metabolisierten

EETs, 8,9- 11,12, und 14,15-EET, in den DRGs der sEH^{-/-}-Mäuse signifikant erhöht waren. Die Konzentrationen an 5,6-EET zeigten keine signifikanten Unterschiede in Wildtyp und sEH^{-/-} (Abb. 3.1.6).

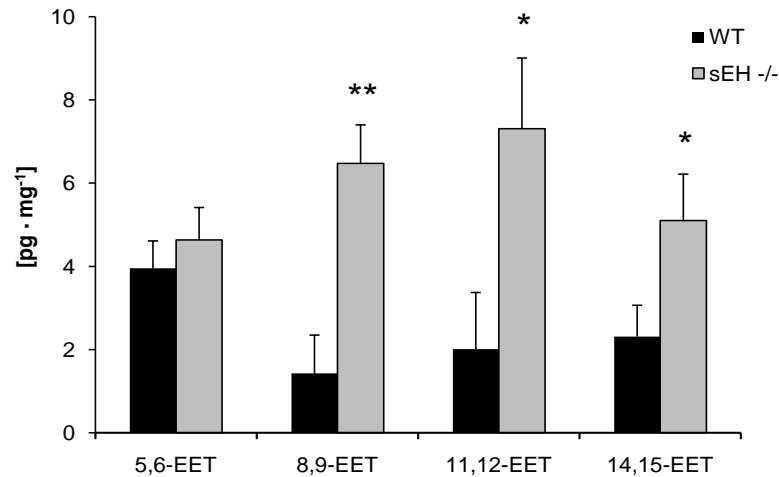


Abb. 3.1.6: **EET-Konzentrationen in DRGs von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen.** Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der EET-Konzentrationen von jeweils acht Tieren pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$, ** = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,01$.

Die Resultate der EET-Messungen unter Basalbedingungen zeigen, dass die Konzentrationen der von sEH metabolisierten EETs, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET, in Plasma und den DRGs der sEH^{-/-}-Tiere signifikant erhöht sind. In den DRGs der sEH-defizienter Tiere ist vor allem die 8,9-EET-Konzentration deutlich höher, als in Wildtyp-DRGs.

3.1.2.2 EET-Konzentrationen im Pfotenödem, Dorsalwurzelganglien und Dosalhorn bei Inflammatorischen Schmerzen

Nachdem höhere EET-Konzentrationen im Plasma der sEH^{-/-}-Mäuse unter Kontrollbedingungen gemessen wurden, sollten die EET-Konzentrationen unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurden die Konzentrationen der EETs in Pfotenödemen, Dorsalwurzelganglien (DRGs) und

Dorsalhörnern des Rückenmarks von Wildtyp-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im zymosan-induzierten Entzündungsverlauf ermittelt.

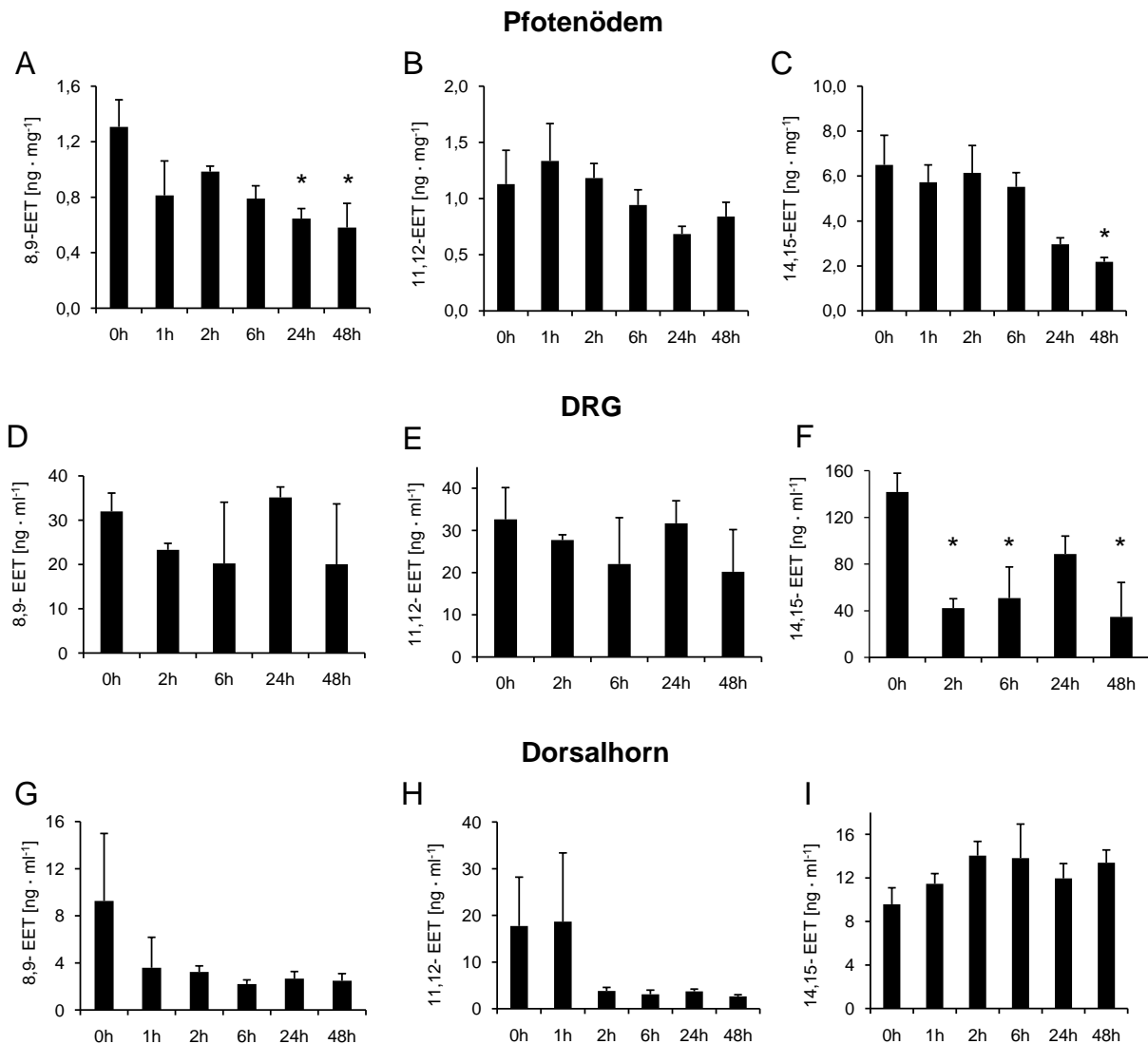


Abb. 3.1.7: EET-Konzentrationen im Pfotenödem (A-C), DRG (D-F) und Dorsalhorn (G-I) von Wildtyp-Mäusen 0-48h nach Zymosan-Injektion (10 mg/ml in PBS). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der EET-Konzentrationen von jeweils acht Tieren pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Bei Messung der EET-Konzentrationen im Entzündungsverlauf konnte beobachtet werden, dass die Konzentrationen von 8,9-, und 14,15-EET im Pfotenödem nach 24h bzw. 48h signifikant absinken.

In den DRGs zeigte sich, dass die Konzentrationen an 14,15-EET bereits nach zwei Stunden signifikant sinken, während bei den anderen beiden Regioisomeren keine signifikante Konzentrationsänderung festgestellt werden konnte. Im Dorsalhorn konnte bei keinem der drei EETs eine Änderung der Konzentration im Entzündungsverlauf beobachtet werden (Abb. 3.1.7).

Da zum Zeitpunkt 48 h nach Zymosan-Injektion sehr deutliche Unterschiede in den mechanischen Schwellenwerten bei den Verhaltensversuchen beobachtet wurden (Abb. 3.1.4 A), sollten nun die EET- und DHET-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt ermittelt werden. Dabei wurden die Pfotenödeme von Wildtyp- und sEH^{-/-}-Mäusen verglichen. Es stellte sich heraus, dass zu diesem Zeitpunkt insbesondere die Konzentrationen von 8,9- und 14,15-EET in Pfotenödemem der sEH-defizienten Mäuse signifikant erhöht waren (Abb. 3.1.8).

Wie erwartet sind die Konzentrationen an 8,9- und 14,15-DHET in den Pfotenödemem der sEH^{-/-}-Mäuse signifikant geringer, als in den Wildtyp-Tieren, da DHETs die Abbauprodukte der sEH sind. Die Konzentrationen an 5,6-EET und 5,6-DHET zeigen wie erwartet keine Unterschiede zwischen Wildtyp und sEH^{-/-}-Mäusen, da 5,6-EET nicht von sEH metabolisiert wird.

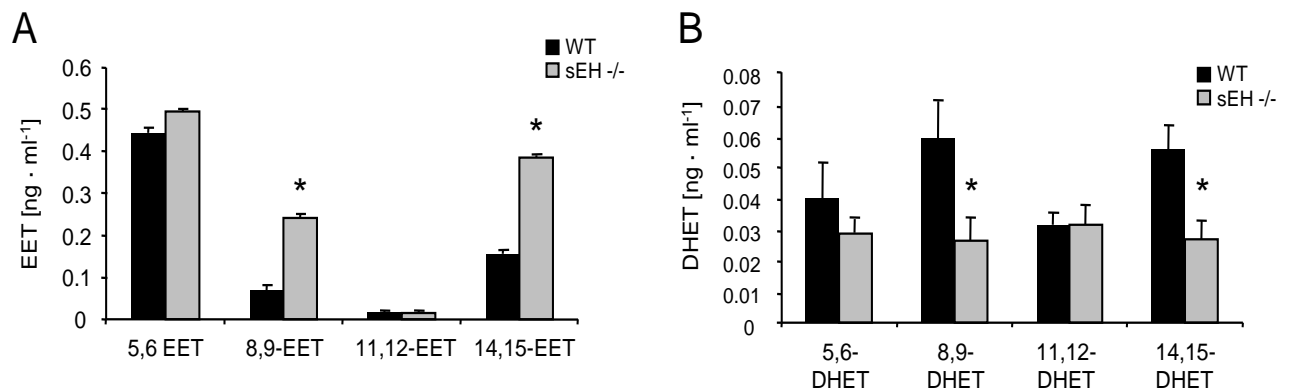


Abb. 3.1.8: EET-(A) und DHET-Konzentrationen (B) im Pfotenödem von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen 48h nach Zymosan-Injektion. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM der EET-Konzentrationen von jeweils sechs bis acht Tieren pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Dies zeigt, dass zum Zeitpunkt erhöhten Schmerzempfindens während der zymosan-induzierten Entzündung auch die Konzentrationen an 8,9-, und 14,15-EET im Pfotenödem signifikant erhöht sind.

3.1.2.3 Freisetzung von EETs nach Stimulation adulter DRGs mit Arachidonsäure, Cytokinen, Bradykinin und Paclitaxel

Nachdem beobachtet wurde, dass im Entzündungsverlauf in DRGs erhöhte EET-Konzentrationen vorliegen, stellte sich die Frage, ob EETs freigesetzt werden, wenn DRGs mit proinflammatorischen Substanzen stimuliert werden. Dafür wurden kultivierte DRGs von adulten Wildtyp-Mäusen mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Danach wurde die Freisetzung von EETs bestimmt, indem die EET-Konzentrationen in Überstand nach Stimulation mittels LC-MS/MS gemessen wurden. Für die Stimulation wurde zunächst Arachidonsäure verwendet (2 h, 0,5 μ M), um zu ermitteln, ob EETs aus Arachidonsäure *de novo* synthetisiert werden. Dabei fiel auf, dass nach Stimulation die Konzentrationen aller EETs im Überstand stark ansteigen. Ohne Stimulation waren bei den sEH-defizienten DRGs für alle EETs signifikant höhere und für alle DHETs signifikant geringere Konzentrationen (Abb. 3.1.9). Auch 5,6-EET scheint unter diesen Bedingungen von sEH abgebaut zu werden, da durch die vermehrte Bildung von 5,6-EET die Konzentrationen hoch genug für eine Metabolisierung durch sEH sind. Dies zeigt, dass die EET-Synthese durch Zugabe von Arachidonsäure in DRG-Kulturen induziert werden kann.

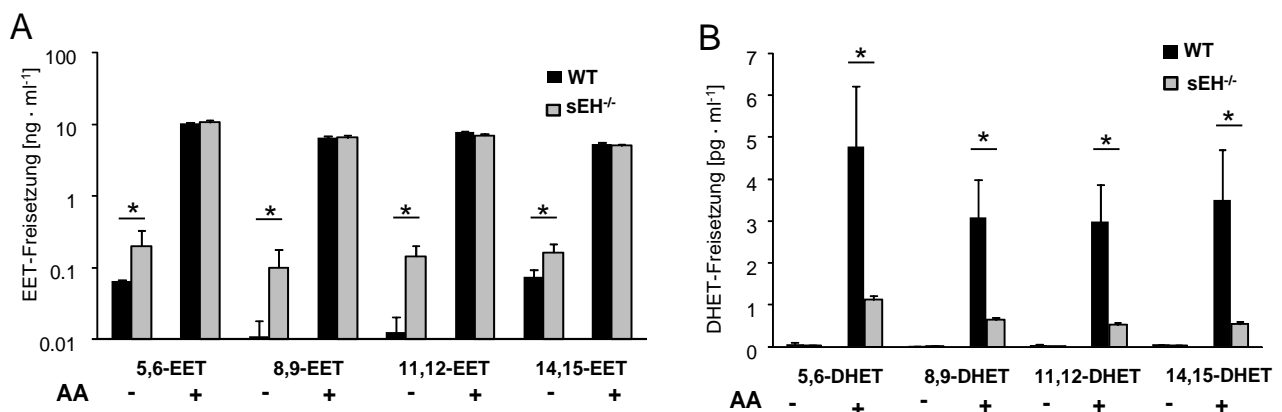


Abb. 3.1.9: EET-(A) und DHET-(B) Konzentrationen in Überstand von kultivierten DRGs adulter Wildtyp-Mäuse (schwarz) und sEH-defizienter Mäuse (grau) nach Stimulation mit 0,5 μ M Arachidonsäure für zwei Stunden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der Konzentrationen von jeweils sechs 48-Wellen pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,01$.

Anschließend wurden DRG-Zellen mit einer Mischung aus proinflammatorischen Cytokinen stimuliert, die NGF (nerve growth factor, 100 ng/ml), GDNF (glial cell-line

derived neurotrophic factor, 100 ng/ml) und TNF α (Tumor-Nekrosefaktor- α , 50 ng/ml) enthielt. Diese Mischung pronozizeptiver Cytokine wurde verwendet, um eine möglichst starke Aktivierung der Zellen zu erreichen. Überdies wurden DRG-Kulturen mit Paclitaxel, einem CYP2C-induzierendem Cytostatikum (1 μ M, 24 h)^{88,132}, sowie mit dem proinflammatorischen Peptidhormon Bradykinin stimuliert (1 μ M, 2 h), um eine Entzündung zu simulieren. Bradykinin wird bei einsetzender Entzündung von Mastzellen freigesetzt¹³³. Dabei wurde angenommen, dass die Induktion der CYP2C-Proteine zu erhöhter EET-Synthese führen könnte. Bei der Messung der EETs mittels LC-MS-MS konnten nur die beiden Regioisomere 11,12-, und 14,15-EET detektiert werden. Dabei zeigte sich jedoch, dass im Überstand der mit Paclitaxel stimulierten Zellen deutlich höhere EET-Konzentrationen vorlagen. Allerdings waren sowohl nach Stimulation mit der Cytokin-Mischung als auch mit Bradykinin keine Unterschiede in den Konzentrationen der beiden EETs im Überstand messbar (Abb. 3.1.10). Dies kann damit erklärt werden, dass sowohl die Cytokin-Mischung, als auch Bradykinin eine frühe Phase der Entzündung simulieren. Da eine Erhöhung der EET-Konzentrationen jedoch erst bei Auflösung der Entzündung gemessen wurde (24 – 48 h), könnten die Stimulationen durch die Cytokine und Bradykinin zu akut für eine EET-Beteiligung sein.

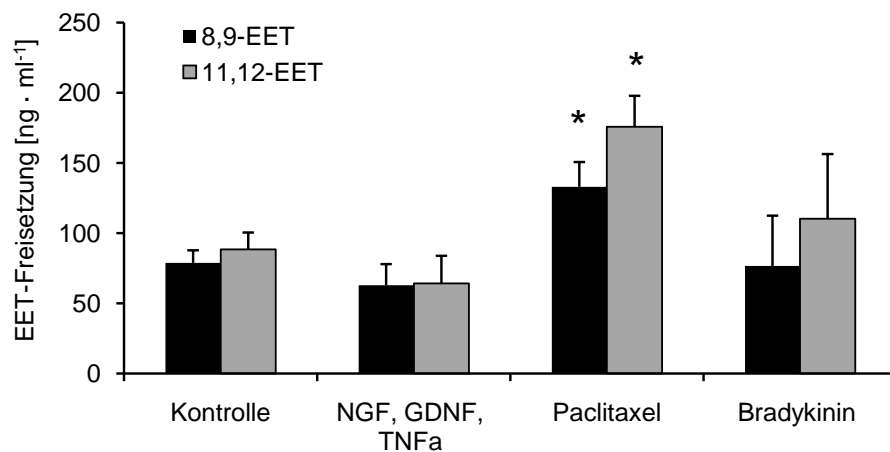


Abb. 3.1.10: **EET-Konzentrationen in Überstand von kultivierten DRGs adulter Wildtyp-Mäuse nach Stimulation mit NGF, GDNF, TNF α (6 h), Paclitaxel (24 h) und Bradykinin (2 h).** Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der Konzentrationen von jeweils sechs 48-Wellen pro Gruppe. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass die EET-Synthese in DRG-Kulturen aus Arachidonsäure induziert wird.

3.1.3 Expression der sEH in L4-L6-Dorsalwurzelganglien und Pfoten

3.1.3.1 Immunhistochemie und Multi-Epitop-Ligand-Kartographie- (MELK) Analyse adulter L4-L6-DRGs von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen

Nachdem die DRGs als eine wichtige Quelle der EET-Synthese identifiziert wurden, sollte die Expression der sEH in der Peripherie (Pfote) und in den Dorsalwurzelganglien L4-L6 mittels Immunhistochemie untersucht werden. Der dafür verwendete Antikörper wurde von Prof. Brandes zur Verfügung gestellt. Dabei zeigte sich, dass der Antikörper ein spezifisches Signal in den DRGs aufweist, in den Pfoten allerdings ein stark unspezifisches Signal zeigt, das auch in den Pfoten der sEH-defizienten Tiere erscheint. Daher wurde im Folgenden die sEH-Expression nur in den DRGs untersucht.

Als allgemeiner Zellmarker für Kernfärbungen wurde DAPI, und für die Färbung neuronaler Zellen NeuN verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass die sEH in einigen, aber nicht allen neuronalen Zellen exprimiert ist (Abb. 3.1.11).

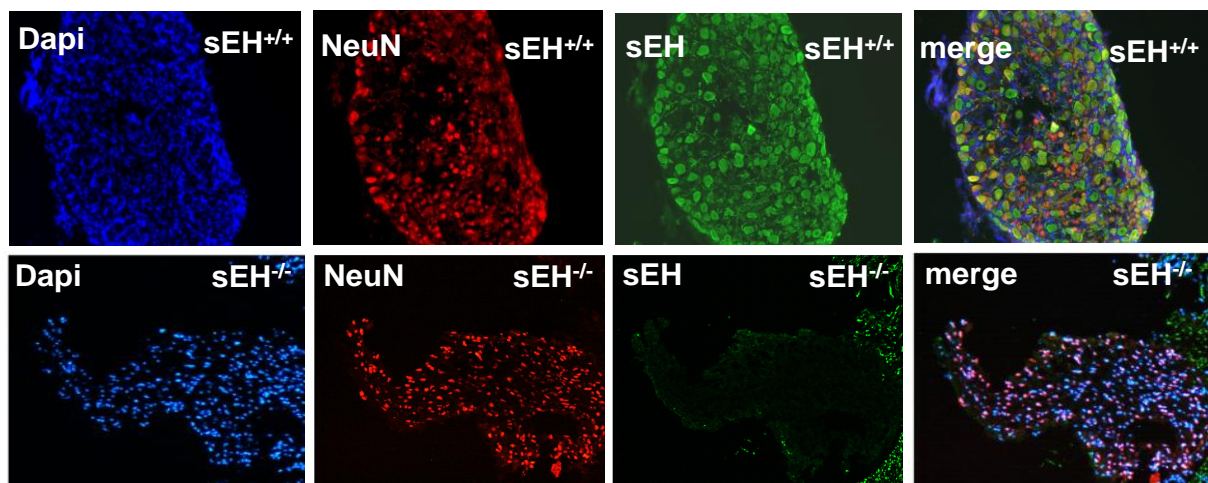


Abb. 3.1.11 Expression der sEH in Wildtyp- (oben) und sEH-defizienten L4-L6-DRGs (unten). Als Marker wurden DAPI (blau) und NeuN (rot) verwendet. Die sEH wurde in grün angefärbt. Rechts sind die Kolokalisationen gezeigt.

Anschließend wurde untersucht, ob die sEH in nozizeptiven Neuronen exprimiert ist. Dafür wurden Schnitte von Wildtyp-L4-L6-DRGs mit DAPI, sEH- und CGRP-Antikörpern und entsprechenden fluoreszierenden Zweitantikörpern inkubiert. CGRP ist ein Marker für peptidäre nozizeptive Neurone⁴⁴. Es zeigte sich, dass die sEH zwar in einigen CGRP-positiven Zellen exprimiert ist, aber der Großteil der sEH-exprimierenden Zellen CGRP-negativ ist (Abb. 3.1.12).

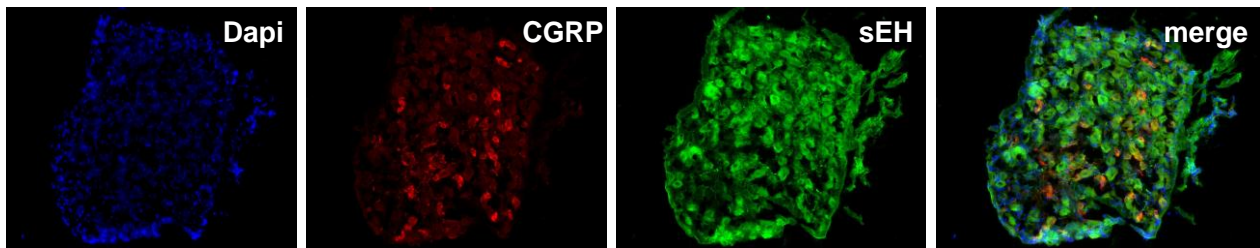


Abb. 3.1.12 **Expression der sEH in Wildtyp-L4-L6-DRGs und Koexpression mit CGRP.** Als Marker wurde DAPI (blau) verwendet. Die sEH wurde in grün und CGRP in rot angefärbt. Rechts sind die Kolokalisationen gezeigt.

Zur genaueren Charakterisierung sEH-exprimierender Zellen wurde eine MELK-Analyse von L4-L6-DRGs aus Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Diese Methode erlaubt die sequenzielle Färbung eines Gewebeschnittes mit mehreren Antikörpern¹³⁴. Als Marker wurden GFAP (als Marker für Astrozyten), NeuN (Neurone), IB4 und NF200 verwendet. Es konnte keine Kolokalisationen der sEH mit GFAP oder IB4 beobachtet werden. Interessanterweise war die sEH hauptsächlich in großen myelinisierten Neuronen (NF200- und NeuN-positive Zellen) exprimiert (Abb. 3.1.13).

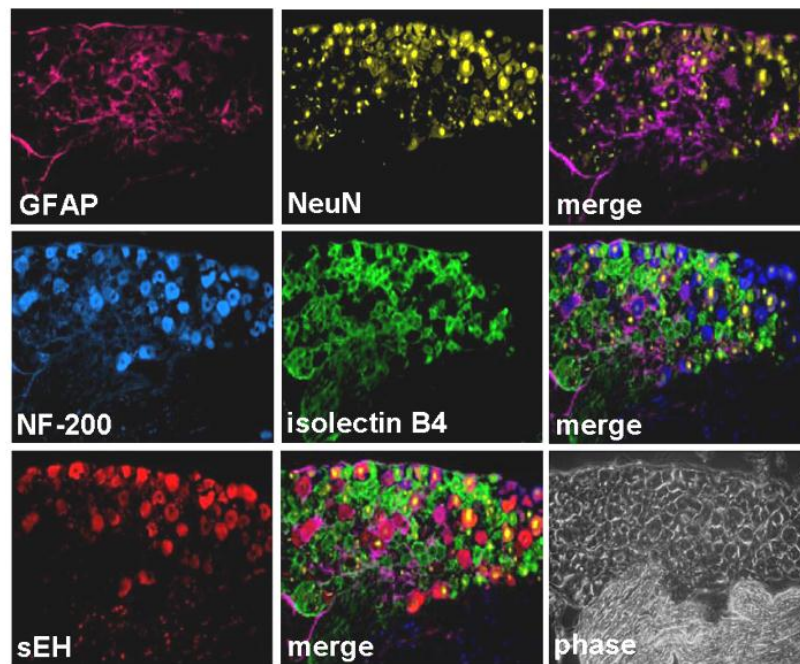


Abb. 3.1.13: **MELK-Analyse der sEH-Expression in Wildtyp-DRGs (L4-L6)**. Als Marker wurden GFAP (pink), NeuN (gelb), NF200 (blau) und IB4 (grün) verwendet. Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) wurde in rot angefärbt. Die Färbung wurde von Dr. Christian Brenneis (Klinische Pharmakologie, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt) durchgeführt.

3.1.3.2 Regulation der sEH-Expression in DRGs im Entzündungsverlauf

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die sEH in großen, filamentösen (NF200-positiven) neuronalen Zellen von Wildtyp-DRGs exprimiert wird, sollte die Regulation der sEH zu verschiedenen Zeitpunkten einer zyosan-induzierten Entzündung untersucht werden. Da ein erhöhtes Schmerzverhalten bei sEH-defizienten Mäusen 48 Stunden nach Zyosan-Injektion messbar war und zu diesem Zeitpunkt geringere EET-Konzentrationen im Pfortenödem messbar waren, wurde auch dieser späte Zeitpunkt der Entzündungsauflösung untersucht. Dafür wurde Wildtyp-Mäusen Zyosan A (12,5 mg/ml) in die linke Hinterpfote injiziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die DRGs (L4-L6) des Tiers sowohl ipsilateral, als auch contralateral präpariert. Das Gewebe wurde lysiert und die sEH-Expression mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte keine Veränderung der sEH-Expression im Entzündungsverlauf beobachtet werden (Abb. 3.1.14).

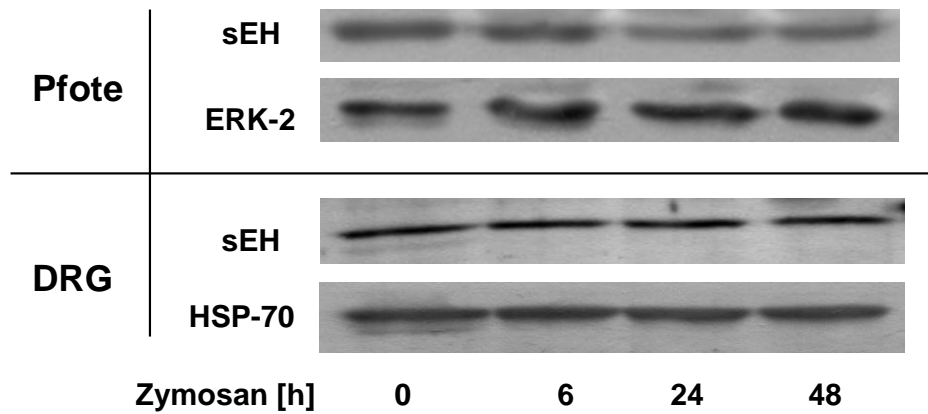


Abb. 3.1.14: **sEH Expression nach zymosan-induzierter Entzündung zu den Zeitpunkten 0, 6, 24 und 48 Stunden nach Injektion.** Es wurden je 30 µg Protein aus Pfortengewebe (oben) und L4-L6-DRGs (unten) verwendet. Als Ladekontrolle dienten ERK-2 und HSP-70 (durchgeführt von Dr. Christian Brenneis und Kai Altenrath, Klinische Pharmakologie, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt).

Dies zeigt, dass keine Änderung der sEH-Expression im Entzündungsverlauf beobachtet werden kann. Die Reduktion der EET-Konzentrationen kann entweder durch nichtenzymatischen (Autohydrolyse) oder enzymatischen Abbau durch β - oder ω -Oxidation erklärt werden.

3.1.4 Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in adulten DRG-Neuronen durch 8,9-, 11,12- und 14,15-EET

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden wie die EETs die nozizeptive Verarbeitung beeinflussen können, und welche der drei Regioisomere dazu in der Lage sind. Dazu wurde zunächst untersucht, ob EETs in der Lage sind intrazelluläre Calcium-Konzentrationen über Aktivierung oder Sensibilisierung von Ionenkanälen zu modulieren. Dazu wurden DRG-Kulturen adulter Wildtyp-Mäuse in Calcium-Imaging-Experimenten mit je 1 μM und 10 μM 8,9-, 11,12- und 14,15-EET stimuliert. Kontrollstimulationen zur Identifizierung von Neuronen erfolgten mit KCl (40 mM). Dabei konnte bei Verwendung von 1 μM kein direkter Calcium-Einstrom in einer signifikanten Zahl von Neuronen beobachtet werden. Auch bei Stimulation mit 10 μM 11,12- und 14,15-EET war keine Reaktion der Zellen erkennbar. Wurden die Zellen jedoch mit 10 μM 8,9-EET (10 Sekunden) stimuliert, konnte ein direkter Calcium-Einstrom in ca. 5% der neuronalen Zellen verzeichnet werden (Abb. 3.1.15).

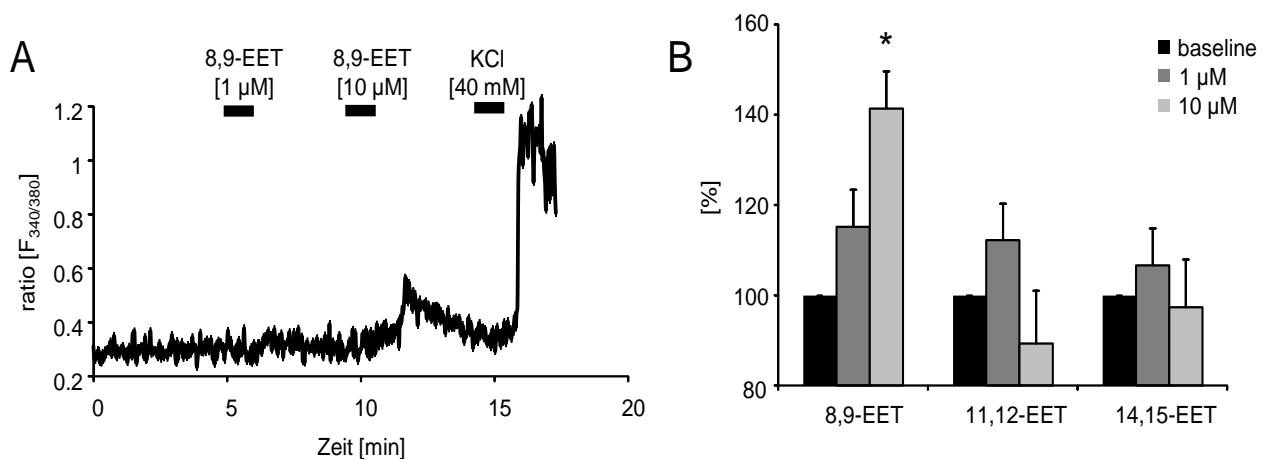


Abb. 3.1.15: **Calcium-Einstrom nach Stimulation adulter DRG-Neurone mit 10 μM 8,9-EET.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung nach Stimulation mit 8,9-EET und KCl. (B) Amplitude der calciumabhängigen Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation adulter DRG-Neurone mit 8,9- (n=8), 11,12- (n=11) oder 14,15-EET (n=16) prozentual dargestellt. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Zur Charakterisierung der auf 8,9-EET antwortenden Zellen wurde untersucht, welche TRP-Kanäle in diesen Neuronen exprimiert sind.

3. Ergebnisse

Dafür wurden die Zellen mit spezifischen TRP-Agonisten sowie 8,9-EET stimuliert und beobachtet, in welchen Zellen es zu Mehrfachstimulationen kam. Als TRP-Agonisten wurden verwendet: Capsaicin (TRPV1-Agonist; 500 nM), Allylthiocyanat (AITC, TRPA1-Agonist, 100 μ M) und Menthol (TRPM8-Agonist; 100 μ M). Es zeigte sich, dass sowohl TRPV1-positive- als auch TRPA1/TRPV1-positive Neurone auf 8,9-EET antworten. TRPM8-positive Neurone zeigten hingegen keine Aktivierung durch 8,9-EET (Abb. 3.1.16).

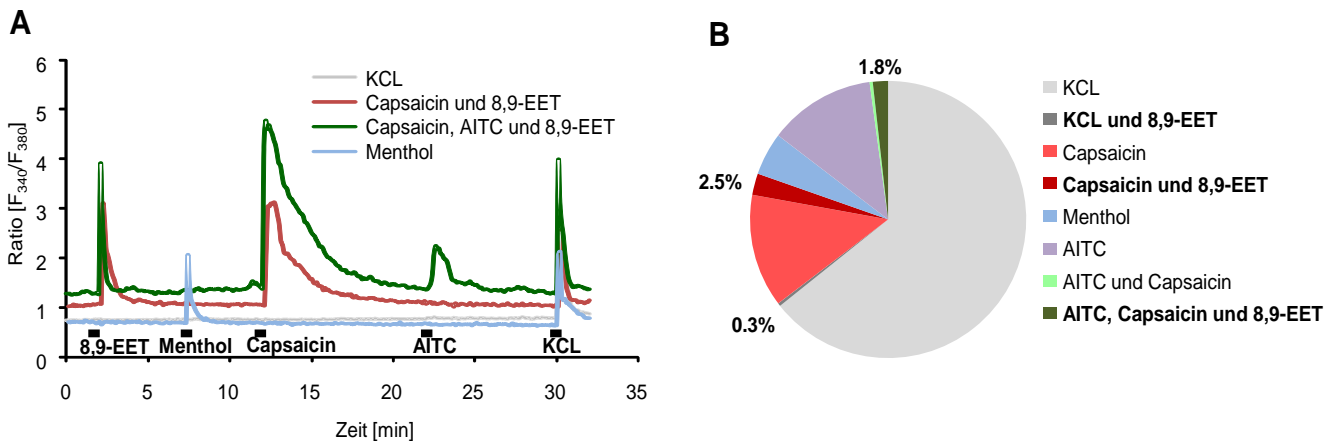


Abb. 3.1.16: **Charakterisierung der auf 8,9-EET antwortenden Neurone.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung nach Stimulation mit 8,9-EET, Menthol, Capsaicin, AITC und KCl. (B) Anteil der auf 8,9-EET reagierenden Zellen an der gesamten Population gemessener Neurone.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass nur 8,9-EET in der Lage ist, direkte und transiente Calcium-Einströme in einer Subpopulation TRPA1- und TRPV1-positiver DRG-Neurone zu verursachen. Dafür ist allerdings eine hohe Konzentration an 8,9-EET erforderlich (10 μ M). Sowohl Aktivierung von TRPV1 als auch von TRPA1 wird mit mechanischer Schmerzwahrnehmung in Verbindung gebracht¹³⁵⁻¹³⁷. Dies könnte die Verringerung der mechanischen Schmerzschwelle sEH-defizienter Mäuse bei erhöhter 8,9-EET-Konzentration erklären.

3.1.5 Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 8,9-11,12- und 14,15-EET

Da auf 8,9-EET antwortende Zellen TRPV1-positiv sind, wurde untersucht, ob 8,9-EET, aber auch 11,12- und 14,15-EET den capsaicin-vermittelten Calciumeinstrom durch TRPV1 sensibilisieren können. Zu diesem Zweck wurden DRG-Neurone mit zwei kurzen Capsaicin-Stimulationen angeregt (200 nM, 10 Sekunden). Die erste Stimulation diente als Kontrolle. Daraufhin wurden die drei EETs (je 1 μ M) oder Vehikel zwei Minuten vor der zweiten Capsaicin-Stimulation eingewaschen. KCl diente als Positivkontrolle für neuronale Zellen. Im Anschluss an die Messung wurden die zwei Capsaicin-Antworten miteinander verglichen. (Abb. 3.1.17).

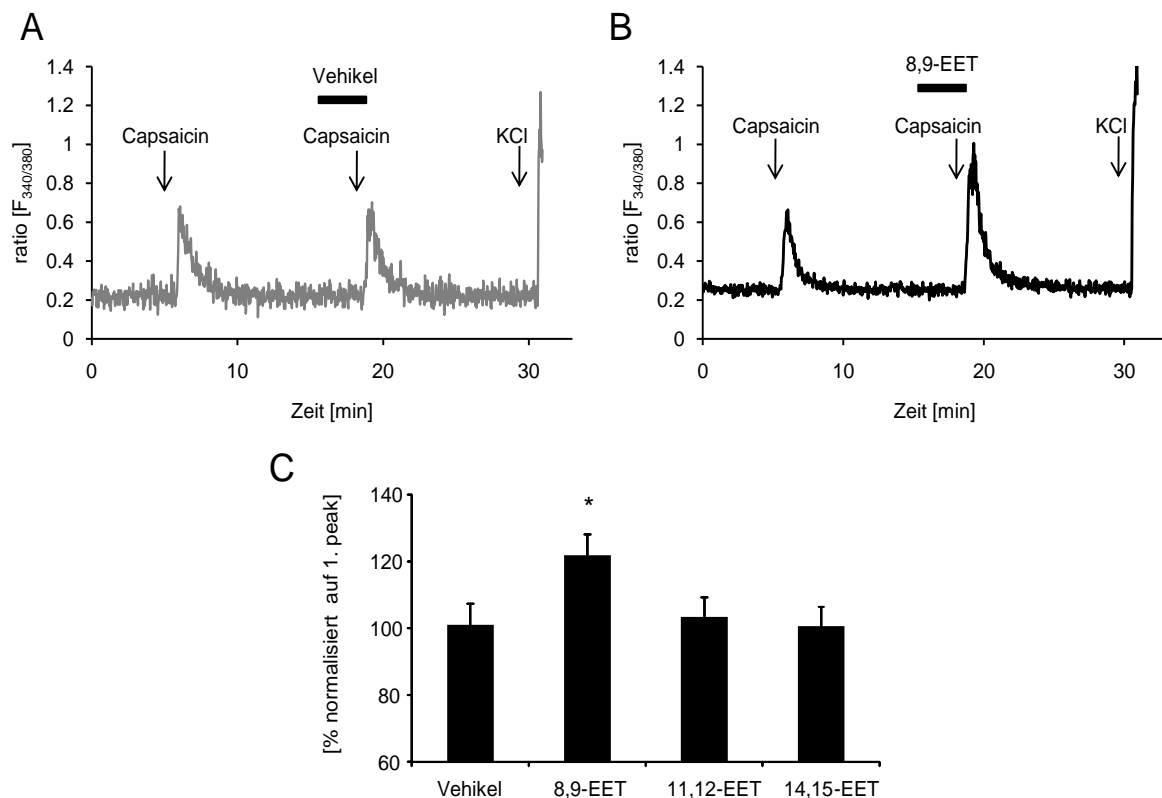


Abb. 3.1.17: **Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 8,9-EET.** (A und B) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung nach Stimulation mit Vehikel (A) oder 8,9-EET (1 μ M, 2 min B), (C) Amplitude der zweiten Capsaicin-Antwort normalisiert auf die Kontrollstimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aller Messungen mit 8,9-EET (n=51), 11,12-EET (n=54) und 14,15-EET (n=47). * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Es wurde beobachtet, dass nur 8,9-EET eine TRPV1-Sensibilisierung verursachte. Sowohl nach 11,12- als auch nach 14,15-EET-Behandlung der Zellen, konnten keine Unterschiede in der Amplitude der Capsaicin-vermittelten Calciumeinströme verzeichnet werden.

3.1.6 Messung der CGRP-Freisetzung aus Ischiasnerven nach Inhibition der sEH mit t-AUCB und nach Stimulation mit 8,9-EET

Aktivierung von TRPV1 oder TRPA1 führt zur Freisetzung des pronozizeptiven und neurovasodilatativen Peptids CGRP (calcitonin gene related peptide), das wiederum an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bindet und Proteinkinasen aktiviert, was schließlich zu neurogener Inflammation führt^{44,45}. Da 8,9-EET in der Lage ist, die capsaicin-vermittelte TRPV1-Aktivierung zu verstärken, sollte untersucht werden, ob auch die CGRP-Freisetzung nach TRPV1-Stimulation erhöht ist, wenn TRPV1 mit einem selektiven sEH-Antagonisten (t-AUCB) behandelt wird. Hierfür wurden Ischiasnerven von Wildtyp-Mäusen verwendet. Da der TRPV1 auch durch Hitze aktiviert wird ($T > 42^{\circ}\text{C}$), wurde als TRPV1-Stimulation eine fünfminütige Inkubation der Nerven bei 47°C gewählt. Die CGRP-Konzentration wurde mittels Enzyme Immuno-Assay (EIA) ermittelt. Es zeigte sich, dass diejenigen Nerven, die mit t-AUCB vorinkubiert wurden, eine verstärkte Freisetzung an CGRP aufwiesen (Abb. 3.1.18).

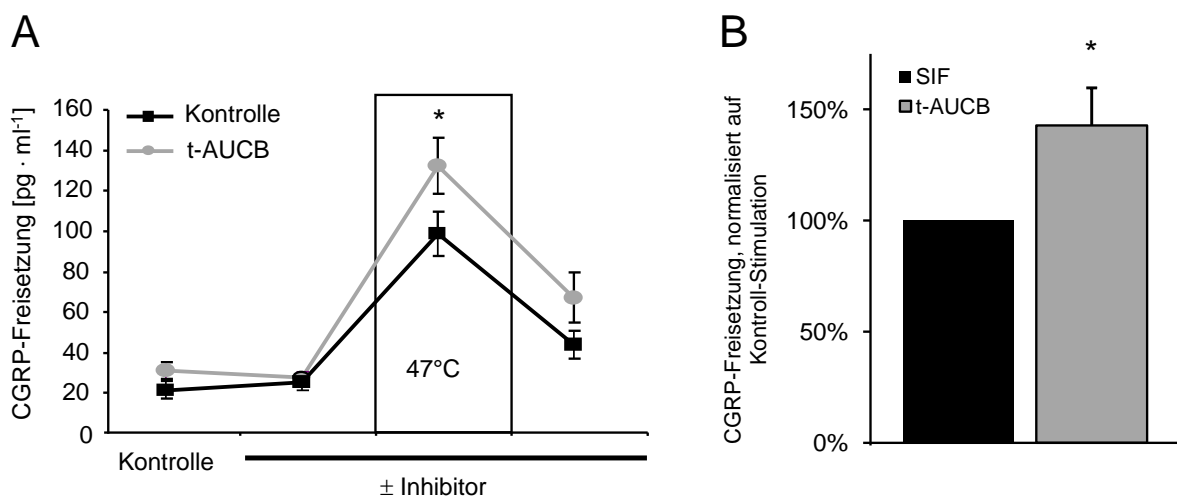


Abb. 3.1.18: **CGRP-Freisetzung nach hitzeinduzierter TRPV1-Aktivierung.** (A) CGRP-Freisetzung (absolut) nach Stimulation der Ischiasnerven mit Hitze (47°C). Sowohl in der Kontrollgruppe (SIF (synthetic intestinal fluid)) schwarz), als auch in der mit t-AUCB behandelten Gruppe steigt die CGRP-

3. Ergebnisse

Freisetzung bei Hitzestimulation stark an. Der Anstieg nach Behandlung mit t-AUCB ist allerdings stärker, als die Vehikel-Kontrolle. (B) CGRP-Freisetzung der t-AUCB behandelten Nerven normalisiert auf die Kontroll-Stimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von acht unabhängigen Messungen. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$. Die Experimente wurden von Dr. Michael Fischer (Physiologie, Uni Erlangen) durchgeführt.

Wie in Abb. 3.1.16 zu erkennen ist, antworten auch TRPA1-positive Zellen auf 8,9-EET. Daher wurde die CGRP-Freisetzung am Ischiasnerv auch nach TRPA1-Stimulation mit AITC untersucht. Die Ischiasnerven wurden bei diesem Versuch allerdings nicht mit einem sEH-Antagonisten, sondern direkt mit 8,9-EET vorbehandelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die CGRP-Freisetzung nach 8,9-EET-Behandlung signifikant höher ist, als bei der Vehikel-Kontrolle (Abb. 3.1.19).

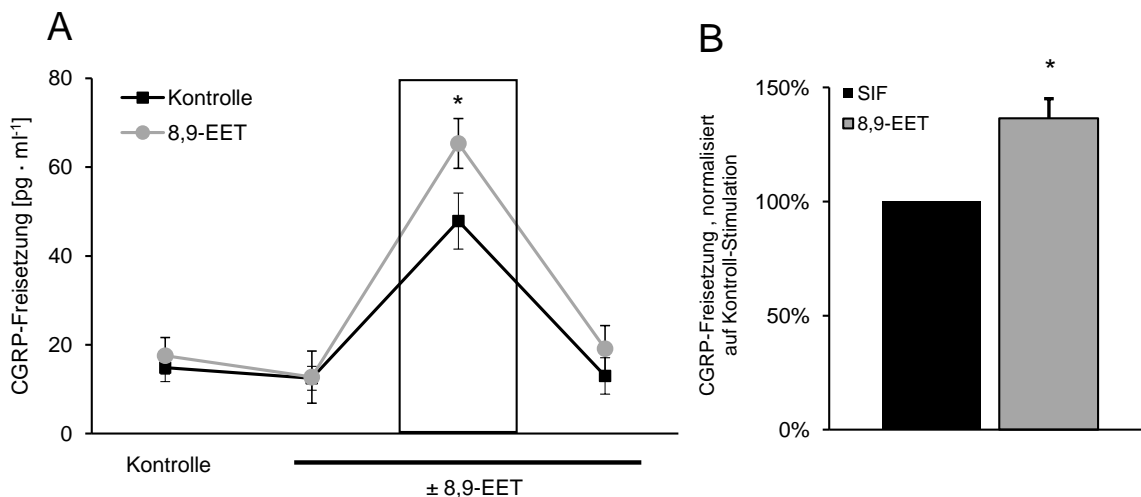


Abb. 3.1.19: **CGRP-Freisetzung nach AITC-induzierter TRPA1-Aktivierung.** (A) CGRP-Freisetzung (absolut) nach Stimulation der Ischiasnerven AITC (100 μ M). Die Messung erfolgte analog zu 3.1.18. (B) CGRP-Freisetzung der 8,9-EET behandelten Nerven normalisiert auf die Kontroll-Stimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von sieben unabhängigen Messungen. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

Somit zeigt sich, dass sowohl pharmakologische Hemmung der sEH, als auch 8,9-EET zu einer Verstärkung der CGRP-Freisetzung in Ischiasnerven durch hitze- oder AITC-Stimulierung führen.

3.1.7 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp-Mäusen nach intraplantarer Injektion von 8,9-, 11,12 – oder 14,15-EET

3.1.7.1 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes

Da 8,9-EET in den *in vitro*-Versuchen pronozizeptive Effekte aufwies, und zum Zeitpunkt erhöhten Schmerzempfindens in inflammatorischen Schmerzmodellen höhere 8,9-EET-Konzentrationen in DRGs beobachtet wurden, sollte nun untersucht werden, ob eine direkte intraplantare Injektion von 8,9-EET, aber auch der anderen beiden Regioisomere 11,12- und 14,15-EET, eine Änderung des mechanischen Schwellenwertes verursacht. Für diese Versuche wurden Wildtyp (C57BL/6N)-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Es wurden je 20 µl einer 10 µM EET-Lösung in die linke Hinterpfote injiziert. Anschließend wurde der mechanische Schwellenwert jedes Tiers über einen Zeitraum von vier Stunden mit dem Dynamic-Plantar-Aesthesiometer ermittelt. Dabei wurde beobachtet, dass nur 8,9-EET die mechanische Schwelle der Tiere zwei Stunden nach Injektion signifikant absenkte. Tiere, die mit den beiden anderen Regioisomeren, 11,12- und 14,15-EET, behandelt wurden, wiesen keine Unterschiede des mechanischen Schwellenwertes verglichen mit der Vehikel-Kontrolle auf (Abb. 3.1.20).

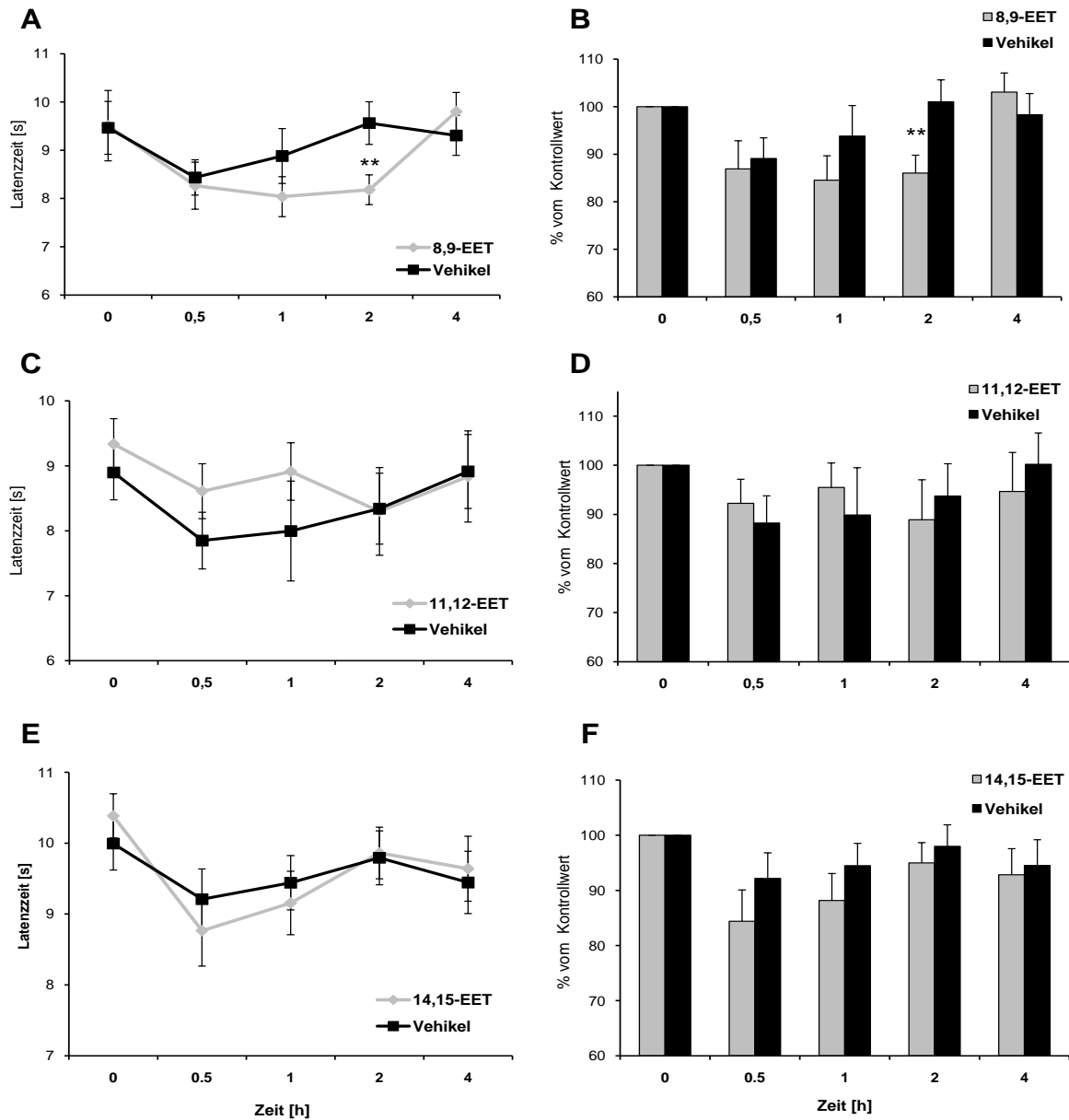


Abb. 3.1.20: **Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intraplantarer EET-Injektion.** Je 20 μl einer 10 μM EET-Lösung wurden in die linke Hinterpfote injiziert. Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes erfolgte über einen Zeitraum von vier Stunden. (A und B) 8,9-EET (C und D) 11,12-EET und (E und F) 14,15-EET Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils acht Tieren pro Gruppe. ** = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,01$.

Anhand der Resultate wird deutlich, dass nur 8,9-EET den mechanischen Schwellenwert absenken kann. Im zymosan-induzierten Entzündungsmodell (Abb. 3.1.8) zeigten sich erhöhte Konzentrationen an 8,9-EET in DRGs zum Zeitpunkt des stärksten Schmerzempfindens. Möglicherweise sind daher die erhöhten Konzentrationen an 8,9-EET die Ursache für das verstärkte Schmerzempfinden.

3.1.7.1 Ermittlung des thermischen Schwellenwertes nach 8,9-EET-Injektion

Nun stellte sich die Frage, ob 8,9-EET neben dem mechanischen Schwellenwert auch den thermischen Schwellenwert herabsenken kann. Zur Klärung dieser Frage wurden je 20 μl einer 10 μM 8,9-EET-Lösung oder Vehikel in die linke Hinterpfote von Wildtyp-Mäusen injiziert. Anschließend wurde der thermische Schwellenwert über einen Zeitraum von vier Stunden ermittelt. Im Gegensatz zum mechanischen Schwellenwert konnte bei dieser Messung allerdings kein Unterschied im thermischen Schwellenwert zu den Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 3.1.21).

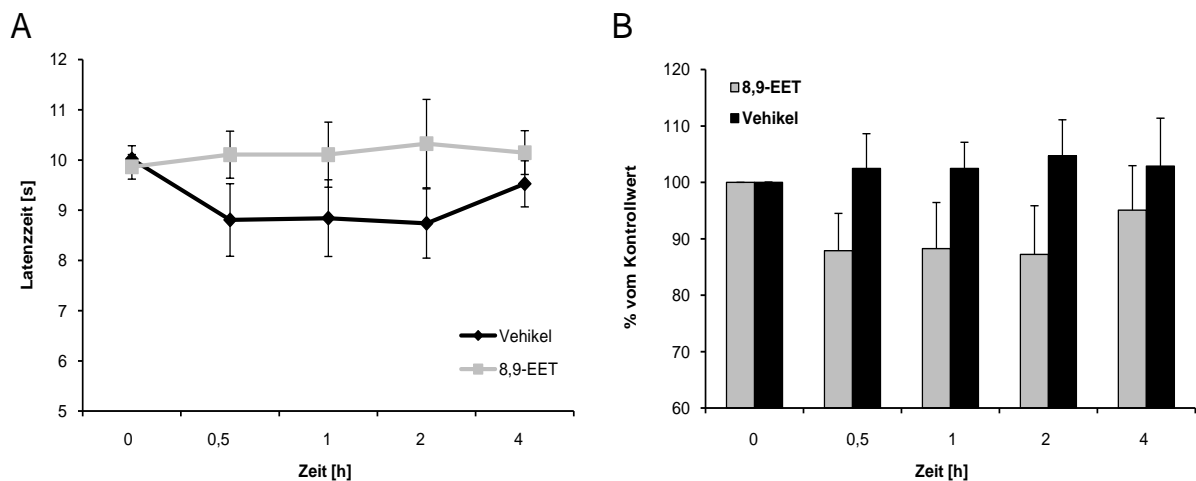


Abb. 3.1.21: **Ermittlung des thermischen Schwellenwertes nach 8,9-EET-Injektion i. plantar.** Je 20 μl einer 10 μM EET-Lösung wurden in die linke Hinterpfote injiziert. Im Anschluss daran wurde der thermische Schwellenwert zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden. (A) Zeitverlauf und Absolutwerte der Latenzzeiten. (B) Prozentuale Auftragung der Latenzzeiten bezogen auf den Kontrollwert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils sechs Tieren pro Gruppe.

3.2 Die Rolle von 5,6-Epoxyeicosatriensäure (5,6-EET) bei der nozizeptiven Verarbeitung

Frühere Untersuchungen mit 5,6-EET führten zu für die Schmerzverarbeitung interessanten Resultaten hinsichtlich der auto- und parakrinen Signalwirkung dieses Lipids, und seiner Fähigkeit, intrazelluläre Ionenkonzentrationen zu modulieren^{138,139}. Wie die übrigen Regioisomere kann 5,6-EET von Zellen als parakrines Signalmolekül freigesetzt werden und an Rezeptoren binden. Insbesondere die Aktivierung von TRP-Kanälen ist bei der peripheren nozizeptiven Verarbeitung von essentieller Bedeutung. In dieser Arbeit wurde 5,6-EET und sein Einfluss auf nozizeptive Prozesse gesondert untersucht, da es als einziges Regioisomer in der Lage ist TRPV4 zu aktivieren⁶⁰, und da es unter normalen Umständen nicht durch sEH metabolisiert wird⁹⁴. Es soll untersucht werden, ob 5,6-EET bei Schmerz aktivitätsabhängig von Nozizeptoren freigesetzt wird und über TRP-Kanal-Aktivierung zu neurogener Inflammation beitragen kann.

3.2.1 5,6-EET-Konzentrationen in Pfoten, Ischiasnerven und L4-L6-DRGs bei akutem Schmerz

Zur Klärung der Rolle von 5,6-EET als sEH-unabhängiges Regioisomer bei der nozizeptiven Verarbeitung wurde zunächst ermittelt, ob sich die 5,6-EET-Konzentrationen bei Akut- oder inflammatorischem Schmerz in den Dorsalwurzelganglien ändern. Als *in vivo*-Modell für Akut-Schmerz wurden das Formalin-Modell, das CFA-Modell (complete freund's adjuvant) und ein Hochdosis-Zymosan-Modell (20 mg/ml) ausgewählt. 30 Minuten nach Injektion von Formalin 5% (v/v), CFA oder Zymosan intraplantar, wurden Pfotenödeme, Ischiasnerven und DRGs entnommen, und die 5,6-EET-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS quantifiziert. Dabei fiel auf, dass 5,6-EET das abundanteste Regioisomer in den L4-L6-DRGs war. Nach Zymosan- und CFA-Injektion erhöhten sich die 5,6-EET-Konzentrationen in den L4-L6-DRGs signifikant, während in den Ischiasnerven und den Pfotenödemem keine Änderung der 5,6-EET-Konzentration zu beobachten war. Die stärkste Erhöhung der 5,6-EET-Konzentrationen war in den L4-L6-DRGs nach 30-minütiger CFA-Behandlung zu beobachten (Abb. 3.2.1).

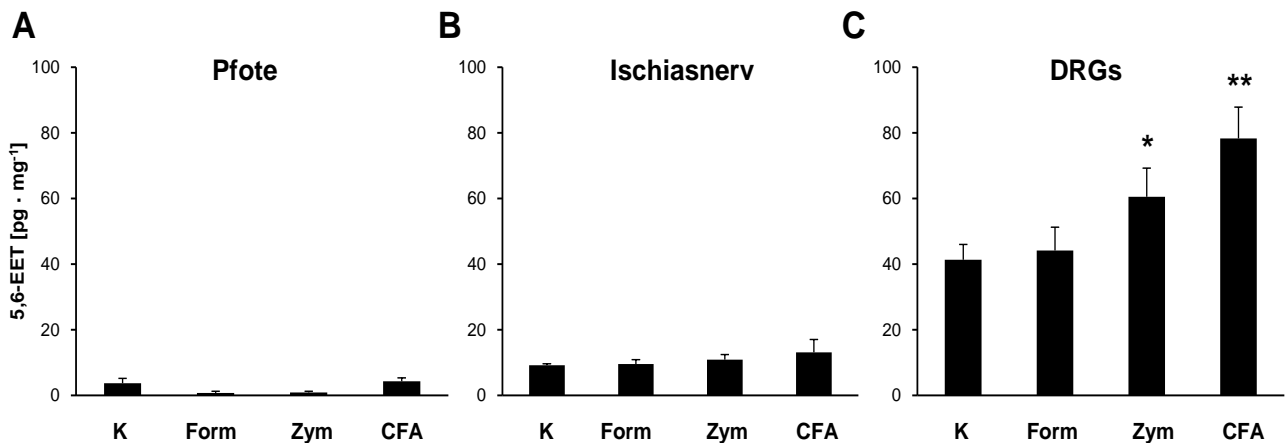


Abb. 3.2.1: **5,6-EET-Konzentrationen bei akutem Schmerz in Pfote, Ischiasnerv und L4-L6-DRGs nach Injektion von Formalin, Zymosan oder CFA.** 30 Minuten nach Injektion von Formalin (5% (v/v), Zymosan (20 mg/ml), CFA oder Vehikel intraplantar wurden Pfotenödem (A), die Ischiasnerven (B) sowie L4-L6-DRGs (C) entnommen, gewogen, sofort in Ethylacetat überführt und bei -80°C gelagert. 5,6-EET-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von je fünf Einzelwerten. K = Kontrolle, Form = Formalin, Zym = Zymosan, CFA = Complete Freund's Adjuvant. * = ungepaarter t-Test, $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

In einem weiteren Versuch wurde Wildtyp-Mäusen intraplantar Capsaicin injiziert (80 $\mu\text{g/ml}$), um einen weiteren akuten Schmerzstimulus zu testen. Vor der Capsaicin-Injektion wurden die Tiere mit Ketamin- / Xylazin-Injektionsnarkose anästhesiert (Ketamin 80 mg/kg, Xylazin 5 mg/kg). Fünf Minuten nach einsetzender Anästhesie wurden je 20 μl der Capsaicin-Lösung oder Vehikel injiziert und weitere 30 Minuten nach Capsaicin-Injektion wurden das Pfotenödem, die L4-L6-DRGs und das Dorsalhorn entnommen, und die Konzentrationen an 5,6-EET in den jeweiligen Geweben mittels LC-MS/MS bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen an 5,6-EET in den DRGs nach Capsaicin-Injektion signifikant anstiegen, und tendenzielle Erhöhungen an 5,6-EET auch in den Dorsalhörnern zu beobachten waren, die jedoch nicht statistisch signifikant waren ($p=0,089$).

Zusammengefasst zeigt sich, dass von den untersuchten Geweben in den L4-L6-DRGs die höchsten Konzentrationen an 5,6-EET auch unter Basalbedingungen vorliegen. Diese erhöhen sich signifikant 30 Minuten nach Injektion einer hohen Dosis Zymosan (20 mg/ml), Capsaicin (80 µg/ml) oder CFA, als Konsequenz des Akutschmerzes (Abb. 3.2.2).

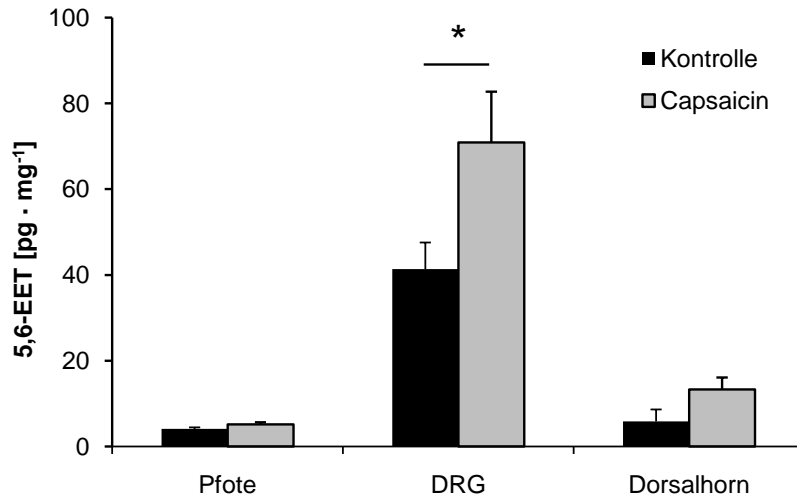


Abb. 3.2.2: **5,6-EET-Konzentrationen bei akutem Schmerz in Pfote, L4-L6-DRGs und Dorsalhörnern nach Injektion von 20 µl Capsaicin intraplantar (80 µg/ml).** 30 Minuten nach intraplantarer Injektion von Capsaicin oder Vehikel wurden Pfotenödem (A), L4-L6-DRGs (B) sowie L4-L6-Dorsalhörner (C) entnommen, gewogen, sofort in Ethylacetat überführt und bei -80°C gelagert. 5,6-EET-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von je sechs Einzelwerten. * = ungepaarter t-Test, p < 0.05.

3.2.2 5,6-EET-Konzentrationen in Pfoten, L4-L6-DRGs und im Dorsalhorn bei inflammatorischen Schmerzen

Nachdem eine erhöhte Freisetzung von 5,6-EET in DRGs bei Akut-Schmerz beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob sich die 5,6-EET-Konzentrationen auch bei inflammatorischen Schmerzen ändern. Um dies zu untersuchen, wurde Wildtyp-Mäusen in einem Entzündungsmodell CFA (Complete Freund's Adjuvant, 20 µl) in beide Hinterpfoten injiziert, und bei akuter Entzündung (nach 6 Stunden) die Pfotenödeme, die L4-L6-DRGs und L4-L6-Dorsalhörner entnommen. Das Gewebe wurde gewogen, direkt

in Ethylacetat überführt und bis zur EET-Messung mittels LC-MS/MS bei -80°C gelagert. Bei der Messung konnten keine signifikanten Änderungen der 5,6-EET-Konzentrationen in den DRGs beobachtet werden (Abb. 3.2.3).

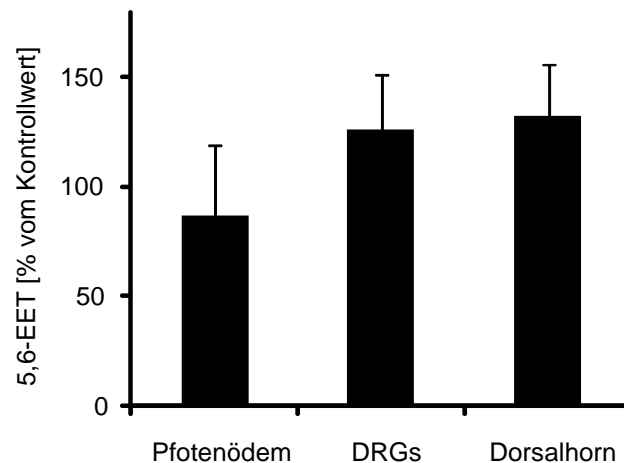


Abb. 3.2.3: **5,6-EET-Konzentrationen bei CFA-induziertem inflammatorischem Schmerz in Pfote, L4-L6-DRGs und L4-L6-Dorsalhörnern.** Das Gewebe wurde sechs Stunden nach CFA-Injektion entnommen. Gemessen wurden 5,6-EET Konzentrationen in Pfotenödemen), L4-L6-DRGs, sowie L4-L6-Dorsalhörnern. 5,6-EET-Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von je sechs Einzelwerten.

3.2.3 Freisetzung von 5,6-EET in kultivierten DRGs

Da EETs auto- und parakrine Signalwirkung besitzen, sollte untersucht werden, ob 5,6-EET von kultivierten DRG-Neuronen freigesetzt wird. Dabei stellte sich zudem die Frage, ob 5,6-EET in DRGs synthetisiert werden kann und ob die Synthese durch Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration induziert werden kann. Zu diesem Zweck wurden DRGs von Wildtyp-Mäusen für 24 Stunden in Kultur gebracht und anschließend mit Arachidonsäure (500 nM, 2h), Calcimycin (Calcium-Ionophor, 1 μM , 3h) oder Vehikel stimuliert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden lysiert. Die EET-Konzentrationen in Überstand und Zelllysat wurden mittels LC-MS/MS bestimmt.

Es zeigte sich, dass sowohl nach Stimulation mit Arachidonsäure, als auch mit Calcimycin die Konzentrationen an 5,6-EET im Überstand signifikant erhöht waren.

Dies bedeutet, dass 5,6-EET in DRG-Neuronen aus Arachidonsäure synthetisiert wird, wenn diese zur Verfügung steht. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Calcimycin bewirkte darüber hinaus eine Induktion der 5,6-EET-Synthese. Da die Erhöhungen der 5,6-EET-Konzentrationen bei beiden Versuchen im Medium signifikant erhöht waren, lässt sich daraus schließen, dass 5,6-EET aus DRGs freigesetzt wird (Abb. 3.2.4).

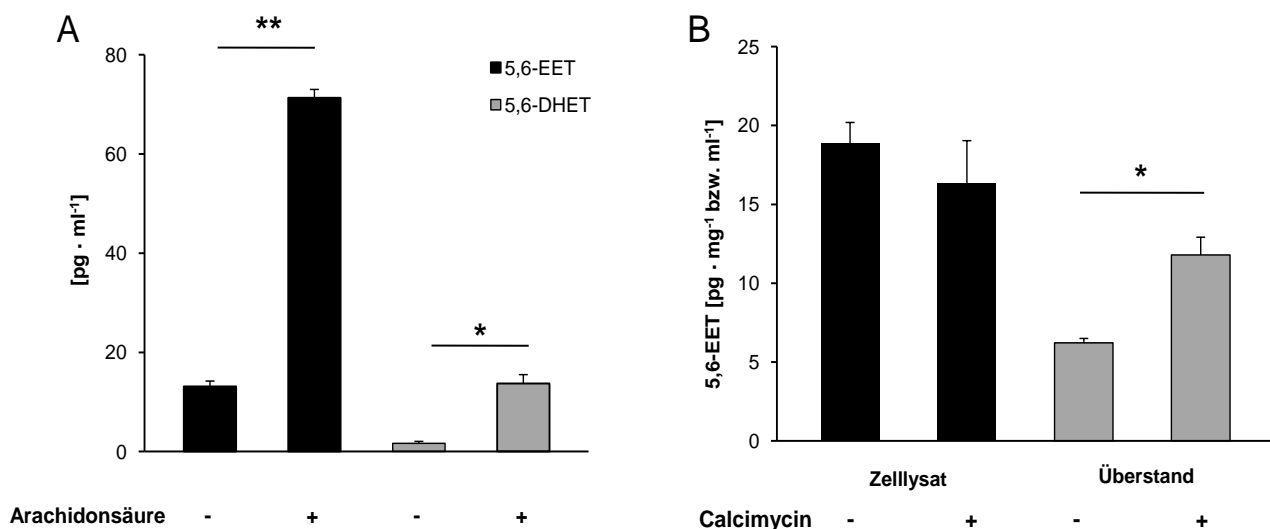


Abb. 3.2.4: **5,6-EET-Konzentrationen nach Stimulation kultivierter DRGs mit Arachidonsäure (A) und Calcimycin (B).** (A) 5,6-EET- (schwarz) und 5,6-DHET (grau) –Konzentrationen im Überstand nach Arachidonsäurestimulation (0,5 μM , 2h, n=4) (B) 5,6-EET-Konzentrationen im Zelllysate (schwarz) und Überstand (grau) nach Calcimycin-Stimulation (1 μM , 3h, n=4). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von je sechs Einzelwerten. * =ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

3.2.4 Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in adulten DRG-Neuronen nach Stimulation mit 5,6-EET

Im Folgenden wurde untersucht, ob 5,6-EET in der Lage ist intrazelluläre Ionenkonzentrationen zu modulieren. Von besonderer Bedeutung war die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration, da diese bei Schmerzprozessen z.B. durch Aktivierung von TRP-Kanälen von zentraler Bedeutung ist. Calciumeinstrom in eine neuronale Zelle kann zur Depolarisation des Membranpotentials führen, was bei Überschreiten eines Schwellenwerts Aktionspotentiale auslöst.

3.2.4.1 *in vitro*-Stabilität von 5,6-EET

5,6-EET gilt, wie alle Epoxide, als instabil in wässrigen Lösungen. In leicht sauren Umgebungen findet eine spontane Autohydrolyse von Epoxiden zu den Dehydroxy-Produkten statt. In der Literatur wird 5,6-EET als instabilstes Regioisomer der Epoxyeicosatriensäuren beschrieben¹⁴⁰. Daher sollte zu Beginn der *in vitro*-Experimente ermittelt werden, welche Halbwertszeit 5,6-EET bei allen in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen besitzt. Dafür wurde je 1 μM 5,6-EET in alle verwendeten Pufferlösungen gegeben, und bei allen verwendeten Temperaturen und allen pH-Umgebungen inkubiert. Getestet wurden gepufferte Lösungen (SIF, PBS, SES, Neurobasalmedium) und Saline sowie die Temperaturen 20°C, 37°C und 45°C, und die pH-Werte 7,4 und 5,2 über einen Zeitraum von sechs Stunden. Die verbliebenen Konzentrationen an 5,6-EET wurden mit Hilfe von LC-MS/MS-Analysen bestimmt.

Es fiel auf, dass die Unterschiede der 5,6-EET-Stabilität zwischen den Puffern sehr gering waren. Einzig in Neurobasalmedium erwies sich 5,6-EET bei 37°C als sehr stabil, da noch nach zwei Stunden ca. 90% an 5,6-EET gemessen wurden. Allerdings erwies sich 5,6-EET als hitzeinstabil. Die Halbwertszeit bei Raumtemperatur betrug etwa zwei Stunden, bei 37°C etwa 45 Minuten und bei 45°C etwa 15-20 Minuten. Bei pH 5,2 waren keine Unterschiede in den verbliebenen 5,6-EET-Konzentrationen verglichen mit pH 7,4 erkennbar (Abb.3.2.5).

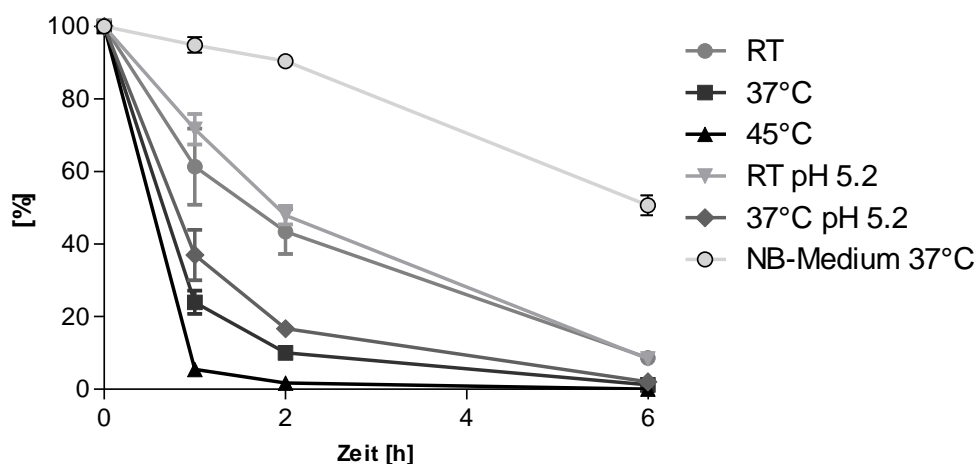


Abb. 3.2.5: *in vitro*-Stabilität von 5,6-EET. Die verbliebenen 5,6-EET-Konzentrationen wurden prozentual aufgetragen. Da zwischen den Puffern mit Ausnahme von Neurobasalmedium keine Unterschiede erkennbar waren, wurden diese zusammengefasst, um die Abbildung zu veranschaulichen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 Proben je Puffer, Temperatur und pH.

3.2.4.2 Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET-vermittelten Calcium-Einströme

Nun wurden adulte DRG-Zellen in Calcium-Imaging-Experimenten mit 5,6-EET stimuliert. Dabei konnte beobachtet werden, dass einige Zellen bereits auf 100 nM 5,6-EET mit einer transienten Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration reagierten. Die Zellen wurden als Neurone identifiziert, da sie ebenfalls auf KCl (40 mM) reagierten. In weiteren Versuchen sollte eine Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET vermittelten Calciumsignale erstellt werden. Dabei zeigte sich, dass bereits 100 nM 5,6-EET genügte, um in ca. 11% der Neurone ein Calcium-Signal zu erzeugen. Dies schien das Maximum an antwortenden Zellen darzustellen, da auch unter Verwendung von 500 nM 5,6-EET nicht signifikant mehr Neurone auf die Substanz reagierten (Abb. 3.2.6).

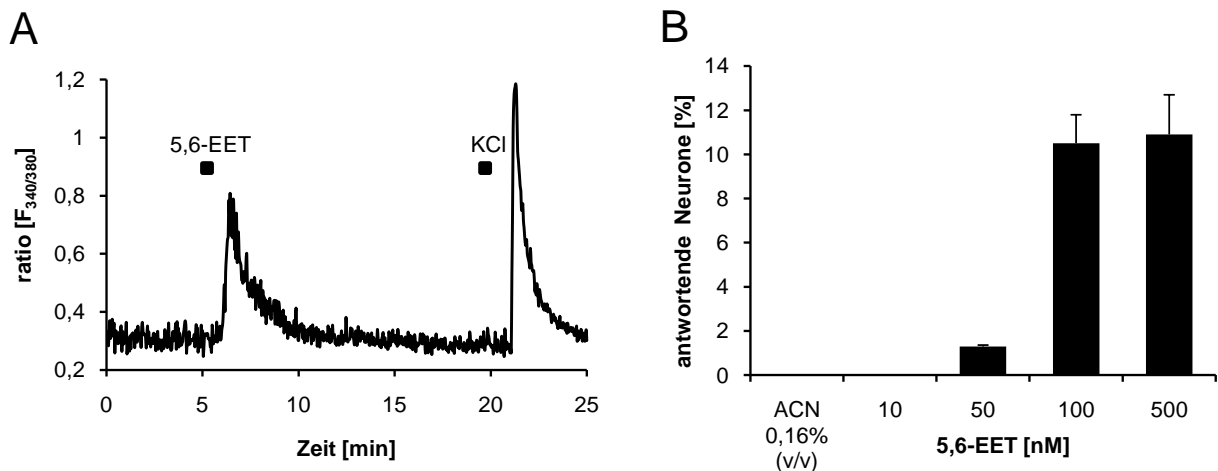


Abb. 3.2.6: **5,6-EET erzeugt transiente Calciumströme in ca. 11% der Wildtyp-DRG-Neurone.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung. Es wurden 100 nM 5,6-EET und 40 mM KCl nach 5 bzw. 20 Minuten für jeweils zehn Sekunden auf die Zellen gegeben. Die Stimulationen führten zu transienten Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET vermittelten Calcium-Signale in DRG-Neuronen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von je 5-6 Messungen mit je 50 – 100 gemessenen Zellen und den EET-Konzentrationen 0 (Vehikel), 10, 50, 100 und 500 nM.

3.2.4.3 Rolle der TRP-Kanäle bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom

Es stellte sich nun die Frage, ob die Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen nach 5,6-EET-Stimulation durch Calcium-Einstrom in die Zelle

3. Ergebnisse

verursacht werden, oder durch Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Reticulums. Zur Klärung dieser Frage, wurden die Stimulationen der DRG-Neurone mit 5,6-EET wiederholt, allerdings unter der Verwendung von calcium-freier extrazellulärer Lösung, die zusätzlich mit 2 mM EGTA versehen war, um restliches freies Ca^{2+} zu chelatieren. Bei Verwendung des calcium-freien Puffers konnte keine Antwort der Zellen auf 5,6-EET beobachtet werden, was auf einen Einstrom von extrazellulärem Calcium bei 5,6-EET-Stimulation hindeutet (Abb. 3.2.7).

Ca^{2+} -Einstrom in neuronale Zellen des peripheren Nervensystems geschieht oft über die Aktivierung von kationenpermeablen TRP-Kanälen (transient receptor potential). Daher sollte nun geklärt werden, ob TRP-Kanäle für den 5,6-EET-induzierten Calcium-Einstrom in DRG-Neurone verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde extrazelluläre Lösung mit 5 μM Ruthenium Rot versehen, einem TRP-Kanal spezifischen Porenblocker, der den TRP-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom verhindert. Bei erneuter Stimulation der DRG-Neurone mit 5,6-EET und Ruthenium Rot konnte kein Ca^{2+} -Einstrom beobachtet werden (Abb. 3.2.7). Dies spricht für eine Aktivierung von TRP-Kanälen durch 5,6-EET.

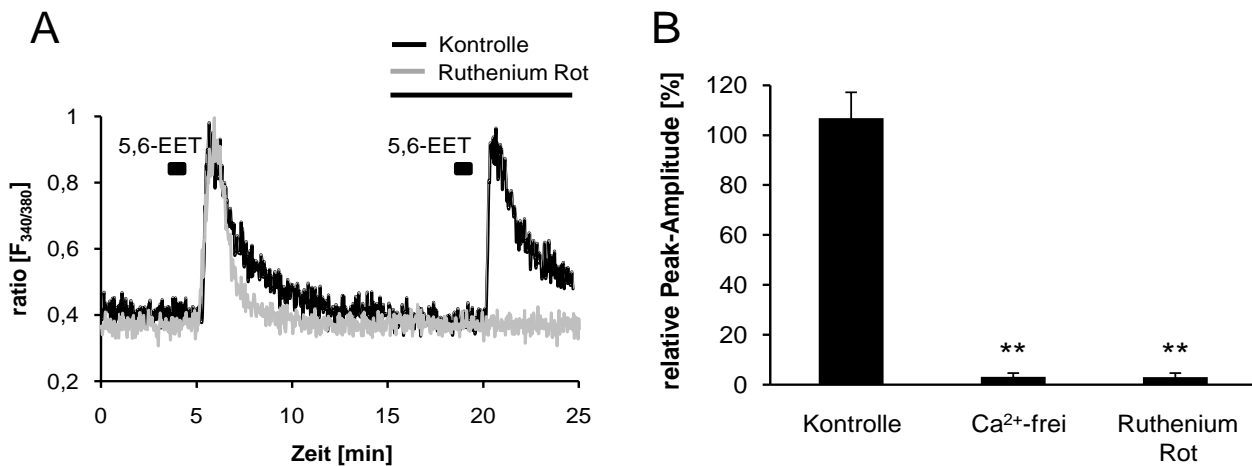


Abb. 3.2.7: **5,6-EET aktiviert TRP-Kanäle und führt zu Ca^{2+} -Einstrom.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung mit zwei 5,6-EET-Stimulationen (100 nM, 10 sek). Fünf Minuten vor der zweiten Stimulation wurden 5 μM Ruthenium Rot (grau) oder Kontrolllösung (schwarz) für zehn Minuten zugegeben. Ruthenium Rot blockt den 5,6-EET vermittelten Ca^{2+} -Einstrom. (B) Amplitude der 5,6-EET-vermittelten Fluoreszenzänderung für die jeweils zweite Stimulation relativ zur Kontrollstimulation. Verwendet wurden Kontrolllösung, Ca^{2+} -freie Lösung (+ 2 mM EGTA) und Ruthenium Rot-Lösung. Sowohl Ruthenium Rot, als auch Ca^{2+} -freie Lösung blocken den 5,6-EET vermittelten Ca^{2+} -Einstrom. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 8 (Kontrolle), 11 (Ca^{2+} -frei) bzw. 13 (Ruthenium Rot) Messungen mit je 50 – 100 gemessenen Zellen. ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

3.2.4.4 Rolle von TRPV4 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom

Um zu untersuchen welche TRP-Kanäle für den 5,6-EET-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sind, wurde die Aktivierung einzelner TRP-Kanäle durch 5,6-EET überprüft. Dabei wurde zunächst der TRPV4 untersucht, da bereits beschrieben wurde, dass 5,6-EET diesen Kanal in einem heterologen Expressionssystem aktivieren kann⁶⁰. Da keine selektiven Antagonisten für den TRPV4 zur Verfügung stehen, wurde der Kanal zunächst in HEK-293-Zellen transfiziert. Anschließend wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit 5,6-EET erstellt. Als Positivkontrolle wurde der TRPV4-Agonist 4 α -PDD verwendet.

Dabei zeigte sich, dass allerdings nur ein geringer Teil der TRPV4-positiven Zellen auf 5,6-EET reagiert (ca. 15%), und dass der Kanal im heterologen Expressionssystem leichter und auch ohne Stimulation aktivierbar war (ca. 10% der TRPV4-positiven Zellen). Der ermittelte EC_{50} von 5,6-EET lag bei 600 nM (Abb. 3.2.8).

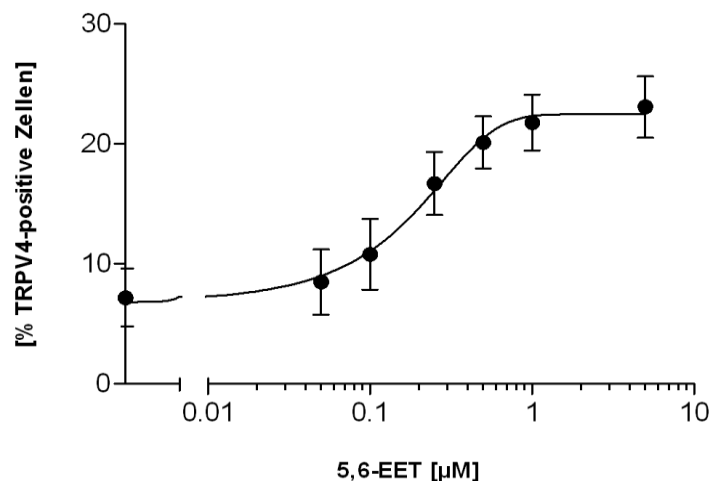


Abb. 3.2.8: **Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET vermittelten TRPV4-Aktivierung in transfizierten HEK-Zellen.** HEK-293-Zellen wurden mit dem humanen TRPV4 transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden Calcium-Imaging-Messungen durchgeführt. Dabei wurde 5,6-EET in Konzentrationen von 50 nM bis 5 µM oder Vehikel (3,2 % Acetonitril (v/v)) für je 30 Sekunden auf die Zellen gegeben und die Zahl der responsiven Zellen ermittelt. Als Positivkontrolle diente der selektive TRPV4-Agonist 4 α -PDD (5 µM). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM aus fünf bis sechs Messungen mit je 20 – 50 Zellen.

Die Vehikel-Aktivierung von TRPV4 im heterologen Expressionssystem weist darauf hin, dass der Kanal zum Teil konstitutive Aktivität besitzt, und der 5,6-EET-Effekt möglicherweise wesentlich geringer ist, als es die Resultate der Dosis-Wirkungs-Kurve aufzeigen. Um eine direkte Beteiligung von TRPV4 am 5,6-EET-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom in DRG-Neuronen auszuschließen, wurden die Calcium-Imaging-Experimente schließlich an DRGs von TRPV4-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Versuche wurden von Dr. Andrew Grant am „London Pain Consortium“ durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die TRPV4-defizienten Neurone in gleicher Weise und Intensität auf 5,6-EET reagieren, wie die Wildtyp-Kontrollen. Somit konnte eine direkte Aktivierung von TRPV4 durch 5,6-EET ausgeschlossen werden (Abb. 3.2.9).

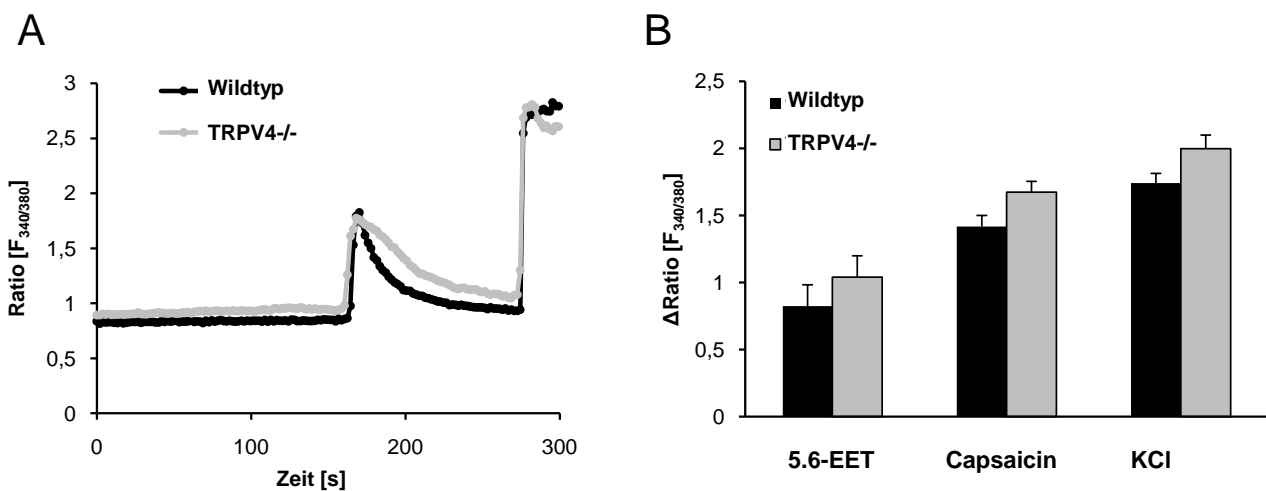


Abb. 3.2.9: **TRPV4-defiziente Neurone antworten auf 5,6-EET.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung mit 5,6-EET- (300 nM 10 Sekunden) und KCl-Stimulation (40 mM, 10 Sekunden) unter Verwendung von Wildtyp- (schwarz) und TRPV4-defizienten DRG-Neuronen (grau). (B) Amplituden der Reaktionen auf 5,6-EET- Capsaicin- und KCl-Stimulationen von Wildtyp- (schwarz) und TRPV4-defizienten DRG-Neuronen (grau). Gezeigt sind die Mittelwerte von 150 – 200 Neuronen. Die Experimente wurden von Dr. Andrew Grant und Vigneswara Kumaran vom „London Pain Consortium“ und Imperial College London durchgeführt.

3.2.4.5 Rolle von TRPV1 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom

Da 5,6-EET einen transienten Ca^{2+} -Einstrom in DRG-Neuronen verursacht, dieser allerdings unabhängig von TRPV4 ist, wurde untersucht, ob TRPV1 der gesuchte, durch 5,6-EET aktivierte Ionenkanal sein könnte. Dafür wurden Calcium-Imaging Experimente an DRGs von Wildtyp-Mäusen unter Verwendung vom AMG 9810, einem selektiven

TRPV1-Antagonisten ⁵⁶, durchgeführt. Zunächst wurde die Effizienz des TRPV1-Antagonisten getestet, indem die DRG-Neurone zweimal mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin (500 nM) für 10 Sekunden stimuliert wurden. Vor der zweiten Stimulation wurde AMG 9810 (1 μ M, 2-4 Minuten) oder Vehikel auf die Zellen gegeben. Es zeigte sich, dass die Capsaicin-Antwort der DRG-Neurone durch AMG 9810 vollständig aufgehoben wurde. Beim Wiederholen der Messungen mit 5,6-EET, konnte allerdings kein Unterschied in den Antworten der DRG-Neurone beobachtet werden. Da AMG 9810 den 5,6-EET-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom nicht verringern konnte, ist auch TRPV1 nicht der gesuchte Ionenkanal, der durch 5,6-EET aktiviert wird (Abb. 3.2.10).

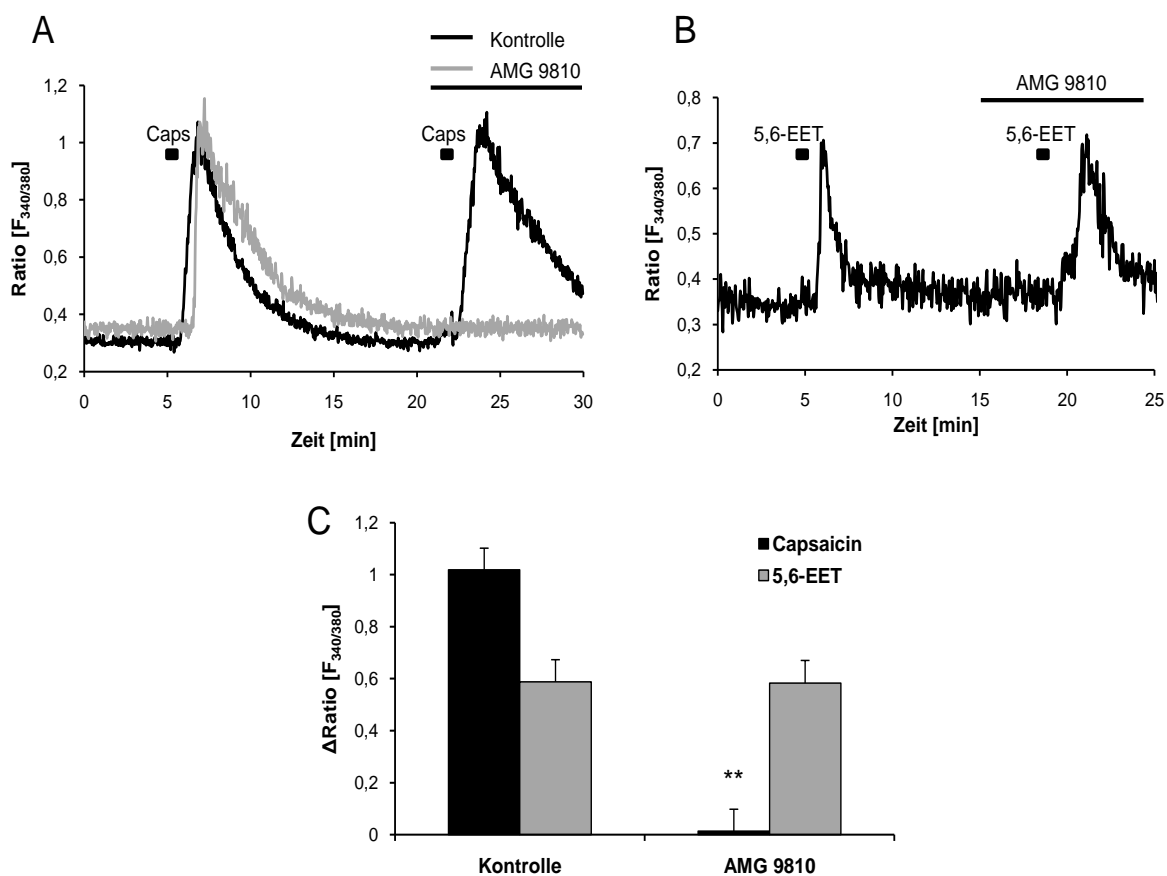


Abb. 3.2.10: **AMG 9810 blockiert effizient die TRPV1-Aktivierung durch Capsaicin, allerdings nicht den 5,6-EET vermittelten Ca^{2+} -Einstrom.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung mit zwei Capsaicin-Stimulationen (500 nM, 10 sek) zur TRPV1-Aktivierung. Zwei Minuten vor der zweiten Stimulation wurde AMG 9810 (1 μ M, grau) oder Kontrolllösung (schwarz) für zehn Minuten zugegeben. (B) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung mit zwei 5,6-EET-Stimulationen (250 nM, 10 sek). Vier Minuten vor der zweiten Stimulation wurde 1 μ M AMG 9810 zugegeben, hatte jedoch keine inhibierende Wirkung auf die 5,6-EET-Antwort. (C) Amplituden der Calcium-Signale auf Capsaicin (schwarz) und 5,6-EET \pm 1 μ M AMG 9810. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von acht Capsaicin) bzw. sieben (5,6-EET) Messungen mit je 50 – 70 Zellen. ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

3.2.4.6 Rolle von TRPA1 bei 5,6-EET-vermitteltem Calcium-Einstrom

Bei der Suche des TRP-Kanals, der durch 5,6-EET aktiviert wird, wurde als Nächstes der TRPA1 untersucht, da er, ebenso wie der TRPV1, in sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems exprimiert ist, und durch eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen aktivierbar ist³². Zu den endogenen TRPA1-Agonisten gehören zudem oxidierte Lipide, wie 4-Hydroxynonenal und die Cyclopentone PGA_2 , PGJ_2 und 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 ^{36,37}. Da auch 5,6-EET als oxidiertes Lipid ein potentieller endogener TRPA1-Agonist sein könnte, wurden zunächst Calcium-Imaging-Experimente mit einem selektiven TRPA1-Antagonisten (HC-030031, IC_{50} 6,2 μM ¹⁴¹) durchgeführt, um zu klären, ob 5,6-EET TRPA1 aktivieren kann. Zu diesem Zweck wurden DRG-Neurone zweimal mit 5,6-EET stimuliert. Zwei Minuten vor der zweiten 5,6-EET-Stimulation wurde der TRPA1-Antagonist appliziert (20 μM) und für insgesamt fünf Minuten eingewaschen. Als Positivkontrolle für DRG-Neurone diente eine kurze KCl-Stimulation (40 mM) am Ende des Experiments. Es zeigte sich, dass bei Applikation des TRPA1-Antagonisten keine weitere Reaktion auf 5,6-EET mehr zu beobachten war. Bei Applikation der Vehikel-Kontrolle reagierten die Zellen allerdings auf den 5,6-EET Stimulus und zeigten keine Unterschiede zur vorangegangenen Kontrollstimulation (Abb. 3.2.11).

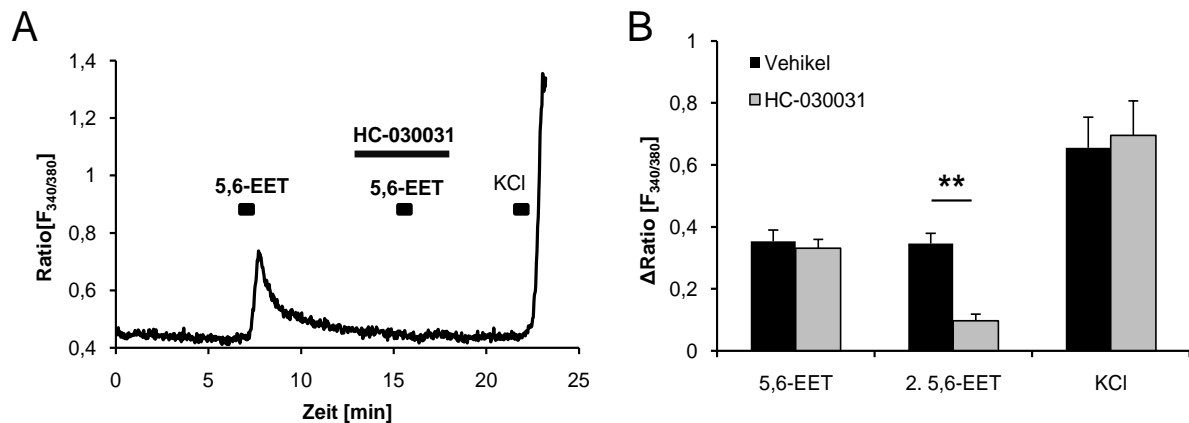


Abb. 3.2.11: **Der TRPA1-Antagonist HC-030031 blockiert den 5,6-EET-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung mit zwei 5,6-EET-Stimulationen (250 nM, 10 sek). Zwei Minuten vor der zweiten Stimulation wurde HC-030031 (20 μM) zugegeben und verhinderte den 5,6-EET-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (B) Amplituden der Calcium-Signale auf 5,6-EET und KCl bei Applikation von Vehikel (schwarz) oder HC-030031 (grau). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von je elf Messungen mit je 30 – 50 Zellen. ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

Da der 5,6-EET-abhängige Calcium-Einstrom durch den selektiven TRPA1-Antagonisten HC-030031 verhindert wurde, sollte eindeutig geklärt werden, ob 5,6-EET den TRPA1-Kanal aktiviert. Dafür wurden DRGs von TRPA1-defizienten Mäusen präpariert und in Calcium-Imaging-Experimenten mit dem selektiven TRPA1-Agonisten AITC (Allyl-isothiocyanat), mit 5,6-EET, sowie mit Capsaicin und KCl stimuliert. Die Antwort der Wildtyp- und TRPA1-defizienten DRG-Neurone auf die jeweiligen Stimuli wurde anschließend verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Antwort auf 5,6-EET in den TRPA1-defizienten DRG-Neuronen ausblieb (Abb. 3.2.12).

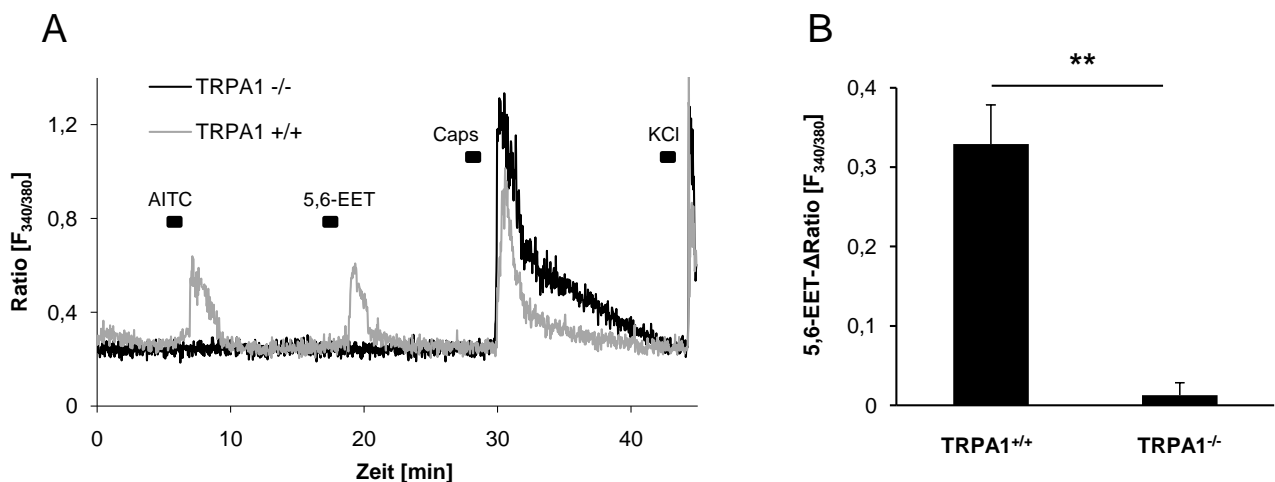


Abb. 3.2.12: **TRPA1-defiziente DRG-Neurone reagieren nicht auf 5,6-EET.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung von Wildtyp- (grau) und TRPA1-defizienten DRG-Neuronen (schwarz). Die Zellen wurden stimuliert mit AITC (100 μ M, 30 sek), 5,6-EET (250 nM, 30 sek), Capsaicin (250 nM, 30 sek) und KCl (40 mM, 30 sek). (B) Amplituden der Calcium-Signale auf 5,6-EET in Wildtyp- (und TRPA1-defizienten DRG-Neuronen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 14 (Wildtyp) bzw. zehn (TRPA1^{-/-}) unabhängigen Messungen mit je 20 – 40 Zellen. ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

Bei Auswertung der 5,6-EET-responsiven Zellen in Wildtyp- und TRPA1-defizienten DRG-Kulturen zeigte sich, dass auch TRPA1-defiziente Neurone auf AITC reagieren. Allerdings ist der Prozentsatz der AITC-responsiven Zellen in TRPA1-defizienten DRG-Neuronen signifikant geringer, als in Wildtyp-DRG-Neuronen. Wie bereits publiziert, reagieren auch in TRPA1-defizienten DRGs einige Neurone auf AITC. Allerdings ist die Zahl der AITC-responsiven Zellen in TRPA1-defizienten DRGs signifikant geringer, als in Wildtyp-DRGs⁷⁶.

Analog dazu zeigte sich, dass nur ein geringer Prozentsatz der TRPA-defizienten DRG-Neurone auf 5,6-EET antwortet (2 von 642 untersuchten Zellen \rightarrow 0,3%).

3. Ergebnisse

In den Wildtyp-DRG-Neuronen hingegen, reagierte ein erheblich höherer Prozentsatz auf 5,6-EET reagierte (51 von 619 untersuchten Zellen → 8,2%). Beim Vergleich der prozentualen Antworten von TRPA1-defizienten- und Wildtyp-DRG-Neurone auf Capsaicin und KCl konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.2.13).

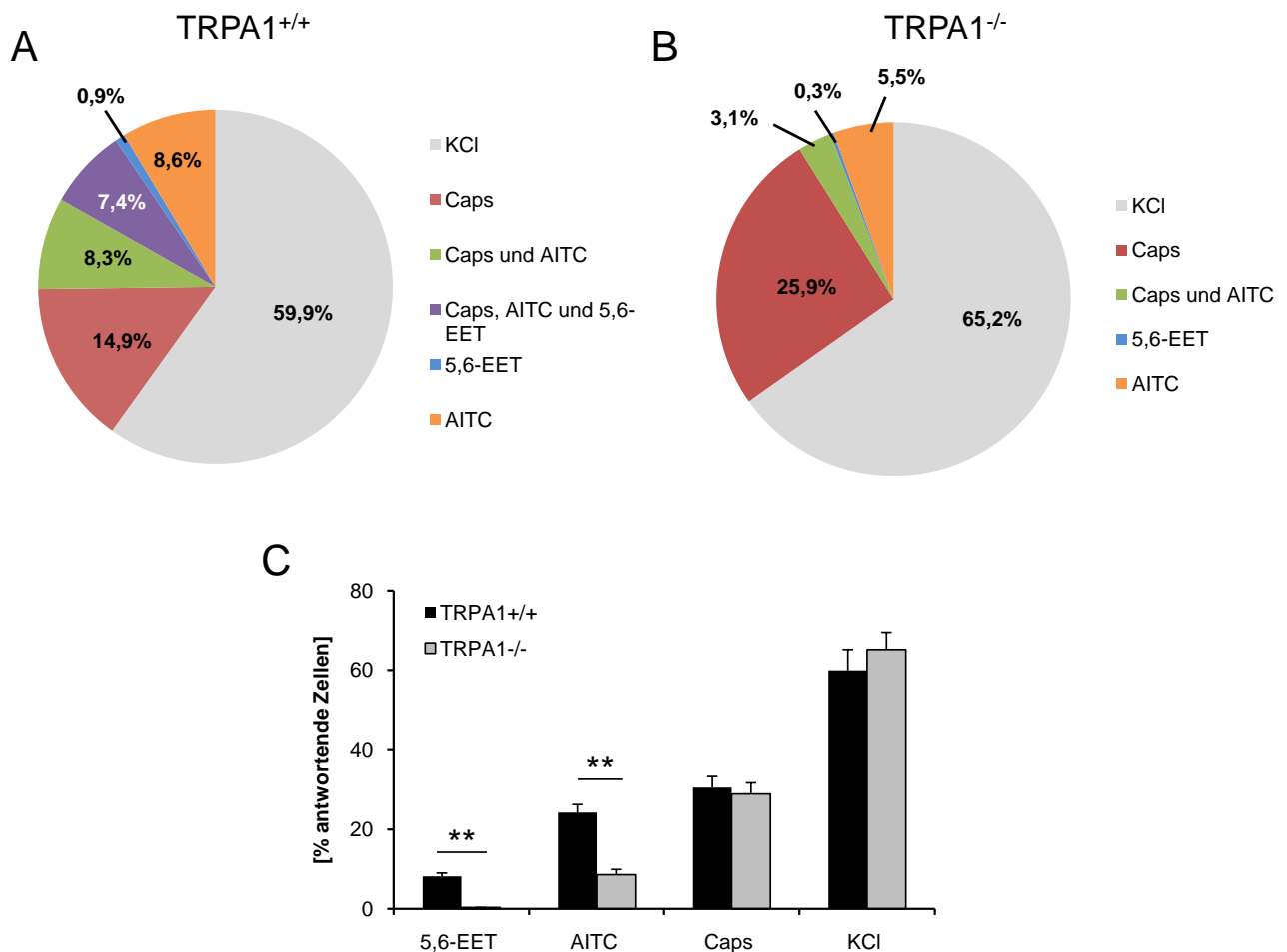


Abb. 3.2.13: **Prozentuale Verteilung der Antworten von TRPA1-defizienten- und Wildtyp-DRGs.**

(A) Prozentuale Verteilung der antwortenden Zellen auf einen oder mehrere Stimuli in Wildtyp-DRGs Gesamtzellzahl: 619 (Caps = Capsaicin). (B) Prozentuale Verteilung der antwortenden Zellen auf einen oder mehrere Stimuli in TRPA1-defizienten-DRGs. Gesamtzellzahl: 642. (C) Prozentuale Verteilung der Gesamtzahl antwortender Zellen auf einen spezifischen Stimulus. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 14 (Wildtyp) bzw. zehn (TRPA1^{-/-}) unabhängigen Messungen. ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass 5,6-EET den Ionenkanal TRPA1 aktivieren kann, und dass die Mehrzahl der 5,6-EET responsiven Neurone ebenfalls TRPV1-positiv ist.

3.2.4.7. Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in TRPA1-transfizierten Zellen nach Stimulation mit 5,6-EET

Zur zusätzlichen Bestätigung der direkten Aktivierung von TRPA1 durch 5,6-EET, wurden HeLa-, N1E-115- und HEK-293-Zellen mit Plasmiden transient transfiziert, die eine Überexpression von TRPA1 erlauben. Dabei wurde für die Transfektion der HeLa-Zellen der murine TRPA1 ((mm)TRPA1) verwendet und für die Transfektion der N1E- und HEK-Zellen der humane TRPA1 (h)TRPA1. Der murine TRPA1 war mit einem GFP-Tag versehen, was eine zusätzliche fluoreszenzmikroskopische Expressionskontrolle erlaubte. Der humane TRPA1 besaß keinen GFP-Tag und wurde daher mit pIRES-GFP kotransfiziert. Die Transfektionsrate wurde mittels Calcium-Imaging und Zählen der GFP bzw. YFP-positiven Zellen bestimmt, und lag zwischen 25 und 60%. Etwa 16 – 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in Calcium-Imaging Experimenten auf die Funktionalität des überexprimierten TRPA1 getestet. Dafür wurden die Zellen mit 5,6-EET und AITC als Positivkontrolle stimuliert. In allen drei transient transfizierten Zelllinien konnte eine Antwort auf 5,6-EET (250 – 500 nM, 30 sek) beobachtet werden. Ebenso reagierten die 5,6-EET responsiven Zellen auf die Positivkontrolle AITC (100 µM, 30 sek, Abb. 3.2.14).

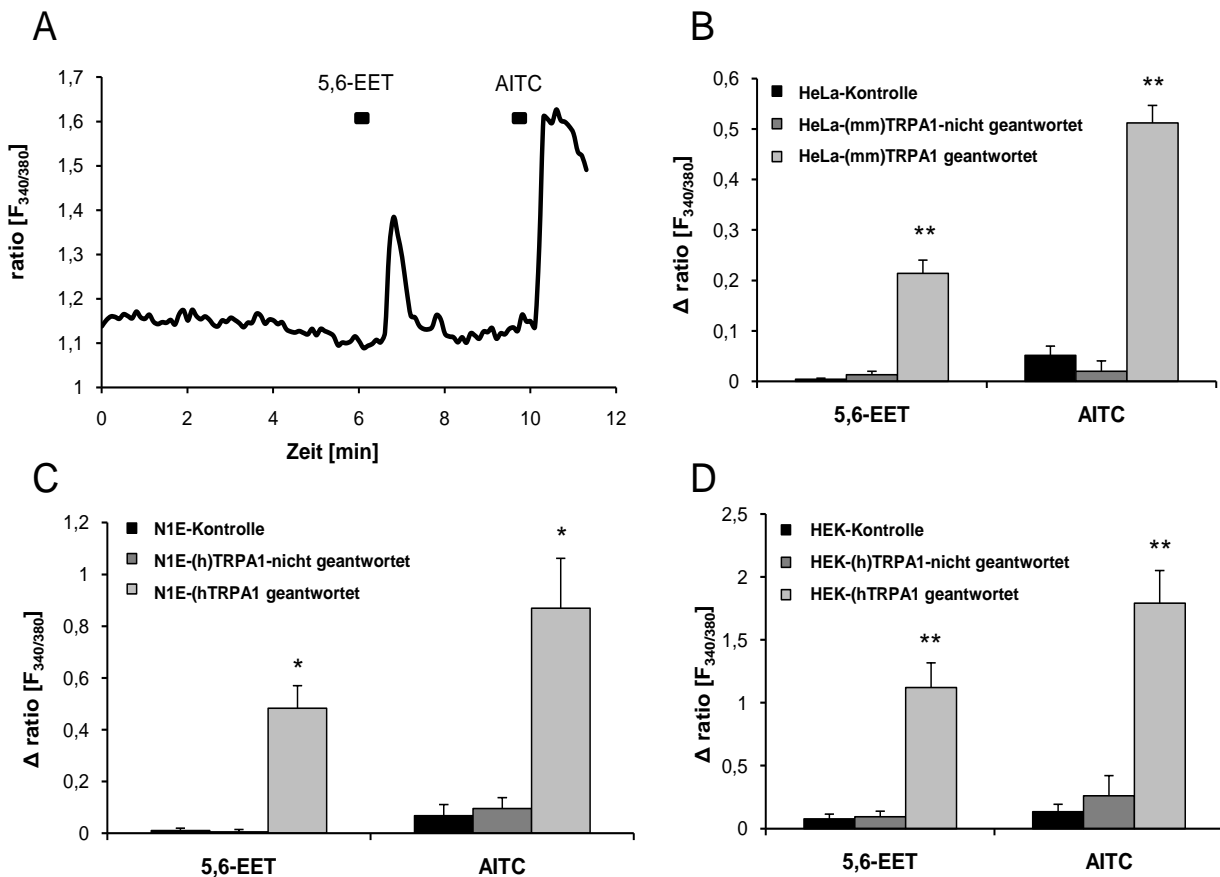


Abb. 3.2.14: **Stimulation TRPA1-transfizierter Zellen mit 5,6-EET und AITC.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung von TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen. Die Zellen wurde stimuliert mit 5,6-EET (500 nM, 30 sek) und AITC (100 μ M, 30 sek), (B-D) Amplituden der Calcium-Antworten auf 5,6-EET und AITC auf den murinen (mm)- oder den humanen (h)-TRPA1 für HeLa-Zellen (B, 6-10 Messungen), N1E-115-Zellen (C, 7 – 12 Messungen) und HEK-Zellen (D, 7 – 10 Messungen). Die Amplituden der Calcium-Antworten wurden gruppiert in kontroll-transfizierte Zellen (Leervektor pIRES, schwarz), transfizierte und nicht-responsive Zellen (dunkelgrau) und transfizierte und antwortende Zellen (hellgrau). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der jeweiligen Anzahl unabhängiger Messungen mit je 20 – 80 Zellen. * = ungepaarter t-Test, $p < 0.05$, ** = ungepaarter t-Test, $p < 0.01$.

Da die TRP-transfizierten Zellen auch auf 5,6-EET antworten, wurde nun eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5,6-EET bestimmt. Für die Messungen der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden HEK-293 verwendet, die, wie oben beschrieben transient mit dem humanen TRPA1 transfiziert wurden. Die verwendeten 5,6-EET-Konzentrationen waren im Bereich von 50 nM bis 5 μ M. Als Positivkontrolle diente AITC. Am Ende jeder Messung wurde die Anzahl der 5,6-EET-responsiven Zellen ermittelt und mit der Anzahl TRPA1-positiver (AITC-responsiver) Zellen verglichen.

Es zeigte sich, dass 5,6-EET in transfizierten Zellen TRPA1 konzentrationsabhängig aktiviert. Der ermittelte EC_{50} -Wert von 5,6-EET lag bei 193 nM (Abb. 3.2.15). Dieser Wert liegt unter deutlich unter den EC_{50} -Werten der bisher identifizierten endogenen TRPA1-Agonisten (4-Hydroxynonenal: 10 – 20 μ M, PGA_2 : 24 μ M³²), ist aber auch niedriger, als EC_{50} -Werte exogener TRPA1-Agonisten (AITC: 3 – 34 μ M, Zimtaldehyd: 13 – 125 μ M³²).

5,6-EET scheint TRPA1 nicht direkt zu aktivieren. Dies kann daraus geschlossen werden, dass nicht alle TRPA1-positiven Zellen durch 5,6-EET aktiviert werden. Somit ist 5,6-EET kein direkter TRPA1-Agonist, sondern ein aktivatorischer TRPA1-Modulator.

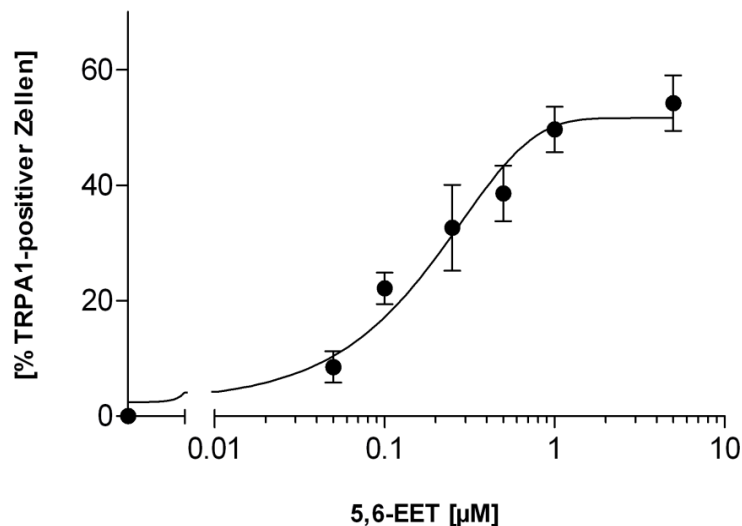


Abb. 3.2.15: **Konzentrations-Wirkungs-Kurve der 5,6-EET-vermittelten TRPA1-Aktivierung in transient transfizierten HEK-Zellen.** Die Zellen wurden mit 5,6-EET in Konzentrationen von 50 nM bis 5 μ M oder Vehikel (3,2 % Acetonitril (v/v)) für je 30 Sekunden stimuliert und die Zahl der responsiven Zellen ermittelt. Als Positivkontrolle diente der selektive TRPA1-Agonist AITC (100 μ M, 30 sek). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM aus fünf bis sechs Messungen mit je 20-80 Zellen.

3.2.4.8 Untersuchung der molekularen Aktivierung von TRPA1 durch 5,6-EET unter Verwendung von TRPA1-Aktivierungsmutanten

Im Folgenden sollte die molekulare Aktivierung des TRPA1 durch 5,6-EET näher untersucht werden. Bislang ist über die molekulare Aktivierung des TRPA1 lediglich bekannt, dass sie durch kovalente Modifikation von elektrophilen Substanzen an n-terminale Cystein-Reste des Kanals geschieht⁶⁹. Diese sind der in N-terminalen, cytosolischen Domäne des Kanals lokalisiert. Daher sollte nun geklärt werden, ob 5,6-EET oder ein zwischengeschalteter zellulärer Faktor auch in der Lage ist, durch Wechselwirkungen mit den entsprechenden Cystein-Resten den TRPA1 zu aktivieren, oder ob dafür ein anderer molekularer Mechanismus in Frage kommt. Prinzipiell ist 5,6-EET chemisch in der Lage Michael-Addukte zu bilden, da die beiden Kohlenstoffe 5' und 6' an der Epoxidgruppe positive Partialladungen tragen und somit elektrophile Eigenschaften aufweisen. Zur Klärung dieser Frage wurden HEK-293 Zellen transient mit dem humanen (h-) TRPA1 und einer Aktivierungsmutante transfiziert. Bei dieser Mutante (3CK) sind drei der regulatorischen Cysteine durch Serin-Reste ausgetauscht und das Lysin-710 durch ein Arginin³⁵ (vgl. Abschnitt 2.1.5).

Nach Transfektion wurden die Zellen mit 5,6-EET (500 nM, 30 sec) und als Positivkontrolle mit Carvacrol (250 µM, 30 sec), einem cystein-unabhängigen TRPA1-Aktivator, stimuliert. Wie erwartet konnte beobachtet werden, dass Carvacrol beide TRPA1-Varianten aktivieren kann. 5,6-EET hingegen kann nur den nicht mutierten TRPA1 aktivieren. Die 3CK-Mutante kann durch 5,6-EET nicht aktiviert werden (Abb. 3.2.17).

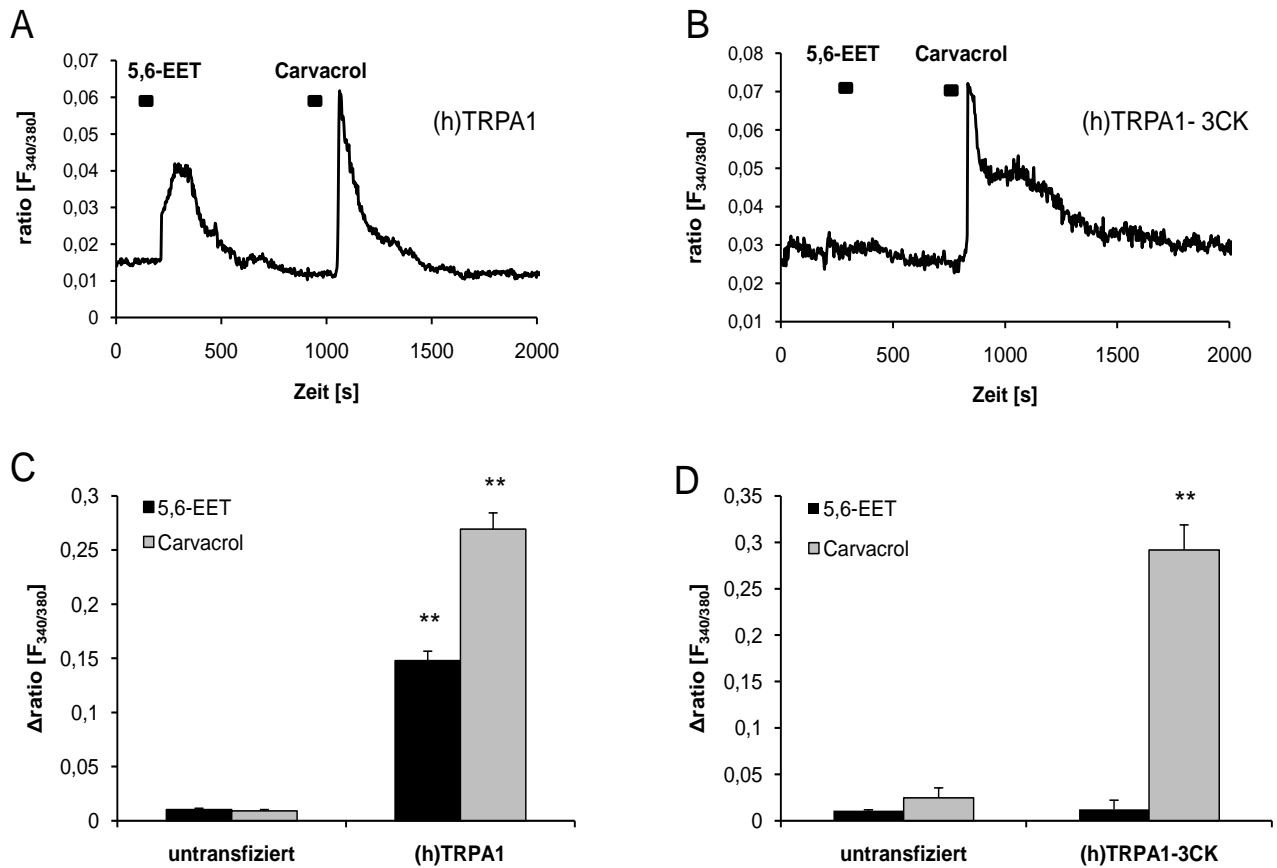


Abb.3.2.16: **Die TRPA1-Aktivierungsmutante 3CK kann nicht durch 5,6-EET aktiviert werden.** (A) Repräsentative Calcium-Imaging-Messungen von (h)TRPA1- (A) und (h)TRPA1-3CK-transfizierten HEK-Zellen (B) nach Stimulation mit 5,6-EET (500 nM, 30sec) und Cavacrol (250 µM, 30 sec). (C) und (D): Amplituden der Calcium-Antwort von (h)TRPA1 (C) oder (h)TRPA1-3CK auf 5,6-EET und Carvacrol. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM aus 12-13 (h)TRPA1 bzw. 15 (h)TRPA1-3CK unabhängigen Messungen mit je 50 – 100 Zellen. ** = ungepaarter t-Test, p < 0.01.

Die Resultate weisen darauf hin, dass die Cysteine C612, C641 und C665 oder das Lysin-710 für die 5,6-EET-vermittelte Aktivierung des TRPA1 essentiell sind, da diese Aminosäuren in beiden Mutanten ersetzt wurden, und diese Mutanten nicht mehr durch 5,6-EET aktivierbar sind.

3.2.5 Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 5,6-EET

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass 5,6-EET ein endogener TRPA1-Modulator ist, sollte untersucht werden, ob 5,6-EET in der Lage ist, die capsaicin-vermittelte TRPV1-Aktivierung verstärken kann. Dies wurde angenommen, da die 5,6-EET-responsiven Zellen auch TRPV1-positiv sind, und in der Literatur bereits Interaktionen der beiden Ionenkanäle beschrieben wurden¹⁴²⁻¹⁴⁵.

Zur Untersuchung der TRPV1-Sensibilisierung wurden DRG-Neurone aus Wildtyp-Mäusen im Abstand von 15 Minuten zweimal kurz mit Capsaicin stimuliert (200 nM, 10 sek). Vor der zweiten Stimulation wurden die Zellen mit 50 nM 5,6-EET oder Vehikel für zwei Minuten inkubiert. Danach wurden die Amplituden der jeweiligen Capsaicin-Antworten miteinander verglichen (Abb. 3.2.18).

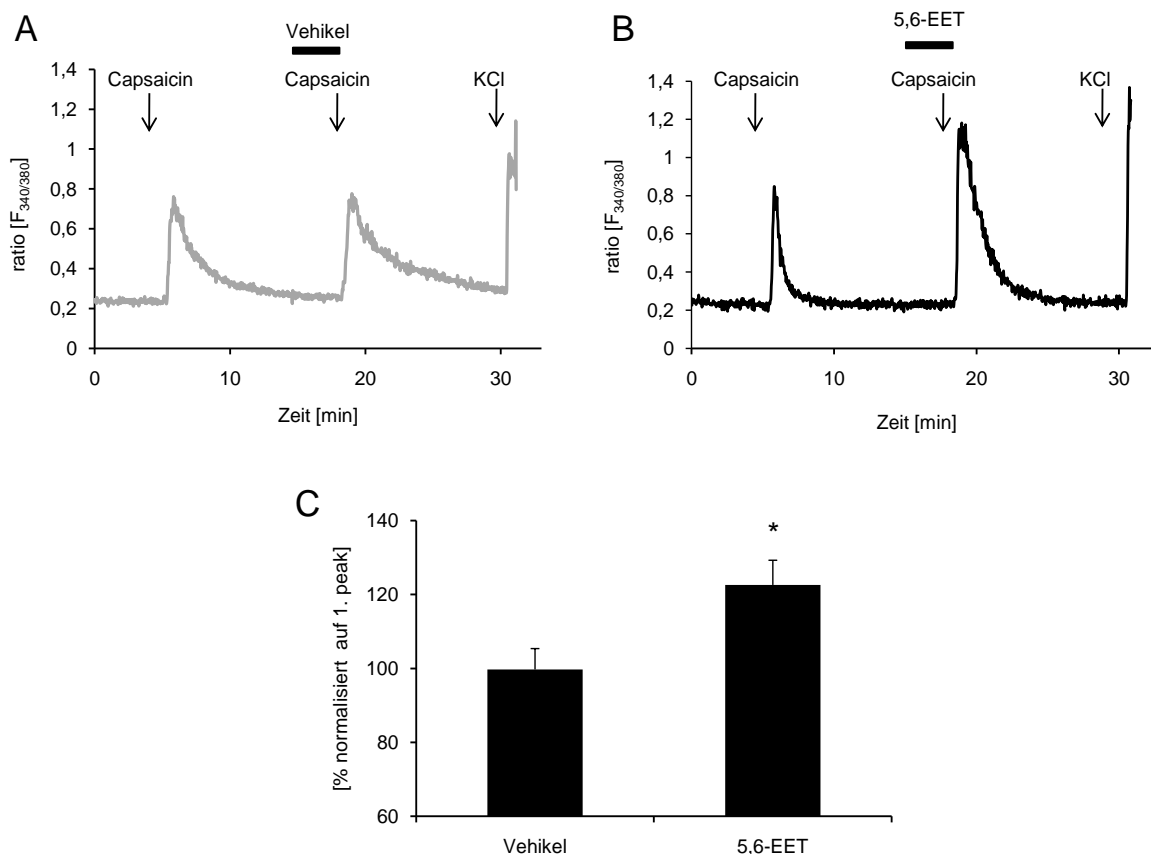


Abb.3.2.17: **Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 5,6-EET.** (A und B) Repräsentative Calcium-Imaging-Messung nach Stimulation mit Vehikel (A) oder 5,6-EET (50 nM, 2 min. B). Als Positivkontrolle für Neurone diente eine abschließende Stimulation mit KCl (40 mM, 10 sek). (C) Amplitude der zweiten Capsaicin-Antwort normalisiert auf die Kontrollstimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 47 Zellen. * = ungepaarter t-Test, $p < 0.05$.

Es zeigte sich, dass die Amplituden der zweiten Capsaicin-Antwort bei Applikation von 5,6-EET signifikant größer waren, als bei der Vehikel-Kontrolle. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass 5,6-EET die capsaicin-vermittelte TRPV1-Aktivierung sensibilisieren kann, und somit neben der direkten TRPA1-Aktivierung auch einen indirekten pronozizeptiven Effekt aufweist.

3.2.6 Messung der CGRP-Freisetzung aus Ischiasnerven nach 5,6-EET-Stimulation

Aktivierung und Sensibilisierung von TRP-Kanälen führt zu vermehrter Freisetzung pronozizeptiver und vasodilativer Neuropeptide, wie Substanz P und CGRP¹⁴⁶. CGRP-Freisetzung und Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors löst eine Aktivierung von Proteinkinasen aus, die zu Neuroinflammation führt^{44,45}.

Da 5,6-EET die capsaicin-vermittelte TRPV1-Antwort verstärken und den TRPA1 direkt aktivieren kann, stellte sich daher die Frage, ob diese TRPV1-Sensibilisierung eine erhöhte CGRP-Freisetzung zur Folge hat. Zur Klärung dieser Frage wurden Ischiasnerven aus Wildtyp-Mäusen isoliert und mit Hitze (47°C), niedrigem pH (5,2) und AITC (100 µM) für je fünf Minuten stimuliert. Die Stimulation der Nerven erfolgte mit und ohne 5,6-EET (5 µM), und die Konzentrationen an freigesetztem CGRP wurden mittels enzyme immuno-assay (EIA) ermittelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei allen drei Stimulationen die CGRP-Freisetzung stark anstieg. Bei Nerven, die zusätzlich mit 5,6-EET behandelt wurden, konnte in allen drei Experimenten zusätzlich eine signifikant höhere CGRP-Freisetzung gemessen werden, als bei der Vehikel-Kontrolle (Abb. 3.2.19).

3. Ergebnisse

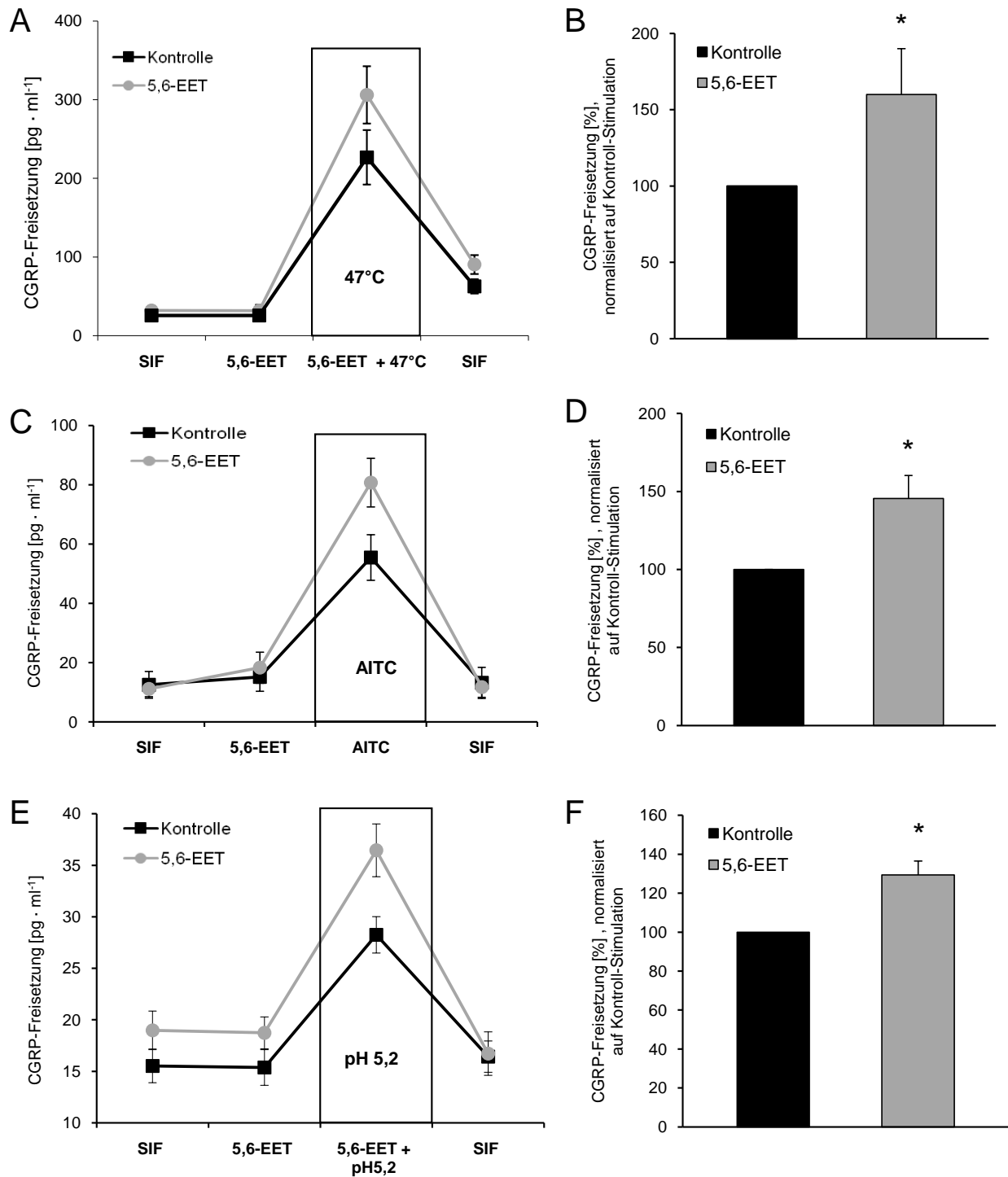


Abb.3.2.18: **5,6-EET-Behandlung von Ischiasnerven führt zu erhöhter CGRP-Freisetzung bei Stimulation mit Hitze (47°C), AITC oder niedrigem pH (5,2).** CGRP-Freisetzung (absolut) nach Stimulation der Ischiasnerven mit Hitze (47°C, A), mit AITC (Allylisothiocyanat, 100 µM, C) und mit pH 5,2 €. Der Anstieg nach Behandlung mit 5,6-EET ist in allen drei Experimenten stärker, als die Vehikel-Kontrolle. (B, D, F) CGRP-Freisetzung der 5,6-EET behandelten Nerven normalisiert auf die Kontroll-Stimulation (B: 47°C, D: AITC 100 µM, F: pH 5,2) Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils sieben unabhängigen Ischiasnerven. * = ungepaarter t-Test, $p \leq 0,05$.

3.2.7 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp- und TRPA1-defizienten Mäusen nach 5,6-EET-Injektion

Nachdem *in vitro*-Versuche zeigen, dass 5,6-EET bei Akut-Schmerz freigesetzt wird und als endogener TRPA1-Modulator Calcium-Einströme in nozizeptive Neurone auslöst, stellte sich die Frage, ob eine direkte periphere oder zentrale Injektion von 5,6-EET Änderungen des nozizeptiven Verhaltens bei Mäusen hinsichtlich der mechanischen und thermischen Schmerzwahrnehmung zur Folge hat.

3.2.7.1 Akut-Schmerz-Test

Zur Messung des akuten Schmerzes nach 5,6-EET-Injektion wurde zunächst ein Akut-Schmerz-Test durchgeführt, bei dem, 5,6-EET in die dorsale Seite der Hinterpfote von Wildtyp-Mäusen injiziert wurde und anschließend die Leckzeit gemessen wurde. Dieses Modell ist analog zum Formalin-Test.^{26,130,147} Da Formalin auch ein TRPA1-Agonist ist⁶⁸, wurde angenommen, dass eine Injektion von 5,6-EET ein ähnliches akut-nozizeptives Verhalten bei Mäusen auslöst. Dazu wurden 20 µl einer 5 µM 5,6-EET-Lösung (in PBS) oder Vehikel in die dorsale Seite der Hinterpfote von Wildtyp-Mäusen injiziert. Anschließend wurde die Leckverhalten beobachtet, und die Leckzeit in zehnminütigen Intervallen gemessen. Es zeigte sich, dass die 5,6-EET behandelten Mäuse eine signifikant längere Leckzeit in den ersten zehn Minuten nach Injektion aufwiesen, als die vehikel-behandelten Tiere. (Abb. 3.2.20).

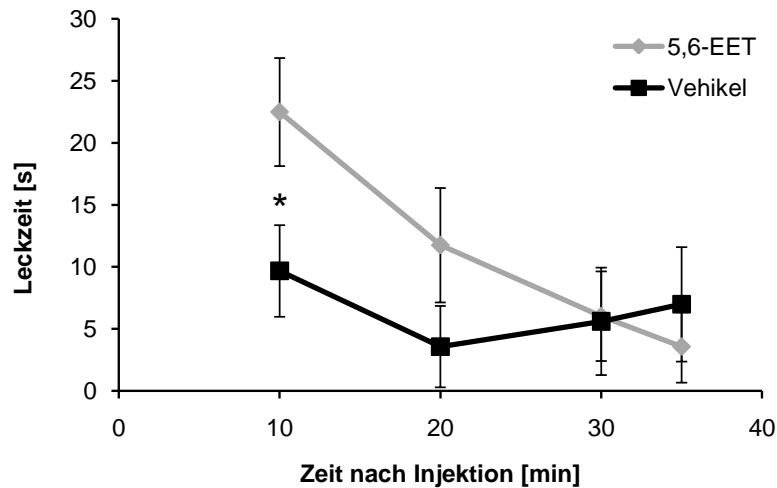


Abb.3.2.19: **Erhöhtes Akut-Schmerzverhalten nach Injektion von 5,6-EET intraplantar.** Wildtyp-Mäusen wurden entweder 5 μ M 5,6-EET (in PBS) oder das entsprechende Volumen an Acetonitril (1,6% v/v in PBS) in die dorsale Seite der linken Hinterpfote injiziert. Die Leckzeiten wurden in Intervallen zu je fünf bis zehn Minuten über einen Zeitraum von 35 Minuten beobachtet und gemessen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils acht Tieren gezeigt. * = zweiseitige ANOVA mit Bonferroni Postkorrektur $p \leq 0,05$.

Somit zeigte sich, dass die Injektion von 5 μ M 5,6-EET zu einer Verstärkung des akuten Schmerzverhaltens führt. Diese erste Phase akut-nozizeptiven Verhaltens ist auch typisch bei Formalin-Injektion. Allerdings tritt bei Formalin-Injektion meist eine zweite Phase akut-nozizeptiven Verhaltens ein, die etwa 30-45 Minuten nach Formalin-Injektion beobachtet werden kann¹³⁰. Dieses biphasische nozizeptive Verhalten konnte bei 5,6-EET-Injektion allerdings nicht beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich eine deutlich erhöhte Leckzeit in den ersten zehn Minuten nach Injektion. Dieser transiente Effekt von 5,6-EET war erwartet, da auch die *in vitro*-Effekte von 5,6-EET transient und kurzzeitig waren.

3.2.7.2 Ermittlung der mechanischen Schmerzschwelle nach Injektion von 5,6-EET

Nachdem ein erhöhtes Akut-Schmerzverhalten bei Wildtyp-Mäusen nach 5,6-EET-Injektion zu beobachten war, sollten die mechanischen und thermischen Schwellenwerte von Wildtyp-Tieren nach intraplantarer Injektion von 5,6-EET ermittelt werden. Da TRPA1

in peripheren Nervenendigungen bei der mechanischen Schmerzempfindung eine Rolle zu spielen scheint^{89,135,136,141,148,149}, wurde daher zunächst der mechanische Schwellenwert nach Injektion von 5,6-EET oder Vehikel ermittelt. Dafür wurden Wildtyp-Mäusen 5 µM 5,6-EET in die plantare Seite der linken Hinterpfote injiziert. Der mechanische Schwellenwert wurde unter Verwendung des Plantar Aesthesiometer über einen Zeitraum von 0 bis sechs Stunden nach Injektion ermittelt. Es konnte beobachtet werden, dass die 5,6-EET-behandelten Tiere eine Stunde nach Injektion eine deutlich geringere mechanische Schmerzschwelle aufwiesen, als die Vehikel-Kontrollen (Abb. 3.2.21).

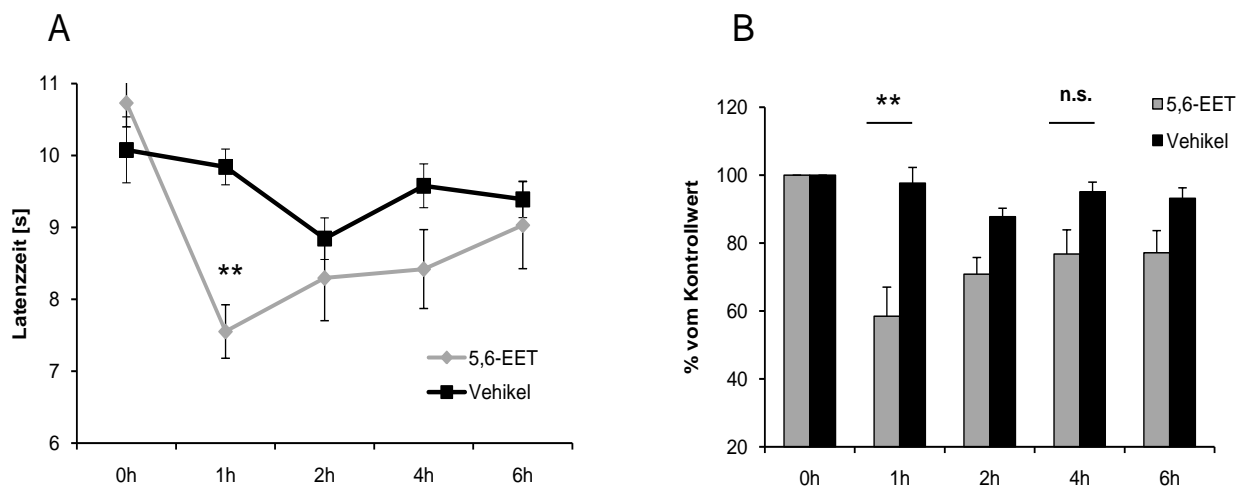


Abb. 3.2.20: **Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intraplantarer 5,6-EET-Injektion.** 20 µl einer 5 µM 5,6-EET-Lösung wurden in die linke Hinterpfote injiziert. Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden. (A) absolute und (B) prozentuale Verteilung der Latenzzeiten nach Injektion. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils acht bis neun Tieren pro Gruppe. ** = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,01$.

Da 5,6-EET bei nozizeptiver Aktivität aus DRGs freigesetzt wird (vgl. 3.2.3) stellt sich die Frage, ob freigesetztes 5,6-EET auch direkt an zentralen Termini wirkt und zu TRPA1-Aktivierung führt. Zu diesem Zweck wurde 5,6-EET intrathekal, also direkt in den Rückenmarkskanal von Wildtyp-Mäusen injiziert. Nach Injektion wurden die Tiere in kleinen Gruppen (je $n=2$) anhand ihrer mechanischen Schwellen untersucht. Um den Zeitverlauf der Änderungen mechanischer Schwellenwerte möglichst genau beobachten zu können, wurden kurze Zeitintervalle gewählt (in der ersten Stunde nach Injektion jeweils 15 Minuten, in der zweiten Stunde nach Injektion jeweils 30 Minuten).

Auch bei diesem Versuch konnte eine Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle bei 5,6-EET-behandelten Tieren beobachtet werden, die bereits 30 Minuten nach Injektion eintrat. Der Effekt hielt etwa eine Stunde an (Abb. 3.2.22).

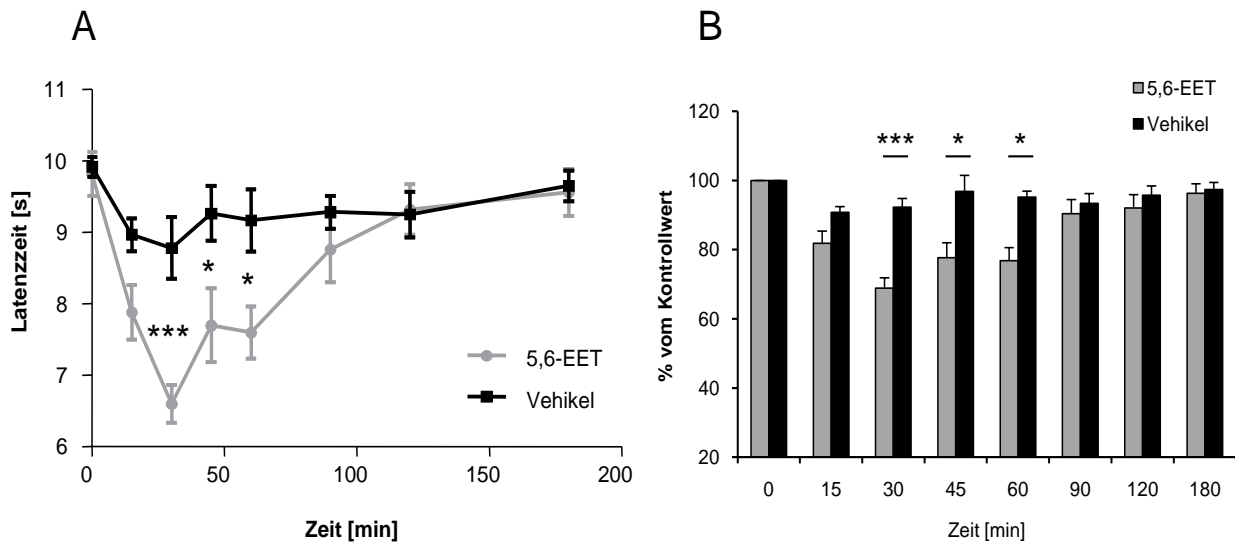


Abb. 3.2.21: **Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intrathekaler 5,6-EET-Injektion.** 10 μ M 5,6-EET oder das entsprechende Volumen an DMSO (in Saline) wurden intrathekal injiziert. Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden. (A) absolute und (B) prozentuale Verteilung der Latenzzeiten nach Injektion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils sechs Tieren pro Gruppe. * = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Diese Wirkung von 5,6-EET auf die mechanische Schmerzschwelle war zu erwarten, da TRPA1 durch mechanische Reize aktiviert wird und eine Stimulierung durch 5,6-EET zu einer Verstärkung der TRPA1-vermittelten mechanischen Schmerzempfindung führt. Der Unterschied im Einsetzen des 5,6-EET-vermittelten Effekts nach intraplantarer und intrathekaler Injektion lässt sich dadurch begründen, dass sich bei intrathekaler Gabe die Substanz in unmittelbarer Nähe zu den DRGs befindet, und somit ein schnellerer Effekt erwartet wird, als in der Peripherie, wo 5,6-EET zunächst durch die Hautschichten der Pfote dringen, und zu den peripheren Nervenendigungen gelangen muss.

3.2.7.3 Nozizeptives Verhalten TRPA1-defizienter Mäuse

Nachdem eine Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle nach 5,6-EET-Injektion beobachtet wurde, sollte geklärt werden, ob dieser Effekt tatsächlich durch TRPA1-Aktivierung erklärt werden kann. Daher wurden nun Wildtyp- und TRPA1-defiziente Mäuse hinsichtlich ihrer mechanischen Schmerzschwelle nach 5,6-EET-Injektion untersucht und verglichen. Dafür wurden 5 μ M 5,6-EET in linken Hinterpfoten von Wildtyp- oder TRPA1-defizienten Mäusen injiziert. Das nozizeptive Verhalten wurde mittels Plantar Aesthesiometer über einen Zeitraum von vier Stunden ermittelt.

Die signifikante Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle der Wildtyp-Mäuse konnte bestätigt werden. Zu den Zeitpunkten 1h und 2h nach Injektion wiesen die Wildtyp-Tiere niedrigere Latenzzeiten auf, als zu Beginn der Messungen. Nach vier Stunden war der Effekt rückläufig. Bei den TRPA1-defizienten Mäusen hingegen, konnte keine Beeinträchtigung der mechanischen Schmerzschwelle durch 5,6-EET-Injektion beobachtet werden (Abb. 3.2.24).

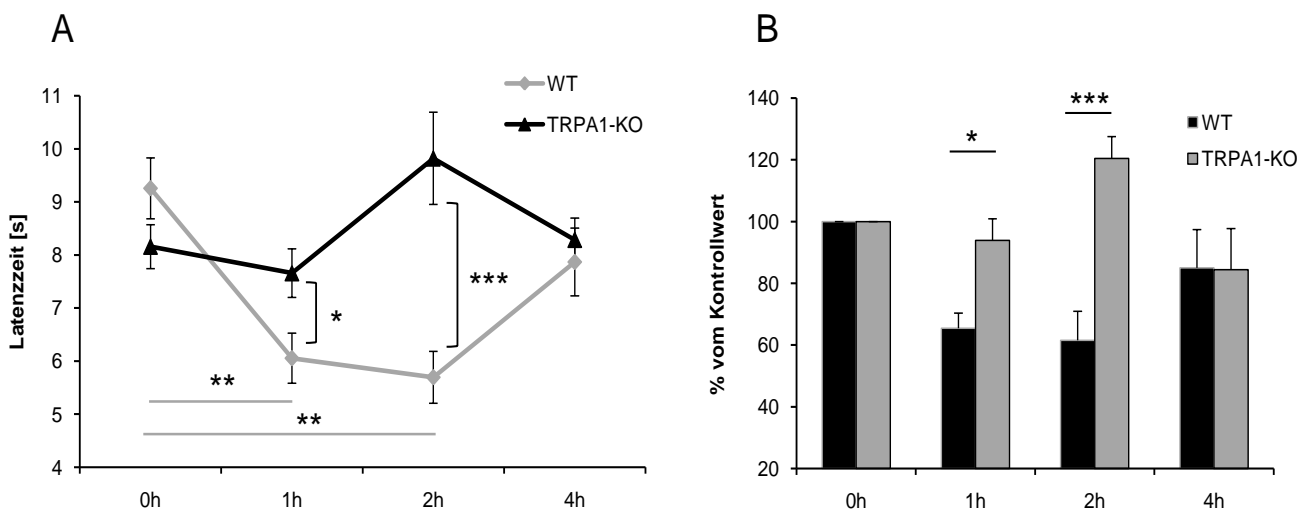


Abb. 3.2.22: **Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intraplantarer 5,6-EET-Injektion von Wildtyp- und TRPA1-defizienten Mäusen.** Es wurden 5 μ M 5,6-EET in die linke Hinterpfote intraplantar injiziert, und die mechanische Schmerzschwelle wurde über einen Zeitraum von vier Stunden ermittelt. (A) absolute und (B) prozentuale Verteilung der Latenzzeiten nach Injektion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils acht Tieren pro Gruppe. * = zweiseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Postkorrektur, $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die Experimente wurden von Dr. Christian Brenneis am Children's Hospital, Boston durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen die Resultate der Verhaltensversuche, dass 5,6-EET durch TRPA1-Aktivierung eine Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle verursacht, was in TRPA1-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden kann. Bei der Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle handelt es sich um einen transienten Effekt, der nach zentraler Gabe von 5,6-EET bereits nach 90 Minuten, und nach peripherer Gabe nach maximal zwei Stunden rückläufig war. Somit konnten die *in vitro*-Ergebnisse bestätigt werden, in denen 5,6-EET als selektiver, aktivatorischer und endogener TRPA1-Modulator identifiziert wurde. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine 5,6-EET-vermittelte TRPA1-Aktivierung *in vivo* zur Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle führt.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Epoxyeicosatriensäuren auf die Verarbeitung nozizeptiver Information untersucht. Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der löslichen Epoxidhydrolase (sEH) und der drei von ihr metabolisierten EETs, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET. Dabei wurde beobachtet, dass sEH-defiziente Mäuse eine verlängerte mechanische Hyperalgesie in der späten Entzündungsphase (48 – 96 Stunden nach intraplantarer Zymosan-Injektion) aufwiesen. Lipidmessungen aus Gewebeproben mittels LC-MS/MS ergaben, dass zum Zeitpunkt des stärksten Schmerzempfindens vorwiegend 8,9-EET in den DRGs sEH-defizienter Mäuse akkumuliert. Der pronozizeptive Effekt von 8,9-EET konnte in Calcium-Imaging-Versuchen mit primär afferenten Neuronen und in CGRP-Freisetzungsvorsuchen mit isolierten Ischiasnerven bestätigt werden. Schließlich wurde in Verhaltensversuchen von Wildtyp-Mäusen nach intraplantarer Injektion von 8,9-EET eine verringerte mechanische Schmerzschwelle festgestellt.

Die Resultate dieses Teils weisen darauf hin, dass die sEH möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Auflösung von Schmerzen im Entzündungsverlauf spielt, indem sie das pronozizeptive 8,9-EET zu seinem bioinaktiven Metaboliten 8,9-DHET hydrolysiert. Es stellt sich daher die zentrale Frage, ob die sEH somit ein potentiellcs Zielprotein bei pathophysiologischem Nozizeptorschmerz darstellt. Diese Frage wird in Abschnitt 4.1 erörtert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von 5,6-EET bei der Schmerzverarbeitung gesondert untersucht, da dieses Lipid nicht über sEH abgebaut wird, und da es bereits als Agonist für den TRPV4-Kanal beschrieben wurde, welcher bei der Verarbeitung nozizeptiver Information eine wichtige Rolle zu spielen scheint^{60,61,110}. Es wurde beobachtet, dass die Konzentrationen an 5,6-EET in DRGs bei Akutschmerz signifikant ansteigen. Mithilfe von *In-vitro*-Freisetzungsvorsuchen konnte gezeigt werden, dass 5,6-EET aus DRGs freigesetzt wird. Darüber hinaus konnte in Calcium-Imaging-Versuchen mit DRG-Neuronen und transfizierten Zelllinien geklärt werden, dass 5,6-EET ein TRPA1-Aktivator ist. Periphere Injektion von 5,6-EET führte zu einer Absenkung der mechanischen Schmerzschwelle in Wildtyp- aber nicht in TRPA1-defizienten Mäusen. Die Resultate dieses Teils weisen 5,6-EET als endogenen pronozizeptiven Lipidmediator aus, der bei Akut-Schmerz in DRGs freigesetzt wird und über TRPA1-Aktivierung zu mechanischer Hyperalgesie führen kann. Aus diesem Teil der Arbeit ergeben sich zwei

zentrale Fragen. Erstens, ob ein Eingriff in die Synthese, den Transport oder die Metabolisierung von 5,6-EET zu einer Reduzierung der pronozieptiven Effekte führen kann, und zweitens inwiefern TRPA1 im Speziellen und TRP-Kanäle im Allgemeinen vielversprechende Zielproteine für die Entwicklung von Analgetika darstellen. Diese beiden Fragen werden in den Abschnitten 4.2 bzw. 4.3 erörtert.

4.1 Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) als Zielprotein bei pathophysiologischem Nozizeptorschmerz

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sEH-Defizienz und die daraus resultierende Erhöhung der 8,9-EET-Konzentration zu verlängerter mechanischer Hyperalgesie bei Entzündungen führt. Die in der Literatur erwähnten antinozizeptiven Effekte von selektiven Hemmstoffen der sEH¹⁵⁰⁻¹⁵², konnten somit in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Diskrepanz zwischen den Resultaten dieser Arbeit und den bereits publizierten Daten lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass bei vorherigen Arbeiten sEH-Hemmstoffe eingesetzt wurden, während in dieser Arbeit ein genetisches „Knock-out“-Modell verwendet wurde¹⁰². sEH-Hemmstoffe der ersten Generation wiesen zu viele „off target“-Effekte aus und mussten modifiziert werden, um eine möglichst hohe Spezifität zu gewährleisten^{153,154}. Aufgrund der fehlenden Spezifität und Selektivität werden daher sEH-Hemmstoffe der ersten Generation, wie etwa AUDA (12-(3-Adamantan-1-yl-ureido)dodecansäure¹⁵⁵) in neueren Studien nicht mehr verwendet. So wurde festgestellt, dass der sEH-Hemmstoff AUDA auch den PPAR α -Rezeptor aktiviert, was zu einer verringerten COX-2-Expression führt^{156,157}. Aus diesem Grund könnten Resultate, die unter Verwendung von sEH-Hemmstoffen der ersten Generation publiziert wurden, auch auf „off target“-Effekten der sEH-Hemmstoffe beruhen.

Der antinozizeptive und anti-inflammatorische Effekt der sEH-Hemmung wird in der Literatur stets auf die Akkumulation von 11,12-EET zurückgeführt, welches die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hemmt¹⁵⁸. In dieser Arbeit konnten in einer späten Phase der Entzündung allerdings keine Unterschiede in den 11,12-EET-Konzentrationen zwischen Wildtyp- und sEH-defizienten DRGs beobachtet werden. Stattdessen waren die Konzentrationen an 8,9- und 14,15-EET sowohl im Plasma als auch in den DRGs der sEH-defizienten Mäuse zu diesem Zeitpunkt (48 h nach Zymosan-Injektion) erhöht. 8,9-EET-Behandlung führte *in vitro* zu Sensibilisierung und Aktivierung von Nozizeptoren. Daher könnten die pronozizeptiven Effekte, welche in

dieser Arbeit in sEH-defizienten Tieren beobachtet wurden, auf 8,9-EET-Akkumulation zurückzuführen sein.

Eine weitere Erklärung für die Unterschiede zwischen pharmakologischer Hemmung und den beobachteten Effekten der sEH-Knockout-Mäuse, könnten in den biochemischen Eigenschaften der sEH liegen. Die sEH besitzt neben ihrer Hydrolase-Domäne noch eine N-terminale Lipid-Phosphatase-Domäne ¹⁵⁹, deren Funktion bislang nicht geklärt werden konnte. In dem in dieser Arbeit verwendeten genetischen „Knock-Out“-Modell, wurde das komplette Protein, also sowohl die Phosphatase-, als auch Hydrolase-Domäne entfernt ¹⁰², während die bekannten sEH-Hemmstoffe lediglich die Hydrolase-Aktivität hemmen ¹⁰⁰. Denkbar wäre, dass durch pharmakologische sEH-Hemmung ein anderes EET-Muster entsteht, da die Phosphatase-Domäne noch aktiv ist. Die selektive Aktivierung der Phosphatase-Domäne könnte die Stabilität von EETs modulieren, oder andere, phosphorylierte Lipide hydrolysieren und somit die intrazellulären Lipidkonzentrationen verschieben. Daher würde sich durch sEH-Hemmung eine andere intrazelluläre Lipidzusammensetzung ergeben, als beim kompletten Fehlen des Proteins im genetischen „Knock-Out“-Modell. Tatsächlich gibt es bereits Hinweise auf physiologische Unterschiede zwischen genetischer sEH-Defizienz und pharmakologischer sEH-Hemmung aus der Literatur. So wurde beschrieben, dass zur Ausbildung pathophysiologischer Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie die Phosphatase-Domäne der sEH benötigt wird, da diese Erkrankung nur bei sEH-Defizienz auftritt und nicht durch sEH-Hemmstoffe induziert werden kann ¹⁶⁰.

Es wäre interessant, die Phosphatase-Domäne mithilfe selektiver Hemmstoffe zu untersuchen, um ihre Rolle beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz bzw. beim Abbau oder der Modulation intrazellulärer EETs zu klären. Leider sind bislang keine selektiven sEH-Phosphatase-Hemmstoffe erhältlich. Aufgrund der physiologischen Notwendigkeit der Phosphatase-Domäne ist es wahrscheinlich, dass sEH-Hemmstoffe das Gleichgewicht zwischen Phosphatase- und Hydrolase-Aktivität beeinträchtigen, und unerwünschte Effekte hervorrufen können.

Schließlich wurde von zwei neu entdeckten Isoformen der sEH berichtet, deren Funktionen bislang noch weitgehend ungeklärt sind ¹⁶¹. Zumindest eine der beiden, die Hepoxylin-Hydrolase, konnte als EET-abbauendes Enzym identifiziert werden ¹⁶².

Möglich ist, dass im Laufe der Entzündung die Expression einer weiteren Epoxidhydrolase induziert wird, die selektiv 11,12-EET, nicht aber die anderen EETs abbaut. Da sEH-Hemmstoffe bislang nur die bereits bekannte lösliche Epoxidhydrolase (EPHX2) hemmen, wäre es denkbar, dass andere Epoxidhydrolasen die Hemmung

kompensieren können. Es sollte daher genauer geklärt werden, welche Rolle die neu identifizierten Epoxidhydrolasen bei der Umsetzung von EETs in DHETs insbesondere im Entzündungsverlauf spielen. Dabei müsste untersucht werden, ob die neu identifizierten Epoxidhydrolasen eine essentielle physiologische Rolle besitzen, die eine Hemmung ausschließt, in welchen Geweben sie exprimiert sind, und ob es sinnvoll und möglich ist, Hemmstoffe gegen mehrere oder alle Epoxidhydrolase-Isoformen zu entwickeln.

Zusammengefasst zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die sEH ein wichtiges Protein beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz darstellt, welches 8,9-EET zu seinem bioinaktiven Metaboliten 8,9-DHET umsetzt. Insbesondere die Phosphatase-Domäne sollte Gegenstand künftiger Forschung sein, um herauszufinden, ob Änderungen der EET-Konstellation in der Zelle durch veränderte Phosphatase-Aktivität hervorgerufen werden. Zudem sollte das Zusammenspiel zwischen Phosphatase- und Hydrolase-Domäne unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden. Allerdings fehlen bislang selektive sEH-Phosphatase-Hemmstoffe, die für diese Untersuchungen notwendig wären. Auch sollten die neu entdeckten Epoxidhydrolasen und ihre biologische Funktion untersucht werden, um mögliche Kompensations- oder „off-Target“-Effekte der sEH-Hemmstoffe zu vermeiden.

4.2 5,6-EET als pronozizeptiver Lipidmediator bei Akutschmerz

5,6-EET wurde im Rahmen dieser Arbeit als pronozizeptiver Lipidmediator identifiziert, der bei akutem Schmerz in DRGs freigesetzt wird und über TRPA1 mechanische Hyperalgesie auslösen kann. Dies macht 5,6-EET zu einem wichtigen endogenen Lipidmediator, welcher beim Übergang von physiologischem zu pathophysiologischem Nozizeptorschmerz beteiligt ist. Seine Eigenschaft TRPA1 zu aktivieren, TRPV1 zu sensibilisieren und CGRP freizusetzen weist darauf hin, dass 5,6-EET bei der Entstehung einer neurogenen Inflammation und möglicherweise einer zentralen Sensibilisierung beteiligt sein kann. 5,6-EET scheint ein Lipidmediator zu sein, der in DRGs freigesetzt wird und parakrin über eine kurze Distanz und eine kurze Zeitspanne wirkt. Daher stellt sich die Frage, ob ein Eingriff in Synthese, Freisetzung und Abbau von 5,6-EET diese pronozizeptiven Effekte möglicherweise reduzieren kann.

Da die Erhöhung der 5,6-EET-Konzentration in DRGs offensichtlich zu Verstärkung der Schmerzwahrnehmung beiträgt, könnte die Hemmung der 5,6-EET-Synthese bzw. Freisetzung eine antinozizeptive Wirkung haben. In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass der CYP2C9-Hemmstoff Sulphaphenazol die 5,6-EET-vermittelte mechanische Hyperalgesie leicht verringern kann. Bei Identifizierung derjenigen CYP-Epoxygenase, welche ausschließlich 5,6-EET synthetisiert, könnten selektive Hemmstoffe für dieses Protein die antinozizeptiven Effekte möglicherweise verstärken. Allerdings ist bislang ungeklärt, welche der CYP-Epoxygenasen ausschließlich 5,6-EET synthetisiert, oder ob 5,6-EET von mehreren CYP-Isoformen synthetisiert wird, da bei der EET-Synthese meist zwei oder mehr Regioisomere gebildet werden^{91,97,128}. Mittlerweile wurden sieben verschiedene CYP-Familien in unterschiedlichen Geweben und Spezies identifiziert, die EETs synthetisieren können, CYP1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J und 4A¹⁶³. Es wäre daher notwendig zu untersuchen welche CYP-Epoxygenasen vorwiegend im peripheren Nervensystem, insbesondere in DRGs, exprimiert sind, und welche hauptsächlich 5,6-EET synthetisieren. Unspezifische, systemische Hemmung mehrerer CYP-Isoformen ist nicht ratsam, da diese aufgrund der weiten Verbreitung und essentiellen Funktionen der CYP-Epoxygenasen, insbesondere in der Niere und der Leber, zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann^{128,164}. Daher lässt sich momentan bei der 5,6-EET-Synthese kein vielversprechendes Zielprotein identifizieren.

Zudem gibt es bei der EET-Synthese bzw. Aktivierung zwei mögliche Mechanismen. Entweder sind CYP-Epoxygenasen die regulatorischen Proteine bei der EET-Aktivierung, oder stattdessen die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂). Die cPLA₂ spaltet die Estergruppe von Eicosanoiden in der Plasmamembran und setzt so Lipide frei, welche vorher in der Membran verestert waren. Da auch EETs an Phosphatidylcholin (PC) verestert in der Plasmamembran vorliegen, können auch sie durch cPLA₂-Aktivität freigesetzt werden⁹¹. Sollte dies bei neuronaler Aktivität geschehen, wie etwa bei akutem Schmerz, so ist die cPLA₂ das regulatorische Enzym für die EET-Freisetzung. Für jeden der beiden Mechanismen ergibt sich ein anderes regulatorisches Protein; CYP-Epoxygenasen für die „on demand“-Synthese der EETs, und die cPLA₂ für die direkte EET-Freisetzung aus Membranlipiden. Auch in dieser Arbeit konnte kein eindeutiger Mechanismus der EET-Freisetzung gefunden werden. Allerdings zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass beide Mechanismen synergistisch stattfinden. So konnte freies 5,6-EET unter Kontrollbedingungen in DRGs gemessen werden, was auf cPLA₂-Aktivität schließen lässt. Doch die 5,6-EET-Konzentrationen in

DRGs verdoppelten sich annähernd bei akutem Schmerz, was auf *de novo*-Synthese durch CYP-Epoxygenasen schließen lässt. Auch Zugabe von Arachidonsäure in kultivierten DRG-Neuronen für zwei Stunden führte zu stark erhöhten Konzentrationen aller EETs, was ein Hinweis auf EET-Synthese durch CYP-Epoxygenasen ist. Diese synergistischen Mechanismen der EET-Freisetzung bzw. -Synthese sowohl durch cPLA₂, als auch durch CYP-Epoxygenasen, wurden bislang in der Literatur nicht erwähnt, stellen aber einen interessanten alternativen Mechanismus der EET-Aktivierung und Freisetzung dar. Die große Vielfalt an EET-synthetisierenden CYP-Epoxygenase-Isoformen erschwert bislang die Identifizierung und Hemmung eines eindeutigen 5,6-EET synthetisierenden Proteins, bietet aber auch Raum für künftige vielversprechende Forschung.

Für die enzymatische Inaktivierung und Metabolisierung von 5,6-EET ist bereits ein Mechanismus in der Literatur beschrieben. So soll 5,6-EET durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und nicht durch die sEH metabolisiert werden⁹⁴. Es stellt sich daher die Frage, ob COX-2-Hemmung durch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) oder COX-2-selektive Hemmstoffe (Coxibe) zu Akkumulation von 5,6-EET, und somit zu verstärkter TRPA1-Aktivierung und zu verstärkter Schmerzwahrnehmung führen kann. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass dies nicht der Fall ist. Erstens ist 5,6-EET wie alle Epoxide in wässriger Lösung instabil und besitzt in Lösungen mit physiologischem pH und physiologischer Temperatur eine Halbwertszeit von etwa 1 – 2 Stunden. Danach kommt es zu Autohydrolyse zu 5,6-DHET und zur weiteren enzymatischen Degradation über β -Oxidation⁹¹. Zweitens wird COX-2 erst bei einsetzender Entzündung exprimiert. Somit ist ein beträchtlicher Anteil an 5,6-EET bereits nichtenzymatisch abgebaut, bevor COX-2 exprimiert wird. Die kurze Halbwertszeit von 5,6-EET, sowie seine transienten und kurzzeitigen pronozizeptiven Effekte lassen darauf schließen, dass 5,6-EET als Signalmolekül über eine kurze Distanz und über einen kurzen Zeitraum wirkt. Daher wird durch COX-2-Hemmung wahrscheinlich keine Akkumulation an 5,6-EET und somit keine verstärkte TRPA1-vermittelte Schmerzwahrnehmung zu erwarten sein.

Lipide, wie EETs, werden in wässriger Lösung, also im Plasma und im Cytosol, meist in gebundener Form an Fettsäurebindproteine (FABP) transportiert¹⁶⁵. Dabei handelt es sich um kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa und einer hydrophoben Tasche, in der Lipide reversibel binden. FABPs könnten die Halbwertszeit von 5,6-EET und somit die Bioverfügbarkeit in wässrigen Lösungen möglicherweise erhöhen. Die Identifizierung eines 5,6-EET-spezifischen Transportmechanismus in Neuronen wäre daher nicht nur für das Verständnis des Lipidtransports, sondern auch

pharmakologisch interessant, da ein selektiver Hemmstoff die Verteilung und Freisetzung von 5,6-EET verhindern könnte und somit möglicherweise antinozizeptive Effekte hätte.

Allerdings müsste geklärt werden, ob es spezifische FABPs für EETs gibt, denn mittlerweile kennt man neun verschiedene FABPs, die sich in ihrer gewebsspezifischen Expression unterscheiden, und offenbar keine große Spezifität für bestimmte Lipide aufweisen¹⁶⁶ (PDB: 1LID).

Neben den Fettsäurebindproteinen gibt es auch membranständige Fettsäuretransporter, die Lipide aktiv durch die Zellmembran transportieren können. Dazu gehören die sechs bekannten Fettsäure-Transportproteine (FATP1-6), die Fettsäuretranslokase CD36, diverse ABC- (ATP-binding-cassette-)Transporter und Caveolin-1^{165,167}. Für andere Lipidgruppen, wie etwa Sphingolipide und Phospholipide, konnten bereits mehrere spezifische ABC-Transporter (ABCA-Familie, ABCB4, ABCG1 und ABCG5/8) identifiziert werden^{168,169}. Aufgrund dessen wäre es möglich, dass auch EET-spezifische Transporter existieren. In früheren Arbeiten wurde überdies die Hypothese aufgestellt, dass ein membranständiger „EET-Rezeptor“ existiert, welcher nach EET-Bindung intrazelluläre Signalkaskaden auslöst und somit die biologische Wirkung der EETs vermittelt⁹¹. Bislang konnte jedoch kein solcher EET-Rezeptor identifiziert werden. Allerdings gibt es aus der Literatur Hinweise, dass EETs Ionenkanäle direkt aktivieren und modulieren können^{60,170,171}. In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Aktivierung von TRPA1 durch 5,6-EET beobachtet werden, jedoch scheint diese nicht durch eine direkte Bindung von 5,6-EET an TRPA1 zu geschehen. Daher wäre es möglich, dass ein 5,6-EET-spezifischer Rezeptor zwischengeschaltet ist und TRPA1 durch die Folgen einer intrazellulären Signalkaskade aktiviert wird. Somit finden sich in dieser Arbeit Hinweise auf einen „EET-Rezeptor“, wobei unklar ist, ob dieser Rezeptor spezifisch für EETs ist oder möglicherweise auch durch andere oxidierte Lipide aktiviert werden kann.

Zusammengefasst lassen sich sowohl in 5,6-EET-Synthese, -Aktivierung und -Freisetzung Mechanismen identifizieren, welche die 5,6-EET-vermittelte Schmerzwahrnehmung möglicherweise hemmen können. Allerdings muss noch untersucht werden, welche CYP-Epoxigenasen bzw. Lipidtransporter in primär afferenten Neuronen exprimiert sind und welche davon spezifisch für 5,6-EET sind. Auch müsste geklärt werden, ob es tatsächlich einen „EET-Rezeptor“ im peripheren Nervensystem gibt. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besitzt 5,6-EET eine kurze Halbwertszeit in wässrigen Lösungen. Daher scheint die enzymatische Metabolisierung durch COX-2 nur eine geringe Rolle bei der Inaktivierung von 5,6-EET zu spielen.

Infolge dessen scheinen TRP-Kanäle als Zielproteine für Analgetika in der 5,6-EET-vermittelten Schmerzwarnnehmung momentan vielversprechender, da sie neben 5,6-EET auch durch eine Vielzahl anderer exogener und endogener pronozizeptiver Stimuli, aktiviert und moduliert werden können, und da bereits selektive Hemmstoffe für einige TRP-Kanäle, darunter TRPA1 und TRPV1 existieren.

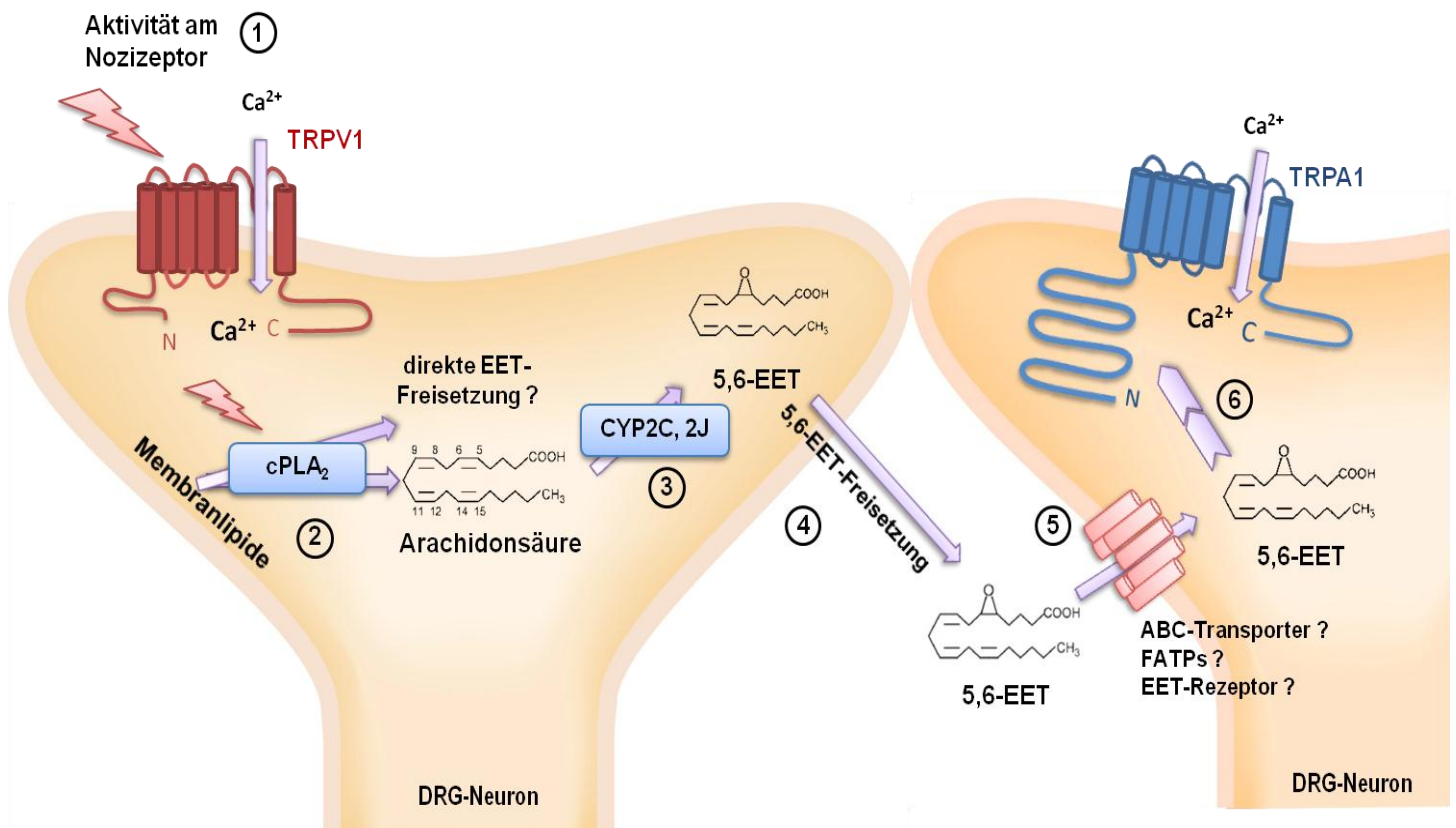


Abb 4.1: Schematische Darstellung der Synthese, des Transports und der Freisetzung von 5,6-EET im DRG. (1) Aktivität am Nozizeptor und Calcium-Einstrom führt zu cPLA₂-Aktivierung (2) und zur Freisetzung von Arachidonsäure oder bereits veresterten EETs. Arachidonsäure wird von CYP-Epoxygenasen der Familien 2C und 2J zu 5,6-EET umgesetzt (3). Die parakrine Wirkung von 5,6-EET erfolgt durch Freisetzung in den extrazellulären Raum (4) und Transport in umliegende DRG-Neurone (5). Nach Transport über die Plasmamembran kann 5,6-EET TRPA1 aktivieren (6), was zu Calcium-Einstrom führt.

4.3 TRPA1 und TRPV1 als Zielproteine für Analgetika

In Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5,6-EET ein endogener TRPA1-Modulator ist, der bei akutem Schmerz durch nozizeptive Aktivität freigesetzt wird und zu verstärkter und verlängerter Schmerzwahrnehmung führt. Dieser Effekt ist offenbar zytokin-unabhängig. Auch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass 5,6-EET ein exklusiv neuronaler Faktor ist. Verglichen mit bisher bekannten TRPA1-Agonisten³², weist 5,6-EET darüber hinaus den niedrigsten EC₅₀-Wert auf (193 nM). Zudem konnte beobachtet werden, dass 5,6-EET TRPV1 sensibilisieren kann, was über erhöhte CGRP-Freisetzung zu einer neurogenen Entzündung führen kann. Die Resultate dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass nach 5,6-EET-vermittelter TRPA1-Aktivierung bedingt durch erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration und IP₃-Synthese der Nozizeptor über einen „Feed-Forward“-Mechanismus sensibilisiert wird. Zusammen mit bereits publizierten Daten^{22,35,71-74,172} stellen die hier vorgestellten Ergebnisse TRPA1 somit als ein vielversprechendes Zielprotein zur Entwicklung von Analgetika dar.

Hilfreich für eine systemische Gabe von selektiven TRPA1-Antagonisten und die Reduzierung von Nebenwirkungen, ist die Tatsache, dass TRPA1 in neuronalem Gewebe ausschließlich im peripheren Nervensystem exprimiert ist. Dadurch könnten Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem, wie sie in der klinischen Entwicklung von TRPV1-Antagonisten auftraten, und die zum Abbruch diverser klinischer Studien führten, vermieden werden^{17,46,55}. In der Tat zeigen selektive TRPA1-Antagonisten vielversprechende antinozizeptive Wirkungen. So konnte der durch Acrolein verursachte Hustenreiz in Säugern durch HC-030031 inhibiert werden^{72,73}. Zudem wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie berichtet, dass die capsaicin-induzierte neurogene Entzündung durch intrathekale Injektion eines TRPA1-Antagonisten reduziert werden kann⁷⁷. Dies zeigt, dass an zentralen Termini lokalisierter TRPA1 nach peripherer Stimulation und nozizeptiver Aktivität zu neurogener Entzündung und zentraler Sensibilisierung beitragen kann. Allerdings ist zu beachten, dass TRPA1 und TRPV1 zu großen Teilen in sensorischen Neuronen koexprimiert sind³⁸, und es in diesen Zellen zu Interaktionen der beiden Kanäle kommt. So konnte gezeigt werden, dass durch TRPA1-Aktivierung und den damit verbundenen Calcium-Einstrom, Calcineurin aktiviert wird. Calcineurin kann TRPV1 dephosphorylieren und somit desensibilisieren¹⁴³. Bei Aktivierung von TRPV1 wird die Phospholipase C- γ (PLC γ) aktiviert, die PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphat) in DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) spaltet⁴⁰. Durch die Depletion von PI(4,5)P₂ kann die TRPA1-Sensitivität

moduliert werden ^{40,142-144}. Überdies scheint es in sensorischen Neuronen auch kovalente Interaktionen zwischen TRPA1 und TRPV1 zu geben ¹⁴⁵.

Diese „Kommunikation“ zwischen den beiden Ionenkanälen könnte ein Problem für die Entwicklung von Analgetika im peripheren Nervensystem darstellen. Durch pharmakologische Hemmung eines TRP-Kanals und durch Ausbleiben oder Störung der „TRP-Kanal-Kommunikation“ kann es zu Kompensationseffekten kommen, sodass die analgetische Wirkung eines selektiven Hemmstoffes für einen der beiden TRP-Kanäle möglicherweise abgeschwächt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5,6-EET als endogenes Signalmolekül in der Lage ist beide TRP-Kanäle zu modulieren. Es kann TRPA1 direkt aktivieren und TRPV1 sensibilisieren. Da eine TRPV1-Sensibilisierung auf TRPA1 sowohl ebenfalls sensibilisierend als auch desensibilisierend wirken kann ^{40,143,144}, dient die bipolare Funktion von 5,6-EET unter physiologischen Bedingungen vermutlich der Vermittlung und Feinabstimmung von Sensibilisierungszuständen beider Kanäle und kann durch Hemmung eines der beiden Kanäle möglicherweise aus dem Gleichgewicht geraten und zur zusätzlichen Verstärkung eines peripheren Signals führen.

Die mechanistischen Grundlagen der TRPA1- und TRPV1-Aktivierung sollten bei der Entwicklung selektiver Antagonisten als Analgetika bedacht werden. Sinnvoll wäre die Entwicklung eines Hemmstoffes, der die TRP-Kanäle nur in sensibilisiertem (phosphoryliertem) Zustand hemmt, und den physiologischen Zustand der Kanäle möglichst wenig beeinträchtigt. Überdies muss die Interaktion der beiden TRP-Kanäle genauer untersucht werden, um Kompensations- oder „Off-Target“-Effekte zu vermeiden. Ein weiterer in der Literatur beschriebener Mechanismus für die Entwicklung von Analgetika ist die Ausnutzung der sogenannten Porendilatation der TRP-Kanäle. Diese beschreibt ein biophysikalisches Phänomen, das bei starker Aktivierung der TRP-Kanäle auftritt und zur Aufweitung der kationenpermeablen Pore und zum Einstrom größerer Kationen führt. Unter Ausnutzung dieses Prinzips konnte gezeigt werden, dass kationische Analgetika, wie das Lidocainderivat QX-314, bei Aktivierung von TRPV1 selektiv in nozizeptive Neurone transportiert werden, um dort intrazellulär Natriumkanäle zu hemmen, und eine lang anhaltende Analgesie zu bewirken ¹⁷³. Mittlerweile ist bekannt, dass auch TRPA1 seine kationenpermeable Pore aufweiten kann ⁴². Eigene präliminäre Voruntersuchungen zeigten, dass 5,6-EET die Porendilatation bei TRPA1 allerdings nicht auslösen kann, da es entweder nicht direkt an den Kanal bindet, oder die TRPA1-Aktivierung durch 5,6-EET zu schwach ist, um die Pore aufzuweiten.

Eine weitere Möglichkeit TRP-Kanäle pharmakologisch zu beeinflussen, ist die Aktivierung der inhibitorischen Schmerzskade und somit die Dämpfung peripherer

nozizeptiver Signale. Mögliche Zielproteine könnten metabotrophe Glutamatrezeptoren (mGLURs) sein. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass Agonisten für Gruppe II und Gruppe III-mGLURs periphere TRPV1-abhängige Signale abschwächen können¹⁷⁴ und unter physiologischen Bedingungen als „Puffer“ für periphere nozizeptive Stimuli fungieren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass TRP-Kanäle vielversprechende Zielproteine für Analgetika bzw. Anti-Hyperalgetika sind. Allerdings muss noch geklärt werden, welche physiologische Funktion TRP-Kanäle besitzen, die, unabhängig von ihrer pathophysiologischen Bedeutung, für den Organismus unerlässlich ist. Zudem muss die Wechselwirkung von TRP-Kanälen mit anderen TRP- oder anderen Ionenkanälen genauer untersucht werden, um gezielter die pathophysiologische Wirkung zu hemmen, ohne die physiologische Funktion zu beeinträchtigen.

In früheren Arbeiten konnten bereits mehrere oxidierte Lipide, wie etwa die Cyclopentone PGA_2 , PGJ_2 und 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 , sowie das beim Lipid-Abbau entstehende 4-Hydroxynonenal, als TRPA1-Agonisten identifiziert werden^{36,37}. 5,6-EET kann nun in die Liste endogener oxidierter Lipide als TRPA1-Aktivatoren aufgenommen werden. Auch für den TRPV1 sind oxidierte Lipide als endogene Agonisten identifiziert worden. Dazu zählen die Linolsäurederivate 9-HODE (9-Hydroxy-10E,12Z-Octadiensäure) und 13-HODE, sowie deren Metabolite 9- und 13-oxoODE²¹. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 5,6-EET und 8,9-EET TRPV1 sensibilisieren können. Die Tatsache, dass oxidierte Lipide durch nozizeptive Aktivität freigesetzt werden und TRP-Kanäle modulieren können, impliziert eine viel stärkere Rolle oxidierter Lipide als endogene Signalmoleküle, als bisher angenommen. Möglicherweise wird die intrazelluläre Kommunikation zwischen TRP- und anderen Ionenkanälen durch Lipide vermittelt, oder auch die Translokation von TRP-Kanälen vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran. Eine mögliche Hypothese wäre, dass TRP-Kanäle ihre Insertionsstelle in der Membran durch lipidvermittelte Chemotaxis finden. Auch könnte die unmittelbare Topographie der TRP-Kanäle in der Membran und die darum liegenden Lipide Einfluss auf Sensibilisierungszustände der Kanäle haben. Dafür spricht unter anderem die Tatsache, dass TRPA1 durch PLC-Aktivität in der Membran und der daraus resultierenden PIP_2 -Depletion moduliert wird¹⁴².

Da EETs auch andere Ionenkanäle modulieren können (z. B. BK_{Ca} -Kanäle^{170,175}), wäre es interessant zu untersuchen, ob endogene oxidierte Lipide nicht auch spannungsabhängige Ionenkanäle, wie etwa Natrium- (Na_v) oder Calcium-Kanäle (Ca_v) modulieren können und in der Lage sind, die faserabhängige Weiterleitung nozizeptiver Signale von der Peripherie abzuschwächen, oder die Aktivität inhibitorischer Neurone zu erhöhen

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Epoxyeicosatriensäuren (EETs) hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Verarbeitung nozizeptiver Information untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der löslichen Epoxidhydrolase (sEH) und der drei von ihr metabolisierten EETs, 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET. Dabei stellte sich heraus, dass sEH-defiziente Mäuse eine verlängerte mechanische Hyperalgesie bei zymosan-induziertem pathophysiologischen Nozizeptorschmerz aufwiesen. Anhand von Lipidmessungen mittels LC-MS/MS konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt des stärksten Schmerzempfindens (48 Stunden nach Zymosan-Injektion) vorwiegend 8,9-EET in den Dorsalwurzelganglien der sEH-defizienten Mäuse akkumuliert. Zudem wurde anhand von Calcium-Imaging-Versuchen gezeigt, dass 8,9-EET Calcium-Einströme in primär afferenten Neuronen von Wildtyp-Mäusen hervorruft, und eine Stimulation von Ischiasnerven mit 8,9-EET zu erhöhter Freisetzung des pronozizeptiven Peptids CGRP führt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Mäuse nach intraplantarer 8,9-EET-Injektion eine geringere mechanische Schmerzschwelle aufweisen.

Die Resultate dieses Teils der Arbeit weisen darauf hin, dass die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) eine wichtige Rolle in der späten Phase des pathophysiologischen Nozizeptorschmerzes spielt, indem sie 8,9-EET zu seinem bioinaktiven Metaboliten 8,9-DHET umsetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde 5,6-EET gesondert untersucht, da es nicht durch sEH metabolisiert wird. Dabei wurde beobachtet, dass 5,6-EET bei akutem Schmerz in DRGs freigesetzt wird. In Calcium-Imaging-Versuchen mit DRG-Neuronen aus Wildtyp-TRPV4- und TRPA1-defizienten Mäusen sowie transfizierten Zelllinien zeigte sich, dass schon geringe Konzentrationen an 5,6-EET den TRPA1- (transient receptor potential ankyrin 1-) Kanal aktivieren (EC_{50} 193 nM) und den TRPV1-Kanal sensibilisieren können. Auch die CGRP-Freisetzung am Ischiasnerv ist nach 5,6-EET-Stimulation signifikant erhöht. Zudem konnte beobachtet werden dass eine periphere Injektion von 5,6-EET zu akuter mechanischer Hyperalgesie in Wildtyp-, aber nicht in TRPA1-defizienten Mäusen führt.

Die Resultate dieses Teils der Arbeit weisen 5,6-EET als bisher potentesten endogenen TRPA1-Aktivator aus, und implizieren eine wichtige Rolle dieses Lipids beim Übergang von physiologischem zu pathophysiologischem Nozizeptorschmerz und zu neurogener Inflammation. Darüber hinaus leisten die Resultate einen Beitrag zum grundlegenden Verständnis endogener TRP-Kanal-Aktivatoren bei der Schmerzwahrnehmung.

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	vollständiger Name
AITC	<u>A</u> llyl <u>i</u> s <u>o</u> thi <u>c</u> yanat
AMPA	α - <u>a</u> mino-3-hydroxy-5- <u>m</u> ethyl-4- <u>i</u> s <u>o</u> xazol- <u>p</u> ropionic <u>a</u> cid
ANOVA	<u>A</u> nalysis of <u>v</u> ariance, statistischer Test
BK _{Ca}	large-conductance calcium-activated potassium channel, Ionenkanal
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CaMKII	<u>C</u> a ²⁺ - <u>C</u> almodulin- <u>K</u> inase II
CGRP	<u>c</u> alcitonin gene <u>r</u> elated <u>p</u> eptide
CFA	<u>C</u> omplete <u>F</u> reud's <u>A</u> djuvant
CHO	<u>104</u> amilia <u>h</u> amster <u>o</u> vary, Zelllinie
COPD	chronisch –104amiliars104e Lungenerkrankung (<u>c</u> hronic <u>o</u> bstructive <u>p</u> ulmonary <u>d</u> esease)
COX	<u>C</u> yclooxygenase
(c)PLA	(<u>c</u> ytosolische) <u>P</u> hospholipase <u>A</u> ₂
CYP	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> ₄₅₀
DAG	<u>D</u> iacylglycerol
DAPI	4,6- <u>D</u> iamidin-2- <u>P</u> henylindol
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DRG	<u>D</u> orsal <u>w</u> urzelganglion
EET	<u>E</u> poxyeicosatriensäure
EIA	<u>e</u> nzyme <u>i</u> mmune <u>a</u> ssay
ER	<u>e</u> ndoplasmatische <u>R</u> eticulum
ERK	<u>e</u> xtracellular-signal <u>r</u> egulated <u>k</u> inase
FCS	Fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FEPS	104amiliars episodisches Schmerzsyndrom (<u>f</u> amilial <u>e</u> pisodic <u>p</u> ain <u>s</u> yndrome)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thi <u>c</u> yanat
GABA	γ - <u>A</u> minobuttersäure
GDNF	<u>g</u> lial cell- <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor
GFAP	<u>g</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cidic <u>p</u> rotein
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
HEK	<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney, Zelllinie
HSP	<u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein
IB4	<u>I</u> solektin <u>B</u> 4
IL	<u>I</u> nterleukin

i.p.	<u>i</u> ntraperitoneal
IP ₃	<u>I</u> nositol-1,4,5-Trisphosphat
i.th.	<u>i</u> ntrathekal
kDA	<u>K</u> ilodalton
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> roth
LOX	<u>L</u> ipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
MELK	<u>M</u> ulti- <u>E</u> pitop- <u>L</u> igand- <u>K</u> artographie
NeuN	<u>n</u> euronale <u>N</u> uclei, neuronaler Zellmarker
NF-κB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> appa-light-chain-enhancer of activated <u>B</u> cells
NF200	<u>N</u> europilament <u>200</u>
NGF	<u>n</u> erve growth <u>f</u> actor
NMDA	<u>N</u> -Methyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
NMDG+	<u>N</u> -Methyl- <u>D</u> - <u>G</u> lucamin
PAR-2	<u>P</u> rotease- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor-2
PBS	phosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PGA2, PGJ2	<u>P</u> rostaglandin <u>A</u> 2, <u>P</u> rostaglandin <u>J</u> 2
PIP ₂	<u>P</u> hosphatidyli <u>n</u> ositol-4,5-bisphosphat
PKA	<u>P</u> roteinkinase <u>A</u>
PKC	<u>P</u> roteinkinase <u>C</u>
PLC	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
PPAR	<u>p</u> eroxisome <u>p</u> roliferator- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor
sEH	lösliche Epoxidhydrolase (<u>s</u> oluble <u>e</u> poxide <u>h</u> ydrolase)
SEM	Standardfehler, <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean
SES	<u>s</u> tandard <u>e</u> xternal <u>s</u> olution
SIF	<u>s</u> ynthetic <u>i</u> ntestinal <u>f</u> luid
TNFα	<u>T</u> umornekrosefaktor- <u>α</u>
TRP	<u>t</u> ransient <u>r</u> eceptor <u>p</u> otential, Familie von Ionenkanälen
YFP	<u>y</u> ellow <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1 Stationen der Schmerzverarbeitung	3
Abb. 1.2 Schmerzrelevante TRP-Kanäle	5
Abb. 1.2 TRPV1-Agonisten	8
Abb. 1.3 TRPV1-Antagonisten	8
Abb. 1.4 ausgewählte TRPA1-Agonisten	12
Abb. 1.5 TRPA1-Antagonisten	12
Abb. 1.6 Synthese der Epoxyeicosatriensäuren aus Arachidonsäure und deren Metabolisierung durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2)	15

3. Ergebnisse

3.1 sEH-abhängige Effekte von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) bei der nozizeptiven Verarbeitung

Abb. 3.1.1 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäusen auf akuten Hitzeschmerz	41
Abb. 3.1.2 Nozizeptives Verhalten von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäuse auf akuten Kälteschmerz	42
Abb. 3.1.3 Mechanische Hyperalgesie von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäuse bei formalin-induziertem Entzündungsschmerz	43
Abb. 3.1.4 Mechanische Hyperalgesie von Wildtyp (wt) und sEH-defizienten Mäuse bei formalin-induziertem Entzündungsschmerz	44
Abb. 3.1.5 EET-Konzentrationen im Plasma von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen	45

Abb. 3.1.6 EET -Konzentrationen in DRGs von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen	46
Abb. 3.1.7 EET-Konzentrationen im Pfotenödem, in DRGs und in Dorsalhörnern von Wildtyp-Mäusen 0-48h nach Zymosan-Injektion	47
Abb. 3.1.8 EET- und DHET-Konzentrationen im Pfotenödem von Wildtyp- und sEH-defizienten Mäusen 48h nach Zymosan-Injektion	48
Abb. 3.1.9 EET- und DHET- Konzentrationen in Überstand von kultivierten DRGs adulter Wildtyp- und sEH-defizienter Mäuse nach Stimulation mit Arachidonsäure	49
Abb. 3.1.10 EET-Konzentrationen in Überstand von kultivierten DRGs adulter Wildtyp-Mäuse nach Stimulation mit NGF, GDNF, TNF α , Paclitaxel und Bradykinin	50
Abb. 3.1.11 Expression der sEH in Wildtyp- und sEH-defizienten L4-L6-DRGs	51
Abb. 3.1.12 Expression der sEH in Wildtyp-L4-L6-DRGs und Koexpression mit CGRP	52
Abb. 3.1.13 MELK-Analyse der sEH-Expression in Wildtyp-DRGs (L4-L6)	53
Abb. 3.1.14 sEH Expression nach zymosan-induzierter Entzündung zu den Zeitpunkten 0, 6, 24 und 48 Stunden nach Injektion	54
Abb. 3.1.15 Calcium-Einstrom nach Stimulation adulter DRG-Neurone mit 10 μ M 8,9-EET	55
Abb. 3.1.16 Charakterisierung der auf 8,9-EET antwortenden Neurone	56
Abb. 3.1.17 Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 8,9-EET	57
Abb. 3.1.18 CGRP-Freisetzung nach hitzeinduzierter TRPV1-Aktivierung	58
Abb. 3.1.19 CGRP-Freisetzung nach AITC-induzierter TRPA1-Aktivierung	59
Abb. 3.1.20 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intraplantarer EET-Injektion	61
Abb. 3.1.21 Ermittlung des thermischen Schwellenwertes nach 8,9-EET-Injektion intraplantar	62

3.2 Die Rolle von 5,6-Epoxyeicosatriensäure (5,6-EET) bei der nozizeptiven Verarbeitung

Abb. 3.2.1 5,6-EET-Konzentrationen bei akutem Schmerz in Pfote, Ischiasnerv und L4-L6-DRGs nach Injektion von Formalin, Zymosan oder CFA	64
Abb. 3.2.2 5,6-EET-Konzentrationen bei akutem Schmerz in Pfote, L4-L6-DRGs und Dorsalhörnern nach intraplantarer Injektion von Capsaicin	65
Abb. 3.2.3 5,6-EET-Konzentrationen bei CFA-induziertem inflammatorischem Schmerz in Pfote, L4-L6-DRGs und L4-L6-Dorsalhörnern	66
Abb. 3.2.4 5,6-EET-Konzentrationen nach Stimulation kultivierter DRGs mit Arachidonsäure und Calcimycin	67
Abb. 3.2.5 <i>in vitro</i> -Stabilität von 5,6-EET	68
Abb. 3.2.6 5,6-EET erzeugt transiente Calciumströme in ca. 11% der Wildtyp-DRG-Neurone	69
Abb. 3.2.7 5,6-EET aktiviert TRP-Kanäle und führt zu Ca ²⁺ -Einstrom	70
Abb. 3.2.8 Dosis-Wirkungs-Analyse der 5,6-EET vermittelten TRPV4-Aktivierung in transfizierten HEK-Zellen	71
Abb. 3.2.9 TRPV4-defiziente Neurone antworten auf 5,6-EET	72
Abb. 3.2.10 AMG 9810 blockiert effizient die TRPV1-Aktivierung durch Capsaicin, allerdings nicht den 5,6-EET vermittelten Ca ²⁺ -Einstrom	73
Abb. 3.2.11 Der TRPA1-Antagonist HC-030031 blockiert den 5,6-EET-vermittelten Ca ²⁺ -Einstrom	74
Abb. 3.2.12 TRPA1-defiziente DRG-Neurone reagieren nicht auf 5,6-EET	75
Abb. 3.2.13: Prozentuale Verteilung der Antworten von TRPA1-defizienten- und Wildtyp-DRGs	76
Abb. 3.2.14 Stimulation TRPA1-transfizierter Zellen mit 5,6-EET und AITC	78
Abb. 3.2.15 Konzentrations-Wirkungs-Kurve der 5,6-EET-vermittelten TRPA1-Aktivierung in transient transfizierten HEK-Zellen	79
Abb.3.2.16 Die TRPA1-Aktivierungsmutante 3CK kann nicht durch 5,6-EET aktiviert werden	81

Abb.3.2.17 Sensibilisierung der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch 5,6-EET	82
Abb.3.2.18 5,6-EET-Behandlung von Ischiasnerven führt zu erhöhter CGRP- Freisetzung bei Stimulation mit Hitze, AITC oder niedrigem pH	84
Abb.3.2.19 Erhöhtes Akut-Schmerzverhalten nach Injektion von 5,6-EET intraplantar	86
Abb. 3.2.20 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach 5,6-EET-Injektion intraplantar	87
Abb. 3.2.21 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach intrathekaler 5,6- EET-Injektion	88
Abb. 3.2.22 Ermittlung des mechanischen Schwellenwertes nach 5,6-EET-Injektion intraplantar von Wildtyp- und TRPA1-defizienten Mäusen	89

4. Diskussion

Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Synthese, des Transports und der Freisetzung von 5,6-EET im DRG	98
Abb. 4.2 Therapeutisches Potential von TRPV1- bzw. TRPA1-Modulatorenals Analgetika	102

Literaturverzeichnis

1. Purves, D. *Neuroscience*, (W. H. Freeman ; Basingstoke : Palgrave [distributor], New York, 2007).
2. Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 739-750 (2010).
3. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.-K., Ruth P., Schäfer-Korting, M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie*, (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2008).
4. Patil, M., Patwardhan, A., Salas, M.M., Hargreaves, K.M. & Akopian, A.N. Cannabinoid receptor antagonists AM251 and AM630 activate TRPA1 in sensory neurons. *Neuropharmacology* (2011).
5. Costigan, M., Scholz, J. & Woolf, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* **32**, 1-32 (2009).
6. Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J. & Julius, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436-441 (1999).
7. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524 (2003).
8. Fischer, M.J., Reeh, P.W. & Sauer, S.K. Proton-induced calcitonin gene-related peptide release from rat sciatic nerve axons, in vitro, involving TRPV1. *The European journal of neuroscience* **18**, 803-810 (2003).
9. Chen, C.C., *et al.* A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428-431 (1995).
10. McMahon, S.B. Are there fundamental differences in the peripheral mechanisms of visceral and somatic pain? *Behav Brain Sci* **20**, 381-391; discussion 435-513 (1997).
11. Kang, K., *et al.* Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature* **464**, 597-600 (2010).
12. Jung, J., *et al.* Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* **279**, 7048-7054 (2004).
13. Stucky, C.L., *et al.* Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Research Reviews* **60**, 2-23 (2009).
14. Yoshida, N., *et al.* Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. *Mol Pain* **7**, 41 (2011).
15. Yao, J., Liu, B. & Qin, F. Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
16. Immke, D.C. & Gavva, N.R. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 582-591 (2006).
17. Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A. & Eid, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 357-372 (2007).
18. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417 (2007).

19. Montell, C. & Rubin, G.M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-1323 (1989).
20. Szallasi, A., Moran, M.M., McAlexander, M.A. & Biro, T. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 601-620 (2011).
21. Patwardhan, A.M., *et al.* Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. *J Clin Invest* **120**, 1617-1626 (2010).
22. Levine, J.D. & Alessandri-Haber, N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 989-1003 (2007).
23. Welch, J.M., Simon, S.A. & Reinhart, P.H. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13889-13894 (2000).
24. Ross, R.A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* **140**, 790-801 (2003).
25. Jeske, N.A., *et al.* A-kinase anchoring protein 150 mediates transient receptor potential family v type 1 sensitivity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *J Neurosci* **31**, 8681-8688 (2011).
26. Bhave, G., *et al.* Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12480-12485 (2003).
27. Bautista, D.M., *et al.* TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-1282 (2006).
28. Bandell, M., *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849-857 (2004).
29. Macpherson, L.J., *et al.* An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* **27**, 11412-11415 (2007).
30. Escalera, J., von Hehn, C.A., Bessac, B.F., Sivula, M. & Jordt, S.E. TRPA1 mediates the noxious effects of natural sesquiterpene deterrents. *J Biol Chem* **283**, 24136-24144 (2008).
31. Matta, J.A., *et al.* General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8784-8789 (2008).
32. Baraldi, P.G., Preti, D., Materazzi, S. & Geppetti, P. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J Med Chem* **53**, 5085-5107 (2010).
33. Lee, S.P., *et al.* Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol* **153**, 1739-1749 (2008).
34. Talavera, K., *et al.* Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* (2009).
35. Bessac, B.F. & Jordt, S.E. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)* **23**, 360-370 (2008).
36. Trevisani, M., *et al.* 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13519-13524 (2007).

37. Materazzi, S., *et al.* Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12045-12050 (2008).
38. Story, G.M., *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829 (2003).
39. Tominaga, M. & Caterina, M.J. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* **61**, 3-12 (2004).
40. Wang, S., *et al.* Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* **131**, 1241-1251 (2008).
41. Del Camino, D., *et al.* TRPA1 Contributes to Cold Hypersensitivity. *J Neurosci* **30**, 15165-15174 (2010).
42. Chen, J., *et al.* Pore dilation occurs in TRPA1 but not in TRPM8 channels. *Mol Pain* **5**, 3 (2009).
43. Patapoutian, A., Tate, S. & Woolf, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 55-68 (2009).
44. Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J.A. & Geppetti, P. Pain pharmacology in migraine: focus on CGRP and CGRP receptors. *Neurol Sci* **28 Suppl 2**, S89-93 (2007).
45. Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J.G. & Geppetti, P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 9-14 (2009).
46. Gunthorpe, M.J. & Chizh, B.A. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discov Today* **14**, 56-67 (2009).
47. Wong, G.Y. & Gavva, N.R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev* **60**, 267-277 (2009).
48. Gavva, N.R., *et al.* The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *Journal of Neuroscience* **27**, 3366-3374 (2007).
49. Gavva, N.R., *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**, 202-210 (2008).
50. Knotkova, H., Pappagallo, M. & Szallasi, A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* **24**, 142-154 (2008).
51. Simpson, D.M., Brown, S. & Tobias, J. Controlled trial of high-concentration capsaicin patch for treatment of painful HIV neuropathy. *Neurology* **70**, 2305-2313 (2008).
52. Anand, U., Otto, W.R. & Anand, P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain* **6**, 82 (2010).
53. Han, P., *et al.* Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochemical pharmacology* **73**, 1635-1645 (2007).
54. Pareek, T.K., *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 660-665 (2007).
55. Gunthorpe, M.J., *et al.* Characterization of SB-705498, a potent and selective vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) antagonist that inhibits the capsaicin-, acid-, and heat-mediated activation of the receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 1183-1192 (2007).

56. Gavva, N.R., *et al.* AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 474-484 (2005).
57. Alessandri-Haber, N., *et al.* Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* **39**, 497-511 (2003).
58. Vriens, J., *et al.* Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *P Natl Acad Sci USA* **101**, 396-401 (2004).
59. Watanabe, H., *et al.* Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* **277**, 13569-13577 (2002).
60. Watanabe, H., *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434-438 (2003).
61. Grant, A.D., *et al.* Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol* **578**, 715-733 (2007).
62. Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Joseph, E.K., Reichling, D. & Levine, J.D. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *Journal of Neuroscience* **26**, 3864-3874 (2006).
63. Alessandri-Haber, N., *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *Journal of Neuroscience* **24**, 4444-4452 (2004).
64. Dina, O.A., *et al.* Integrin signaling in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *European Journal of Neuroscience* **19**, 634-642 (2004).
65. Dina, O.A., *et al.* Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia. *Pain* **115**, 191-203 (2005).
66. Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M.J. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* **25**, 1304-1310 (2005).
67. Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Joseph, E.K., Reichling, D.B. & Levine, J.D. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* **28**, 1046-1057 (2008).
68. McNamara, C.R., *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13525-13530 (2007).
69. Macpherson, L.J., *et al.* Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541-545 (2007).
70. Andre, E., *et al.* Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 2574-2582 (2008).
71. Nassini, R., Materazzi, S., De Siena, G., De Cesaris, F. & Geppetti, P. Transient receptor potential channels as novel drug targets in respiratory diseases. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 535-542 (2010).
72. Geppetti, P., Patacchini, R., Nassini, R. & Materazzi, S. Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel. *Lung* **188 Suppl 1**, S63-68 (2010).

73. Andre, E., *et al.* Transient receptor potential ankyrin receptor 1 is a novel target for pro-tussive agents. *Br J Pharmacol* **158**, 1621-1628 (2009).
74. Kremeyer, B., *et al.* A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* **66**, 671-680 (2010).
75. Lotsch, J. Genetic variability of pain perception and treatment-clinical pharmacological implications. *Eur J Clin Pharmacol* (2011).
76. Kwan, K.Y., *et al.* TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277-289 (2006).
77. Wei, H., Koivisto, A. & Pertovaara, A. Spinal TRPA1 ion channels contribute to cutaneous neurogenic inflammation in the rat. *Neurosci Lett* **479**, 253-256 (2010).
78. Bresalier, R.S., *et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* **352**, 1092-1102 (2005).
79. Woolf, C.J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* (2010).
80. Juni, P., *et al.* Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* **364**, 2021-2029 (2004).
81. Soepenberg, O., *et al.* Real-time pharmacokinetics guiding clinical decisions; phase I study of a weekly schedule of liposome encapsulated paclitaxel in patients with solid tumours. *Eur J Cancer* **40**, 681-688 (2004).
82. Ohtsu, T., *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel: a 3-hour infusion versus a 24-hour infusion. *Clin Cancer Res* **1**, 599-606 (1995).
83. Czejka, M., *et al.* Clinical pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel after polychemotherapy with the cytoprotective agent amifostine. *Anticancer Res* **20**, 3871-3877 (2000).
84. Cavanaugh, D.J., *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* **31**, 5067-5077 (2011).
85. Zhang, X., Huang, J. & McNaughton, P.A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* **24**, 4211-4223 (2005).
86. Chiang, C.Y., Li, Z., Dostrovsky, J.O. & Sessle, B.J. Central sensitization in medullary dorsal horn involves gap junctions and hemichannels. *Neuroreport* **21**, 233-237 (2010).
87. Gao, Y.J. & Ji, R.R. Activation of JNK pathway in persistent pain. *Neurosci Lett* **437**, 180-183 (2008).
88. Sonnichsen, D.S. & Relling, M.V. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Pharmacokinet* **27**, 256-269 (1994).
89. Wei, H., Hamalainen, M.M., Saarnilehto, M., Koivisto, A. & Pertovaara, A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology* **111**, 147-154 (2009).
90. Cohen, J.E., Lee, P.R., Chen, S., Li, W. & Fields, R.D. MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
91. Spector, A.A. & Norris, A.W. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C996-1012 (2007).

92. Zeldin, D.C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **276**, 36059-36062 (2001).
93. Konkel, A. & Schunck, W.H. Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 210-222 (2011).
94. Carroll, M.A., Balazy, M., Margiotta, P., Falck, J.R. & McGiff, J.C. Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cyclooxygenase and release of prostaglandins. *J Biol Chem* **268**, 12260-12266 (1993).
95. Revermann, M. Pharmacological inhibition of the soluble epoxide hydrolase-from mouse to man. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 173-178.
96. Marowsky, A., Burgener, J., Falck, J.R., Fritschy, J.M. & Arand, M. Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience* **163**, 646-661 (2009).
97. Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D. & Weintraub, N.L. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* **43**, 55-90 (2004).
98. Fang, X., Weintraub, N.L., Stoll, L.L. & Spector, A.A. Epoxyeicosatrienoic acids increase intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**, 1242-1246 (1999).
99. Spiecker, M. & Liao, J.K. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys* **433**, 413-420 (2005).
100. Imig, J.D. & Hammock, B.D. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 794-805 (2009).
101. Revermann, M. Pharmacological inhibition of the soluble epoxide hydrolase-from mouse to man. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 173-178 (2010).
102. Sinal, C.J., *et al.* Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J Biol Chem* **275**, 40504-40510 (2000).
103. Fang, X., *et al.* Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem* **276**, 14867-14874 (2001).
104. Inceoglu, B., *et al.* Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18901-18906 (2008).
105. Wang, X., *et al.* The involvement of epoxygenase metabolites of arachidonic acid in cAMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J Endocrinol* **190**, 871-878 (2006).
106. Fernandes, J., *et al.* IP3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid. *J Cell Biol* **181**, 143-155 (2008).
107. Iliff, J.J., Wang, R.K., Zeldin, D.C. & Alkayed, N.J. Epoxyeicosanoids as mediators of neurogenic vasodilation in cerebral vessels. *Am J Physiol-Heart C* **296**, H1352-H1363 (2009).
108. Woolf, C.J. & Ma, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* **55**, 353-364 (2007).
109. Jordt, S.E., McKemy, D.D. & Julius, D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 487-492 (2003).

110. Alessandri-Haber, N., *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci* **24**, 4444-4452 (2004).
111. Vriens, J., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T. & Nilius, B. Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* **282**, 12796-12803 (2007).
112. Hasko, G., *et al.* Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of immunology* **157**, 4634-4640 (1996).
113. Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., Schmall, R. & Woolf, C.J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* **36**, 57-68 (2002).
114. Schagger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379 (1987).
115. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *P Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354 (1979).
116. Bergmans, H.E., van Die, I.M. & Hoekstra, W.P. Transformation in Escherichia coli: stages in the process. *J Bacteriol* **146**, 564-570 (1981).
117. Weber, K. & Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* **244**, 4406-4412 (1969).
118. Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y. & Fay, F.S. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* **318**, 558-561 (1985).
119. Burnett, R., Guichard, Y. & Barale, E. Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology* **119**, 83-93 (1997).
120. Friedenberger, M., Bode, M., Krusche, A. & Schubert, W. Fluorescence detection of protein clusters in individual cells and tissue sections by using toponome imaging system: sample preparation and measuring procedures. *Nat Protoc* **2**, 2285-2294 (2007).
121. Schubert, W., *et al.* Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* **24**, 1270-1278 (2006).
122. Brenneis, C., *et al.* Soluble epoxide hydrolase limits mechanical hyperalgesia during inflammation. *Molecular pain* **7**, 78 (2011).
123. Strecker, T., Reeh, P.W., Weyand, M. & Messlinger, K. Release of calcitonin gene-related peptide from the isolated mouse heart: methodological validation of a new model. *Neuropeptides* **40**, 107-113 (2006).
124. Fischer, M.J. & Reeh, P.W. Sensitization to heat through G-protein-coupled receptor pathways in the isolated sciatic mouse nerve. *Eur J Neurosci* **25**, 3570-3575 (2007).
125. Yeomans, D.C. & Proudfit, H.K. Characterization of the Foot Withdrawal Response to Noxious Radiant-Heat in the Rat. *Pain* **59**, 85-94 (1994).
126. D'amour, F.E. & Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **72**, 74-79 (1941).

127. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia. *Pain* **32**, 77-88 (1988).
128. Spector, A.A. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S52-56 (2009).
129. Revermann, M. Pharmacological inhibition of the soluble epoxide hydrolase-from mouse to man. *Curr Opin Pharmacol*.
130. Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. & Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**, 5-17 (1992).
131. Randich, A., Meller, S.T. & Gebhart, G.F. Responses of primary afferents and spinal dorsal horn neurons to thermal and mechanical stimuli before and during zymosan-induced inflammation of the rat hindpaw. *Brain Res* **772**, 135-148 (1997).
132. Gan, Y., Wientjes, M.G., Lu, J. & Au, J.L. Cytostatic and apoptotic effects of paclitaxel in human breast tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**, 177-182 (1998).
133. Levant, A., Levy, E., Argaman, M. & Fleisher-Berkovich, S. Kinins and neuroinflammation: dual effect on prostaglandin synthesis. *Eur J Pharmacol* **546**, 197-200 (2006).
134. Pierre, S., et al. Toponomics analysis of functional interactions of the ubiquitin ligase PAM (Protein Associated with Myc) during spinal nociceptive processing. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2475-2485 (2008).
135. Corey, D.P., et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-730 (2004).
136. Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L. & Stucky, C.L. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* **29**, 4808-4819 (2009).
137. Petrus, M., et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* **3**, 40 (2007).
138. Sakairi, Y., et al. 5,6-EET inhibits ion transport in collecting duct by stimulating endogenous prostaglandin synthesis. *Am J Physiol* **268**, F931-939 (1995).
139. Ben-Amor, N., et al. A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *J Physiol* **570**, 309-323 (2006).
140. Yang, W., et al. Stable 5,6-epoxyeicosatrienoic acid analog relaxes coronary arteries through potassium channel activation. *Hypertension* **45**, 681-686 (2005).
141. Eid, S.R., et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* **4**, 48 (2008).
142. Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Jeske, N.A. & Hargreaves, K.M. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* **583**, 175-193 (2007).
143. Akopian, A.N. Regulation of Nociceptive Transmission at the Periphery via TRPA1-TRPV1 Interactions. *Curr Pharm Biotechnol* (2010).
144. Patil, M.J., Jeske, N.A. & Akopian, A.N. TRPV1 regulates activation and modulation of TRPA1 by Ca²⁺. *Neuroscience* (2010).

145. Staruschenko, A., Jeske, N.A. & Akopian, A.N. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem* **285**, 15167-15177 (2010).
146. Bernardini, N., Neuhuber, W., Reeh, P.W. & Sauer, S.K. Morphological evidence for functional capsaicin receptor expression and calcitonin gene-related peptide exocytosis in isolated peripheral nerve axons of the mouse. *Neuroscience* **126**, 585-590 (2004).
147. Shields, S.D., Cavanaugh, D.J., Lee, H., Anderson, D.J. & Basbaum, A.I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* (2010).
148. Brierley, S.M., *et al.* The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* (2009).
149. Petrus, M., *et al.* A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular Pain* **3**, - (2007).
150. Inceoglu, B., Schmelzer, K.R., Morisseau, C., Jinks, S.L. & Hammock, B.D. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**, 42-49 (2007).
151. Inceoglu, B., *et al.* Inhibition of soluble epoxide hydrolase reduces LPS-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of inflammatory pain. *Life Sci* **79**, 2311-2319 (2006).
152. Inceoglu, B., *et al.* Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
153. Kim, I.H., *et al.* Design of bioavailable derivatives of 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid, a potent inhibitor of the soluble epoxide hydrolase. *Bioorg Med Chem* **15**, 312-323 (2007).
154. Liu, J.Y., *et al.* Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation. *Br J Pharmacol* **156**, 284-296 (2009).
155. Dorrance, A.M., *et al.* An epoxide hydrolase inhibitor, 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid (AUDA), reduces ischemic cerebral infarct size in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **46**, 842-848 (2005).
156. Fang, X., *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by substituted urea-derived soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 260-270 (2005).
157. Grau, R., Punzon, C., Fresno, M. & Iniguez, M.A. Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J* **395**, 81-88 (2006).
158. Node, K., *et al.* Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* **285**, 1276-1279 (1999).
159. Cronin, A., *et al.* The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 1552-1557 (2003).
160. Keseru, B., *et al.* Hypoxia-induced pulmonary hypertension: comparison of soluble epoxide hydrolase deletion vs. inhibition. *Cardiovasc Res* **85**, 232-240 (2010).
161. Decker, M., Arand, M. & Cronin, A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol* **83**, 297-318 (2009).

162. Cronin, A., Decker, M. & Arand, M. Mammalian soluble epoxide hydrolase is identical to liver hepoxilin hydrolase. *Journal of Lipid Research* **52**, 712-719 (2011).
163. Roman, R.J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* **82**, 131-185 (2002).
164. Wang, M.H., *et al.* Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 966-973 (1998).
165. Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P. & Bonen, A. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. *Physiol Rev* **90**, 367-417 (2010).
166. Hertzfel, A.V. & Bernlohr, D.A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 175-180 (2000).
167. Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007-1017 (2001).
168. Quazi, F. & Molday, R.S. Lipid transport by mammalian ABC proteins. *Essays Biochem* **50**, 265-290 (2011).
169. Takahashi, K., *et al.* ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol* **38**, 2-12 (2005).
170. Lauterbach, B., *et al.* Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension* **39**, 609-613 (2002).
171. Loot, A.E., *et al.* Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation. *Cardiovasc Res* **80**, 445-452 (2008).
172. Garrison, S.L. & Stucky, C.L. The Dynamic TRPA1 Channel: A Suitable Pharmacological Pain Target? *Curr Pharm Biotechnol* (2011).
173. Binshtok, A.M., Bean, B.P. & Woolf, C.J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* **449**, 607-610 (2007).
174. Carlton, S.M., Zhou, S., Govea, R. & Du, J. Group II/III Metabotropic Glutamate Receptors Exert Endogenous Activity-Dependent Modulation of TRPV1 Receptors on Peripheral Nociceptors. *J Neurosci* **31**, 12727-12737 (2011).
175. Fukao, M., Mason, H.S., Kenyon, J.L., Horowitz, B. & Keef, K.D. Regulation of BKca channels expressed in human embryonic kidney 293 cells by epoxyeicosatrienoic acid. *Molecular Pharmacology* **59**, 16-23 (2001).

Publikationen

Nozizeption und Schmerz

1. **Marco Sisignano**, Chul-Kyu Park, Carlo Angioni, Dong Dong Zhang, Christian von Hehn, Enrique J Cobos, Nader Ghasemlou, Zhen-Zhong Xu, Vigneswara Kumaran, Ruirui Lu, Andrew Grant, Michael JM Fischer, Achim Schmidtko, Peter Reeh, Ru-Rong Ji, Clifford J Woolf, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich and Christian Brenneis.

5,6-EET is produced by nociceptive activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals.

Eingereicht (Journal of Neuroscience)

2. Christian Brenneis*, **Marco Sisignano***, Ovidiu Coste, Michael J Fischer, Kai Altenrath, Carlo Angioni, Helmut Schmidt, Ingrid Fleming, Ralf P Brandes, Peter W Reeh, Clifford J Woolf, Gerd Geisslinger and Klaus Scholich.

Soluble epoxide hydrolase limits mechanical hyperalgesia during inflammation.

Molecular Pain 2011, 7:78

3. Dong Dong Zhang, **Marco Sisignano**, Claus Dieter Schuh, Holger Stark and Klaus Scholich. Antinociceptive properties of the Histamine 3 (H3) receptor antagonist BF2.649. **Eingereicht (European Journal of Pain)**

4. Christian Brenneis, Katrin Kistner, David Segal, **Marco Sisignano**, Sandra Labocha, N. Ferreirós, Amanda Strominger, Enrique J Cobos, Nader Ghasemlou, Gerd Geisslinger, Peter Reeh, Bruce Bean, Clifford J Woolf.

Phenotyping the function of TRPV1 expressing sensory neurons by targeted axonal silencing. **Manuskript in Bearbeitung**

5. Ovidiu Coste, Christine Möser, **Marco Sisignano**, Audrey Minden, Gerd Geisslinger and Ellen Niederberger. PAK 5 and its impact on acute, inflammatory and neuropathic pain. **Eingereicht (Molecular Pain)**

Andere Themen

1. **Sisignano, M.**, Morbitzer, D., Gätgens, J., Oldiges, M. and J.Soppa.
A 2-oxoacid dehydrogenase complex of *Haloferax volcanii* is essential for the growth on isoleucine but not the other branched chain amino acids. **Microbiology 156 (2009), pp. 521–529.**

Posterpräsentationen und Vorträge

Marco Sisignano, Christian Brenneis, Carlo Angioni, Klaus Scholich, Gerd Geisslinger
Modulation of nociception through soluble epoxide hydrolase (sEH) and 8,9-EET.
Rhein-Main-Neuroscience-Network-Meeting, Oberwesel 2010, Posterpräsentation

Marco Sisignano

Endogenous Lipids as peripheral pain modulators.

2nd annual symposium: Research in Molecular & Cell Biological Sciences,
Frankfurt, 2011, Vortrag

Marco Sisignano, Christian Brenneis, Carlo Angioni, Klaus Scholich, Gerd Geisslinger
Soluble epoxide hydrolase (sEH) and 8,9-EET modulate pain sensitivity.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT),
Frankfurt, 2011, Posterpräsentation

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Geisslinger für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen und für seine Unterstützung und Ratschläge bei der Anfertigung der Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. Stark bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Erstellung des Gutachtens im Fachbereich Pharmazie.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Scholich für seine ausgezeichnete Betreuung und seine vielen hilfreichen Anregungen und Vorschläge im Laufe der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen unmittelbaren Betreuer Herrn Dr. Christian Brenneis, der die Idee zu diesem Projekt hatte und aufgrund seiner engagierten Betreuung und konstruktiven Kritik maßgeblich am Erfolg des Projekts beteiligt ist.

Mein Dank gilt außerdem allen Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Scholich für ihre freundliche Unterstützung bei Fragen technischer oder theoretischer Art sowie die gute Arbeitsatmosphäre. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Carlo Angioni für die Analytik-Messungen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Anette für ihre Geduld und Unterstützung im Lauf der Doktorarbeit.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder für die stetige Unterstützung danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marco Sisignano
Geburtsdaten	24. Oktober 1981, Frankfurt am Main
Anschrift	Rendelerstr. 28, 60385 Frankfurt am Main
Telefon	0162 / 43 66 512
E-Mail-Adresse	Marco.Sisignano@med.uni-frankfurt.de

Doktorarbeit

seit 09 / 2008

Doktorarbeit am Institut für Klinische Pharmakologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Institutsleiter: Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger.

Gefördert durch die LOEWE-Exzellenzinitiative des Landes Hessen.

Thema: **Die Rolle der Epoxyeicosatriensäuren (EETs) bei der nozizeptiven Verarbeitung**

06 / 2010 – 08 / 2010

LiFF-Reisestipendium zur Harvard Medical School, Children's Hospital, Longwood, MA, USA, zum F.M. Kirby Neurobiology Center, Institutsleiter: Prof. C. J. Woolf

- Themen:
1. Effekte von 5,6-Epoxyeicosatriensäure auf primär afferente Neurone
 2. Selektiver Transport kationischer Analgetika in Nozizeptoren durch Aktivierung von TRP-Kanälen

Studium

09 / 2003 – 09 / 2008

Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

09 / 2008

Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe

Abschlussnote: 1,0 / Prädikat: mit Auszeichnung bestanden

12 / 2007 – 08 / 2008

Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Soppa

Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Thema: Charakterisierung der 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplexe in *Haloferax volcanii*

09 / 2002 – 09 / 2003

Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Zivildienst

2001 - 2002

Zivildienst bei „Sozialdienst Frankfurt e.V.“, mobiler sozialer Hilfsdienst

Schule

2001

Abitur am Helmholtz-Gymnasium in Frankfurt am Main, Note: 2,2