

# **Untersuchung der Rolle von mPGES-1 bei der nozizeptiven Transmission**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main  
von

**Christian Brenneis**  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2007)  
(D 30)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

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

Datum der Disputation:

Eine Theorie sollte so einfach wie möglich sein,  
aber nicht einfacher.

Albert Einstein

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Nozizeption .....	1
1.1.1	Schmerzformen und deren Ursachen .....	1
1.2	Die Pathophysiologie inflammatorischer Schmerzen .....	2
1.2.1	Sensibilisierung am peripheren Nozizeptor .....	2
1.2.2	Zentrale Sensibilisierung .....	3
1.3	Die Prostaglandinsynthese .....	5
1.4	Die Regulation der Prostaglandinsynthese .....	8
1.4.1	Mechanismen im peripheren, entzündeten Gewebe .....	8
1.4.2	Regulation der Prostaglandinsynthese im Rückenmark .....	8
1.5	Die Sensibilisierung der nozizeptiven Transmission durch Prostaglandine .....	10
1.5.1	Prostaglandinwirkungen am peripheren Nozizeptor .....	10
1.5.2	Prostaglandinwirkungen auf die nozizeptive Transmission im Rückenmark .....	11
1.6	COX-Inhibitoren .....	14
1.7	mPGES-1: Ein neues Zielmolekül für die Schmerztherapie? .....	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien .....	18
2.2	Zellkulturmedien und Zusätze .....	19
2.3	Puffer und Lösungen .....	20
2.4	Antikörper .....	21
2.5	Versuchstiere .....	21
2.6	Genotypisierung .....	22
2.6.1	Isolierung genomischer DNA .....	22

---

2.6.2	PCR.....	22
2.6.3	Agarose Gelelektrophorese.....	23
<b>2.7</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.7.1	Gewinnung peritonealer Makrophagen.....	23
2.7.2	Isolierung primär embryonaler Rückenmarkskulturen (Glia und Neurone).....	23
2.7.3	Gewinnung von neuronengereicherten Rückenmarkskulturen.....	24
2.7.4	Gewinnung primärer Rückenmarksastrozyten (neuronenfreie Rückenmarkskulturen).....	24
2.7.5	Isolierung und Stimulierung von Thrombozyten aus humanem Blut.....	25
2.7.6	Isolierung und Stimulierung von Monozyten aus humanem Blut.....	25
2.7.7	Vollbluttest.....	25
2.7.8	Kultivierung von RAW 264.7 Makrophagen.....	26
2.7.9	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	26
<b>2.8</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.8.1	Isolierung der mikrosomalen Proteinfraction.....	26
2.8.2	Detektion phosphorylierter Proteine.....	26
2.8.3	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.8.4	Immunoblot-Analyse (Western Blot).....	27
<b>2.9</b>	<b>Immunochemische Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.9.1	Immunocytochemie.....	27
2.9.2	Immunohistochemie.....	28
2.9.3	Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK).....	29
<b>2.10</b>	<b>Vergleich der zellulären und zellfreien Metabolisierung von Arachidonsäure [1-<sup>14</sup>C].....</b>	<b>30</b>
2.10.1	Metabolische Markierung mit Arachidonsäure [1- <sup>14</sup> C].....	30
2.10.2	Zellfreie Prostaglandinsynthese mit Zellextrakten.....	30
<b>2.11</b>	<b>Analytik der Prostaglandine.....</b>	<b>30</b>
2.11.1	Dünnschichtchromatographie (DSC).....	30
2.11.2	ELISA.....	31
2.11.3	LC-MS/MS.....	31
<b>2.12</b>	<b>Calcium Imaging.....</b>	<b>31</b>
<b>2.13</b>	<b>Tiermodelle.....</b>	<b>32</b>
2.13.1	Versuchstiere.....	32
2.13.2	Hanging-Wire Test.....	33
2.13.3	Pole Test.....	33
2.13.4	Tailflick Test.....	33
2.13.5	Hot-Plate Test.....	33
2.13.6	Writhing Test.....	34

---

2.13.7	Spared-Nerve-Injury (SNI) .....	34
2.13.8	Formalin Test .....	34
2.13.9	Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie .....	34
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle der COX-Isoformen in Rückenmarkskulturen .....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Stimulierung der PGE <sub>2</sub> -Synthese in primären Rückenmarkskulturen.....	35
3.1.2	SC-560 und Rofecoxib inhibieren die TNF $\alpha$ induzierte PGE <sub>2</sub> Synthese.....	39
3.1.3	SC-560 inhibiert in Rückenmarkskulturen die PGE <sub>2</sub> -Synthese unabhängig von COX-1 .....	40
3.1.4	Die Selektivität von SC-560 in der zellfreien PGE <sub>2</sub> -Synthese .....	43
3.1.5	Die Selektivität von SC-560 in humanem Vollblut und gewaschenen Blutzellen .....	44
<b>3.2</b>	<b>Shift der spinalen Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Mäusen .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	mPGES-1 Knockoutmäuse .....	47
3.2.2	Shift der PGE <sub>2</sub> -Synthese in mPGES-1-defizienten peritonealen Makrophagen .....	48
3.2.3	Shift der PGE <sub>2</sub> -Synthese im Rückenmark adulter mPGES-1 <sup>-/-</sup> Mäuse.....	49
3.2.4	Shift der stimulierten PGE <sub>2</sub> -Synthese in Rückenmarkskulturen mPGES-1-defizienter Mäuse .....	50
<b>3.3</b>	<b>Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit durch Prostaglandine .....</b>	<b>53</b>
3.3.1	Lokalisierung der Prostaglandinrezeptoren im Rückenmark .....	53
3.3.2	Die Sensibilisierung von NMDA Rezeptoren in kultivierten Rückenmarksneuronen.....	55
3.3.3	Sensibilisierung NMDA induzierter Calciumeinströme durch Prostaglandine.....	57
3.3.4	Cicaprost sensibilisiert die NMDA Rezeptoren durch PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung.....	59
<b>3.4</b>	<b>Das nozizeptive Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Motorische Fähigkeiten mPGES-1-defizienter Mäuse.....	60
3.4.2	Das nozizeptive Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse bei akutem Schmerz.....	61
3.4.3	Das Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse im „spared nerve injury“ Modell für neuropathische Schmerzen.....	62
3.4.4	mPGES-1-defiziente Mäuse in Schmerzmodellen mit PGE <sub>2</sub> -vermittelter zentraler Sensibilisierung.....	63
<b>3.5</b>	<b>Regulation der Zytokinfreisetzung und COX-2-Expression durch Prostaglandine .....</b>	<b>65</b>
3.5.1	PGE <sub>2</sub> unterdrückt in Rückenmarkskulturen die COX-2- und mPGES-1-Expression .....	65
3.5.2	EP-2 und EP-4 Rezeptoren vermitteln die Repression der LPS induzierten Prostaglandinsynthese.....	67
3.5.3	EP-2- und EP-4-Agonisten blockieren die LPS induzierte Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Zytokinfreisetzung .....	68
3.5.4	EP-2-Rezeptoren werden in Mikroglia exprimiert .....	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation der PGE<sub>2</sub> Synthese im Rückenmark.....</b>	<b>71</b>

---

<b>4.2</b>	<b>COX-Isoform Selektivität von SC-560</b> .....	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>mPGES-1: Ein Zielprotein für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente ?</b> .....	<b>75</b>
4.3.1	Die Bedeutung von mPGES-1 für das nozizeptive Verhalten .....	76
4.3.2	Shift der Prostaglandinsynthese bei mPGES-1-defizienten Mäusen .....	77
4.3.3	Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit durch Prostacyclin .....	79
4.3.4	Negative Rückkopplungsregulation durch PGE <sub>2</sub> .....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>94</b>
8.1	Veröffentlichungen .....	94
8.2	Poster Präsentationen .....	95
8.3	Danksagung .....	96
8.4	Lebenslauf .....	97

# 1 Einleitung

## 1.1 Nozizeption

Nozizeption bezeichnet die Aktivität von Schmerzreize verarbeitenden peripheren und zentralnervösen Neuronengruppen. Dies beinhaltet die auf einen noxischen Reiz hin entstehende Aktivierung eines peripheren Nozizeptors (Rezeptorpotential), die Generierung eines Aktionspotentials in den primär afferenten Nervenfasern, die Weiterleitung des Reizes über Synapsen in den äußeren dorsalen Schichten des Rückenmarks (Lamina I und II) und in Hirnstammneuronen und schließlich die Verarbeitung der Signale in höheren Gehirnregionen. Wichtige Stationen der zentralen Schmerzverarbeitung sind der Thalamus, der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex (verantwortlich für die sensorisch-diskriminative Komponente des Schmerzes), sowie das limbische System (verantwortlich für die affektive Komponente des Schmerzes). Während für einen Fluchreflex eine Signalweiterleitung bis zur Hirnstammebene ausreicht, muss zur Entstehung eines Schmerzbewusstseins die Großhirnrinde aktiviert werden (1). Werden im Rückenmark keine Schmerzreize weitergeleitet, entsteht keine nozizeptive Reaktion.

### 1.1.1 Schmerzformen und deren Ursachen

Das akute Schmerzempfinden dient der schnellen Erkennung und Abwehr gewebeschädigender Einflüsse. Es ist ein lebenserhaltendes, physiologisch wichtiges Sinnessystem.

Unter pathophysiologischen Umständen kann es zur krankhaft erhöhten Schmerzwahrnehmung kommen. Hierbei handelt es sich entweder um eine verstärkte Wahrnehmung noxischer Reize (Hyperalgesie) oder um eine plötzlich schmerzhaft Wahrnehmung nicht noxischer Reize (Allodynie). Eine Sensibilisierung des nozizeptiven Systems kann verschiedene Ursachen haben. Inflammatorische Schmerzen werden vordergründig durch Schmerzmediatoren verursacht, die lokal die Erregungsschwelle der peripheren Nozizeptoren herabsetzen. Die starke und andauernde Aktivität der primären Afferenzen führt im zentralen Nervensystem (ZNS) zusätzlich zur Induktion eines Schmerzgedächtnisses. Es handelt sich dabei um eine Sensibilisierung der synaptischen Übertragung im Rückenmark und in höheren Gehirnregionen (2). Das Schmerzgedächtnis kann auch nach Verschwinden des ursprünglichen Reizes fortbestehen und damit zur eigentlichen Krankheit werden, welche eine Therapie erfordert.

Neben den inflammatorischen Schmerzen gibt es noch eine weitere, bis heute schlecht therapierbare Form pathophysiologischer Schmerzen. Die so genannte Neuropathie entsteht durch direkte Verletzungen von Nervengewebe (3). So können z.B. afferente Schmerzfasern, die längere Zeit einem Druck ausgesetzt sind, spontan Aktionspotentiale bilden. Nach kompletter Durchtrennung der Nerven können sich Neurinome bilden. Dies sind Neuritenauswüchse der durchtrennten Stümpfe, die elektrische Verknüpfungen zu anderen afferenten Nervenfasern bilden können. C-Fasern, die im Rückenmark schmerzprojizierende Neurone aktivieren, können so plötzlich zusätzlich von mechanischen oder sympathischen Reizen innerviert werden. Das Krankheitsbild der Neuropathie ist von einschießenden Schmerzen oder einer mechanischen Allodynie gekennzeichnet. Ursachen sind neben Traumen auch stoffwechselbedingte Krankheiten (Diabetes mellitus).

## **1.2 Die Pathophysiologie inflammatorischer Schmerzen**

### **1.2.1 Sensibilisierung am peripheren Nozizeptor**

Noxische Reize induzieren an den peripheren Ausläufern (Nozizeptoren) myelinisierter A $\delta$ - oder unmyelinisierter C-Fasern Rezeptorpotenziale. Ein Paradebeispiel zur experimentellen Aktivierung der Nozizeptorfunktion ist die Stimulierung von kultivierten Hinterwurzelganglien (DRGs) durch Capsaicin, einem Bestandteil des Pfeffers. Dies induziert einen Kationeneinstrom durch Transient-Receptor-Potential-Vallinoidrezeptor-1 (TRPV-1) Kanäle, depolarisiert so die Zellmembran und induziert ein Rezeptorpotential (4). Ist das Rezeptorpotential hoch genug, öffnen sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle. Es entsteht ein Aktionspotential, welches die nozizeptiven Signale von der Peripherie zum Hinterhorn des Rückenmarks überträgt.

Bei Gewebeschädigung durch Verbrennung, Verkühlung, bakterielle Infektion oder chemische Reizung (Capsaicin, Formalin), werden im betroffenen Gewebe Immunreaktionen ausgelöst. Folge ist eine Ansammlung von Flüssigkeit (Ödem), eine Senkung des pH-Wertes und eine Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Hierzu zählen Zytokine, Serotonin, Neurotrophine, Bradykinin, Histamin, ATP und Prostaglandine (5). Diese Mediatoren können die Nozizeptoren entweder durch direkte Erregung (Bradykinin) oder durch Verstärkung der Aktivität anderer Stimuli (Prostaglandine) sensibilisieren. So setzen z.B. Prostaglandine durch Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren die Aktivierungsschwelle von TRPV-1 Kanälen herab. Der Nozizeptor ist anschließend leichter erregbar (6).



## 1.2.2 Zentrale Sensibilisierung

Eine primäre Hyperalgesie am peripheren Nozizeptor ist lokal auf das entzündete Gewebe begrenzt. Nach einer Endzündung entsteht jedoch nicht nur direkt am geschädigten Gewebe, sondern auch in den umliegenden Regionen ein gesteigertes Schmerzempfinden. Diese sogenannte sekundäre Hyperalgesie wird durch eine Sensibilisierung der nozizeptiven Transmission im ZNS ausgelöst. Bisherige Erkenntnisse zum Mechanismus der zentralen Sensibilisierung fokussieren in erster Linie auf die erste synaptische Übertragung der nozizeptiven Transmission im Rückenmark.

Primär afferente Schmerzfasern projizieren ihre Signale auf die äußeren Neurone des dorsalen Rückenmarkes (Lamina I und II). Als exzitatorische Transmitter dienen hierbei hauptsächlich Glutamat, Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP) oder Substanz P. Neben der Aktivierung (Depolarisierung) durch Schmerzfasern können die Projektionsneurone auch durch Signale inhibitorischer Neurone hyperpolarisiert werden. Zu den inhibitorischen Transmittern gehören GABA, Serotonin, Noradrenalin und Glycin. Nur wenn in den Projektionsneuronen durch das Zusammenwirken aller Signaleingänge ein unterschwelliges Membranpotenzial erreicht wird, kommt es zum Aktionspotential und der nozizeptive Reiz wird über die spinothalamischen Bahnen zum Stammhirn weitergeleitet.

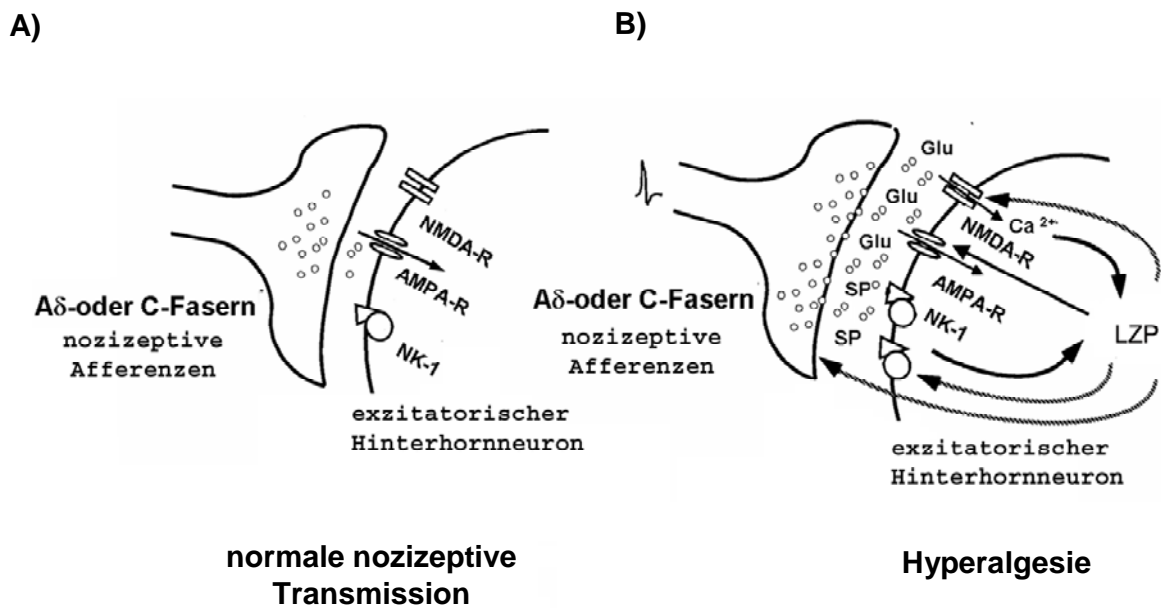
Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es durch die erhöhte Schmerzfasernaktivität zu einer sensibilisierten nozizeptiven Transmission im Rückenmark kommen. Eine kurzlebige, schnelle Potenzierung der synaptischen Übertragung ist die synaptische Bahnung. Treffen während einer hochfrequenten Stimulierung Signale so schnell ein, dass die Neuronen zwischen den ankommenden Aktionspotentialen nicht mehr repolarisieren können, kommt es an den Prä- und Postsynapsen stufenweise zu einer Erhöhung des Membranpotentials. Dies verstärkt präsynaptisch die Transmitterausschüttung und postsynaptisch die Erregbarkeit. Durch die Aktivität primär afferenter Schmerzfasern während einer Hyperalgesie, wird jedoch keine solche hochfrequente Stimulation (HFS; 100 Hz) erreicht. Die HFS wird zwar um die Mechanismen einer veränderten neuronalen Plastizität zu untersuchen in experimentellen Ansätzen häufig angewandt, ist aber physiologisch eher von geringer Relevanz.

Werden die primär afferenten C-Fasern experimentell einer niedrig frequenten Stimulation (NFS; 2 Hz) ausgesetzt, kann es im Rückenmark durch Induktion der Langzeitpotenzierung (LZP) zu einer länger anhaltenden Sensibilisierung der Transmission kommen. Dieser Mechanismus wurde speziell in Lamina I Neuronen, die zum periaqueduktalen Grau (PAG) projizieren, beobachtet (7). Für die Entstehung der LZP ist die Aktivierung von N-Methyl-D-

Aspartat (NMDA) oder Neurokinin-1 Rezeptoren (NK-1; Rezeptor für Substanz P) von besonderer Bedeutung (8). Kommen an den C- oder A $\delta$ -Fasern nur selten Aktionspotenziale an, kann das ausgeschüttete Glutamat, da die NMDA Rezeptoren durch Magnesiumionen blockiert sind, nur die Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionat (AMPA) Rezeptoren aktivieren (Abbildung 1-1). Bei permanenter Schmerzfaseraktivität, wie es z.B. während einer primären Hyperalgesie der Fall ist, kommt es in den Projektionsneuronen zu einer starken Depolarisierung der Membran. Hierdurch wird der spannungsabhängige Magnesiumblock am NMDA Rezeptor entfernt. Glutamat kann nun auch die NMDA Rezeptoren aktivieren und es kommt zusätzlich zu einem Calciumeinstrom. Neben Glutamat kann auch Substanz P über eine Sensibilisierung der T-Type-Voltage-Gated-Calcium-Kanäle (VGCCs) im Rückenmark die neuronale Erregbarkeit erhöhen (8). Da die intrathekale Applikation von NK-1- oder NMDA-Rezeptor Antagonisten die sekundäre Hyperalgesie, nicht aber den akuten Schmerz reduziert (9-11), wird klar, dass diese Rezeptoren maßgeblich an der Ausbildung der zentralen Sensibilisierung beteiligt sind.

In den Projektionsneuronen verändern die erhöhten zytosolischen Calciumkonzentrationen durch Aktivierung verschiedener Kinasen, calciumabhängiger Phospholipasen und Synthasen auf vielfältige Weise die neuronale Plastizität. So können z.B. durch Aktivierung der Calmodulinkinase II (CaMKII) AMPA Rezeptoren an den postsynaptischen Spalt rekrutiert werden (12) oder es kann durch Phosphorylierung der AMPA und NMDA Rezeptoren deren Erregbarkeit herabgesetzt werden.

Erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen induzieren aber auch durch eine Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) die Synthese parakrin agierender Transmitter wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine. Diese werden aus den Zellen transportiert und sensibilisieren entweder die Erregbarkeit postsynaptischer Projektionsneurone oder erhöhen als retrograde Botenstoffe die Transmitterausschüttung an der Präsynapse (13, 14).



**Abbildung 1-1: Die zentrale Sensibilisierung im Rückenmark.** (A) Synapsen im Rückenmark ohne Hyperalgesie. Terminale Enden der A $\delta$  und C-Fasern (Schmerzafferenzen) setzen nach Aktivierung Glutamat frei. Dies aktiviert an der postsynaptischen Membran AMPA-Rezeptoren und induziert einen Kationeneinstrom. (B) Synapsen im Rückenmark während einer Hyperalgesie. A $\delta$  und C-Fasern (Schmerzafferenzen) schütten verstärkt Glutamat und Neuropeptide aus. Dies führt zur Depolarisierung der Membran und damit zur erhöhten Aktivität der NMDA- und NK-1 Rezeptoren. Die hohen zytosolischen Calciumkonzentrationen und die Signaltransduktion der NK-1 Rezeptoren induzieren ihrerseits eine Langzeitpotenzierung (LZP). Dieser Mechanismus verstärkt langanhaltend die synaptische Übertragung. Abkürzungen: Glu = Glutamat; SP = Substanz P; NK-1 = Neurokinin-1 Rezeptor; AMPA-R = AMPA-Rezeptoren; NMDA-R = NMDA-Rezeptoren. Modifizierte Abbildung nach Schaible et al. (5).

### 1.3 Die Prostaglandinsynthese

Prostaglandine sind Lipidmediatoren, die hauptsächlich aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure (AA) generiert werden. AA wird durch Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) oder Phospholipase C (PLC) aus Phospholipiden freigesetzt, von Cyclooxygenasen (COX) zunächst oxidativ zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) zyklisiert und anschließend durch deren Peroxidaseaktivität (POX) zu PGH<sub>2</sub> umgesetzt (15). PGH<sub>2</sub> ist sehr instabil und wird entweder nicht-enzymatisch oder durch verschiedene terminale Prostaglandinsynthasen zu Prostaglandinen, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) oder Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) reduziert (16).

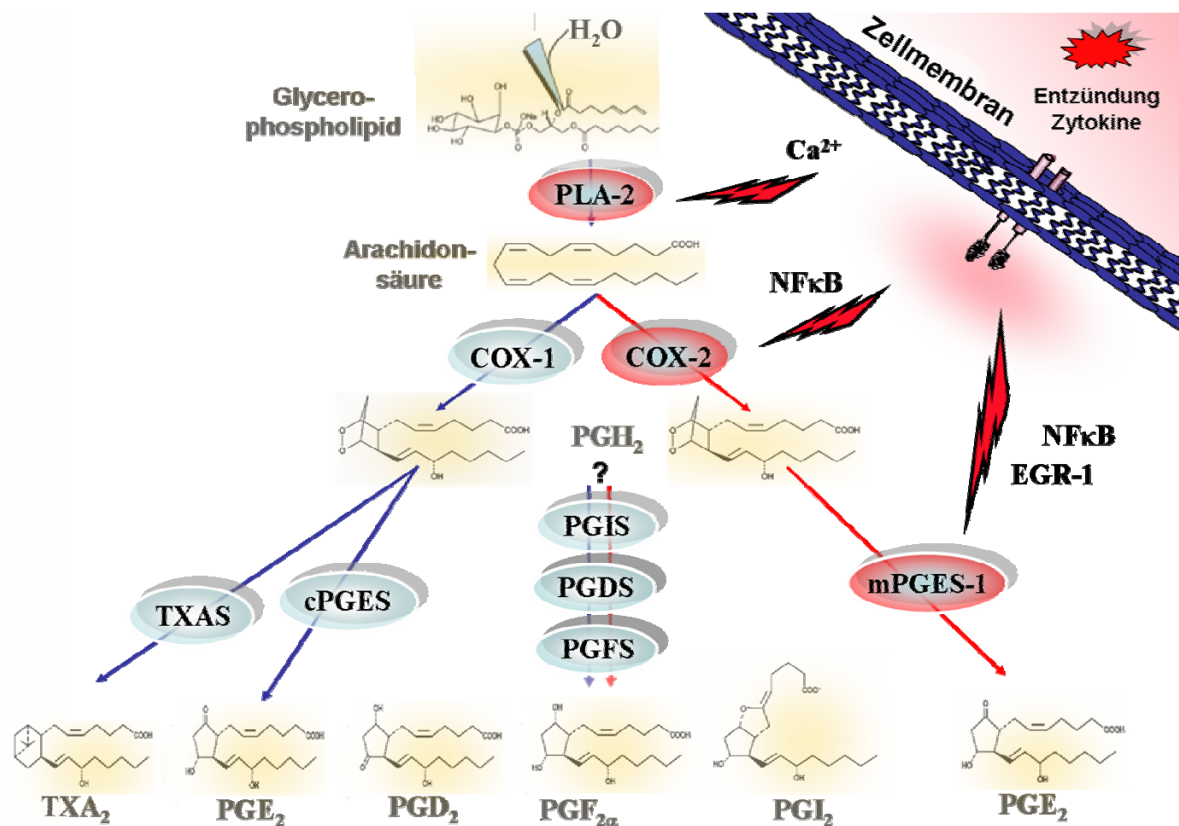
Die oxidative Zyklisierung von AA führt zur Generierung der „2-er Serie“ von Prostaglandinen (17) (Abbildung 1-2). COX-Enzyme können allerdings neben AA auch

Dihomo- $\gamma$ -Linolsäure (DGLA) zu der „1-er Serie“ der Prostaglandine oder Cannabinoide (2-Arachidonylglycerol, Arachidonyl Ethanolamide) zu Prostaglandinglycerolestern und Prostaglandinethanolamiden metabolisieren (18, 19). Endogene Cannabinoide werden ebenfalls durch Phospholipasen aus der Membran freigesetzt.

Funktionell und kinetisch kann die Prostaglandinsynthese in einen konstitutiven und in einen induzierten Syntheseweg eingeteilt werden. Die konstitutive Prostaglandinsynthese ist zur Erhaltung der Homeostase notwendig und wird hauptsächlich durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) vermittelt. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es nach Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren zur Expression der Typ IIA sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) und dadurch zu einer vielfach erhöhten Prostaglandinsynthese (20). COX-2 gehört zu den „immediate early genes“. Ihre Expression wird nach einer Translokation von Nuklear-Faktor-kappa-B (NF- $\kappa$ B) zum Nukleus induziert und kann zusätzlich durch Modifikation der mRNA Stabilität und der Proteindegradationsrate dynamisch reguliert werden (21). Der K<sub>m</sub>-Wert für AA ist bei COX-2 geringer als bei COX-1. COX-2 ist an den perinukleären Membranen lokalisiert und kann nach Stimulation große Mengen AA effizient zu Prostaglandinen umsetzen.

Für die Metabolisierung zu PGE<sub>2</sub> konnten bisher drei Enzyme mit spezifischer PGE<sub>2</sub> Syntheseaktivität identifiziert werden. (16). Die zytosolische PGE<sub>2</sub> Synthase (cPGES) wird konstitutiv exprimiert, ist funktionell meist mit COX-1 gekoppelt, im Zytosol lokalisiert und benötigt für eine effiziente PGE<sub>2</sub> Synthese Glutathion (GSH) (22). Die mikrosomale PGE<sub>2</sub> Synthase-1 (mPGES-1) ist funktionell meist mit COX-2 gekoppelt und in erster Linie für die induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese verantwortlich (23-25). Sie gehört zu der MAPEG (membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathion metabolism) Proteinfamilie, benötigt zur Reduktion von PGH<sub>2</sub> ebenfalls als Kofaktor GSH und ist an der perinukleären Membran mit COX-2 ko-lokalisiert. mPGES-1 wird wie COX-2 durch proinflammatorische Mediatoren reguliert und stellt deshalb ein potentielles Zielmolekül für die pharmakologische Therapie dar. Ihre Expression wird ebenfalls durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert, benötigt jedoch zusätzlich von COX-2 synthetisiertes endogenes PGE<sub>2</sub> (26). PGE<sub>2</sub> induziert durch Aktivierung der EP-2- und EP-4 Rezeptoren die Translokation des Early-Growth-Response-Factors-1 (EGR-1) zum Kern, der dort zusammen mit NF- $\kappa$ B die mPGES-1 Expression induziert (27). Dies führt zu einer zeitverzögerten mPGES-1 Expression. Zusätzlich obliegt mPGES-1 wie COX-2 einer posttranskriptionellen Expressionskontrolle. So kann IL1 $\beta$  über eine Aktivierung der c-Jun-N-Terminal-Kinase (JNK) die mPGES-1 mRNA stabilisieren (28). Die zuletzt entdeckte PGE-Synthase ist die mikrosomale PGE

Synthase-2 (mPGES-2). mPGES-2 ist konstitutiv exprimiert, unabhängig von GSH und funktionell mit beiden COX-Isoformen gekoppelt (29). Die physiologische Bedeutung der mPGES-2 ist nicht bekannt.



**Abbildung 1-2: Die Prostaglandinsynthesekaskade.** Prostaglandine werden aus Membranphospholipiden synthetisiert. Die blau dargestellten Enzyme werden meist konstitutiv exprimiert. Die Expression der rot dargestellten Enzyme wird unter pathophysiologischen Bedingungen induziert. Bei der Prostaglandin F Synthase (PGFS) und der Prostaglandin D Synthase (PGDS) ist die funktionelle Kopplung zu den COX Isoformen nicht untersucht. Die Abbildung stellt die Situation vereinfacht dar. Es kann in verschiedenen Zelltypen zu Abweichungen kommen.

Neben PGE<sub>2</sub> können aus Arachidonsäure noch weitere physiologisch wichtige Prostaglandine synthetisiert werden. Proteinextrakte aus Gehirn, Lunge, Leber und Niere reduzieren PGH<sub>2</sub> auch mit einem großen Anteil zu Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) und Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (30). Weitere physiologisch aktive PGH<sub>2</sub>-Metabolite sind Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). Diese werden im Gewebe jedoch sehr schnell abgebaut. Es sind deshalb nur ihre Abbauprodukte Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) und 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) detektierbar. Für die Synthese dieser Prostaglandine konnten bisher die Prostaglandin F-Synthase (PGFS) (31), die Prostacyclinsynthase (PGIS) (32), die Thromboxansynthase (TXAS) (33), die Hematopoetische-Prostaglandin D Synthase und die Lipocalin-Type-

Prostaglandin D Synthase (34) als spezifische Prostaglandinsynthasen identifiziert werden. Viele dieser terminalen Synthasen sind wie mPGES-1 an den ER-Membranen lokalisiert, glutathionabhängig und mit COX-2 funktionell gekoppelt (35). Lediglich für TXAS und cPGES wird eine überwiegend COX-1 vermittelte Prostaglandinsynthese beschrieben.

## **1.4 Die Regulation der Prostaglandinsynthese**

### **1.4.1 Mechanismen im peripheren, entzündeten Gewebe**

Prostaglandine werden in einer Vielzahl von Organen (Magenschleimhaut, Gefäßendothel, Lungenepithel, Niere) konstitutiv synthetisiert (5, 36). Bei einer Entzündung wie z. B. bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis wandern Immunzellen in die betroffenen Gewebe ein, die durch Sekretion proinflammatorischer Mediatoren sich selbst oder die umliegenden Zellen zur COX-2- und mPGES-1-Expression stimulieren (37). Es kommt nach Gewebeschädigung zunächst zur Freisetzung von Histamin, Bradykinin, ATP und Angiotensin. Im weiteren Verlauf der Entzündung beginnt die Neusynthese von verschiedenen Zytokine wie z.B. Interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), die ihrerseits in Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen die Expression der COX-2 und mPGES-1 induzieren (16). Experimentell werden Zellen meist durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) zur Zytokin- und Prostaglandinsynthese stimuliert.

### **1.4.2 Regulation der Prostaglandinsynthese im Rückenmark**

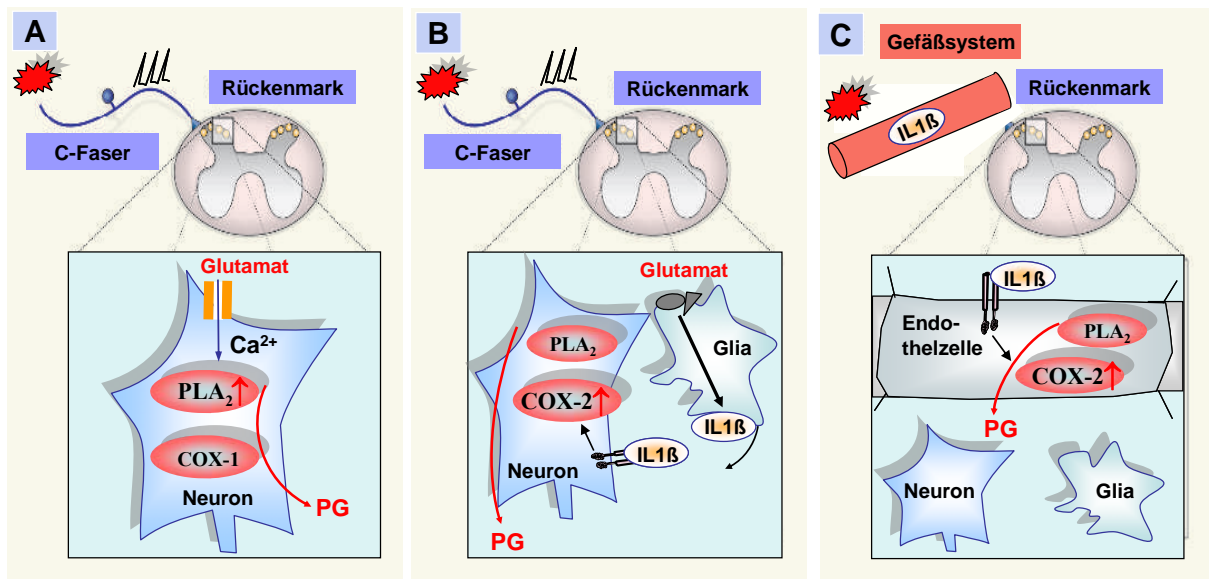
Bei peripheren Entzündungen und pathophysiologischen Schmerzen kann es auch im Rückenmark zur Stimulierung der Prostaglandinsynthese kommen. Für die Übertragung des Signals vom entzündeten Gewebe zum Rückenmark wurden bisher prinzipiell drei verschiedene Mechanismen beschrieben. Entscheidend ist hierbei die Art und Dauer der Entzündung bzw. der Schmerzen.

Im Tierversuch mit Nagern konnte gezeigt werden, dass nach heftigen akuten Schmerzen in der Pfote schon nach relativ kurzer Zeit in Rückenmarksneuronen eine erhöhte Prostaglandinsynthese induziert wird (Abbildung 1-3 A). Beobachtungen, die einen solchen schnellen Mechanismus beschreiben, stammen aus dem Formalinmodell. Wird Formalin in die Pfote injiziert, kommt es zu akutem Schmerz. Die starke Aktivität der primären Schmerzfasern erhöht in Rückenmarksneuronen die cytosolische Calciumkonzentrationen und aktiviert dort die calciumabhängige PLA<sub>2</sub>. Die gebildete AA wird anschließend von den dort konstitutiv exprimierten COX-Isoformen (38) und der cPGES (39) zu PGE<sub>2</sub> metabolisiert. Eine Induktion der COX-2 ist bei diesem Mechanismus nicht notwendig. Durch Mikrodialyse

konnten in der Spinalflüssigkeit etwa 10 Minuten nach der Formalininjektion erhöhte PGE<sub>2</sub> Konzentrationen nachgewiesen werden (40). Etwa 40-50 Minuten nach Formalininjektion ist eine PGE<sub>2</sub>-abhängige zentrale Sensibilisierung zu beobachten, die durch nichtselektive COX-Inhibitoren oder durch genetischen "knockdown" von cPGES signifikant reduziert werden kann (38, 39).

Bei Schmerzmodellen, in denen Schmerzen durch lang anhaltende starke Entzündungen verursacht werden, kann auch durch Induktion der COX-2 Expression in Neuronen die Prostaglandinsynthese aktiviert werden (Abbildung 1-3 B). Die erhöhte neuronale Aktivität (primäre Hyperalgesie) und Glutamatfreisetzung aktivieren Mikroglia und Astrozyten, die daraufhin proinflammatorische Zytokine freisetzen. Die Zytokine induzieren in Rückenmarksneuronen die COX-2-Expression (41). Ein Beispiel hierfür ist die Zymosan- oder die Complete Freund's Adjuvant- (CFA) induzierte Hyperalgesie. In diesen Modellen konnte im Rückenmark eine erhöhte Zytokinsekretion und eine vielfach erhöhte COX-2- und mPGES-1-Expression nachgewiesen werden (41, 42). Die intrathekale Gabe selektiver COX-2-Hemmstoffe oder TNF $\alpha$ -Rezeptor-Antagonisten reduziert im Zymosan- oder CFA-Model die Schmerzen signifikant (43).

Engblom et al. beobachteten im Adjuvant induzierten Arthritismodell oder nach systemischer IL-1 $\beta$ -Injektion, dass die COX-2- und mPGES-1-Expression in Endothelzellen des Hirnstammes induziert wird (44, 45) (Abbildung 1-3 C). Bei diesem Mechanismus wird die COX-2-Expression nicht durch eine erhöhte neuronale Aktivität, sondern durch proinflammatorische Zytokine, die über die Blutzirkulation zum ZNS gelangen, stimuliert. Die Zytokine im Blut binden an ihre Rezeptoren an den Endothelzellen und induzieren dort die COX-2 Expression. Die synthetisierten Prostaglandine werden in das ZNS abgegeben, überwinden so die Bluthirnschranke (BHS) und können im ZNS die Erregbarkeit der Neurone erhöhen (45). Dieser Mechanismus kann eine systemische Entzündung erklären, die z.B. nach LPS Injektion auftritt und mit Fieber verbunden ist (46). Eine lokal begrenzte zentrale Sensibilisierung ist mit der Übertragung über das Gefäßsystem jedoch schwer zu erklären.



**Abbildung 1-3: Hypothesen zur Induktion der Prostaglandinsynthese im Rückenmark**  
 (A) Schnelle Induktion durch erhöhte neuronale Aktivität ohne Veränderung der COX-2 Expression bei Akutschmerz. Durch eine erhöhte Schmerzfaseraktivität werden in Rückenmarksneuronen die cytosolischen Calciumkonzentrationen erhöht. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) und damit zur verstärkten Prostaglandinsynthese. Beispiel für diesen Mechanismus ist der Formalintest (38-40). (B) Neuronale Übertragung mit Induktion der COX-2 Expression. Durch eine erhöhte Schmerzfaseraktivität nach Entzündung (primäre Hyperalgesie) werden nach mehreren Stunden im Rückenmark Gliazellen aktiviert. Diese setzen  $IL1\beta$  frei und induzieren dadurch in Neuronen eine COX-2 Expression und Prostaglandinsynthese. Ein solcher Mechanismus wurde im CFA- oder Zymosanmodell beschrieben (41). (C) COX-2 Induktion in Gefäßendothelzellen. Proinflammatorische Zytokine ( $IL1\beta$ ) gelangen über die Blutzirkulation vom entzündeten Gewebe zum Rückenmark und induzieren dort in Gefäßendothelzellen die COX-2 Expression. Von den Endothelzellen werden anschließend Prostaglandine synthetisiert und in Richtung ZNS abgegeben. Dieser Mechanismus wurde im Adjuvant-induzierten Arthritismodell beschrieben (44, 45).

## 1.5 Die Sensibilisierung der nozizeptiven Transmission durch Prostaglandine

### 1.5.1 Prostaglandinwirkungen am peripheren Nozizeptor

Ein experimentell gut untersuchter Mechanismus zur Schmerzsensibilisierung durch Prostaglandine ist die Modifikation des TRPV-1 Rezeptors (4, 6).  $PGE_2$  und  $PGI_2$  können am Nozizeptor den Prostaglandin E Rezeptor-1 (EP-1), EP-4 oder den Prostacyclin Rezeptor (IP) aktivieren (47, 48). Diese Rezeptoren sind  $G_{\alpha s}$  oder  $G_{\alpha q}$  gekoppelt und induzieren eine durch PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung des TRPV-1- und des Tetrodotoxin-Resistent-Natrium-Kanals (Nav1.8) (49). Hierdurch werden die Aktivierungsschwellen



TRPV-1- oder Nav1.8-Rezeptoren erniedrigt (Abbildung 1-4). Die Beteiligung der EP-1 und IP Rezeptoren an der primären Hyperalgesie wird zusätzlich durch das reduzierte Schmerzverhalten der EP-1<sup>-/-</sup> und IP<sup>-/-</sup> Mäuse im „Writhing-Test“, einem Modell für akuten, visceralen Schmerz, unterstützt (50)

Für den Prostaglandin E Rezeptor-3 (EP-3) existieren verschiedene Spleißformen, die G<sub>αs</sub>- oder G<sub>αi</sub> gekoppelt sein können. Für die G<sub>αs</sub> gekoppelte Spleißform wurde nach LPS Stimulierung eine erhöhte Expression beobachtet. Ob die Aktivierung des EP-3 Rezeptors tatsächlich für die Hyperalgesie mitverantwortlich ist, wurde jedoch noch nicht eindeutig gezeigt und ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar (47).

Nach subkutaner oder intraplantarer Applikation von TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> konnte bisher kein verändertes Schmerzverhalten beobachtet werden (51). Es ist daher unwahrscheinlich, dass deren Rezeptoren (TP, FP, DP) an der Entstehung einer primären Hyperalgesie beteiligt sind.

### **1.5.2 Prostaglandinwirkungen auf die nozizeptive Transmission im Rückenmark**

Für die Potenzierung der synaptischen Übertragung im Rückenmark sind verschiedene Mechanismen möglich. Es kann entweder die Ausschüttung exzitatorischer Transmitter erhöht, die Ausschüttung inhibitorischer Transmitter erniedrigt oder die Erregbarkeit postsynaptischer schmerzprojizierender Neurone sensibilisiert werden. Prostaglandinrezeptoren müssen daher entweder an den Ausläufern der primär afferenten Schmerzfasern oder an Neuronen des dorsalen Horns lokalisiert sein (Tabelle 1-1).

Obwohl nach der intrathekalen Injektion von PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (52), PGF<sub>2α</sub> (53, 54) und PGD<sub>2</sub> (55) eine verstärkte Hyperalgesie beobachtet wurde, konnte bisher nur für PGE<sub>2</sub> der Mechanismus für die Sensibilisierung der synaptischen Transmission im Rückenmark identifiziert werden.

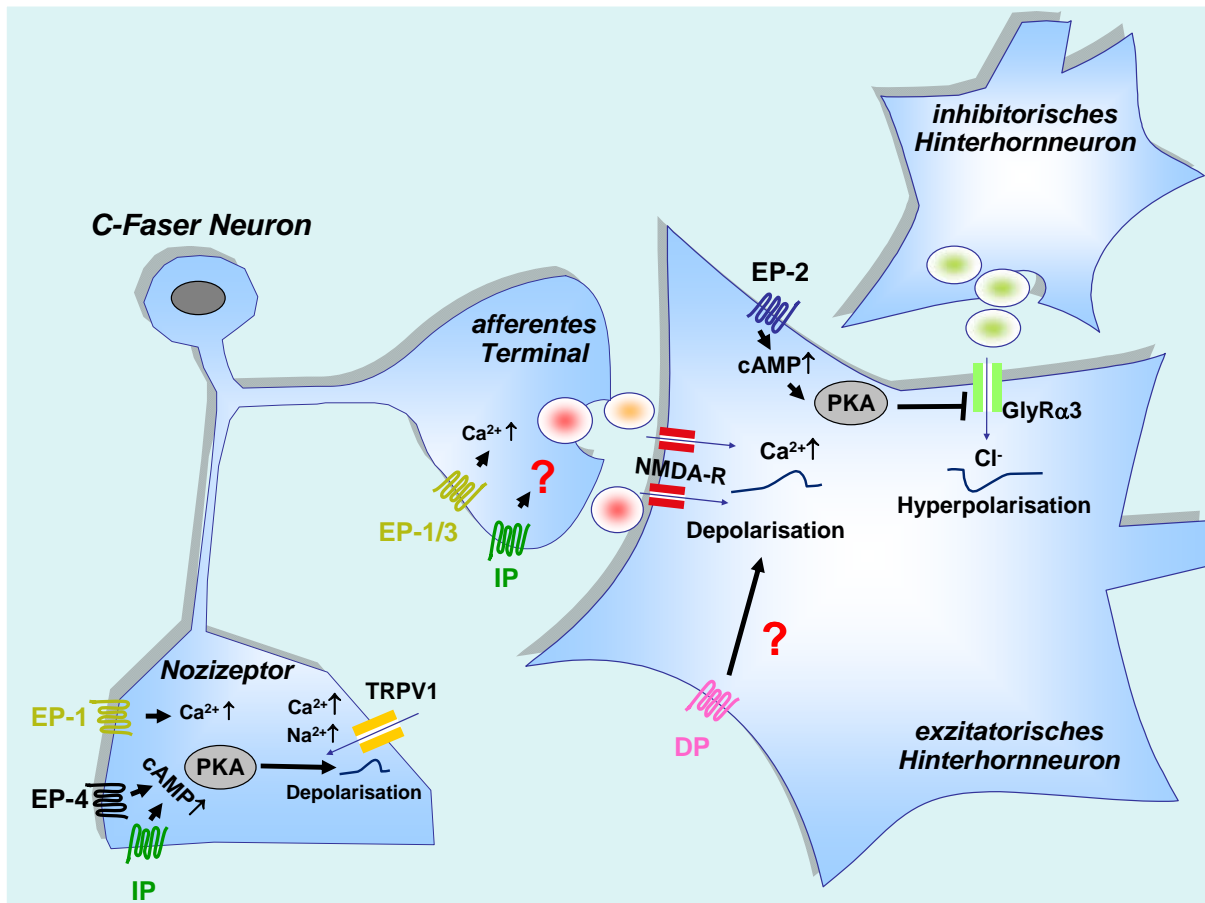
Der Prostaglandin E Rezeptor-2 (EP-2) wird in exzitatorischen Neuronen der Lamina I und II exprimiert. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass dessen Aktivierung eine direkte Depolarisierung der Neurone (56) oder eine Hemmung des Glycinrezeptor Subtyp α3 (GlyRα3) verursacht (57). Glycinionen sind Transmitter inhibitorischer Neurone, die in exzitatorischen Neuronen Chloridkanäle öffnen können und diese hierdurch hyperpolarisieren. Der GlyRα3 wird restriktiv in Neuronen des dorsalen Horns exprimiert und dort nach EP-2 Aktivierung durch PKA phosphoryliert (57). Diese Modifikation reduziert den Chlorideinstrom und dadurch die Hyperpolarisation der exzitatorischen Neurone. Somit wird durch Inhibierung der endogenen Schmerzhemmung durch PGE<sub>2</sub> die nozizeptive Transmission verstärkt.

**Tabelle 1-1:** Die Rolle der Prostaglandinrezeptoren in der nozizeptiven Transmission

(Nach Vanegas et al. (2), Zeilhofer (47) und Lin, et al. (48))

Rezeptor	Signalweg (Effektor)	Expressionsmuster (Nozizeptor oder Rückenmark)	Nozizeptiver Phenotyp (Knockdown, Agonismus, Antagonismus oder Knockout)
EP-1	Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub>	Nozizeptor afferente Ausläufer in Lamina I-II	<u>EP-1<sup>-/-</sup> Mäuse:</u> - reduzierte Nozizeption im Writhing-Test - keine reduzierte Nozizeption im Formalin-Test
EP-2	cAMP↑	Rückenmarksneuronen der Lamina IV-VI und Motoneuronen	<u>EP-2<sup>-/-</sup> Mäuse:</u> - nach i.t. PGE <sub>2</sub> Gabe keine Hyperalgesie - keine reduzierte Nozizeption im Formalin- und im CCI-Model
EP-3	Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub> cAMP↑ cAMP↓	Nozizeptor afferente Ausläufer in Lamina I-II	<u>EP-3<sup>-/-</sup> Mäuse:</u> - nach LPS- Behandlung reduzierte Nozizeption im Writhing-Test - keine reduzierte Nozizeption im Formalin- Test
EP-4	cAMP↑	Nozizeptor	EP-4 Antagonist und ein EP-4 Knockdown reduziert die CFA induzierte Hyperalgesie
IP	cAMP↑ Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub>	Nozizeptor afferente Ausläufer aller Laminae nicht in Rückenmarksneuronen	<u>IP<sup>-/-</sup> Mäuse:</u> - reduzierte Nozizeption im Writhing-Test
FP	Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub>	nicht untersucht	nicht untersucht
DP	cAMP↑	in Rückenmarksneuronen der Sustancia Gelatinosa und Motorneuronen	nicht untersucht
CRTH2 (DP-2)	cAMP↓ Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub>	nicht untersucht	nicht untersucht
TP	cAMP↑ Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub>	nicht untersucht	nicht untersucht

Für EP-1- und EP-3-Rezeptoren wurde eine präsynaptische Lokalisierung in den dorsalen Laminae beschrieben (58). Minami et al. beobachteten, dass  $\text{PGE}_2$  in DRG-Kulturen (also präsynaptisch) über den EP-1/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg die Glutamatfreisetzung verstärkt (59). Dieses Ergebnis konnte jedoch in anderen Studien nicht reproduziert werden (56).



**Abbildung 1-4: Mechanismen der Schmerzsensibilisierung durch Prostaglandine**

Am peripheren Nozizeptor wird durch Aktivierung der EP-1, EP-4 und IP Rezeptoren der Kationeneinstrom durch den TRPV-1 Rezeptor sensibilisiert. Im Rückenmark kann entweder im afferenten Terminal EP-1 oder EP-3 vermittelt die Transmitterausschüttung verstärkt oder im exzitatorischen Hinterhornneuron über EP-2 Rezeptoren die Hyperpolarisation durch GlyRα3 Rezeptoren gehemmt werden. Für IP, DP und FP Rezeptoren sind noch keine Mechanismen im Rückenmark bekannt. Man beobachtete jedoch nach intrathekaler Gabe von  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eine sensibilisierte Nozizeption. Zudem wurde eine Expression der DP Rezeptoren in Rückenmarksneuronen und der IP Rezeptoren in den afferenten Ausläufern beschrieben (2).

IP Rezeptoren wurden durch *in situ* Hybridisierungen im Rückenmark bisher nur in den afferenten Terminalen der äußeren Lamina nachgewiesen (60). Nach Zymosan-Stimulierung wurden erhöhte Konzentrationen der spinalen IP mRNA detektiert (52). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die intrathekale Applikation von Cicaprost (IP-Agonist) die mechanische

Hyperalgesie im Zymosanmodell verstärkt. Für DP Rezeptoren wurde ebenfalls eine neuronale Expression im dorsalen Rückenmark beschrieben (61). FP Rezeptoren wurden bisher im Rückenmark noch nicht untersucht. Obwohl für die pronozizeptive Wirkung von PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> bisher noch keine Mechanismen gefunden wurden, gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass diese Prostaglandine zur Entstehung der zentralen Sensibilisierung beitragen (35).

## **1.6 COX-Inhibitoren**

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) gehören weltweit zu den am meisten verwendeten Arzneimitteln. Ihre Anwendung ist vor allem bei entzündlichen Schmerzen, wie sie bei rheumatoider Arthritis auftreten, indiziert. Vane et al. (62) konnten schon 1971 zeigen, dass ihre Wirkung auf einer Hemmung der COX beruht. Neben den antiphlogistischen, antipyretischen und analgetischen Wirkungen treten bei klassischen NSAIDs wie z.B. Aspirin, Ibuprofen oder Flurbiprofen auch zahlreiche Nebenwirkungen auf. Hierbei ist vor allem ein Verlust der gastrointestinalen Integrität zu nennen, der auf die Hemmung der COX-1 zurückzuführen ist (63). Die Entdeckung der induzierbaren COX-2 um 1988 ermöglichte schließlich eine gezieltere Hemmung der pathophysiologischen Prostaglandinsynthese und führte zur Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren (Coxibe) (64).

Zur Substanzklasse der Coxibe gehören fast ausschließlich diarylheterocyclische Verbindungen von denen einige Vertreter in Tabelle 1-2 zusammengefasst sind. Sie sind allesamt hydrophob und besitzen eine starke Proteinaffinität (65-67). Wie die klassischen NSAIDs Flurbiprofen oder Indomethacin binden sie über Wasserstoffbrücken an das aktive COX-2-Zentrum und verdrängen dort die AA. Durch ihre charakteristische Struktur (diarylheterocyclisch) passen sie sterisch gut in die hydrophobe Seitentasche von COX-2, können aber bei COX-1 nicht bis zum aktiven Zentrum dringen. Bei der Entwicklung dieser Verbindungen wurde auch die COX-1 selektive Substanz SC-560 identifiziert (68). SC-560 findet zwar nicht als Medikament, häufig aber zur experimentellen Analyse von COX-1 Verwendung. Es hemmt gereinigte COX-1 mit einer 600fach niedrigeren Konzentration als gereinigte COX-2.

Für den Wirkmechanismus und die unterschiedlichen Selektivitäten der diarylheterocyclischen Verbindungen wurde bereits ein kinetisches Modell postuliert (69). Hiernach erfolgt die Inhibierung der COX-2 Aktivität in einem dreistufigen Prozess. Im ersten Schritt binden die Substanzen zunächst an die Öffnung der hydrophoben Tasche der COX-2. Im zweiten nähert sich der Inhibitor innerhalb der Tasche an das aktive Zentrum und

inhibiert dort die Cyclooxygenaseaktivität. Die Verbindungen, einschließlich SC-560 unterschieden sich kinetisch in diesen beiden Schritten nicht. Besitzt der Inhibitor ein Phenylsulfonamid- und Phenylsulfonmotiv, kann er in einem dritten Schritt über Wasserstoffbrückenbindung bei COX-2 eine Konformationsveränderung auslösen. Dies führt zur Ausbildung eines festen Inhibitor-Enzym Komplexes. SC-560 besitzt im Vergleich zu Celecoxib und Rofecoxib anstelle des Phenylsulfonmotives ein Methylether, kann mit COX-2 daher keinen festen Inhibitor-Enzym-Komplex bilden, dissoziiert vom Enzym weg und wirkt hierdurch COX-1 selektiv.

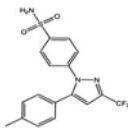
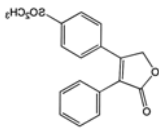
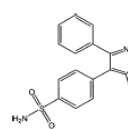
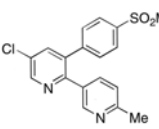
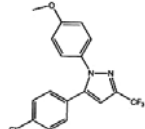
**Kinetisches Modell mit drei Schritten:  $E + I \leftrightarrow [EI] \leftrightarrow [EI^*] \rightarrow [EX]$**

E= Enzym; I= Inhibitor; \*= aktiver Inhibitor-Komplex; [EX] = freies aktives Enzym; entnommen aus Walker et al., 2001 (69)

Tabelle 1-2: Selektive diarylheterocyclische COX-Inhibitoren

(Die  $IC_{50}$  Werte wurden durch *in vitro* Tests ermittelt (siehe angegebenen Publikationen),

\* Quotient aus  $IC_{50}$  (COX-1)/  $IC_{50}$  (COX-2))

Substanz	Celecoxib	Rofecoxib	Valdecoxib	Etoricoxib	SC-560
Struktur					
$IC_{50}$ (COX-1)	6,7 $\mu$ M	18,8 $\mu$ M	26,1 $\mu$ M	116 $\mu$ M	0,009 $\mu$ M
$IC_{50}$ (COX-2)	0,87 $\mu$ M	0,53 $\mu$ M	0,87 $\mu$ M	1,1 $\mu$ M	6,3 $\mu$ M
COX-2 Selektivität *	7,6	35	30	106	0,0014
Referenz	Penning et. al., 1997	Chan et. al., 1999	Talley et. al., 2000	Riendeau et. al., 2001	Smith et. al., 1998

## **1.7 mPGES-1: Ein neues Zielmolekül für die Schmerztherapie?**

Die klinischen Studien CLASS, VIGOR und TARGET zeigten, dass selektive COX-2 Hemmstoffe in Bezug auf die gastrointestinale Toxizität den klassischen NSAIDs deutlich überlegen sind. Gleichzeitig zeigte die VIGOR Studie jedoch, dass die Behandlung mit Rofecoxib bei kardiovaskulär vorbelasteten Patienten thromboembolische Ereignisse begünstigt (70-72). Dies führte zur Rücknahme von Rofecoxib (Vioox™) und Valdecoxib (Bextra™) vom Arzneimittelmarkt. Da die thromboembolischen Ereignisse nicht bei allen COXiben gleichermaßen auftraten (TARGET-Studie), wird noch diskutiert, ob die unerwünschten Begleiterscheinungen durch substanzspezifische Effekte hervorgerufen werden oder ob generell eine selektive COX-2 Hemmung durch Verschiebung des TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> Verhältnisses diese Nebenwirkungen verursacht (73). TXA<sub>2</sub> wirkt pro- und PGI<sub>2</sub> antithrombotisch. Im Gefäßsystem wird TXA<sub>2</sub> hauptsächlich in Thrombozyten von COX-1 und PGI<sub>2</sub> in Endothelzellen von COX-2 synthetisiert. Coxibe könnten im Gegensatz zu unselektiven klassischen NSAIDs auf dieses Prostaglandingleichgewicht ungünstig wirken. In Anbetracht dieser Hypothese wird nun überlegt, ob Rheuma, Fieber und Schmerz durch eine selektive Inhibierung der PGE<sub>2</sub> Synthese auf Ebene der mPGES-1 nebenwirkungsärmer therapiert werden kann.

Zur Validierung dieses Zielproteins wurden mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse in verschiedenen Krankheitsmodellen getestet. Die Tiere entwickelten in der Kollagen induzierten Arthritis signifikant weniger Krankheitssymptome (74, 75) und nach systemischer LPS Gabe kein Fieber (76). Inwieweit jedoch eine mPGES-1 Hemmung zur Reduktion entzündlicher Schmerzen geeignet ist, wurde bisher nur mit dem „Writhing Test“ untersucht. Hier beobachteten zwei Gruppen mit verschiedenen mPGES-1<sup>-/-</sup> Mausstämmen ein reduziertes Schmerzverhalten (74, 75). Es ist jedoch unklar, ob bei dem nozizeptiven Verhalten im „Writhing Test“ eine zentrale Sensibilisierung beteiligt ist. In anderen Schmerzmodellen mit nachgewiesener zentraler Sensibilisierung wurden mPGES-1 Mäuse bisher nicht getestet.

Biochemisch wurde gezeigt, dass mPGES-1-defiziente peritoneale Makrophagen nach LPS Stimulierung verglichen mit Wildtyp-Zellen weniger PGE<sub>2</sub> synthetisieren. Gleichzeitig wurde jedoch in diesen Zellen eine erhöhte TXB<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> Synthese beobachtet (75, 77, 78). Da neben PGE<sub>2</sub> auch andere Prostaglandine pronozizeptiv wirken, wird insbesondere durch einen unvorhersehbaren Shift der Prostaglandinsynthese im Rückenmark die Eignung von mPGES-1 als Zielmolekül für die Schmerztherapie noch diskutiert (35).

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Um die Eignung von mPGES-1 als Zielmolekül für die Schmerztherapie zu beurteilen, sollten in der vorliegenden Arbeit die funktionellen Konsequenzen einer mPGES-1 Hemmung im Rückenmark untersucht werden. Es sollte zunächst die spinale Expression der Cyclooxygenasen und PGE-Synthasen untersucht und durch selektive Inhibitoren sowie mit Hilfe von Knockoutmäusen die biochemische Funktion der COX-Isoformen und der PGE-Synthasen charakterisiert werden. Weiterhin sollten die Folgen einer mPGES-1 Hemmung im Rückenmark auf das gesamte Spektrum der Prostaglandinsynthese und das Verhalten von mPGES-1 Knockoutmäusen in akuten-, inflammatorischen- und neuropathischen Schmerzmodellen charakterisiert werden.

Prostaglandine beeinflussen das Schmerzverhalten u. a. durch Sensibilisierung der synaptischen Transmission im Rückenmark. Um diesbezüglich die Folgen einer Verschiebung des Prostaglandingleichgewichts nach mPGES-1 Hemmung zu beurteilen, sollte die Beeinflussung der Erregbarkeit von Rückenmarksneuronen durch Prostaglandine mittels „Calcium Imaging“ untersucht werden.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Experimente sollte es möglich sein zu beurteilen, wie sich eine Hemmung der spinalen mPGES-1 auf den Eicosanoidmetabolismus, die neuronale Erregbarkeit und das Schmerzverhalten auswirkt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

<b>Substanz:</b>	<b>Hersteller:</b>
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
5-fluoro-3-desoxyuridin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Aceton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Arachidonsäure	Cayman, Ann Arbor, USA
Arachidonsäure [1- <sup>14</sup> C]	Moravek Biochemicals, Brea, USA
Benzen	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Borax	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Calcimycin A23187	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Cicaprost	Schering AG, Berlin
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Cytosine-β-D-arabin-furanosid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
D-AP-5	Tocris, Ellisville, USA
DAPI	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dichlormethan	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Chloroform	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	JT Baker Deventer, Holland
Ethanol 70%	Apotheke, Universitätsklinik Frankfurt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fura-2	Biotium, Hayward, USA
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco, Paisley, Schottland



HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagenase Type CLS VI	Biochrom AG, Berlin
Lipopolysaccharide (e-coli)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Methanol 100%	JT Baker Deventer, Holland
Mineralöl	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NGF 7S	AppliChem, Darmstadt
NMDA	Tocris, Ellisville, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Cayman, Ann Arbor, USA
Penicillin G/Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Pluronic F-127	Biotium, Hayward, USA
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RNAse A	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
SC-560	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
SC-560	Witega, Berlin, Germany
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TNF $\alpha$ (rat)	PeproTech, Umkirch
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Uridin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ubiquitin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

## 2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

B27	Gibco, Paisley, Schottland
Fötiales Kälberserum	Gibco, Paisley, Schottland
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Schottland
Normales Ziegenserum	Chemicon, Billerica, USA
Neurobasal™	Gibco, Paisley, Schottland
RPMI 1640 + GlutaMAX	Gibco, Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Schottland

### 2.3 Puffer und Lösungen

<b>Ponceau Färbelösung</b> 0.5 % w/v Ponceau S 3 % Eissessig	<b>TN Puffer</b> 50 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl
<b>Laemmli-Puffer 4 x</b> 100 mM Tris pH 7,8 5 % SDS 40 % Glycerol 0,06 % Bromphenolblau 5 % Mercaptoethanol	<b>TNT Puffer</b> 50 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl 0.1 % Tween 20
<b>SDS PAGE Laufpuffer</b> 25 mM Tris pH 8.3 200 mM Glyzin 0.1 % (w/v) SDS	<b>SDS PAGE Transferpuffer</b> 50 mM Tris pH 8.3 190 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol
<b>Extrazelluläre Lösung (pH 7,2)</b> 136 mM NaCl 5,4 mM KCL 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM HEPES 10 mM Glukose	<b>Boratpuffer (pH 8,5)</b> 50 mM Borsäure 23,6 mM Borax
<b>Phospholämmli</b> ¼ Endvolumen 4x Lämmli 5 mM NaPyrophosphat 10 mM NaF 5 mM aktiviertes Na-ortho-Vanadat 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 mM EDTA	<b>aktiviertes Na-ortho-Vanadat</b> 200 mM Na-ortho-Vanadat (pH 10) mehrfach aufkochen bis die Flüssigkeit klar bleibt

## 2.4 Antikörper

Antigen	Verdünnung			Hersteller	Peptidsequenzen
	IF	WB	MELK		
COX-1	1:50	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA	
COX-2	1:50	1:1000		Cayman, Ann Arbor, USA	
cPGES	1:50	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA	
mPGES-1	1:50	1:1000		Agrisera, Vännäs, Schweden	
mPGES-2	1:50	1:500		Cayman, Ann Arbor, USA	
CGRP			8 µg/ml	Sigma, Deisenhofen	
IB-4			1:100	Sigma, Deisenhofen	
GFAP	1: 800		1:100	Sigma, Deisenhofen	
NeuN	1:1000		1:200	Chemicon, Temecula, USA	
HSP-70		1:4000		BD Biosciences, Heidelberg	
ERK-2		1:2000		Promega, Madison, USA	
NF-200			1:100	Sigma, Deisenhofen	
IP	1:50			Eurogentech, Seraing, Belgien	RNLTYVRGSVG PAT
DP	1:50			Eurogentech, Seraing, Belgien	RYRSRCSNSTNMESSL
FP	1:50			Eurogentech, Seraing, Belgien	SPAAALLSNTTCQTEN
EP-2			1:100	Eurogentech, Seraing, Belgien	
IBA			1:100	Wako Chem, Richmond, USA	

## 2.5 Versuchstiere

Tiere	Hersteller
Sprague Dawley Ratten	Charles River, Wiga oder Javier, Le Genest-St-ISLE, Frankreich
CFW Mäuse	Charles River, Wiga
C578BL/6 Mäuse	Charles River, Wiga
COX-1 <sup>-/-</sup> (BL/6) Mäuse	Freundliche Gabe von Rolf Nüsing
mPGES-1 <sup>-/-</sup> (CFW) Mäuse	Freundliche Gabe von Aventis, Bridgewater

## 2.6 Genotypisierung

### 2.6.1 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde mit dem MiniPrep Kit (Preqlab, Erlangen) aus Mäuseschwänzen oder embryonalem Gewebe nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt.

### 2.6.2 PCR

Genotypisierung der COX-1<sup>-/-</sup> Mäuse:

#### 1x PCR Ansatz:

1 µg DNA  
 2 µl 10x PCR Puffer  
 2 µl 2 mM dNTP  
 je 1 µl 10 µM forward-Primer  
 je 1 µl 10 µM reverse-Primer  
 je 1 µl 10 µM Neo-Primer  
 1 µl Tag Pol (Peqlab, Erlangen)  
 add. 20 µl dest. H<sub>2</sub>O

#### PCR Programm:

95 °C	5 Minuten	} 35x
95 °C	30 Sekunden	
58 °C	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	

#### Fragmentgrößen:

WT= 601 bp  
 KO= 664 bp

Genotypisierung der mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse:

Primername	Sequenz
PGES2-F5	CCTGGTTCTCACGCTCTTTC
PGES2-R5	GAACGTA CTTCTTCCGCAGC
3193	CGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC

#### 1x PCR Ansatz:

1 µg DNA  
 2,5 µl 10x PCR Puffer  
 0,5 µl 10 mM dNTP  
 je 1 µl der 10 µM Primerlösung  
 0,5 µl Tag Pol (Peqlab, Erlangen)  
 add. 25 µl mit dest. H<sub>2</sub>O

**PCR Programm:**

94 °C	3 Minuten	} 40x
94 °C	30 Sekunden	
60 °C	30 Sekunden	
72 °C	90 Sekunden	
72 °C	7 Minuten	

**Fragmentgrößen:**

WT= 517 bp

KO= 680 bp

**2.6.3 Agarose Gelelektrophorese**

Die DNA Fragmente wurden mit 2,5 % Agarose/TAE Gelen bei 5 V/cm aufgetrennt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV Licht (365nm) sichtbar gemacht, digital aufgenommen und mit dem DNA Größenmarker 100 kB Ladder (Peqlab, Erlangen) verglichen.

**2.7 Zellbiologische Methoden****2.7.1 Gewinnung peritonealer Makrophagen**

Zur Gewinnung peritonealer Makrophagen wurden vier adulten weiblichen Mäusen je 0,5 ml einer 10 % Thioglycollate/PBS (Sigma, St. Louis, USA) Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 4 Tagen wurden die Tiere getötet und die Haut vom Abdomen entfernt. Anschließend wurden 5 ml HBSS (ohne Calcium und Magnesium mit 0,01 % EDTA) (Sigma, St. Louis, USA) mit einer 27-Gaugenadel in die Bauchhöhle injiziert. Zum Ablösen der Zellen wurden die Tiere geschüttelt und das HBSS (mit den abgelösten Zellen) mit einer 21-Gaugenadel herausgesaugt und auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1000x g, 5 Minuten) und je zweimal mit HBSS und Medium (RPMI 1640 mit 1 % FCS, 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin) gewaschen. Das Sediment wurde in Medium resuspendiert und 500000 Zellen/ 3,5 cm Schale ausplattiert. Nach 4 Stunden Inkubation wurde das Medium mit serumfreiem Medium ausgetauscht und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Stimulierung erfolgte für 15 Stunden in serumfreiem RPMI Medium.

**2.7.2 Isolierung primär embryonaler Rückenmarkskulturen (Glia und Neurone)**

Am Vortag der Tierpräparation wurden sterile Kulturschalen oder Deckgläser für 2 Stunden in 1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma, St. Louis, USA) in Boratpuffer bei RT inkubiert,

anschließend dreimal mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Hierauf wurden die Zellen anschließend ausplattiert.

Zur Zellgewinnung wurde das ganze Rückenmark von Mäuse- oder Rattenembryonen 17 Tage *post coitus* präpariert und in eiskaltes HBSS (Sigma, St. Louis, USA) mit MgCl<sub>2</sub> transferiert. Das Gewebe wurde für 25 Minuten in Trypsin/EDTA (Sigma, St. Louis, USA) und für 30 Minuten in Kollagenase/Medium (500 U/ml, Biochrom AG) inkubiert. Es folgte eine mechanische Separierung durch Pipettieren mit einer 1 ml Gilsonpipette. Die Zellsuspension wurde in Poly-Lysin beschichteten Kulturschalen ausplattiert und für 2-4 Stunden in Neurobasal Medium mit B-27 Supplementen, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen in Neurobasal Medium mit B-27 Supplementen, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin und 0,01 µg/ml murinem Nervenwachstumsfaktor (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 6 Tage inkubiert. Die Stimulierung erfolgte in serumfreiem Neurobasalmedium mit B-27 Supplementen, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

### **2.7.3 Gewinnung von neuronengereicherten Rückenmarkskulturen**

Zur Gewinnung der neuronengereicherten Rückenmarkskulturen wurde bis zum 2. Tag nach dem Ausplattieren der Zellen das gleiche Protokoll wie zur Gewinnung von Rückenmarkskulturen durchgeführt. Dann wurde die Kultur, um die Teilung von Astrozyten und Mikroglia zu minimieren, mit serumfreiem Neurobasalmedium und 10 µM Uridin, 1 µM Cytosin-β-D-Arabino-Furanosid und 10 µM 5-Fluoro-3-Desoxyuridin (Sigma, St. Louis, MO) für weitere 3 Tage inkubiert. Die Stimulierung erfolgte in serumfreiem Neurobasalmedium mit B-27 Supplementen, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

### **2.7.4 Gewinnung primärer Rückenmarksastrozyten (neuronenfreie Rückenmarkskulturen)**

Zur Gewinnung der Astrozytenkulturen wurde bis zum Ausplattieren der Zellen das gleiche Protokoll wie zur Gewinnung von Rückenmarkskulturen durchgeführt. Die primären Rückenmarkszellen wurden dann zur Anreicherung der Astrozyten in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Kulturschalen variabler Größe kultiviert. Um zu gewährleisten, dass die Kultur nahezu keine Neurone

enthält, wurden die Zellen 2-3mal passagiert. Da sie keine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen, wurde eine längere Kultivierung vermieden. Sollte eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden, wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Stimulierung der Zellen erfolgte nach Waschen der Zellen in serumfreiem RPMI 1640 Medium.

### **2.7.5 Isolierung und Stimulierung von Thrombozyten aus humanem Blut**

Zur Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma wurden 20 ml humanes Blut für 20 Minuten bei 300x g zentrifugiert. Das Plasma im Überstand wurde erneut bei 1000x g zentrifugiert und das Sediment in 4 ml RPMI 1640 + GlutaMAX mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin resuspendiert.  $7 \times 10^5$  Zellen wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen für 5 Minuten vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,25 mg/ml Arachidonsäure (Endkonzentration) gestartet und durch Zugabe von 400 µl 1 % Ameisensäure/Chloroform gestoppt. Das synthetisierte TXB<sub>2</sub> wurde nach Extraktion und Evaporation unter Stickstoff in Testpuffer resuspendiert und durch ELISA quantifiziert.

### **2.7.6 Isolierung und Stimulierung von Monozyten aus humanem Blut**

Monozyten wurden mit dem CPT Vacutainersystem (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers isoliert.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in 24-Well Platten ausplattiert und für 4 Stunden in RPMI 1640 + GlutaMAX, mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin inkubiert. Das Medium wurde anschließend mit serumfreiem Medium inklusive 1 µg/ml LPS und den Inhibitorkonzentrationen ausgetauscht und zur PGE<sub>2</sub> Synthese für weitere 22 Stunden inkubiert. Das PGE<sub>2</sub> wurde durch ELISA direkt aus dem Medium bestimmt.

### **2.7.7 Vollbluttest**

Zur Bestimmung der COX-1 vermittelten TXB<sub>2</sub> Produktion wurde frisches humanes Blut ohne Zusatz von Gerinnungshemmern mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (79). Die geronnenen Blutproben wurden anschließend für 5 Minuten bei 10000x g zentrifugiert und das TXB<sub>2</sub> aus dem Überstand durch ELISA bestimmt. Zur Bestimmung der COX-2 vermittelten PGE<sub>2</sub> Synthese wurde frisch heparinisiertes Blut mit 100 µg/ml LPS und den angegebenen Inhibitorkonzentrationen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer 24-Well Platte inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 10000x g zentrifugiert und das PGE<sub>2</sub> durch ELISA aus dem Überstand bestimmt.

### **2.7.8 Kultivierung von RAW 264.7 Makrophagen**

Die RAW 264.7 Makrophagen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Kulturschalen variabler Größe kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit Medium gewaschen, mit dem Zellschaber in Suspension gebracht, in Medium verdünnt und auf mehrere neue Schalen verteilt.

### **2.7.9 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Primäre Astrozytenkulturen oder RAW 264.7 Zellen wurden durch Trypsinisierung geerntet, mit Medium gewaschen und durch Zentrifugation (300x g; 5 Minuten) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in Einfriermedium (RPMI 1640; 50 % FCS; 20 % DMSO) suspendiert, gedrittelt, in Kryogefäße überführt und diese in einer Isopropanolumgebung langsam auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung der Kryogefäße erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C kurz angewärmt, die Zellsuspension in Standardmedium 1:15 verdünnt und auf eine 10 cm Ø Zellkulturschale ausplattiert.

## **2.8 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.8.1 Isolierung der mikrosomalen Proteinfraktion**

Das Gewebe wurde in PBS mit 0,25 M Saccharose und 1 M Phenylmethansulfonylfluorid (Sigma, St. Louis, MO) durch Pottern und Sonifizierung homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 Minuten bei 1000x g und der Überstand für 15 Minuten bei 10000x g zentrifugiert. Um die mikrosomalen Vesikel zu Sedimentieren wurde dieser Überstand für 1 Stunde bei 170000x g ultrazentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert, mit Lämmli-puffer versetzt und für die SDS-PAGE verwendet.

### **2.8.2 Detektion phosphorylierter Proteine**

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der Proteine wurde die Rückenmarkszellen nach Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und sofort in 100 °C warmem Phospholämmli lysiert, die Proben für 5 Minuten bei 100 °C gekocht und bis zur SDS-PAGE Analyse bei -80 °C aufbewahrt.



### **2.8.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Herstellung der Gesamtproteinlysate wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, in kochendem 1x Lämmli-puffer geerntet und anschließend für 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS PAGE. Nach Gießen von Trenngel (8 % bis 15 % Acrylamid) und Sammelgel (6 %) wurden 15-30 µg Protein pro Tasche und ein PeqGold Molekulargewichtsmarker (Peqlab, Erlangen) aufgetragen. Die wurden Proteine bei 120 Volt ca. 90 Minuten in Laufpuffer getrennt.

### **2.8.4 Immunoblot-Analyse (Western Blot)**

Einzelne Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer in einer „Wet-Blotting“ Apparatur (BioRad, München) bei konstanter Spannung von 100 Volt für 80 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Protran) (Whatman, Brentford, UK) übertragen. Die Membran wurde anschließend für 5 Minuten in Ponceau Lösung gefärbt, mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und das Bandenmuster dokumentiert. Nun wurde die Membran zur parallelen Analyse verschiedener Proteine in mehrere Teile geschnitten. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu minimieren, wurden die Membranteile für 1 Stunde in TNT Puffer mit 5 % Milchpulver blockiert. Der Erstantikörper wurde in TNT + 5 % Milchpulver verdünnt und für 2 Stunden bei RT oder 15 Stunden bei 4 °C mit der Membran, in einer Polyvinyl Folie eingeschweißt, inkubiert. Nach 3maligen Waschen für jeweils 5 Minuten mit TNT folgte 1 Stunde Inkubation bei RT mit dem Merettich(HRP)-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:5000 in TNT + 5 % Milchpulver). Ungebundene sekundäre Antikörper wurden anschließend durch 3maliges Waschen mit TNT entfernt und die Membran mit der HRP-Substratlösung Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA) betropft. Die Lumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm (Pierce, Rockford, USA) detektiert. Jeder Western Blot wurde mindestens einmal wiederholt.

## **2.9 Immunochemische Methoden**

### **2.9.1 Immunozytochemie**

Die Proteinlokalisierung in bestimmten Zelltypen bzw. deren Ko-Lokalisation wurde durch Immunozytochemie analysiert. Hierzu wurden über 7 Tage kultivierte und mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  stimulierte Rückenmarkszellkulturen verwendet, die auf Poly-Lysin beschichteten

Deckgläsern (Marienfeld, Lauda Königshofen) wuchsen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4 % PFA in PBS und zur Permeabilisierung für 10 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 in TNT Puffer inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 1 Stunde mit 3 % BSA in TNT blockiert. Es folgte 1 Stunde Inkubation mit dem Primärantikörper in 1 % BSA. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde der gebundene Primärantikörper durch 1 Stunde Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, detektiert. Die Signale wurden mit einer Kappa DX20H Kamera (Kappa, Gleichen) an einem Nikon Eclipse® E600 Mikroskop (Objektiv 20x) (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

### **2.9.2 Immunohistochemie**

Zur Gewinnung des Rückenmarkgewebes wurden die Mäuse nach Tötung durch CO<sub>2</sub> zunächst fixiert. Hierzu wurden in den linken Ventrikel erst 20 ml 0,1 M NaCl und dann 200 ml 4 % PFA/ PBS (pH 7,4) perfundiert. Dabei wurde zum Ausfluss das rechte Atrium geöffnet. Das Rückenmark wurde dann aus den fixierten Mäusen präpariert und der Lumbalteil des Rückenmarks anschließend für 45 Minuten in 4 % PFA/ PBS (pH 7,4) für 1 Stunde in 10 % Sacharose, für 24 Stunden in 20 % Sacharose und für weitere 24 Stunden in 30 % Sacharose inkubiert. Das Gewebe wurde dann in Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Instruments, Nussloch) eingebettet und bis zum Schneiden bei -80 °C gelagert. 10-15 µm dünne Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Erzielung einer guten Antigenzugänglichkeit wurden die Schnitte nach dreimaligen Waschen mit PBS für 10 Minuten mit 0,1 % Triton X-100/ PBS permeabilisiert und zweimal für 5 Minuten mit 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0) bei 240 Watt in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurde das Gewebe für 1 Stunde bei RT mit 3 % BSA/ PBS und 10 % Ziegenserum/ PBS blockiert. Der Erstantikörper wurde in 3 % BSA/ PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit den Fluoreszenzmarker-gekoppelten Sekundärantikörpern in 3 % BSA/ PBS für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) unter einem Deckglas (Marienfeld, Lauda Königshofen) eingebettet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer Kappa DX20H Kamera (Kappa, Gleichen) an einem Nikon Eclipse® E600 Mikroskop (Objektiv 20x) (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

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

Bei der MELK können eine große Anzahl verschiedener Proteine auf Gewebeschnitten oder kultivierten Zellen parallel detektiert werden. Hierzu werden direkt FITC markierte Antikörper mit dem Gewebe bzw. den Zellen inkubiert, die Signale mit einer Kamera aufgenommen und anschließend das Fluoreszenzsignal durch Lichteinwirkung ausgebleicht. Diese Prozedur kann mit beliebig vielen verschiedenen Antikörpern wiederholt werden. Durch die Subtraktion der Signale, die vor jeder neuen Antikörperinkubation aufgenommen werden, wird zusätzlich der Hintergrund reduziert. Die Fluoreszenzbilder werden durch die Einstellung unterschiedlicher Schwellenwerte bearbeitet, in Falschfarben dargestellt und übereinander gelegt.

#### **2.9.3.1 Markierung der Antikörper mit FITC**

Zur Markierung mit FITC mussten die Antikörper falls notwendig von prim. Amin, Glycin, Tris-Base oder anderen Proteinen (BSA) befreit werden. Die gereinigten Antikörper wurden dann für 1 Stunde bei RT mit 81 µg Fluorescein (Invitrogen, Carlsbad, USA) pro mg Protein inkubiert und anschließend das ungebundene Fluorescein durch Gelfiltration von den markierten Antikörpern getrennt. Hierzu wurden Chromatographie-Säulen (Bio Rad, Hercules, USA) zunächst mit 60 mg Sephadex G-50 (GE Healthcare, München) in 2,3 ml PBS befüllt und bei 1100x g für 3 Minuten zentrifugiert. Auf die Säulen wurde die Antikörperlösung aufgetragen und erneut für 5 Minuten bei 1100x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit den angegebenen Verdünnungen (2.4) zur Inkubation in dem MELK-Roboter verwendet.

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

Zur Färbung von Gewebeschnitten mit dem MELK-Roboter wurde das Rückenmark aus BL/6 Wildtypmäusen präpariert, mit einem Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und diese für 10 Minuten bei -20 °C mit Aceton fixiert. Rückenmarkszellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert (2.7.2) und mit 4 % PFA/ PBS fixiert. Die Permeabilisierung des Gewebes oder der Zellen erfolgte für 10 Minuten in 0,1 % Triton X 100/ PBS und die Blockierung für 30 Minuten in 10 % Ziegen Serum/ PBS. Anschließend wurde das Gewebe bzw. die Zellen auf ein Gestell im invertierten Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop des MELK-Systems (MelTec, Magdeburg) transferiert. Die Antikörper und Waschlösungen werden hier automatisch zu- und abgeführt.

Nach jeder Inkubation mit den markierten Antikörpern (für 15 Minuten in 1 % BSA/ PBS) wurde ein Phasenkontrastbild und ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden dann durch Lichteinwirkung mit der Anregungswellenlänge gebleicht und der Zyklus mit der Antikörperinkubation wiederholt. Die Bedienung des MELK-Roboters wurde von Frau Wiebke Becker durchgeführt.

## **2.10 Vergleich der zellulären und zellfreien Metabolisierung von Arachidonsäure [1-<sup>14</sup>C]**

### **2.10.1 Metabolische Markierung mit Arachidonsäure [1-<sup>14</sup>C]**

Zur metabolischen Markierung wurden Rückenmarkskulturen oder 264.7 RAW-Makrophagen für 8 Stunden mit 1  $\mu$ M radioaktiver Arachidonsäure [1-<sup>14</sup>C] (Moravek Biochemicals, Brea, USA) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit Zellkulturmedium gewaschen und mit 5  $\mu$ M LPS und den angegebenen Inhibitorkonzentrationen für 15 Stunden inkubiert. Danach wurden die Prostaglandine aus dem Medium mit gleichem Volumen 1 % Ameisensäure/Chloroform extrahiert.

### **2.10.2 Zellfreie Prostaglandinsynthese mit Zellextrakten**

Zur zellfreien Prostaglandinsynthese wurden 264.7 RAW-Makrophagen für 15 Stunden mit 5  $\mu$ g/ml LPS vorstimuliert. Die Zellen wurden anschließend in 0,1 M Tris-HCL (pH 7,5) durch Behandlung mit Ultraschall homogenisiert. Die Reaktionslösung bestand aus 100  $\mu$ l einer 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l Proteinlösung mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen. Die Reaktion wurde mit 5  $\mu$ M Arachidonsäure [1-<sup>14</sup>C] gestartet. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit dem 4fachen Volumen 1 % Ameisensäure/Chloroform gestoppt und die Prostaglandine zur Dünnschichtchromatographie-(DSC)-Analyse extrahiert.

## **2.11 Analytik der Prostaglandine**

### **2.11.1 Dünnschichtchromatographie (DSC)**

Die Auftrennung und Visualisierung der radioaktiv markierten Prostaglandine aus den Versuchen 2.10 erfolgte über eine DSC. Hierzu wurden die Prostaglandine nach Ablauf der Reaktion mit dem 4-fachen Volumen 1 % Ameisensäure/Chloroform aus dem Zellkulturmedium (zellbasiert) oder dem Lysat (zellfrei) extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde unter Stickstoff bei 45 °C verdampft, das Sediment in 50  $\mu$ l Chloroform

resuspendiert und auf eine ALUGRAM SIL G/UV Silicagel 60 Platte (Macherey Nagel, Düren) quantitativ aufgetropft. Die Lipide wurden dann in einer Trennkammer mit dem Laufmittel Benzen/Dichlormethan/Essigsäure (70/35/1.75) (Roth, Karlsruhe, Germany) bei 4 °C getrennt und mit einem PhosphorImager BAS-1500 (Fuji-Film, Vienna, Austria) visualisiert. Die Identifizierung der einzelnen Prostaglandine erfolgte durch Vergleich mit den Laufeigenschaften der reinen Substanzen (Cayman, Ann Arbor, USA).

### **2.11.2 ELISA**

TXB<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> wurden mit den kommerziell erhältlichen Enzyme-Immunoassay Kits (Assay Designe, Ann Arbor, USA) nach Angaben des Herstellers detektiert.

TNF $\alpha$  wurde mit dem Quantikine Kit für Ratten TNF $\alpha$  (R&D System, Wiesbaden-Nordenstadt) nach Angaben des Herstellers detektiert.

### **2.11.3 LC-MS/MS**

Die Extraktion und Instrumentalisierung der LC-MS/MS Analyse wurde von Herrn Dr. Ronald Schmidt und Herrn Carlo Angioni durchgeführt. Im ersten Experiment wurde versucht, 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, 11-dh-TXB<sub>2</sub>, 13,14dh-15k-PGE<sub>2</sub>, 13,14dh-15k-PGD<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>, Delta12-PGJ<sub>2</sub>, 15d-PGD<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> zu detektieren. Da aber nur 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> in ausreichenden Mengen detektiert werden konnten, wurde bei den weiteren Versuchen die Analyse auf diese Substanzen beschränkt. Für die Zellkulturversuche wurden die Prostaglandine direkt aus dem Medium extrahiert. Rückenmarksgewebe wurde nach der Präparation sofort in flüssigem Stickstoff gefroren, zur Analytik in PBS aufgetaut, gleich danach homogenisiert und die Prostaglandine mit Etylacetat extrahiert. Zur genauen Beschreibung der Instrumentalisierung siehe Schmidt et al., 2005.

## **2.12 Calcium Imaging**

Zur Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentrationen in Echtzeit wurden Neurone aus 3-7 Tage alten Rückenmarkskulturen verwendet. Als Calciumsensor diente der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM (Biotium, Hayward, USA). Dieser kann über die Zellmembran in das Zytosol diffundieren und entweicht nach Abspaltung des Esters nicht mehr aus der Zelle. Bei diesem Farbstoff erhöht sich bei Bindung von Calcium die Emission nach Anregung mit 340 nm und erniedrigt sich bei Anregung mit 380 nm. Nach Berechnung

des Quotienten der beiden Emissionswerte kann die Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration im Zeitverlauf dargestellt werden.

Die Beladung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM (Biotium, Hayward, USA) für 45 Minuten bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ . Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in die Perfusionskammer (ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) auf einem Mikroskopstativ Axioskop 2 FS plus (Carl Zeiss Göttingen) überführt. Die extrazelluläre Lösung wurde von 50 ml-Spritzen (Dispomed, Gelnhausen) über einen Infusomat (Braun, Kronberg) mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa einem Tropfen/Sekunde in die Kammer geleitet und am anderen Ende abgesaugt. Zur Stimulierung wurden 100  $\mu\text{M}$  NMDA oder 50 mM KCL entweder als Badapplikation von den gleichen Spritzen wie die extrazelluläre Lösung oder als Luftstoßapplikation mit einem Ventilkontrollsystem (ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) direkt auf die gemessenen Zellen appliziert. Die Anregung der Zellen erfolgte mit abwechselnd 340 nm und 380 nm von einem Polychrom IV Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing) und wurde mit der Software Tillvision (Till Photonics, Gräfelfing) gesteuert. Die Emission wurde bei Betrachtung durch ein 40x Wasserobjektiv (Carl Zeiss Göttingen) und Filterung mit dem Fura-2 Filtersatz Typ LP 440 (Till Photonics, Gräfelfing) durch die Interline Transfer CCD Kamera IMAGO Type super-VGA (Till Photonics, Gräfelfing) aufgenommen. Die Kamera machte alle 2 Sekunden eine Aufnahme der Emission nach 340 nm und 380 nm Anregung. Zur Auswertung wurden mit der Software Tillvision (Till Photonics, Gräfelfing) einzelne Zellen ausgewählt, mit Microsoft Excel der Quotient der Emission der Anregungen 340 nm/380 nm errechnet und als Funktion über die Zeit dargestellt. Um die Effekte der Testsubstanzen (Prostaglandine) zu beurteilen, wurden die gleichen Zellen jeweils bei Ab- und Anwesenheit der Substanz mit NMDA stimuliert. Die Höhe der Calciumeinströme mit Testsubstanz wurde anschließend mit dem Mittelwert der Kontrollstimulationen verglichen und prozentual dargestellt.

## **2.13 Tiermodelle**

### **2.13.1 Versuchstiere**

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur  $22 \pm 0,5$  °C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt. Bei der Beurteilung des Verhaltens war der Beobachter unwissend über Genotyp oder Behandlung.

Als Wildtypkontrolle wurden Tiere gleichen Geschlechts, etwa dem gleichen Alter und dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet.

### **2.13.2 Hanging-Wire Test**

Zur Analyse der motorischen Fähigkeiten im Hanging-Wire Test wurden die Tiere für 5 Sekunden auf die Mitte eines Käfiggitters gesetzt. Anschließend wurde das Gitter langsam um 180 ° invertiert, in 30 cm Höhe über einem mit Streu gefüllten Käfig gehalten und die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gestoppt. Hielten sich die Tiere länger als 90 Sekunden wurde das Experiment gestoppt und 90 als Maximalwert verwendet. Das Experiment wurde für jedes Tier dreimal wiederholt.

### **2.13.3 Pole Test**

Zur Analyse der motorischen Fähigkeiten im Pole Test wurden die Tiere für 5 Sekunden auf einen waagerechten Stab mit 3 cm Durchmesser gesetzt. Anschließend wurde der Stab senkrecht gestellt, in 30 cm Höhe über einem mit Streu gefüllten Käfig gehalten und Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gestoppt. Hielten sich die Tiere länger als 90 Sekunden, wurde das Experiment gestoppt und 90 als Maximalwert verwendet. Das Experiment wurde für jedes Tier dreimal wiederholt.

### **2.13.4 Tailflick Test**

Zur Analyse des akuten Schmerzes im Tailflick Test wurde der mittlere Teil des Mäuseschwanzes mit einem Infrarotlaser (IR 40) bestrahlt und die Zeit bis zum reflexartigen Wegziehen des Schwanzes automatisch mit dem Plantar Test 7371 (Ugo Basile, Comerio VA, Italy) bestimmt. Zeigten die Tiere nach 20 Sekunden keine Reaktion wurde das Experiment gestoppt und 20 als Maximalwert verwendet. Das Experiment wurde für jedes Tier dreimal wiederholt.

### **2.13.5 Hot-Plate Test**

Der Hot-Plate Test wurde von Herrn Dr. Ovidiu Coste wie in Tegeder et al. beschrieben durchgeführt (80). Die Auswertung und Auswahl der Tiere erfolgte durch eigene Arbeit.

### **2.13.6 Writhing Test**

Der Writhing Test wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (74). Es wurden pro Gramm Körpergewicht 16 µl einer 0,7 % Essigsäure/PBS Lösung intraperitoneal injiziert und anschließend über 20 Minuten die Streckungen („writhes“) der Tiere gezählt. Als Schmerzverhalten wurde die krampfartige Streckung des Rumpfes mit gleichzeitigem Spreizen der Hinterpfoten definiert.

### **2.13.7 Spared-Nerve-Injury (SNI)**

Die Tiere wurden von Herrn Dr. Ovidiu Coste wie in Decosterd et al. beschrieben operiert und die mechanische Allodynie wie unter Zymosan Test (2.13.9) ermittelt (81). Die Auswertung und Auswahl der Tiere erfolgte in eigener Arbeit.

### **2.13.8 Formalin Test**

Der Formalin Test wurde von Herrn Dr. Ovidiu Coste wie in Hofacker et al. beschrieben durchgeführt (39). Die Auswertung und Auswahl der Tiere erfolgte durch eigene Arbeit.

### **2.13.9 Zymosan-induzierte mechanische Hyperalgesie**

Zunächst wurde die Basisempfindlichkeit ohne Entzündung ermittelt. Hierzu wurden die Tiere, sitzend auf einem Metallgitter, an beiden Hinterpfoten mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Comerio VA, Italy) mechanisch stimuliert. Die Apparatur erzeugt einen sich konstant erhöhenden Druck, stoppt beim Wegziehen der Pfote und speichert den Wert des erzeugten Druckes. Am nächsten Tag wurden 20 µl Zymosan A (12,5 mg/ml in PBS) (Sigma, Deisenhofen, Germany) subkutan in die Unterseite der linken Hinterpfote injiziert. 10 mg/kg Etoricoxib (20 µg/µl in DMSO) wurde 4 Stunden und 6 Stunden nach der Zymosaninjektion intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere bekamen zu den gleichen Zeitpunkten DMSO. Die mechanischen Schwellen der behandelten Tiere wurden zwischen 4 Stunden und 10 Stunden abwechselnd am rechten und linken Fuß ermittelt. Die Daten wurden jeweils in Intervallen zu 2 Stunden zusammengefasst und 5 g als Maximalwert verwendet.

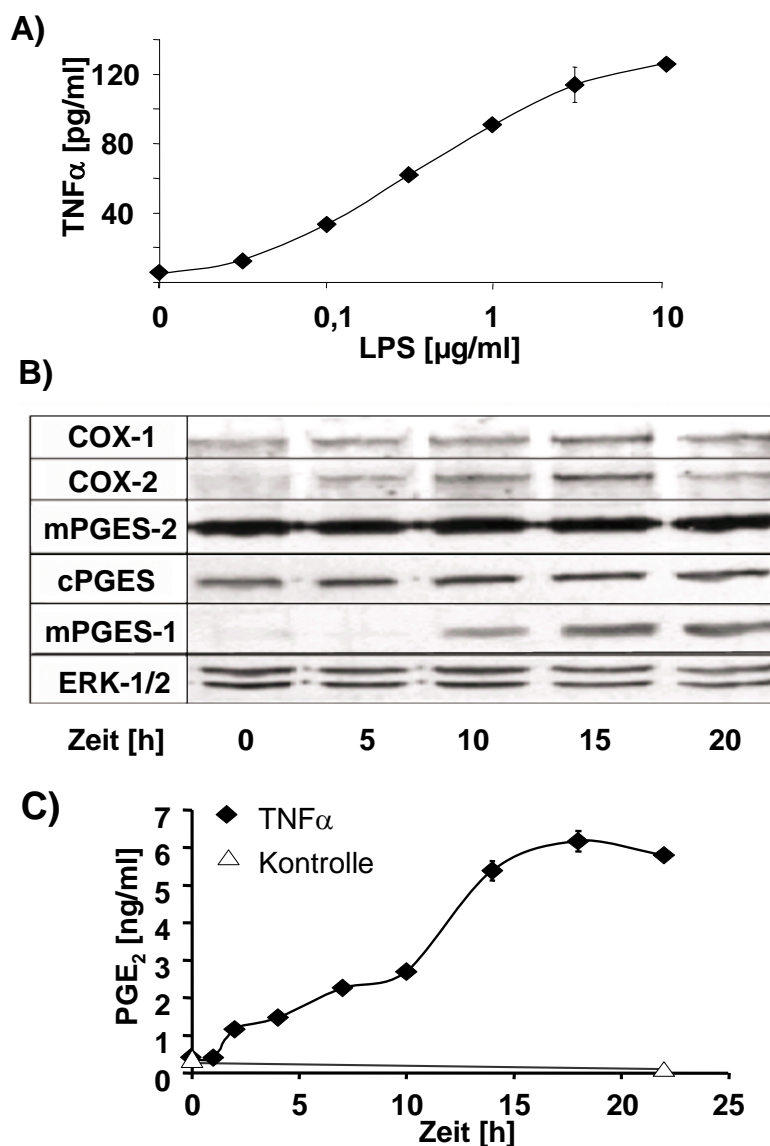


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zur Rolle der COX-Isoformen in Rückenmarkskulturen

#### 3.1.1 Stimulierung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in primären Rückenmarkskulturen

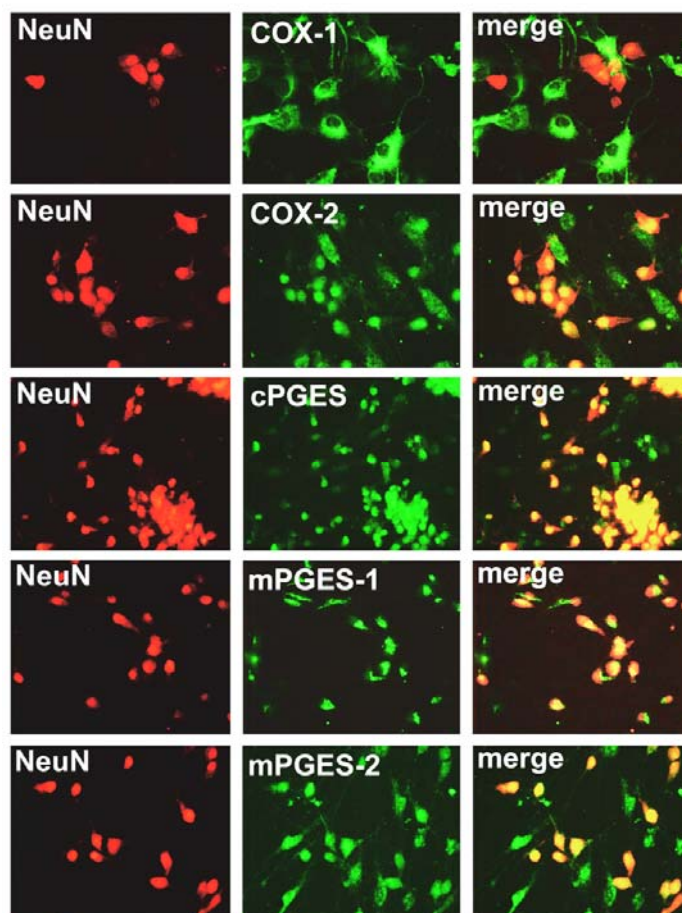
Um die Mechanismen der stimulierten PGE-Synthese im Rückenmark zu untersuchen, wurde ein primäres Zellkultursystem aus embryonalem Rattenrückenmark etabliert. Das dissoziierte Gewebe wurde unter Bedingungen kultiviert, die selektiv das Überleben von Neuronen begünstigt. Nach sieben Tagen Kultivierung wurden in der Primärkultur überwiegend Neurone (40 %- 90 %) aber auch Astrocyten, Mikroglia, Endothelzellen, Glattmuskelzellen und weitere nicht bestimmte Zelltypen identifiziert (Daten nicht gezeigt). Da bei der Entwicklung einer zentralen Sensibilisierung im Rückenmark vor allem die induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese von Bedeutung ist, wurde durch LPS Gabe eine Entzündung imitiert. Zwei Stunden nach Inkubation mit LPS wurden im Medium der Rückenmarkszellen durch ELISA dosisabhängig erhöhte Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  detektiert (Abbildung 3-1 A). Die direkte exogene Zugabe von TNF $\alpha$  induzierte nach fünf Stunden eine erhöhte COX-2 und nach 10 Stunden eine erhöhte mPGES-1 Expression (Abbildung 3-1 B). Die Expressionsstärke von COX-1, mPGES-2 und cPGES blieben dagegen über den gesamten Zeitraum der TNF $\alpha$  Stimulierung unverändert. Die Messung der Prostaglandinkonzentrationen im Medium zeigte, dass TNF $\alpha$  in den Rückenmarkskulturen auch die PGE<sub>2</sub> Synthese erhöhte (Abbildung 3-1 C). Der stärkste Anstieg der PGE<sub>2</sub> Synthese wurde, zeitgleich mit Beginn der mPGES-1 Expression, zwischen 10 und 14 Stunden nach TNF $\alpha$  Gabe beobachtet. Nach 18 Stunden erreichte die PGE<sub>2</sub> Konzentration ihr Maximum.



**Abbildung 3-1: Induktion der PGE $_2$  Synthese in Rückenmarkskulturen.** (A) TNF $\alpha$  Sekretion von Rückenmarkszellen. TNF $\alpha$  wurde nach 2 Stunden Inkubation mit den angegebenen LPS Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei Messungen (B) Western Blot Analyse von Enzymen der PGE $_2$  Synthasekaskade. Rückenmarkszellkulturen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert (C) PGE $_2$  Sekretion von Rückenmarkszellkulturen. Stimulation wie in (B). PGE $_2$  wurde nach den angegebenen Zeitpunkten durch ELISA aus den Medienüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei Messungen.

Um die Lokalisierung der PGE $_2$ -synthetisierenden Enzyme zu untersuchen, wurden Rückenmarkszellkulturen immunozytochemisch charakterisiert. Zur Induktion der COX-2 und mPGES-1 Expression wurden die Zellen vor der Fixierung für 15 Stunden mit TNF $\alpha$  stimuliert. Die Detektion der Enzyme erfolgte mit spezifischen primären polyklonalen Antikörpern, die durch FITC-markierte Sekundärantikörper nachgewiesen wurden. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern allein ergab keine Signale (Daten nicht gezeigt).

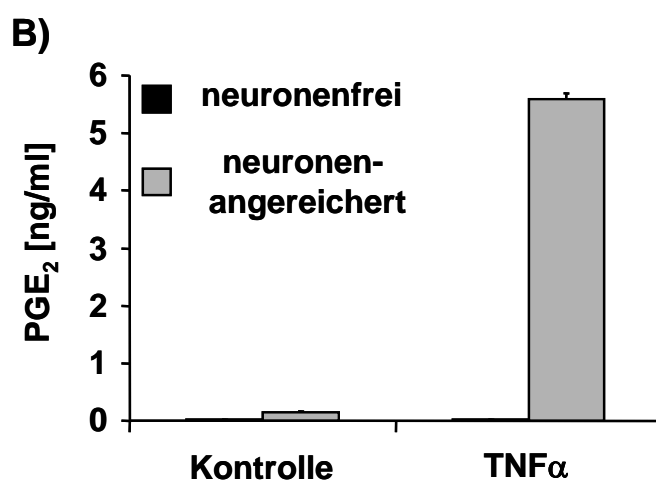
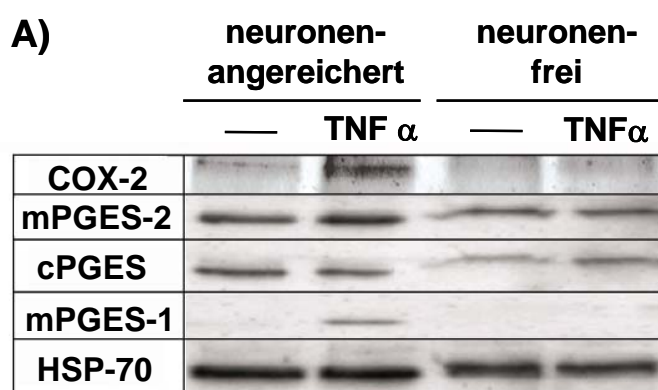
Neuronale Zellen wurden durch Färbung mit NeuN identifiziert. COX-2, cPGES und mPGES-2 wurden sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert (Abbildung 3-2). COX-1 war dagegen ausschließlich in nicht-neuronalen Zellen und mPGES-1 überwiegend in neuronalen Zellen nachweisbar. Daten aus *in situ* Hybridisierungen mit mPGES-1 „antisense“ RNA unterstützen die neuronale Lokalisierung von mPGES-1 im Rückenmark (unpublizierte Ergebnisse von Frau Van Nguyen).



**Abbildung 3-2: Immunocytochemische Färbung primärer Rückenmarkszellkulturen.** Die Zellen wurden für 15 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. NeuN (rot) dient als Marker für Neurone. Die Enzyme der PGE $_2$  Synthesekaskade wurden mit FITC-markierten (grün) Antikörpern detektiert. Um Ko-Lokalisierungen (gelb) darzustellen, wurden im rechten Abschnitt (merge) die Bilder überlagert.

Studien mit mPGES-1-defizienten Makrophagenkulturen zeigten, dass mPGES-1 für die induzierte PGE $_2$ -Synthese von großer Bedeutung ist (77, 78). Nach den immunocytochemischen Daten dieser Arbeit wird mPGES-1 im Rückenmark in Neuronen exprimiert. Es ist daher anzunehmen, dass Neurone maßgeblich an der TNF $\alpha$  induzierten PGE $_2$  Synthese beteiligt sind. Zur weiteren Analyse dieser Hypothese wurde die TNF $\alpha$

induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese von neuronenangereicherten mit der von neuronenfremen Rückenmarkskulturen (Astrozytenkultur) verglichen. Die Zellkulturen stammten jeweils vom gleichen Rückenmarksgewebe, wurden aber durch unterschiedliche Kultivierungsmethoden auf eine Anreicherung der jeweiligen Zelltypen (Neuronen oder Astrozyten) selektiert. Die vergleichende Untersuchung zeigte, dass TNF $\alpha$  in der neuronenfremen Rückenmarkskultur weder eine COX-2 und mPGES-1 Expression (Abbildung 3-3 A) noch eine PGE<sub>2</sub> Synthese induzierte (Abbildung 3-3 B). Dies weist darauf hin, dass die TNF $\alpha$  induzierten PGE<sub>2</sub> Synthese in Neuronen stattfindet.



**Abbildung 3-3: Vergleich der TNF $\alpha$  induzierten PGE<sub>2</sub> Synthese in neuronalen und neuronenfremen Rückenmarkskulturen.** Kulturen wurden für 15 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert und anschließend die Expression (A) durch Western Blot und die PGE<sub>2</sub> Synthese (B) durch ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Messungen.

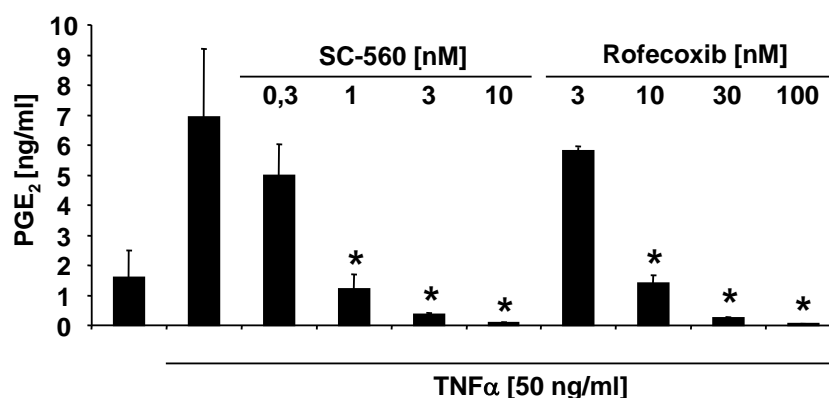
### 3.1.2 SC-560 und Rofecoxib inhibieren die $\text{TNF}\alpha$ induzierte $\text{PGE}_2$

#### Synthese

Die Expressionsanalysen zeigten (3.1.1), dass eine Stimulierung der Rückenmarkskulturen mit  $\text{TNF}\alpha$  die COX-2 Expression erhöht, während die COX-1 Expression unverändert bleibt. Durch selektive COX-Inhibitoren wurde im folgenden Abschnitt die Rolle der COX Isoformen in der spinalen Prostaglandinsynthese pharmakologisch charakterisiert.

Um selektiv COX-1 zu hemmen wurde SC-560 verwendet. Für diese Substanz liegen die halbmaximalen Konzentrationen ( $\text{IC}_{50}$ ) für die Hemmung von gereinigter COX-1 und COX-2 bei jeweils 9 nM bzw. bei 6,3  $\mu\text{M}$  (68). Dies entspricht einer 700fachen COX-1 Selektivität. Rofecoxib besitzt dagegen eine 100fache COX-2 Selektivität. In Versuchen mit gereinigten Enzymen wurde für diese Substanz ein  $\text{IC}_{50}$  (COX-1) von 36,3  $\mu\text{M}$  und ein  $\text{IC}_{50}$  (COX-2) von 0,36  $\mu\text{M}$  ermittelt (82).

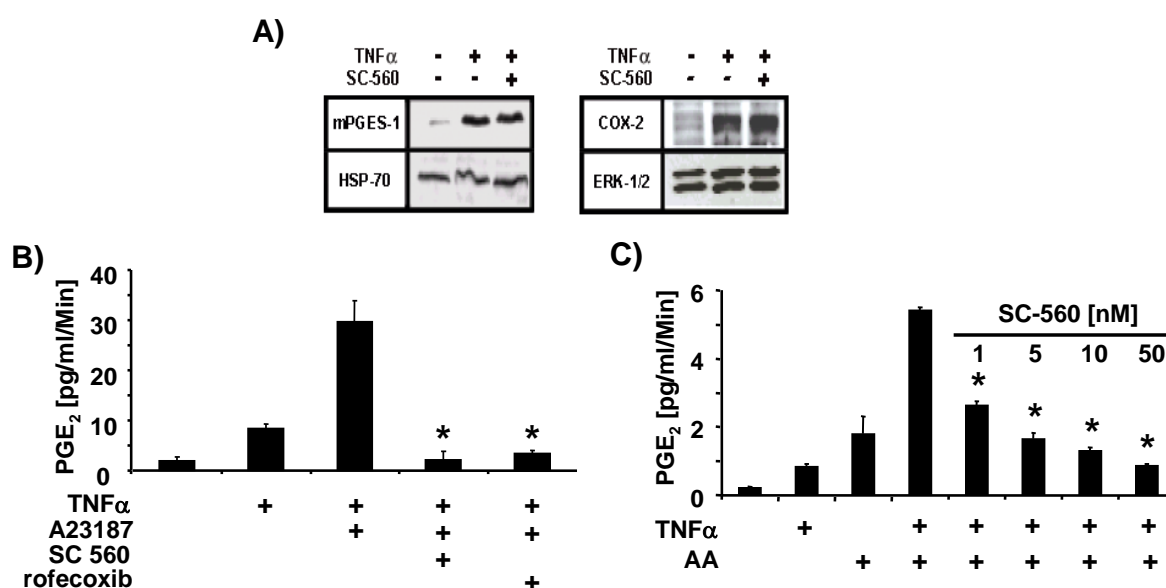
Um die biochemische Funktion der COX Isoformen zu untersuchen, wurden die Rückenmarkskulturen mit  $\text{TNF}\alpha$  und SC-560 oder Rofecoxib inkubiert und anschließend im Überstand durch ELISA die  $\text{PGE}_2$  Konzentrationen bestimmt. Überraschenderweise hemmten nanomolare Konzentrationen beider COX-Inhibitoren die  $\text{PGE}_2$  Synthese vollständig (Abbildung 3-4). Das Ergebnis deutet daher darauf hin, dass beide COX-Isoformen für die  $\text{TNF}\alpha$  induzierte  $\text{PGE}_2$  Synthese unverzichtbar sind. Dies ist für COX-1 unerwartet, da die induzierte  $\text{PGE}_2$  Synthese bisher in fast allen Studien als COX-2 vermittelt beschrieben wurde (83-85).



**Abbildung 3-4: SC-560 und Rofecoxib blockieren in Rückenmarkskulturen die  $\text{TNF}\alpha$  induzierte  $\text{PGE}_2$  Synthese.** Rückenmarkskulturen wurden mit 50 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und den angegebenen Inhibitorkonzentrationen für 15 Stunden stimuliert. Die  $\text{PGE}_2$  Konzentrationen wurden aus den Medienüberständen durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei Messungen. Das Ergebnis ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche. \* = zweiseitiger „students t-TEST“;  $P \leq 0,05$  verglichen mit  $\text{TNF}\alpha$  allein.

### 3.1.3 SC-560 inhibiert in Rückenmarkskulturen die PGE<sub>2</sub>-Synthese unabhängig von COX-1

Um herauszufinden wie SC-560 in Rückenmarkskulturen die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese inhibiert, wurden die Effekte auf die verschiedenen Faktoren der PGE<sub>2</sub> Synthesekaskade analysiert. In Makrophagen wurde beobachtet, dass die COX-1 Aktivität für die Induktion der COX-2 Expression von Bedeutung ist (86). Es wurde daher untersucht, ob SC-560 in Rückenmarkskulturen die TNF $\alpha$  induzierte COX-2 und mPGES-1 Expression hemmt. Die Inkubation mit 1  $\mu$ M SC-560 hatte keinen Einfluss auf die Expression beider Enzyme (Abbildung 3-5 A).



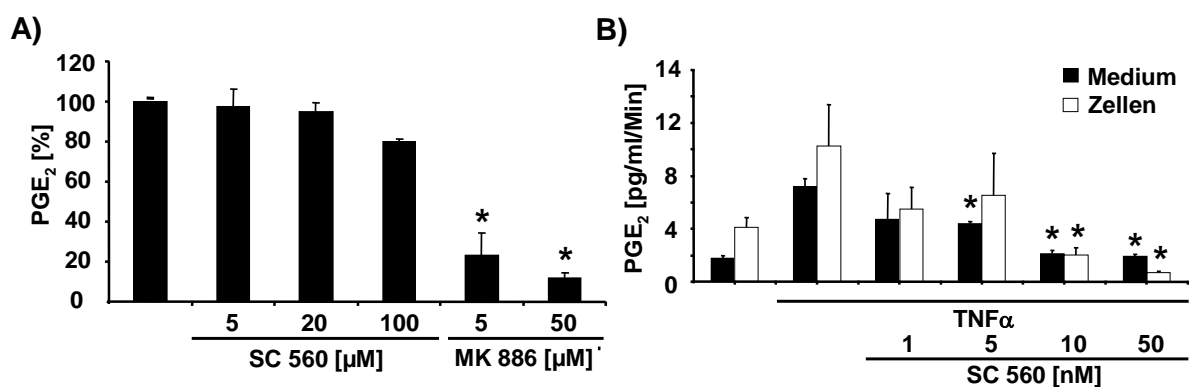
**Abbildung 3-5: SC-560 hat weder auf die COX-2 und mPGES-1 Expression noch auf die PLA<sub>2</sub> Aktivität einen Effekt.** (A) Western Blot Analyse von COX-2 und mPGES-1 in Rückenmarkskulturen. Die Zellen wurden für 15 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  und 1  $\mu$ M SC-560 stimuliert. (B) Effekt von SC-560 auf die PLA<sub>2</sub> Aktivität. Rückenmarkskulturen wurden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  vorstimuliert, anschließend für 2 Stunden mit 2  $\mu$ M A23187, 10 nM SC-560 oder 30 nM Rofecoxib inkubiert und das PGE<sub>2</sub> im Medium bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei Messungen (C) Effekt von SC-560 auf die AA-Freisetzung. Gleiches Experiment wie in B, nur mit Zugabe von 500 nM AA und 30 Minuten Inkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Messungen. Alle Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei weitere Experimente. \* = zweiseitiger „students t-TEST“,  $p \leq 0,05$  verglichen mit den Werten ohne SC-560.

Im ersten Schritt der PGE<sub>2</sub> Synthesekaskade wird durch die PLA<sub>2</sub> aus Membranphospholipiden Arachidonsäure (AA) freigesetzt (20). Da die Aktivität der meisten PLA<sub>2</sub> Isoformen abhängig von Calcium ist, kann die AA-Freisetzung durch die Inkubation mit dem Calciumionophor A23187 induziert werden. In TNF $\alpha$  stimulierten

Rückenmarkskulturen wurde während der Inkubation mit A23187 eine dreifach erhöhte PGE<sub>2</sub> Synthese gemessen (Abbildung 3-5 B). Trotz der Aktivierung durch das Calciumionophor inhibierten 10 nM SC-560 sowie 30 nM Rofecoxib vollständig die PGE<sub>2</sub> Synthese.

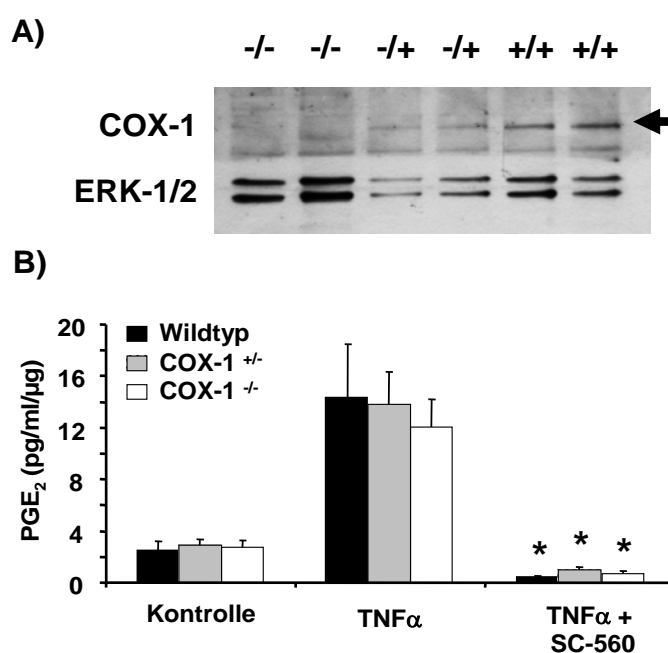
Um auch den Einfluss von SC-560 auf die Kopplung zwischen PLA<sub>2</sub> und COX-2 auszuschließen, wurde AA direkt exogen zugegeben. Dies führte innerhalb der Inkubation für 30 Minuten zu einer fünffach erhöhten PGE<sub>2</sub> Synthese (Abbildung 3-5 C). SC-560 hemmte auch hier bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen die PGE<sub>2</sub> Synthese komplett. Es ist daher auszuschließen, dass SC-560 auf die Freisetzung von AA und daher biochemisch über der COX-Reaktion einwirkt.

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von SC-560 auf die PGES Aktivität analysiert. Hierzu wurden A549 Zellen zur Induktion der mPGES-1 Expression mit IL-1 $\beta$  stimuliert und die Lysate für die Metabolisierung von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> verwendet. Die Aktivität der PGE-Synthasen konnte durch 5  $\mu$ M des unspezifischen mPGES-1 Inhibitors MK-886 (87), nicht aber durch hohe SC-560-Konzentrationen (100  $\mu$ M) inhibiert werden (Abbildung 3-6 A). Schließlich wurde untersucht, ob SC-560 den PGE<sub>2</sub> Transport aus der Zelle blockiert. Würde SC-560 den Export von PGE<sub>2</sub> aus der Zelle hemmen, müsste nach TNF $\alpha$  Stimulierung in der Zelle PGE<sub>2</sub> akkumulieren. Ein Vergleich der PGE<sub>2</sub> Konzentrationen im Medium und in den Zellen zeigte, dass SC-560 auch auf den Transport keinen Einfluss hat (Abbildung 3-6 B).



**Abbildung 3-6: SC-560 beeinflusst die mPGES-1 Aktivität und den PGE<sub>2</sub> Transport nicht.** (A) Effekt von SC-560 auf die mPGES-1 Aktivität. Bestimmung der PGE-Synthaseaktivität mit mikrosomalen Fraktionen IL-1 $\beta$  stimulierter A549 Zellen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PGH<sub>2</sub> gestartet (Dieses Experiment wurde von Thorsten Meier in Stockholm durchgeführt und die Daten freundlicherweise bereitgestellt; genaue Durchführung in (25)). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei Messungen. (B) Effekt von SC-560 auf den PGE<sub>2</sub> Transport. Die Rückenmarkskulturen wurden für 15 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  vorstimuliert und für 30 Minuten mit AA inkubiert. Das PGE<sub>2</sub> wurde aus den Zellen extrahiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw. von zwei Messungen. Alle Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei weitere Experimente. \* = zweiseitiger „students t-TEST“,  $p \leq 0,05$  verglichen mit den Werten ohne SC-560 Zugabe.

Aufgrund der bisherigen Experimente kann als Wirkmechanismus für SC-560 eine Interferenz mit allen Enzymen der PGE<sub>2</sub> Synthesekaskade außer COX-2 ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass entweder COX-1 für die COX-2-Aktivität essentiell ist oder dass SC-560 die COX-2 direkt hemmt. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die Wirkung von SC-560 in COX-1 defizienten Rückenmarkskulturen untersucht. Dazu wurde das Rückenmark von COX-1<sup>+/+</sup> (Wildtyp), COX-1<sup>+/-</sup> (Heterozygot) und COX-1<sup>-/-</sup> (Knockout) Mäusen in Kultur gebracht. Der Genotyp der präparierten Embryonen wurde durch PCR und das Fehlen von COX-1 durch Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3-7 A). TNF $\alpha$  stimulierte die PGE<sub>2</sub> Synthese in Rückenmarkskulturen aus Wildtyp, COX-1<sup>+/-</sup> und COX-1<sup>-/-</sup> Mäusen fast identisch (Abbildung 3-7 B). Dies zeigt, dass COX-1 für die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese nicht notwendig ist. Die induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese wurde durch 10 nM SC-560 auch in COX-1<sup>-/-</sup> Rückenmarkskulturen vollständig inhibiert. SC-560 hemmt COX-2 daher unabhängig von COX-1. Um Kontaminationen der Substanz auszuschließen, wurden die Versuche mit SC-560 von verschiedenen Firmen durchgeführt. Zusätzlich wurde mit LC-MS/MS Analyse das Defragmentierungsspektrum von SC-560 verglichen und keine Unterschiede festgestellt (Messung von Carlo Angioni durchgeführt; Daten nicht gezeigt).



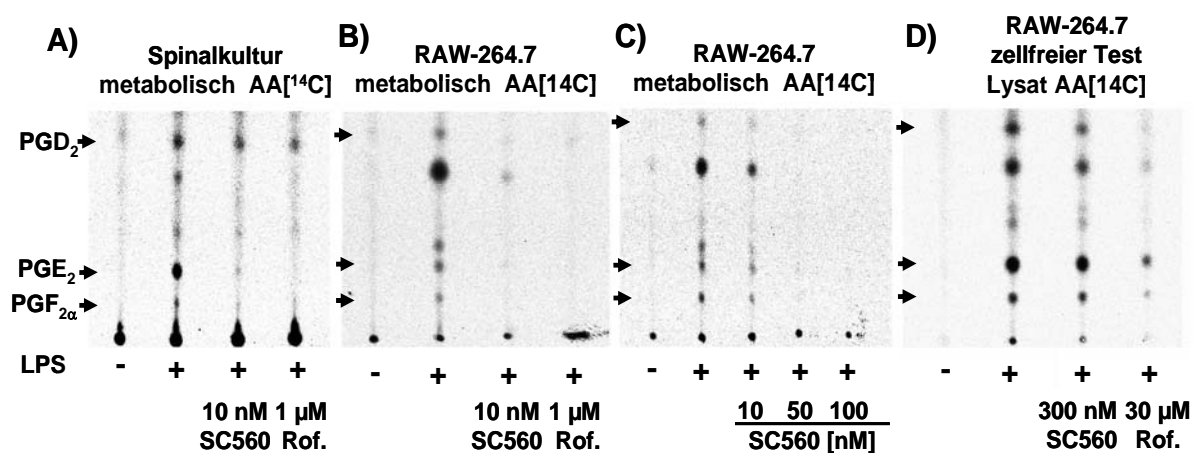
**Abbildung 3-7: SC-560 inhibiert in COX-1 defizienten Rückenmarkskulturen die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese.** (A) Western Blot Analyse von COX-1 in Rückenmarkskulturen von COX-1<sup>-/-</sup> Embryonen. (B) Rückenmarkskulturen von Wildtyp-, COX-1<sup>+/-</sup>- und COX-1<sup>-/-</sup> Embryonen wurden für 15 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  und 10 nM SC-560 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Präparationen aus jeweils 20 Embryonen. Je Genotyp wurden Embryonen aus mindestens drei verschiedenen Müttern präpariert. \* = zweiseitiger „students t-TEST“,  $p \leq 0,01$  verglichen mit der TNF $\alpha$  Stimulation allein.



### 3.1.4 Die Selektivität von SC-560 in der zellfreien PGE<sub>2</sub>-Synthese

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass SC-560 in Rückenmarkskulturen COX-2 mit sehr niedrigen Konzentrationen hemmt. Die COX-1 Selektivität von SC-560, die von Smith et al. bei gereinigten COX Enzymen bestimmt wurde (68), konnte daher in den Versuchen mit Rückenmarkskulturen nicht bestätigt werden. Um zu prüfen, ob die Einbindung von COX-2 in ein intaktes Zellsystem Ursache für den Verlust der COX-1 Selektivität ist, wurde die Wirkung von SC-560 in Zellkultur auf die Metabilisierung radioaktiv markierter AA von intakten und lysierten RAW-264.7 Makrophagen verglichen.

Nach metabolischer Markierung mit AA [1-<sup>14</sup>C] synthetisierten stimulierte Rückenmarkszellen oder RAW-264.7 Makrophagen radioaktive Prostaglandine, die anschließend durch Dünnschichtchromatographie (DSC) aufgetrennt wurden und durch einen Vergleich mit Markersubstanzen als PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> identifiziert werden konnten (Abbildung 3-8 A-C).



**Abbildung 3-8: COX-2 Inhibierung durch SC-560 in Zellkultur und in der zellfreien *in vitro* Synthese.** (A) Rückenmarkskulturen wurden für acht Stunden mit 1 μM AA [1-<sup>14</sup>C] beladen und anschließend für 15 Stunden mit 5 μg/ml LPS und den COX Inhibitoren stimuliert. Prostaglandine wurden anschließend aus dem Zellmedium extrahiert und durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. (B) Gleiches Experiment wie in A mit RAW-264.7 Zellen. (C) Gleiches Experiment wie in B mit verschiedenen SC-560 Konzentrationen. (D) RAW-264.7 Zellen wurden für 15 Stunden mit 5 μg/ml LPS stimuliert und anschließend homogenisiert. Die Lysate wurden mit den angegebenen Inhibitoren versetzt und die Prostaglandinsynthese durch Zugabe von 5 μM AA [1-<sup>14</sup>C] gestartet. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Chloroform gestoppt und die Prostaglandine zur Auftrennung extrahiert.

SC-560 hemmte in intakten RAW-264.7 Zellen die induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese mit ähnlichen Konzentrationen wie bei den Rückenmarkskulturen. Die potente Hemmung von COX-2

durch SC-560 in Zellkultur scheint also nicht für Rückenmarkszellen spezifisch zu sein. Um zu untersuchen, ob die COX-1 Selektivität von SC-560 nach einer Zerstörung des zellulären Systems wieder hergestellt werden kann, wurden die RAW.264.7 Zellen nach LPS Stimulierung homogenisiert und anschließend die Prostaglandinsynthese durch Zugabe von AA [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] gestartet. Die DSC-Analyse zeigte, dass hier SC-560 auch bei einer 30-fach höheren Konzentration (300 nM) die stimulierte Prostaglandinsynthese nicht effizient hemmt (Abbildung 3-8 D).

### **3.1.5 Die Selektivität von SC-560 in humanem Vollblut und gewaschenen Blutzellen**

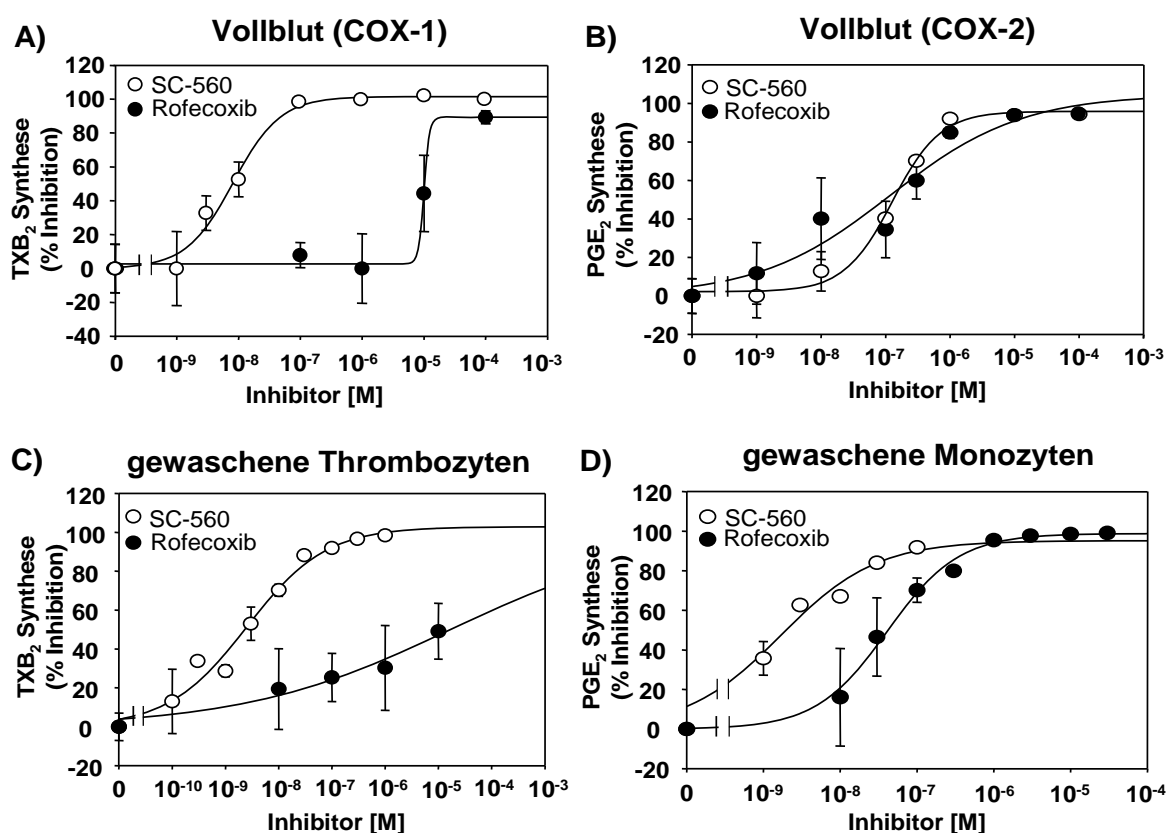
Eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung der COX Selektivität von Inhibitoren ist die Analyse mit humanem Vollblut (88). Hier wird die COX-1 Aktivität durch die TXA<sub>2</sub> Synthese von aktivierten Thrombozyten bestimmt. Die Thrombozyten werden durch die einsetzende Aggregation aktiviert und das stabile TXA<sub>2</sub> Abbauprodukt TXB<sub>2</sub> nach 60 Minuten Inkubation im Plasma bestimmt. Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde in diesem Test für SC-560 ein IC<sub>50</sub> Wert von 8,2 nM ermittelt (Abbildung 3-9 A). Für Rofecoxib lag der IC<sub>50</sub> Wert bei 10 µM.

Zur Bestimmung der COX-2-Aktivität wurde das Vollblut mit LPS stimuliert und anschließend die PGE<sub>2</sub> Konzentration im Plasma bestimmt. Die LPS Stimulierung induzierte eine 30fach erhöhte PGE<sub>2</sub> Synthese. SC-560 und Rofecoxib inhibierten die PGE<sub>2</sub> Synthese mit einem IC<sub>50</sub> Wert von jeweils 128 nM und 120 nM (Abbildung 3-9 B). Obwohl für die Substanzen im COX-2-Test ein fast identischer IC<sub>50</sub> Wert bestimmt wurde, errechnet sich für SC-560 und Rofecoxib eine sehr unterschiedliche COX-1/COX-2 Selektivität von jeweils 0,06 und 83 (Tabelle 3-1). Verglichen mit den Ergebnissen von Rückenmarkskulturen (Abbildung 3-4) wurden im Vollbluttest für beide Hemmstoffe deutlich höhere IC<sub>50</sub> (COX-2) Werte bestimmt. Im Vollbluttest ist SC-560 daher COX-1- und Rofecoxib COX-2-selektiv.

Eine Ursache für diese Verschiebung könnte der unterschiedliche Zelltyp, die verwendete Spezies oder das unterschiedliche extrazelluläre Medium bzw. Plasma sein. Eine Beeinflussung der COX Selektivität verschiedener Inhibitoren durch den Proteingehalt im Medium wurde bereits beschrieben (89). Um das extrazelluläre Medium der Zellen im Bluttest an die Zellkulturversuche anzugleichen, wurde der Versuch mit gewaschenen kultivierten humanen Thrombozyten und Monozyten durchgeführt. Zur Ermittlung der COX-1 Aktivität wurden Thrombozyten in serumfreiem Zellkulturmedium suspendiert und nach Zugabe von AA das TXB<sub>2</sub> im Plasma bestimmt. In diesem Test lag der IC<sub>50</sub> Wert von SC-560

bei 2,5 nM (Abbildung 3-9 C). Rofecoxib dagegen hemmte die TXA<sub>2</sub> Synthese auch in sehr hohen Konzentrationen (10 µM) nicht.

Zur Ermittlung der COX-2 Aktivität im Test mit gewaschenen Blutzellen wurden Monozyten isoliert. Diese wurden ebenfalls in serumfreiem Zellkulturmedium ausplattiert, mit LPS stimuliert und anschließend im Medium die PGE<sub>2</sub> Konzentration bestimmt. In diesem Test wurde für SC-560 und Rofecoxib ein IC<sub>50</sub> Wert von jeweils 1,8 nM bzw. 41 nM ermittelt (Abbildung 3-9 D). Die hier beobachtete COX-2 Hemmung durch SC-560 ist mit der in TNFα stimulierten Rückenmarkszellen vergleichbar. Eine COX-1 Selektivität war daher auch bei gewaschenen Blutzellen nicht mehr vorhanden (Tabelle 3-1).



**Abbildung 3-9: Selektivität von SC-560 und Rofecoxib im Test mit Vollblut und gewaschenen Blutzellen.** (A) COX-1 Hemmung im Vollbluttest. Humanes Vollblut wurde mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen für 60 Minuten ohne Gerinnungshemmer inkubiert. Anschließend wurde TXB<sub>2</sub> aus dem Plasma bestimmt. (B) COX-2 Hemmung im Vollblut. Vollblut wurde für 24 Stunden mit 100 µg/ml LPS inkubiert und das PGE<sub>2</sub> aus dem Überstand bestimmt. (C) COX-1 Hemmung in gewaschenen Thrombozyten. Thrombozyten wurden für 10 Minuten mit 0,25 mg/ml AA inkubiert und nach Extraktion die TXB<sub>2</sub> Mengen bestimmt. (D) COX-2 Hemmung in gewaschenen Monozyten. Gewaschene Monozyten wurden für 22 Stunden mit 5 µg/ml LPS stimuliert und PGE<sub>2</sub> im Überstand bestimmt. In allen Experimenten wurden die Proben in Duplikaten angesetzt und die Mittelwerte ± Stabw. gezeigt. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt.

Obwohl in den Versuchen mit Vollblut (Abbildung 3-9), in der zellfreien Synthese (Abbildung 3-8) und mit gereinigten Enzymen (68) SC-560 COX-1 selektiv war, wirkte die Substanz in kultivierten gewaschenen Blutzellen (Abbildung 3-9), RAW-264.7 (Abbildung 3-8) und primären Rückenmarkszellen (Abbildung 3-4) als unselektiver COX-Inhibitor.

**Tabelle 3-1: IC<sub>50</sub> Werte von SC-560 und Rofecoxib im Test mit Blutzellen.**

<b>Testsystem</b>	<b>Substanz</b>	<b>IC<sub>50</sub> (COX-1)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (COX-2)</b>	<b>Selektivität IC<sub>50</sub>(COX1)/ IC<sub>50</sub>(COX-2)</b>
Vollbluttest	SC-560	0,0082	0,128	<b>0,06</b>
Vollbluttest	Rofecoxib	10	0,12	<b>83</b>
Gewaschene Blutzellen	SC-560	0,0025	0,0018	<b>1,3</b>
Gewaschene Blutzellen	Rofecoxib	n.B.	0,041	<b>&gt;240</b>

### **3.2 Shift der spinalen Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Mäusen**

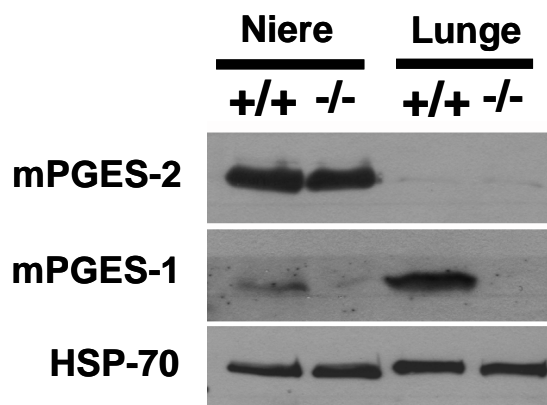
Die Hemmung der COX-2 im Rückenmark hat eine antihyperalgetische Wirkung. Da jedoch die Therapie mit COXiben durch Reduktion aller Syntheseprodukte von COX-2 (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>) zahlreiche Nebenwirkungen hervorruft (71), wird eine selektive Inhibierung der PGE<sub>2</sub> synthetisierenden Enzyme als vielversprechende Strategie zur Therapie von Fieber, rheumatischen Krankheiten und passageren Schmerzen diskutiert (74, 76, 90). Obwohl bei mPGES-1 defizienten Mäusen in Fieber- und in rheumatischen Modellen weniger Krankheitssymptome beobachtet wurden, wurde die Rolle der mPGES-1 im Rückenmark im Hinblick auf die Entwicklung einer spinalen Sensibilisierung und das nozizeptive Verhalten bisher nicht detailliert untersucht und ist unklar.

In peritonealen Makrophagen wurde beobachtet, dass die Deletion von mPGES-1 nicht nur eine Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese, sondern auch eine erhöhte Synthese von TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> verursacht (77). Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass LPS in Rückenmarkskulturen die TNFα Synthese und hierdurch in Neuronen die COX-2 und mPGES-1 Expression induziert (3.1.1 und 3.1.2). Im folgenden Abschnitt wurden die Konsequenzen einer mPGES-1 Deletion für die gesamte Prostaglandinsynthese im Rückenmark mit Hilfe von Knockoutmäusen und LC-MS/MS Analyse untersucht.

#### **3.2.1 mPGES-1 Knockoutmäuse**

Zur Analyse der Rolle von mPGES-1 wurden von Aventis (Bridgewater, USA) mPGES-1 Knockoutmäuse zur Verfügung gestellt (91). Die Mäuse wurden durch „gene targeting“ generiert. Hierbei wurde in Exon 1 des mPGES-1 Gens ein Neomycingen eingefügt. Bei dem verlängerten Transkript wird am Ende der Neomycinsequenz die Translation abgebrochen. Die Neomycin-Insertion wurde in den „swiss webster (SFW)“ Auszuchtstamm gezüchtet und der Genotyp mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

mPGES-1 wird in Nieren und Lungen konstitutiv exprimiert (36, 92). Die Western Blot Analyse der mikrosomalen Fraktionen dieser Gewebe bestätigte, dass in den Organen von Wildtyptieren, nicht aber in denen von mPGES-1-defizienten Mäusen, mPGES-1 exprimiert wird. Die mPGES-2 Expression in der Niere zeigte dagegen bei beiden Genotypen keine Veränderung (Abbildung 3-10).



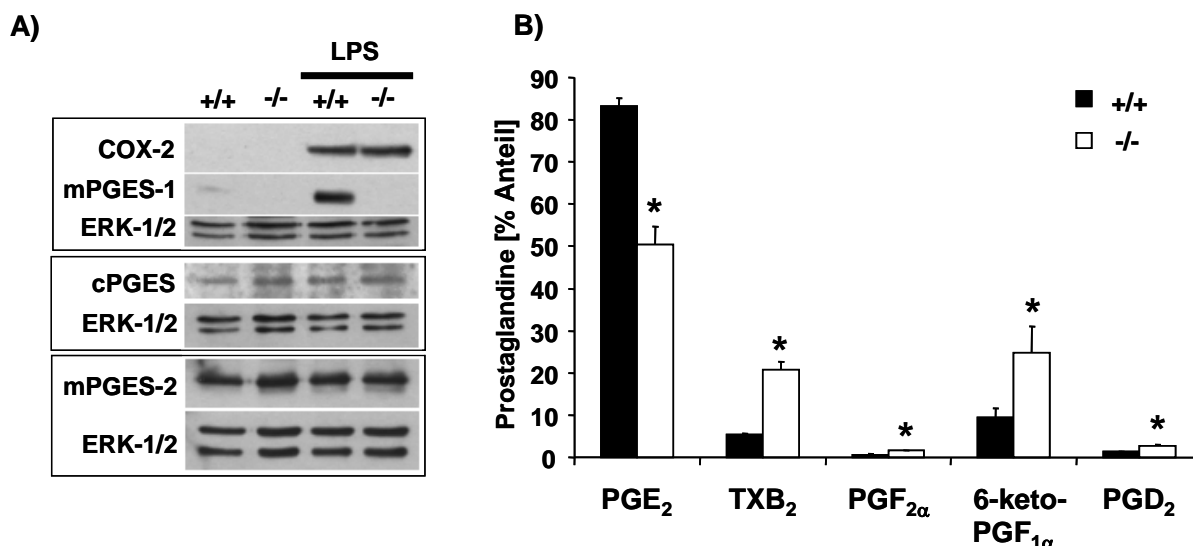
**Abbildung 3-10:** Western Blot Analyse mikrosomaler Fraktionen aus Lunge und Niere von Wildtyp und mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen.

### 3.2.2 Shift der PGE<sub>2</sub>-Synthese in mPGES-1-defizienten peritonealen Makrophagen

Fehlt die PGE-Synthaseaktivität, kann das instabile COX-2 Produkt PGH<sub>2</sub> als Substrat anderer terminaler Prostaglandinsynthasen zu verschiedenen Prostaglandinen metabolisiert werden. Dieser Shift der Prostaglandinsynthese wurde bereits bei peritonealem Makrophagen aus mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen beschrieben und als Kontrolle des funktionellen Knockout in unseren Mäusen überprüft (35, 75, 77, 78). Zur Gewinnung der Makrophagenkulturen wurde Thioglycollat intraperitoneal injiziert, vier Tage später die eingewanderten Zellen ausgewaschen und in Kultur gebracht.

Eine LPS Stimulierung induzierte in Makrophagen beider Genotypen eine starke COX-2 Expression (Abbildung 3-11 A), während eine mPGES-1 Expression nur in Wildtypzellen nachgewiesen werden konnte. Die Expression von cPGES und mPGES-2 blieb unabhängig von der Stimulierung und dem Genotyp unverändert. Es scheint daher in den mPGES-1-defizienten Zellen zu keiner kompensatorischen Regulation dieser PGE-Synthasen zu kommen.

Verglichen mit den unbehandelten Zellen, induzierte die LPS Stimulierung in den Wildtypzellen eine 45 fach erhöhte PGE<sub>2</sub> Synthese. Ein Vergleich zwischen den Genotypen zeigte, dass LPS stimulierte, mPGES-1-defiziente Makrophagen nur etwa 40 % PGE<sub>2</sub> synthetisierten. Die Synthese von 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TxB<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> war dagegen signifikant erhöht (Abbildung 3-11 B). Die Veränderung des Prostaglandingleichgewichts ist mit der von Trebino et al (35) beobachteten Shift der Prostaglandinsynthese vergleichbar.

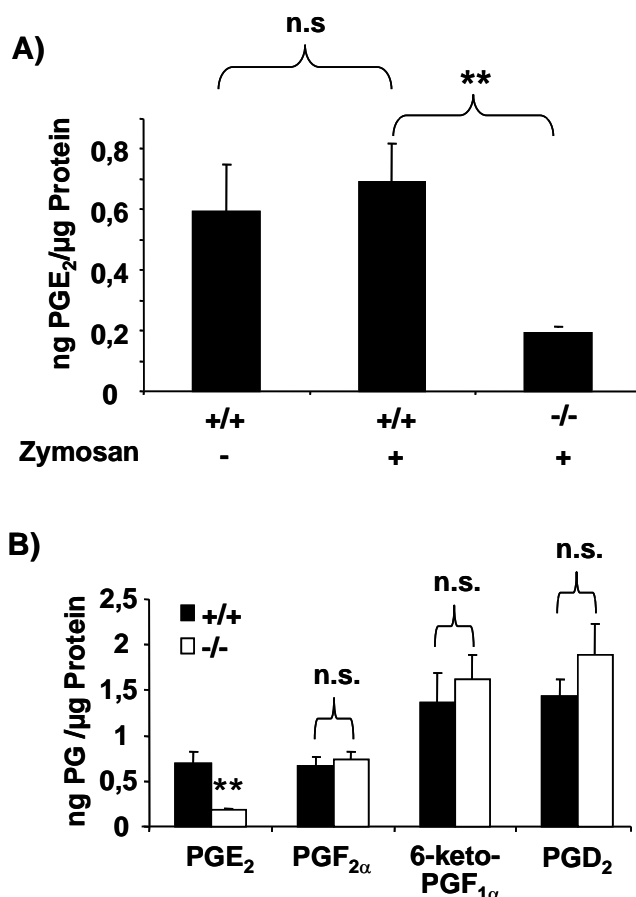


**Abbildung 3-11: Umleitung der Eicosanoidsynthese in mPGES-1-defizienten peritonealen Makrophagen.** (A) Peritoneale Makrophagen von Wildtyp- (+/+) und mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für 15 Stunden mit 5 µg/ml LPS stimuliert und die Proteinmengen durch Western Blot analysiert. (B) Gleiche Zellen und Stimulierung wie in A. Die Prostaglandinkonzentrationen wurden parallel durch LC-MS/MS aus dem Zellkulturmedium bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Anteile in Prozent ± SEM von neun Ansätzen. \* = zweiseitiger „students t-TEST“, p ≤ 0,05

### 3.2.3 Shift der PGE<sub>2</sub>-Synthese im Rückenmark adulter mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse

Da die Expression der terminalen Prostaglandinsynthasen gewebe- und zellspezifisch ist, kann die Deletion von mPGES-1 je nach Gewebetyp einen spezifischen Shift der Prostaglandinsynthese zur Folge haben. Das veränderte Prostaglandingleichgewicht kann in Abhängigkeit von den Prostaglandinrezeptoren im Umfeld verschiedene physiologische oder pathophysiologische Auswirkungen haben (35). Da es die Zielsetzung dieser Arbeit ist, die Rolle von mPGES-1 in der spinalen Sensibilisierung zu untersuchen, wurden die biochemischen Konsequenzen der mPGES-1 Hemmung im Rückenmark analysiert.

Ein Hyperalgesie-Modell mit PGE<sub>2</sub> vermittelter zentraler Sensibilisierung ist die Zymosan A induzierte Hyperalgesie (93). Um den PGH<sub>2</sub>-Metabolismus nach mPGES-1 Deletion zu analysieren, wurden 10 Stunden nach Zymosanjektion im Rückenmarksgewebe (L4-L5) die Prostaglandinkonzentrationen mittels LC-MS/MS ermittelt. Das Ergebnis zeigte zwischen den Kontrolltieren und den Zymosan behandelten Tieren keine Unterschiede. mPGES-1<sup>-/-</sup> Tiere hatten jedoch generell signifikant niedrigere PGE<sub>2</sub> Konzentrationen im Rückenmark als die Wildtypiere (Abbildung 3-12 A). Die anderen messbaren Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> und PGF<sub>2α</sub> lagen im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse jedoch höher konzentriert vor (Abbildung 3-12 B). Die Unterschiede waren zwar nicht signifikant, deuten jedoch auf einen Shift der Prostaglandinsynthese hin.



**Abbildung 3-12: Prostaglandine im Rückenmark zymosanbehandelter Wildtyp- (+/+) und mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse.** (A) PGE<sub>2</sub> Konzentrationen im Lumbalmark (L4, L5) von Wildtyp- und mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Das Gewebe wurde 10 Stunden nach der Injektion von 250 µg Zymosan A entnommen. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM von 3-4 Tieren. (B) Konzentrationen verschiedener Prostaglandine nach Zymosanbehandlung wie in A. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM von 3-4 Tieren. Die Prostaglandine wurden parallel durch LC-MS/MS bestimmt. Zweiseitiger „students t-TEST“; \*\* =  $p \leq 0,01$  verglichen mit Wildtypmäusen.

### 3.2.4 Shift der stimulierten PGE<sub>2</sub>-Synthese in Rückenmarkskulturen mPGES-1-defizienter Mäuse

Obwohl COX-2 Inhibitoren die zymosaninduzierte Hyperalgesie reduzieren, ließen sich im Rückenmarksgewebe nach Zymosanbehandlung keine erhöhten Prostaglandinkonzentration nachweisen. Eine Ursache könnte sein, dass die COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese nur lokal an wichtigen Schaltstellen zunimmt und daher bei der Bestimmung der Prostaglandine im gesamten Rückenmark nicht detektierbar ist. Um speziell die Konsequenzen einer mPGES-1 Deletion für die induzierte, COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese biochemisch zu charakterisieren, wurden LPS stimulierte, mPGES-1-defiziente Rückenmarkskulturen untersucht.



Eine LPS Stimulierung induzierte in den Rückenmarkskulturen beider Genotypen eine starke COX-2 Expression, während die mPGES-1 Expression nur im Wildtyp hochreguliert wurde (Abbildung 3-13 A). Die Expression von cPGES und mPGES-2 blieb unabhängig von Genotyp und Stimulierung unverändert. Um die Auswirkungen der mPGES-1-Deletion auf das breite Spektrum der Eicosanoidsynthese zu charakterisieren, wurde versucht im Zellkulturmedium mittels LC-MS/MS 14 verschiedene Eicosanoide zu detektieren. Bei der Bestimmung von **6-k-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, 11-dh-TXB<sub>2</sub>, 13,14dh-15k-PGE<sub>2</sub>, 13,14dh-15k-PGD<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>, Delta-12-PGJ<sub>2</sub>, 15d-PGD<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> waren nur PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGF<sub>2α</sub>, und TXB<sub>2</sub> oberhalb** der jeweiligen Nachweisgrenze. Unstimulierte mPGES-1-defiziente Rückenmarkszellen synthetisierten nach 15 Stunden Inkubation weniger PGE<sub>2</sub> aber wesentlich mehr 6-keto-PGF<sub>1α</sub> und PGF<sub>2α</sub> als Wildtypzellen (Abbildung 3-13 B). Dabei wurde zusätzlich beobachtet, dass die Summe der synthetisierten Prostaglandine in mPGES-1<sup>-/-</sup> Zellen wesentlich höher war als in Wildtypzellen. Eine LPS Stimulierung erhöhte in den Wildtypzellen die PGE<sub>2</sub> Synthese um das 10fache. Der Vergleich des Prostaglandinspektrums der stimulierten Zellen zeigte, dass mPGES-1-defiziente Rückenmarkskulturen nur ein Viertel der PGE<sub>2</sub> Menge, dafür aber über fünfmal mehr 6-keto-PGF<sub>1α</sub> und PGF<sub>2α</sub> und etwa viermal mehr PGD<sub>2</sub> als Wildtypzellen synthetisierten (Abbildung 3-13 C). TXB<sub>2</sub> konnte in diesen Experimenten nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden. Um auszuschließen, dass der Shift der Prostaglandinsynthese ein Resultat kompensatorischer Anpassungen während der Embryonalentwicklung ist, wurden die Ergebnisse der „Knockout“ Tiere mit einer pharmakologischen mPGES-1 Hemmung verglichen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung stand nur der unspezifische Inhibitor MK-886 zur Verfügung. Dieser hemmt PGES-1 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,6 µM, blockiert aber schon bei niedrigeren nanomolaren Konzentrationen die 5-Lipoxygenase-activating-protein (FLAP) Aktivität (87). Bei peritonealen Makrophagen wirkte die Substanz schon bei 1 µM toxisch und es konnte, da sich die Zellen ablösten, kein Einfluss auf Prostaglandinsynthese gemessen werden (Daten nicht gezeigt). In Rückenmarkskulturen bewirkte MK-886 erst mit höheren Konzentrationen (> 30 µM) ein Ablösen der Zellen. Nach LPS Stimulierung erhöhte MK-886 ab einer Konzentration von 1 µM den 6-keto-PGF<sub>1α</sub>/PGE<sub>2</sub> Quotient dosisabhängig (Abbildung 3-13 D).

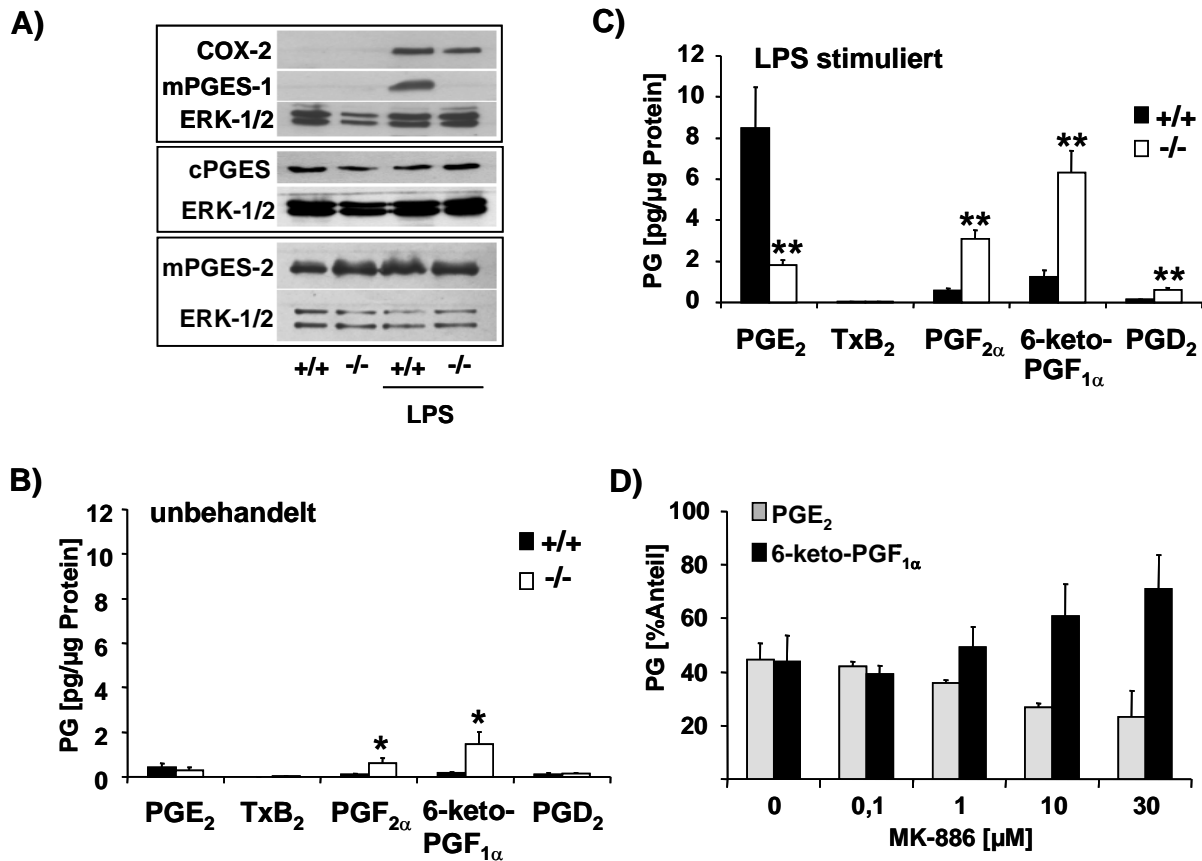


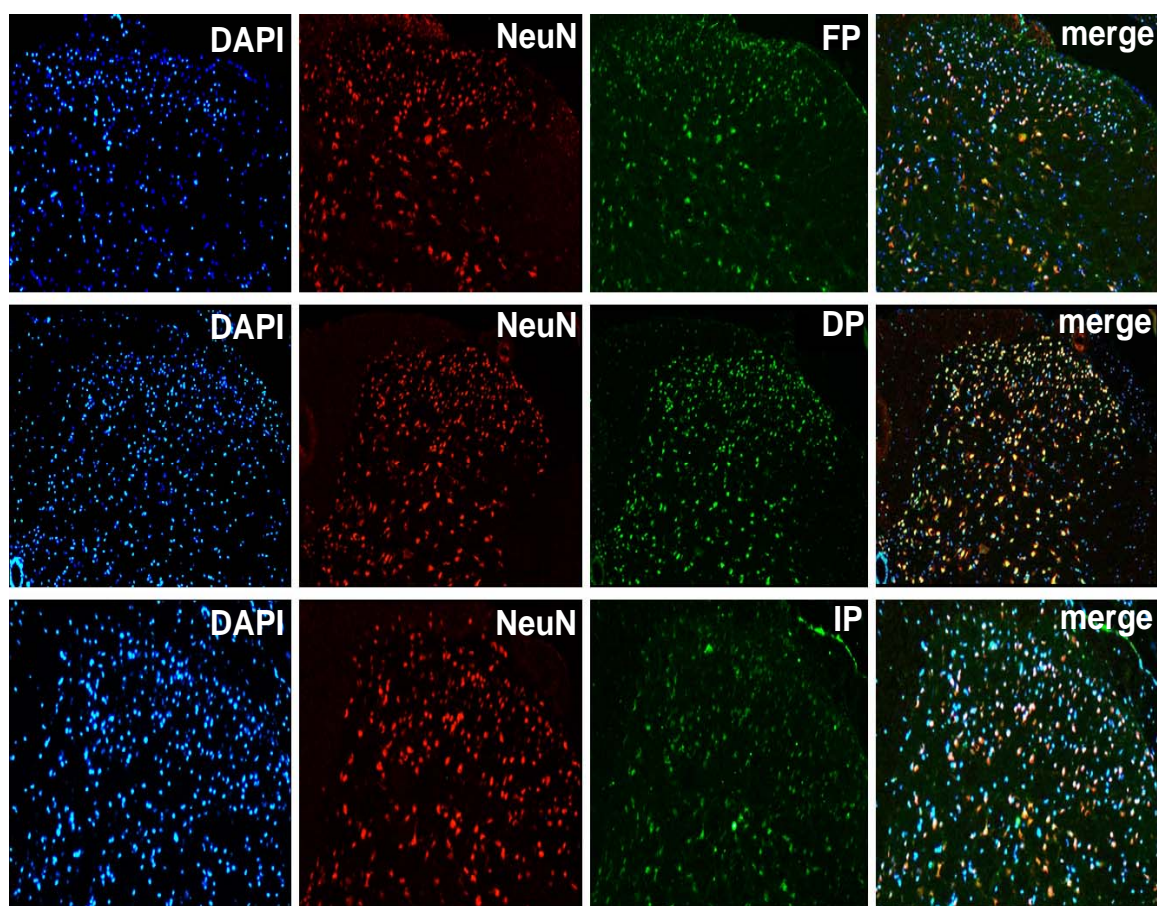
Abbildung 3-13: Umleitung der Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Rückenmarkskulturen. (A) Western Blot Analyse von Rückenmarkskulturen aus Wildtyp (+/+) und mPGES<sup>-/-</sup> (-/-) Mäusen, die für 15 Stunden mit 5 μg/ml LPS stimuliert wurden. (B) Prostaglandine im Medium unstimulierter Rückenmarkskulturen von Wildtyp und mPGES<sup>-/-</sup> Mäusen. Prostaglandine wurden nach 15 Stunden Inkubation bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aus fünf Ansätzen. (C) Gleiches Experiment wie in B mit 5 μg/ml LPS. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aus 14 Ansätzen. (D) Gleiches Experiment wie in C mit Rückenmarkskulturen aus Wildtypmäusen und den angegebenen MK-886 Konzentrationen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SD der relativen Prostaglandinanteile aus 2-3 Ansätzen. In allen Experimenten wurden die Prostaglandine im Zellkulturmedium durch LC-MS/MS bestimmt.

### 3.3 Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit durch Prostaglandine

Durch den Shift der Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Mäusen wird im Rückenmark verstärkt  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGD}_2$  synthetisiert. Um zu beurteilen, ob diese Prostaglandine im Rückenmark die nozizeptive Transmission modifizieren können, wurde die Expression von deren Rezeptoren und die Konsequenzen einer Aktivierung dieser Rezeptoren im Hinblick auf eine Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit analysiert.

#### 3.3.1 Lokalisierung der Prostaglandinrezeptoren im Rückenmark

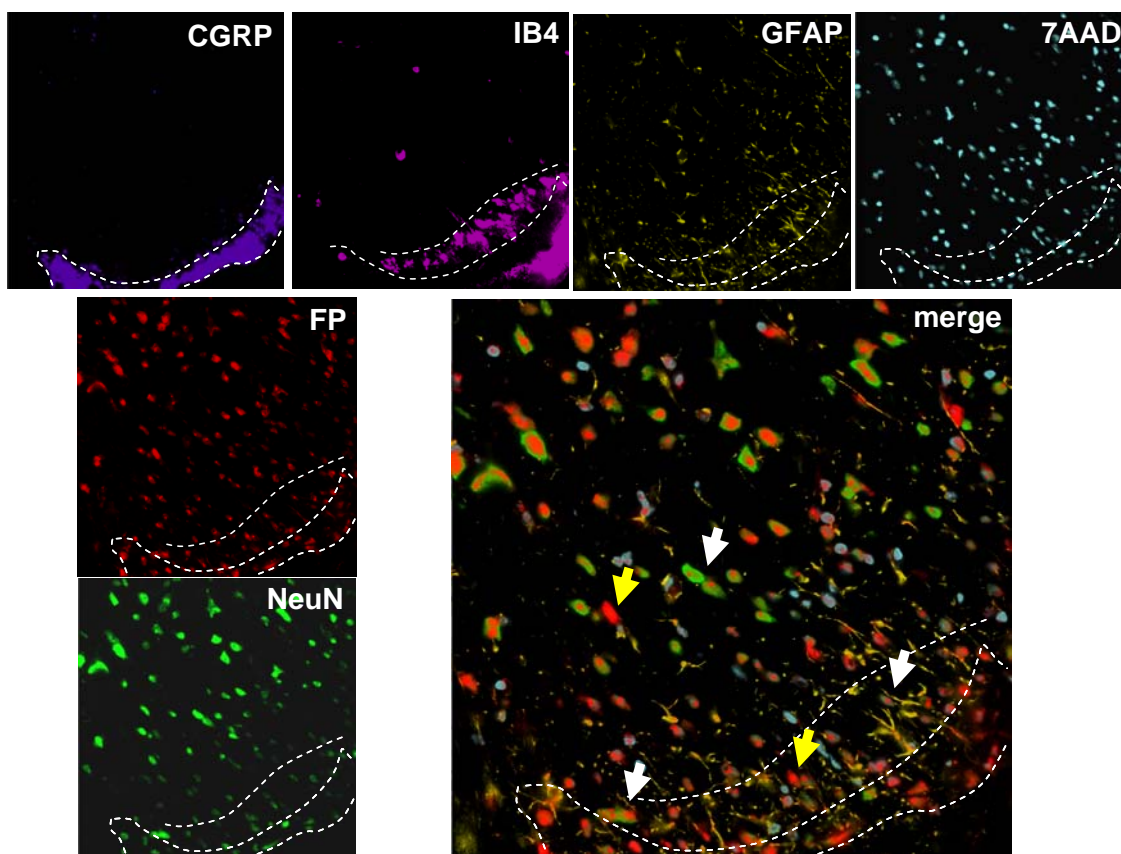
Zunächst wurde die Lokalisierung von FP, DP und IP Rezeptoren im Dorsalhorn des Rückenmarks immunohistochemisch untersucht. Das Lumbalmark (L4-L5) wurde 10 Stunden nach einer intraplantaren Zymosaninjektion entnommen.



**Abbildung 3-14: Lokalisierung der FP, DP und IP Rezeptoren im Lumbalmark.** Das Lumbalmark wurden 8 Stunden nach Zymosan A Injektion aus SFW Mäusen präpariert und immunohistochemisch gefärbt. Gezeigt sind die ipsilateralen Hinterhörner. DAPI (blau) markiert die Zellkerne, NeuN (rot) die Neuronenkerne, FP, IP und DP (grün) die jeweiligen Prostaglandinrezeptoren und merge (gelb) die Prostaglandinrezeptoren in Neuronen.

Durch Ko-Färbung mit NeuN konnte sowohl für den FP als auch für den DP und IP Rezeptor in Neuronen des gesamten dorsalen Horns eine Expression gezeigt werden (Abbildung 3-14). Quantitative Unterschiede zwischen dem ipsi- und contralateralen dorsalen Horn wurden nicht gefunden (Daten nicht gezeigt).

Um die neuronale Lokalisierung in den schmerzrelevanten Bereichen (Lamina I+II) genauer zu analysieren, wurde am Beispiel des FP Rezeptors durch die Multi-Epitope-Ligand-Kartographie (MELK) (94) die Expression mit dem Marker CGRP (Lamina I), IB-4 (Lamina II), 7AAD (Zellkerne), GFAP (Astrocyten) und NeuN (Neuronen) verglichen (Abbildung 3-15). Bei der MELK Technologie (MelTec, Magdeburg) werden FITC-markierte Antikörper nacheinander auf dem Gewebe inkubiert. Die Fluoreszenzsignale werden jeweils aufgenommen, und anschließend durch Bestrahlung ausgebleicht. Diese Prozedur wird mit beliebig vielen verschiedenen Antikörpern wiederholt und in Falschfarben übereinander gelegt.



**Abbildung 3-15: FP Rezeptoren in Neuronen der Lamina I+II.** Die FP Rezeptorexpression wurde im Lumbalmark (L4-L5) von B/6 Mäusen mit verschiedenen Lamina- und Zelltypmarkern mittels MELK „Multi-Epitop-Ligand-Kartographie“ verglichen. CGRP = Lamina I, IB4 = Lamina II, GFAP = Astrozyten, 7AAD = Zellkerne, NeuN = Neurone. Im übereinander gelagerten „merge“ Bild markieren weiße Pfeile Neurone die FP Rezeptoren exprimieren. Gelbe Pfeile markieren nicht neuronale Zellen mit FP Rezeptoren.

Die Überlagerung im „merge“ Bild zeigte, dass die FP Rezeptoren sowohl in neuronalen (weiße Pfeile) als auch in nicht neuronalen Zellen (gelbe Pfeile) der Lamina II und in den tieferen Laminae lokalisiert sind. Da primär afferente Schmerzfasern auf Lamina I + II Neurone im Rückenmark projizieren, könnte der Shift der Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Mäusen zu  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die nozizeptive Transmission beeinflussen.

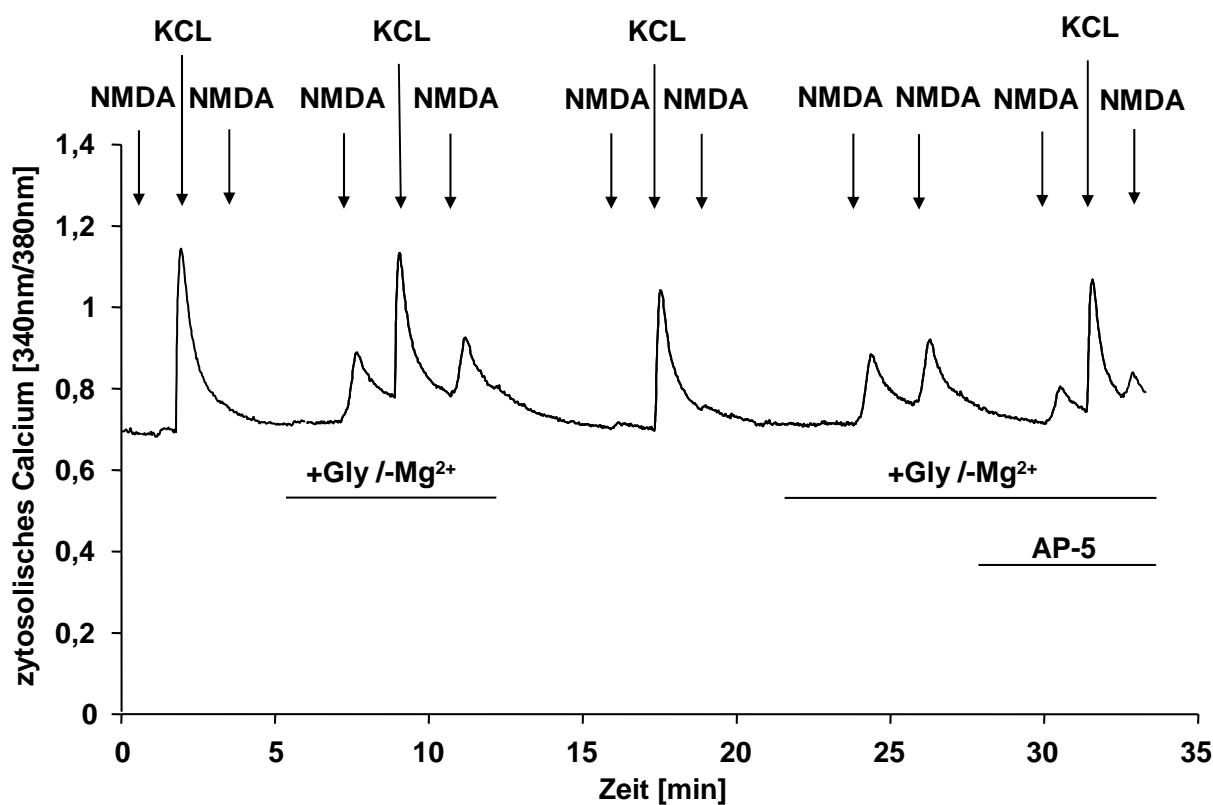
### **3.3.2 Die Sensibilisierung von NMDA Rezeptoren in kultivierten Rückenmarksneuronen**

Auf Rückenmarksebene konnte für die Sensibilisierung der nozizeptiven Transmission bisher ausschließlich für  $\text{PGE}_2$  ein detaillierter Mechanismus beschrieben werden (56).  $\text{PGE}_2$  inhibiert die Aktivierung von Glycinrezeptoren. Dies reduziert die Hyperpolarisation postsynaptischer Neurone und damit deren Erregbarkeit (57). Andere Prostaglandine beeinflussen die nozizeptive Transmission über diesen Mechanismus nicht (43).

Neben der Hemmung der glycinergen Transmission gibt es jedoch noch zahlreiche andere Möglichkeiten, um die nozizeptive Transmission im Rückenmark zu sensibilisieren. So konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration in postsynaptischen oder auch präsynaptischen Zellen eine Langzeitpotenzierung (LTP) induziert (95). Diese LTP im Dorsalhorn des Rückenmarks wird mit der Entwicklung einer zentralen Sensibilisierung in Zusammenhang gebracht. Ein wichtiger selektiver Calciumkanal, der an der Ausbildung einer LTP beteiligt ist, ist der NMDA Kanal (95). Im folgenden Kapitel wurde untersucht, ob die Aktivierung der verschiedenen Prostaglandinrezeptoren den NMDA induzierten Calciumeinstrom und damit die Erregbarkeit postsynaptischer Rückenmarksneurone modifizieren kann.

Der NMDA Kanal gehört mit den Kainat- oder AMPA-Rezeptoren zu den ionotropen Glutamatrezeptoren (96). Er ist für Calcium permeabel. Neben den ligandenabhängigen, existieren noch verschiedene spannungsabhängige Calciumkanäle, die z.B. durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen geöffnet werden können. Um zu zeigen, dass der NMDA induzierte Calciumeinstrom tatsächlich von NMDA Rezeptoren vermittelt wird und der Rezeptor unter den Versuchsbedingungen sensibilisierbar ist, wurden dessen spezifische Eigenschaften in Vorversuchen überprüft. Aus der Literatur ist bekannt, dass NMDA-Rezeptoren durch Magnesiumionen spannungsabhängig blockiert und durch Glycinionen allosterisch aktiviert werden können (97). Um diese charakteristische Eigenschaft zu demonstrieren, wurde der Calciumeinstrom in Rückenmarksneuronen nach Stimulation mit Kaliumchlorid (KCL) oder NMDA, bei An- und Abwesenheit von Glycin und Magnesium im

extrazellulären Medium, verglichen. Kaliumchlorid sollte nur die spannungsabhängigen Calciumkanäle aktivieren. Abbildung 3-16 zeigt ein repräsentatives Neuron, bei dem sich nur durch Stimulierung mit hohem extrazellulären Kalium nicht aber durch NMDA ein Calciumeinstrom induzieren ließ. Bei Stimulation in Ringerlösung ohne Magnesium und mit zusätzlich 600 nM Glycin induzierte die gleiche NMDA Konzentration plötzlich einen Calciumeinstrom, während der KCL induzierte Calciumeinstrom unverändert blieb. Dieser Effekt war reversibel. Im gleichen Experiment wurde zusätzlich demonstriert, dass der NMDA induzierte Calciumeinstrom durch 50  $\mu\text{M}$  AP-5, einem NMDA Rezeptor Antagonisten, reduziert werden kann. Der Vorversuch weist daher darauf hin, dass bei Stimulation mit den verwendeten NMDA Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) eine Sensibilisierung der NMDA Rezeptoren detektierbar ist.



**Abbildung 3-16: NMDA induzierte Calciumeinströme.** Neurone aus Rückenmarkskulturen wurden mit normaler Ringerlösung, Ringerlösung ohne Magnesium und mit 600 nM Glycin oder mit zusätzlich 50  $\mu\text{M}$  AP-5 (NMDAR-Antagonist) umspült. Die zytosolischen Calciumkonzentrationen wurden durch „calcium imaging“ bestimmt. Dargestellt ist der Quotient der Emissionen nach wechselnder Anregung mit 340 nm und 380 nm. 100  $\mu\text{M}$  NMDA oder 50 mM KCL wurden lokal durch Luftstoßapplikation appliziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

### 3.3.3 Sensibilisierung NMDA induzierter Calciumeinströme durch Prostaglandine

In den folgenden Experimenten wurden die Effekte verschiedener Prostaglandine auf eine Sensibilisierung des NMDA induzierten Calciumeinstroms in Rückenmarkneuronen analysiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst ohne und später mit verschiedenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen im extrazellulären Medium für je 10 Sekunden mehrfach mit NMDA stimuliert. Wie die repräsentativen Neurone in Abbildung 3-17 A zeigen, werden die Amplituden des NMDA induzierten Calciumeinstromes durch PGE<sub>2</sub> nicht verändert. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen durchgeführt. Nach Errechnung der Mittelwerte konnten bei keiner Konzentration signifikante Unterschiede gemessen werden (Abbildung 3-17 B).

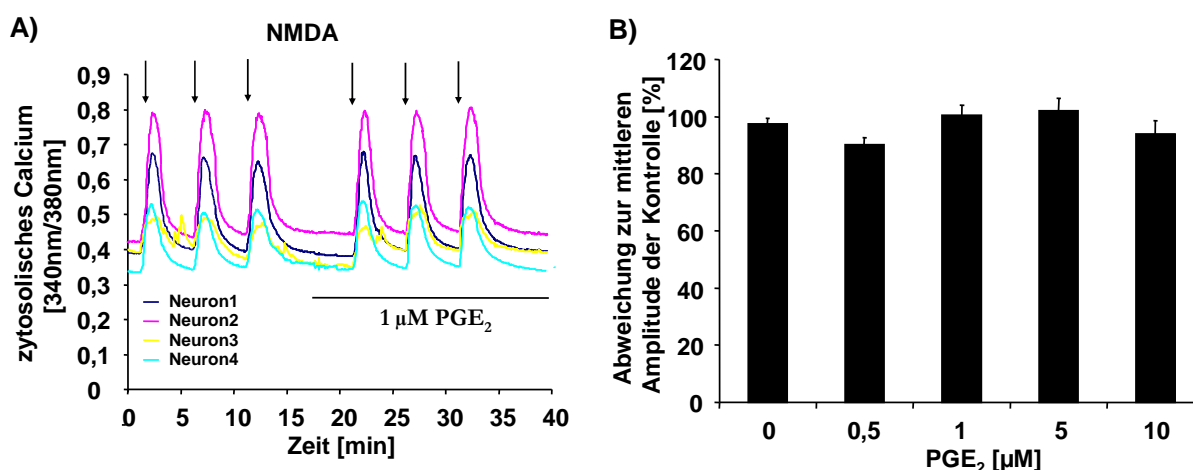


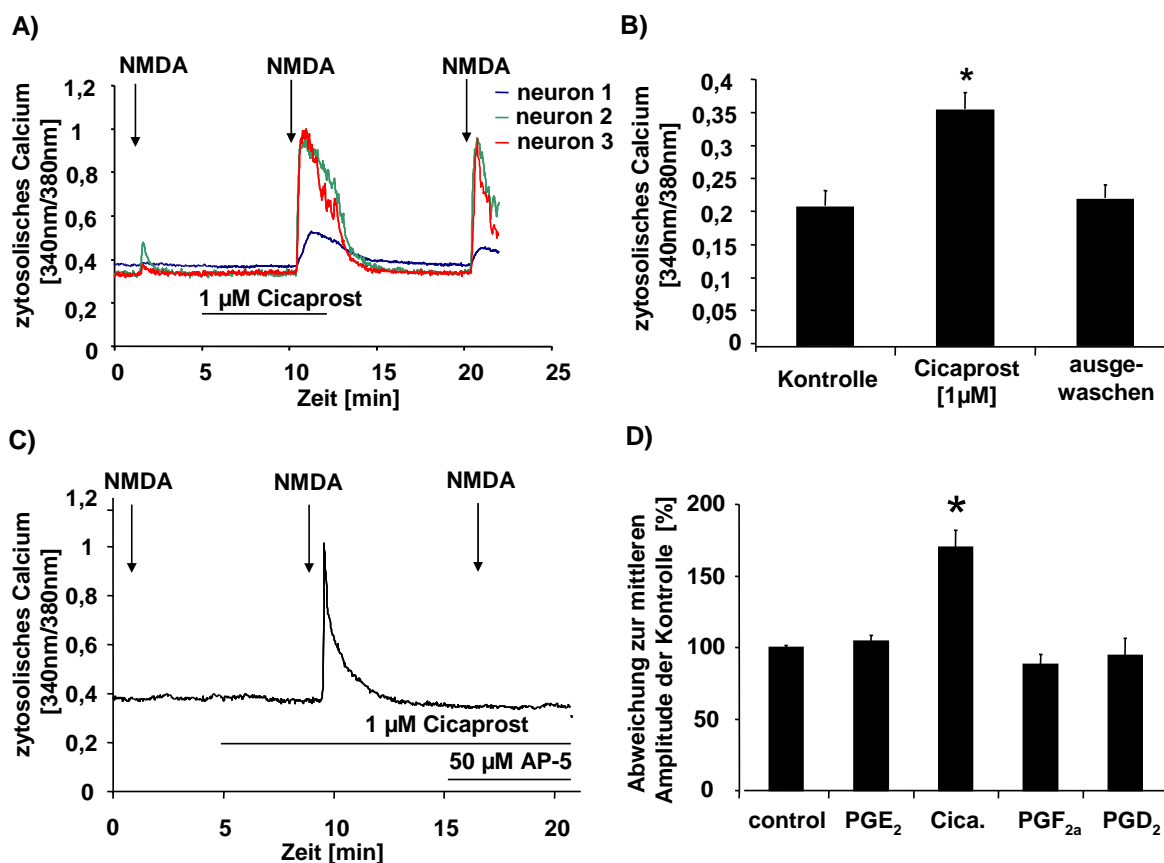
Abbildung 3-17: PGE<sub>2</sub> sensibilisiert den NMDA induzierten Calciumeinstrom nicht. (A) Neurone aus Rückenmarkskulturen wurden mit 1 µM PGE<sub>2</sub> in Ringerlösung umspült und zu den angegebenen Zeitpunkten für 10 Sekunden mit 100 µM NMDA stimuliert. Die zytosolischen Calciumkonzentrationen wurden durch „calcium imaging“ gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. (B) Experiment wie in A nur mit verschiedenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen. Die Amplituden des Calciumeinstroms nach PGE<sub>2</sub> Applikation wurden mit den mittleren Amplituden der Kontrollen verglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils 10-17 Zellen.

In den nächsten Versuchen wurde untersucht, ob Cicaprost (stabiler IP Agonist), PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> den NMDA induzierten Calciumeinstrom in Rückenmarksneuronen sensibilisieren kann. Die Experimente wurden nach dem gleichen Protokoll wie mit PGE<sub>2</sub> durchgeführt.

1 µM Cicaprost bewirkte in Neuronen, die im Kontrollversuch gar nicht oder nur schwach antworteten, eine Sensibilisierung des NMDA induzierten Calciumeinstromes (Abbildung 3-18 A). In 64 % der Zellen verursachte Cicaprost einen um mindestens 30 % erhöhten



Calciumeinstrom. Dieser Effekt von Cicaprost konnte in den meisten Fällen ganz oder zum Teil ausgewaschen werden (Abbildung 3-18 A + B). 50  $\mu\text{M}$  des NMDA-Rezeptor Antagonisten AP-5 blockierten den sensibilisierten Calciumeinstrom vollständig (Abbildung 3-18 C). 1  $\mu\text{M}$   $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder  $\text{PGD}_2$  hatten wie  $\text{PGE}_2$  keinen Einfluss auf den NMDA induzierten Calciumeinstrom (Abbildung 3-18 D).

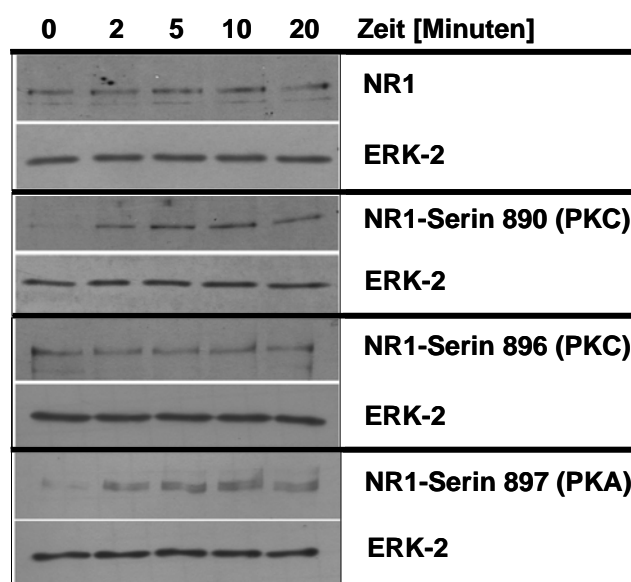


**Abbildung 3-18: Einfluss von Cicaprost (IP-Agonist),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGD}_2$  auf den NMDA induzierten Calciumeinstrom.** (A) Neurone aus Rückenmarkskulturen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  Cicaprost in Ringerlösung umspült und zu den angegebenen Zeitpunkten für 10 Sekunden mit 100  $\mu\text{M}$  NMDA stimuliert. Die zytosolischen Calciumkonzentrationen wurden durch „calcium-imaging“ bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. (B) Statistische Auswertung der Amplituden von 88 Zellen, wie in A stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* = zweiseitiger t-TEST,  $p \leq 0,01$  verglichen mit den Kontrollamplituden. (C) Gleiches Experiment wie in A mit 50  $\mu\text{M}$  AP-5. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. (D) Zusammenfassung der Effekte von jeweils 1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_2$ , Cicaprost,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGD}_2$  auf den NMDA induzierten Calciumeinstrom. Gezeigt sind Mittelwerte der Abweichungen der Amplituden vor und nach der Prostaglandinapplikation in Prozent  $\pm$  SEM von 16-88 Zellen. \* = zweiseitiger t-TEST;  $p \leq 0,01$ .



### 3.3.4 Cicaprost sensibilisiert die NMDA Rezeptoren durch PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung

Die Aktivität von NMDA Rezeptoren kann durch die Phosphorylierung an verschiedenen Serinresten modifiziert werden (98). Nach intradermaler Capsaizininjektion konnte in Rückenmarksneuronen am NMDA Rezeptor eine PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung beobachtet werden (99, 100). Sowohl die Phosphorylierung durch PKA als auch die durch PKC konnte bisher mit einer Erhöhung der Calciumpermeabilität der NMDA Rezeptoren und einer Sensibilisierung der nozizeptiven Transmission im Rückenmark in Zusammenhang gebracht werden (101-103). Der Maus IP Rezeptor kann sowohl mit  $G_{\alpha s}$  als auch mit  $G_{\alpha q}$  koppeln. Die Aktivierung von  $G_{\alpha q}$  ist jedoch PKA abhängig und damit biochemisch von dem  $G_{\alpha s}$  Weg „downstream“ (104). Zur Analyse der Phosphorylierung des NMDA Rezeptors wurden neuronengereicherte Rückenmarkskulturen mit Cicaprost inkubiert und anschließend die phosphorylierten NR1 Untereinheiten mittels Western Blot detektiert. Cicaprost induzierte schon nach zwei Minuten Inkubation am Serin 890 (PKC) und Serin 897 (PKA) eine Phosphorylierung (Abbildung 3-19). Bei der Expression der NR-1 Untereinheit selbst oder der Phosphorylierung an Serin 896 konnte keine Regulation beobachtet werden. Cicaprost scheint also in Rückenmarksneuronen sowohl über PKA als auch über PKC den NMDA Rezeptor zu sensibilisieren.



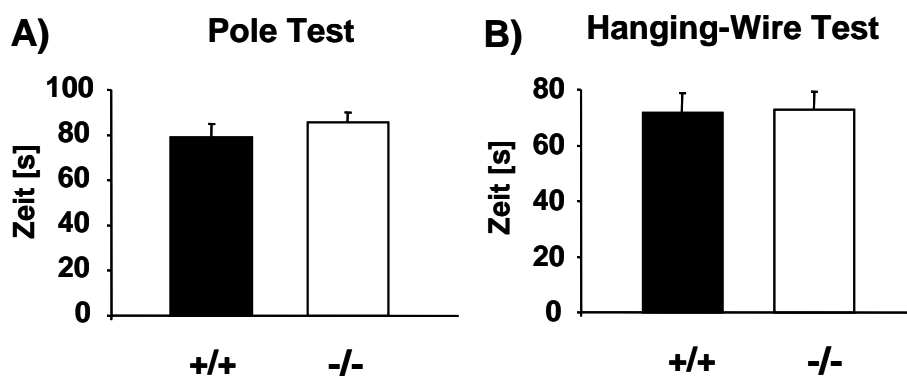
**Abbildung 3-19: Cicaprost induziert in Rückenmarksneuronen eine PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung des NMDA Rezeptors.** Neuronengereicherte Rückenmarkskulturen (Ratte) wurden für die angegebenen Zeiten mit 1  $\mu$ M Cicaprost inkubiert. Die Zellen wurden mit Phospholämmligeeirnetet und sowohl die unphosphorylierte (NR-1) als auch die phosphorylierten NR-1 Untereinheiten des NMDA Rezeptors mittels Westernblot detektiert. Die Beschriftung zeigt die Position der phosphorylierten Aminosäuren und die beteiligten Proteinkinasen an.

### 3.4 Das nozizeptive Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse

Zur Charakterisierung der Funktion von mPGES-1 im nozizeptiven Verhalten wurden mPGES-1-defiziente Mäuse bisher nur im „Writhing“ Test untersucht (74, 75). Die Deletion von mPGES-1 bewirkte im Rückenmark einen Shift der Prostaglandinsynthese zu PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> (3.2). Die „Calcium-Imaging“ und immunhistologischen Experimente zeigten, dass die Rezeptoren dieser Prostaglandine in Rückenmarksneuronen exprimiert werden und dass eine Aktivierung der IP-Rezeptoren den NMDA induzierten Calciumeinstrom sensibilisiert. Um zu untersuchen, ob im Rückenmark durch den Shift der Prostaglandinsynthese in mPGES-1<sup>-/-</sup>-Mäusen die Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese kompensiert werden kann, wurden mPGES-1-defiziente Mäuse in verschiedenen nozizeptiven Modellen untersucht.

#### 3.4.1 Motorische Fähigkeiten mPGES-1-defizienter Mäuse

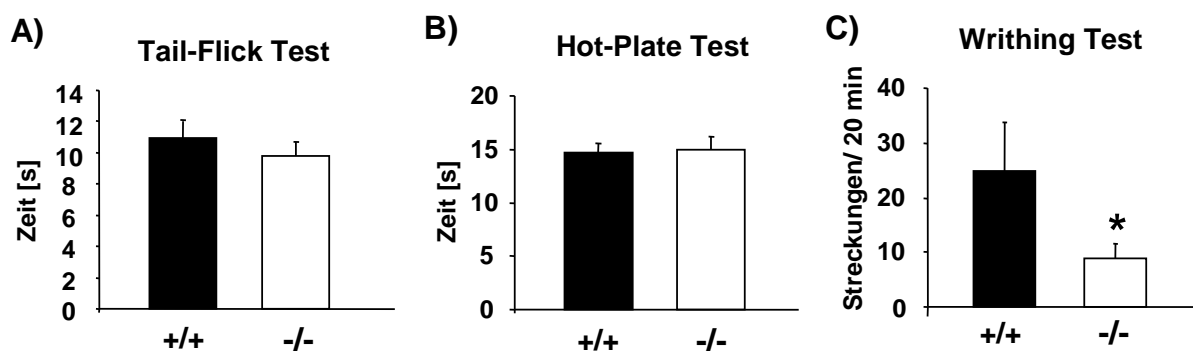
Da ein normales motorisches Verhalten eine Grundvoraussetzung für die richtige Beurteilung des Schmerzverhaltens ist, wurden die mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse zunächst im „Hanging Wire“ Test und im „Pole“ Test mit Wildtypmäusen verglichen. Für den „Hanging Wire“ Test mussten die Tiere kopfüber an einem Käfiggitter und beim „Pole-Test“ an einem senkrecht stehenden Stab hängen. mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse konnte sich bei beiden motorischen Tests ebenso lange an Gitter und Stab halten wie Wildtypmäuse (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20: Motorisches Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse.** (A) Pole-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von je 14 mPGES-1<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen. (B) Hanging-Wire-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von je 14 mPGES-1<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen. Bei beiden Versuchen wurde nach 90 Sekunden das Experiment gestoppt und 90 als Maximalwert verwendet.

### 3.4.2 Das nozizeptive Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse bei akutem Schmerz

Zur Analyse des akuten Schmerzverhaltens der mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse wurde die nozizeptive Reaktion auf einen noxischen Reiz ohne Sensibilisierung gemessen. Im „Tail-Flick“ Test wurden die Mäuseschwänze mit einem Laserstrahl gereizt und die Latenzzeit zum nozizeptiven Reflex bestimmt. Bei den nozizeptiven Antworten konnten zwischen Wildtyp- und mPGES1<sup>-/-</sup> Mäusen keine Unterschiede festgestellt werden. (Abbildung 3-21 A). Im „Hot-Plate“ Test für Akutschmerz wurden die Mäuse auf eine heiße Platte gesetzt und die Zeit bis zum schnellen Hochziehen einer der Pfoten bestimmt. Während beim „Tail-Flick“ Test der reine Schmerzreflex beobachtet wird, sind im nozizeptiven Verhalten des „Hot-Plate“ Test auch höhere Entscheidungszentren involviert. Es konnten hier ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abbildung 3-21 B). Die Versuche zeigen daher, dass die Wildtyp und mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse gleiche sensorische und motorische Fähigkeiten besitzen und somit ein Vergleich des nozizeptiven Verhaltens in pathophysiologischen Modellen möglich ist.



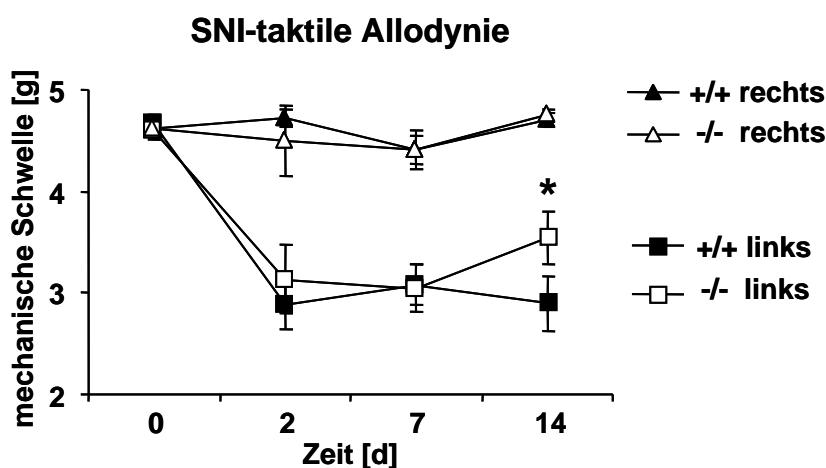
**Abbildung 3-21: Schmerzverhalten mPGES-1-defizienter Mäuse in Modellen für akuten Schmerz.** (A) „Tail-Flick“ Test. Die Mäuseschwänze wurden mit einem Laser bestrahlt und die Zeit bis zum ruckartigen Wegziehen des Schwanzes gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 14 Tieren. (B) „Hot-Plate“ Test. Die Mäuse wurden auf ein 52 °C heiße Platte gesetzt und die Zeit bis zum nozizeptiven Verhalten gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 14 Tieren. (C) „Writhing“ Test. Es wurden nach einer intraperitonealen Injektion Essigsäure die krampfhaften Streckungen gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7-9 Tieren. \* = einseitiger „students TTEST“,  $p \leq 0,05$ .

Ein gängiges Modell zur Charakterisierung von akuten, visceralen Schmerzen ist der „Writhing“ Test. In diesem Versuch wurde den Mäusen intraperitoneal verdünnte Essigsäure injiziert und anschließend über einen Zeitraum von 20 Minuten die krampfhaften Streckungen gezählt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei diesem Modell die Behandlung mit

Ketorolac (COX-Inhibitor) oder eine mPGES-1 Deletion das Schmerzverhalten reduziert (74, 75, 105). Auch unsere getesteten mPGES-1-defizienten Mäuse zeigten nach Essigsäureinjektion signifikant weniger krampfartige Streckungen als die Wildtyptiere, was die bereits veröffentlichten Ergebnisse bestätigt (Abbildung 3-21 C).

### 3.4.3 Das Verhalten mPGES-1-defizienter Mäuse im „spared nerve injury“ Modell für neuropathische Schmerzen

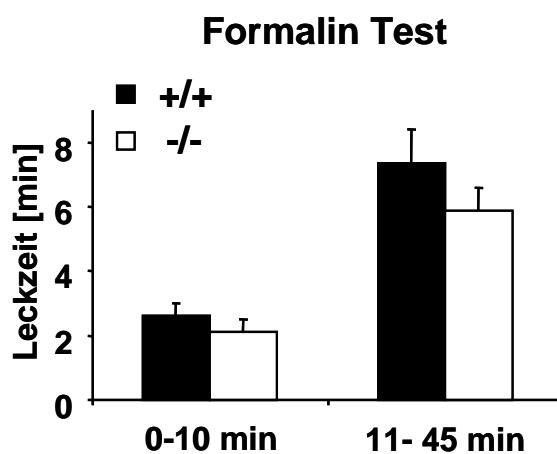
Neuropathische Schmerzen können nach einer Verletzung von Nerven entstehen. Bei dem neuropathischen Schmerzmodell „Spinal Nerve Ligation“ (SNL) wurde beobachtet, dass mPGES-1-defiziente Mäuse keine Hyperalgesie entwickeln (106). Dies war überraschend, da COX-Inhibitoren in dem gleichen Modell nicht wirksam sind und daher eine Rolle von PGE<sub>2</sub> unwahrscheinlich ist (107). Zur weiteren Untersuchung der Funktion von mPGES-1 in der Entwicklung neuropathischer Schmerzen wurden die mPGES-1-defizienten Mäuse im „Spared Nerve Injury“ Modell (81) getestet. Hier wurde den Tieren am linken Hinterbein der Tibial- und der Peronealnerv durchtrennt, während der Suralnerv intakt blieb. Anschließend wurde über 14 Tage die mechanische Reizschwelle bestimmt. Das Ergebnis zeigte sowohl für Wildtyp als auch für mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse schon nach zwei Tagen am behandelten Fuß eine mechanische Allodynie, die bis sieben Tage nach der Operation anhielt (Abbildung 3-22). Nach 14 Tagen zeigten die mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyptieren eine leichte Reduktion der Allodynie.



**Abbildung 3-22: Mechanische Allodynie mPGES-1-defizienter Mäuse im „Spared Nerve Injury“ Modell für neuropathische Schmerzen.** Es wurde mit einem Plantar-Ästhesiometer zu den angezeigten Zeitpunkten die mechanische Reizschwelle bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 14 Tieren. \* = zweiseitiger t-TEST,  $p \leq 0,05$ .

### 3.4.4 mPGES-1-defiziente Mäuse in Schmerzmodellen mit PGE<sub>2</sub>-vermittelter zentraler Sensibilisierung

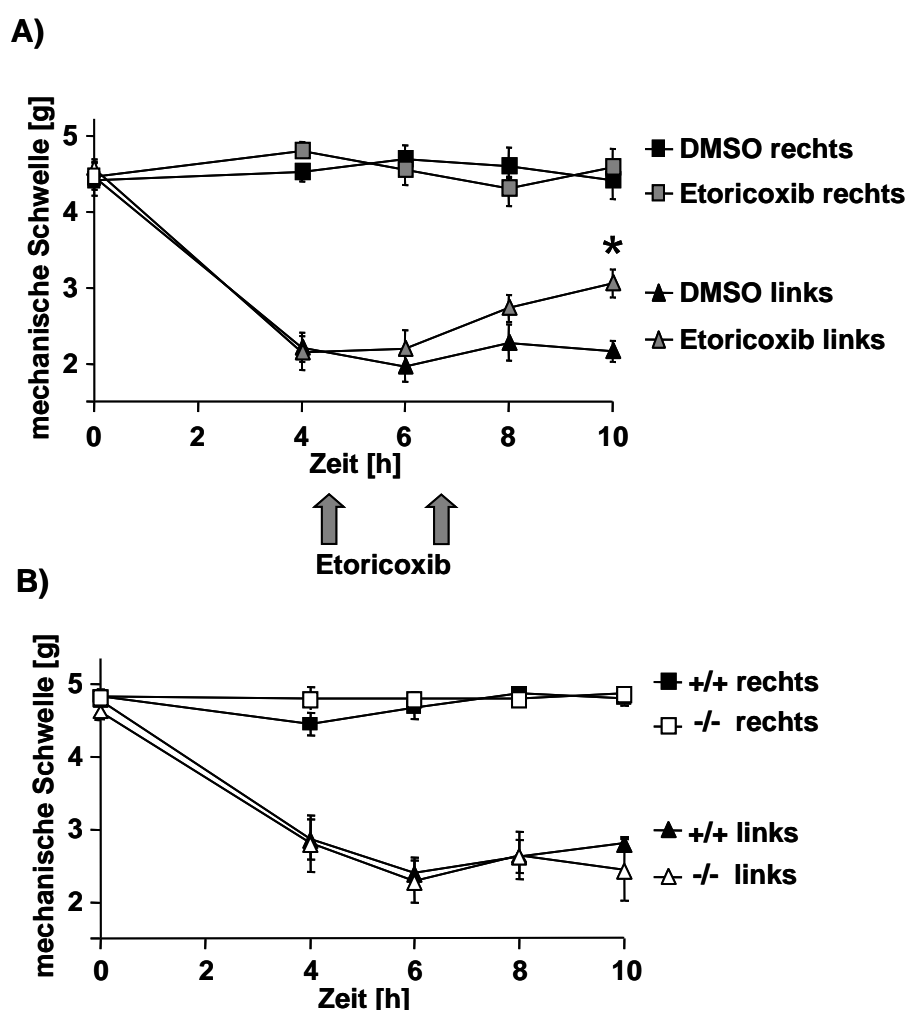
Die bisherigen Ergebnisse (3.1.1 und 3.2) zeigten, dass mPGES-1 maßgeblich an der induzierten PGE<sub>2</sub>-Synthese im Rückenmark beteiligt ist. Schmerzmodelle bei denen das nozizeptive Verhalten durch spinales PGE<sub>2</sub> vermittelt wird, sind daher im Hinblick auf eine Analyse der Funktion von mPGES-1 besonders interessant. Im Formalin Test wird durch eine intraplantare Injektion von Formaldehyd ein biphasiges nozizeptives Verhalten ausgelöst. Während die erste Phase eine akute Schmerzreaktion beschreibt, wird die zweite Phase durch eine PGE<sub>2</sub> vermittelte zentrale Sensibilisierung hervorgerufen. Die Rolle der COX Isoformen ist jedoch in dem Modell unklar. Durch pharmakologische Untersuchungen wurde dem Verhalten teils eine COX-1/cPGES (38, 39, 108), teils aber auch eine COX-2 (109) Abhängigkeit zugewiesen. Die in dieser Arbeit getesteten mPGES-1-defizienten Mäuse zeigten in beiden Phasen nur eine geringe Reduktion des Schmerzverhaltens (Abbildung 3-23). Sie entwickelten das charakteristisch auftretende Leckverhalten der 2. Phase ohne signifikante Unterschiede zu den Wildtyptieren.



**Abbildung 3-23: mPGES-1-defiziente Mäuse im Formalin-Test.** 50  $\mu$ l 5 % Formaldehyd wurde in die linke Pfote injiziert und anschließend für 45 min das Leckverhalten an der Pfote bestimmt und in zwei Phasen zusammengefasst. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 9 Tieren.

Bei der Zymosan induzierten thermalen und mechanischen Hyperalgesie konnte im Gegensatz zum Formalin-Test durch die intrathekale Applikation von Celecoxib die Beteiligung einer COX-2 abhängigen zentralen Sensibilisierung demonstriert werden (43, 93). Um zu überprüfen, ob die Zymosan-induzierte Hyperalgesie mit den untersuchten Mäusen (SFW) auch tatsächlich COX-2 abhängig ist, wurde in dem Modell die Wirkung des selektiven COX-2 Hemmstoffes Etoricoxib untersucht. Eine intraplantare Zymosaninjektion induzierte an der

behandelten Pfote schon nach vier Stunden eine deutliche Reduktion der mechanischen Reizschwelle. Wurde vier und sechs Stunden nach der Zymosaninjektion 10 mg/kg Etoricoxib intraperitoneal injiziert (110), konnte nach acht bis zehn Stunden eine signifikante Erhöhung der mechanischen Schwelle beobachtet werden (Abbildung 3-24 A). Die Hyperalgesie muss daher in diesem Zeitfenster COX-2 abhängig sein. Im nächsten Experiment wurde im identischen Modell das Schmerzverhalten von mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Das nozizeptive Verhalten war jedoch verglichen mit den Wildtyptieren zu keinem Zeitpunkt reduziert (Abbildung 3-24 B).



**Abbildung 3-24: Effekte der COX-2 Inhibierung und mPGES-1 Deletion in der Zymosan induzierten mechanischen Hyperalgesie.** (A) Die Unterseite beider Hinterpfoten wurde mit einer steigenden Kraft mechanisch stimuliert und die Schwelle bis zur nozizeptiven Reaktion bestimmt. 10 mg/kg Etoricoxib wurden vier und sechs Stunden nach der Zymosaninjektion in Wildtyp (SFW) Tiere intraperitoneal injiziert. Die Daten von zwei Stunden wurden jeweils zusammengefasst. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 8-9 Tieren. \*= einseitiger t-TEST,  $p \leq 0,05$  verglichen mit unbehandelten Tieren (B) Gleiches Experiment wie in A mit mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 11 Tieren.

Der Versuch demonstrierte, dass die Deletion von mPGES-1 im Gegensatz zur Inhibierung von COX-2 keine Reduktion der PGE<sub>2</sub>-abhängigen zentralen Sensibilisierung bewirkt, obwohl im Rückenmark mPGES-1-defizienter Tiere die PGE<sub>2</sub> Konzentration erniedrigt ist (3.2.3). Eine Erklärung könnte die verstärkte Synthese anderer pronozizeptiver Prostaglandine sein (3.2.3), die im Rückenmark das fehlende PGE<sub>2</sub> kompensieren.

### **3.5 Regulation der Zytokinfreisetzung und COX-2-Expression durch Prostaglandine**

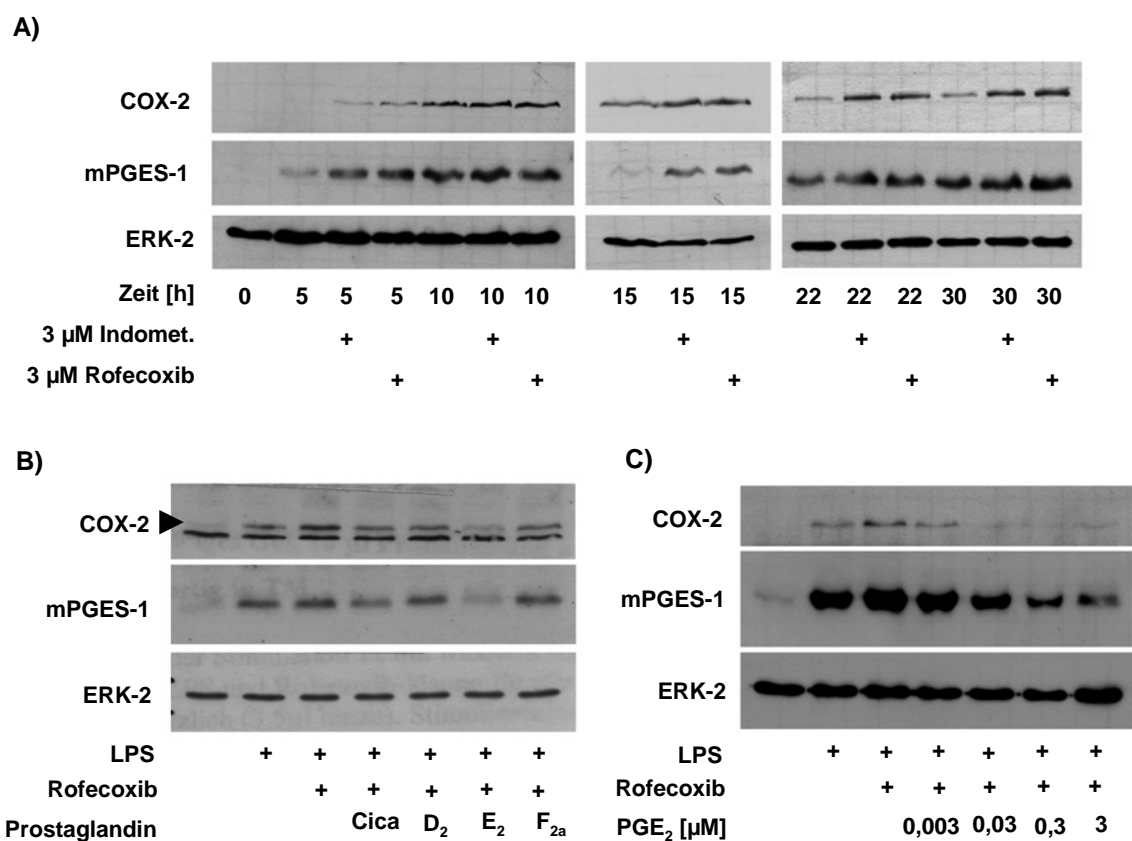
Neben den schnellen pronozizeptiven Effekten auf die neuronale Erregbarkeit können Prostaglandine auch an Heilungsprozessen beteiligt sein und als Immunmodulatoren antiinflammatorische Wirkungen besitzen (111). Versuche mit Immunzellen aus dem Gefäßsystem zeigten, dass eine COX-2 Inhibierung eine erhöhte TNF $\alpha$  Freisetzung und damit auch eine erhöhte COX-2 Expression zur Folge hat (112, 113). Dies zeigt, dass Prostaglandine in verschiedenen Zelltypen über eine negative Rückkopplungsregulation ihre eigene Synthese durch Repression der Zytokinfreisetzung limitieren können.

In Monozyten und dendritischen Knochenmarkszellen wurde beobachtet, dass sowohl die Aktivierung der EP-2 und EP-4 Rezeptoren, als auch der DP und IP Rezeptoren die TNF $\alpha$  Freisetzung inhibiert (114, 115). Sacco et al postulierten, dass im ZNS eine solche negative Rückkopplung nicht vorhanden ist (116). Um abschätzen zu können, ob im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse die Umleitung des Eicosanoidmetabolismus die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und damit längerfristig die Prostaglandinsynthese beeinflusst, wurde in Rückenmarkskulturen die antiinflammatorische Rolle der Prostaglandinrezeptoren analysiert.

#### **3.5.1 PGE<sub>2</sub> unterdrückt in Rückenmarkskulturen die COX-2- und mPGES-1-Expression**

Zunächst wurde der Einfluss von COX Hemmstoffen auf die LPS induzierte mPGES-1- und COX-2-Expression untersucht. Der quantitative Vergleich über einen längeren Zeitraum zeigte, dass sowohl die unselektive COX-Hemmung durch Indometacin als auch die selektive COX-2 Inhibierung durch Rofecoxib zwischen 5- und 30 Stunden nach der LPS Stimulation die COX-2- und die mPGES-1-Expression erhöhten (Abbildung 3-25 A). Da beide Inhibitoren denselben Effekt zeigten, kann hier eine Rolle von COX-1 ausgeschlossen werden.

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, werden in Rückenmarkskulturen von COX-2 hauptsächlich PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> synthetisiert. Um zu untersuchen, welche der Prostaglandine für die negative Rückkopplung verantwortlich sind, wurde durch Rofecoxib die Synthese aller Prostaglandine blockiert und jeweils 1 μM der verschiedenen Prostaglandine exogen in das Medium gegeben. Da PGI<sub>2</sub> äußerst instabil ist, wurde es durch den stabilen und hoch selektiven IP-Agonist Cicaprost ersetzt (117). Abbildung 3-25 B zeigt, dass die exogene Zugabe von 1 μM PGE<sub>2</sub> die Induktion von COX-2 und mPGES-1 fast komplett hemmt. Von den anderen Prostaglandinen zeigte nur 1 μM Cicaprost einen schwachen Effekt. Ein Experiment mit verschiedenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen zeigte, dass schon 3 nM PGE<sub>2</sub> die LPS induzierte COX-2 und mPGES-1 Expression hemmen kann (Abbildung 3-25 C).



**Abbildung 3-25: PGE<sub>2</sub> inhibierte die LPS induzierte COX-2- und mPGES-1-Expression.**

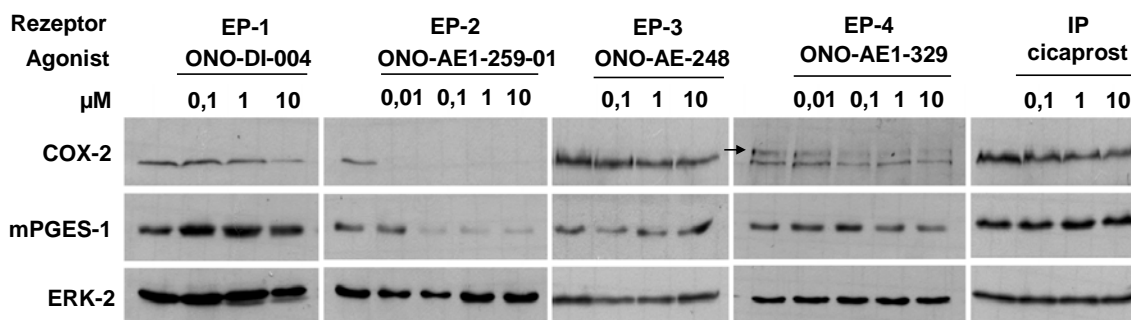
(A) Rückenmarkskulturen wurden mit 1 μg/ml LPS und 3 μM Indometacin (Indomet.) oder 3 μM Rofecoxib für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert und anschließend die Expression von COX-2 und mPGES-1 durch Western Blot Analyse verglichen. (B) Rückenmarkskulturen wurden für 21 Stunden mit 1 μg/ml LPS, 3 μM Rofecoxib und 1 μM der jeweiligen Prostaglandine inkubiert und die Expression durch Western Blot Analyse verglichen. Cica = Cicaprost. (IP Agonist) (C) Gleiches Experiment wie in B mit verschiedenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen.



### 3.5.2 EP-2 und EP-4 Rezeptoren vermitteln die Repression der LPS induzierten Prostaglandinsynthese

PGE<sub>2</sub> kann vier verschiedene Rezeptortypen aktivieren. Um herauszufinden welche von diesen für die negative Rückkopplungsreaktion verantwortlich sind, wurden die einzelnen Rezeptoren während der LPS Stimulierung selektiv aktiviert. Die verfügbaren Agonisten haben jeweils für die EP-2, EP-3 und EP-4 Rezeptoren einen EC<sub>50</sub>-Wert von 4-5 nM, während der für den EP- Rezeptor einen EC<sub>50</sub>-Wert von 400 nM besitzt (118). Die Rückenmarkskulturen wurden für 21 Stunden mit LPS, Rofecoxib und verschiedenen Konzentrationen der Agonisten inkubiert. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass die selektiven EP-2 und EP-4 Agonisten schon in nanomolaren Konzentrationen die Induktion von COX-2 und mPGES-1 inhibierten (Abbildung 3-26 A). Die EP-1, EP-3 und IP Agonisten hemmten dagegen erst mit 10 µM die COX-2 Expression. Bei diesen Konzentrationen ist jedoch eine selektive Aktivierung der Rezeptoren nicht mehr gewährleistet.

A)



B)

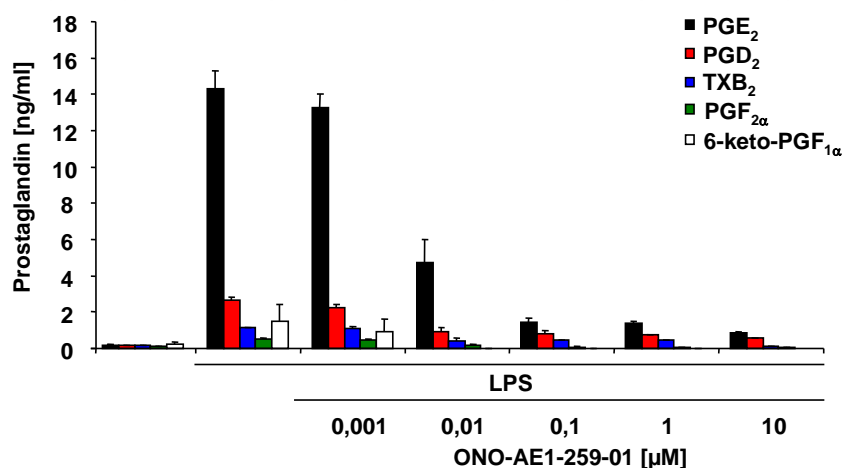


Abbildung 3-26: EP-2 und EP-4 Agonisten hemmen die LPS induzierte Prostaglandinsynthese in Rückenmarkskulturen. (A) Western Blot Analyse von COX-2, mPGES-1 und ERK-2 (Ladkontrolle). Rückenmarkskulturen wurden für 21 Stunden mit 1 µg/ml LPS, 3 µM Rofecoxib und den angezeigten Konzentrationen der Agonisten inkubiert. (B) Messung verschiedener Prostaglandine durch LC-MS/MS. Rückenmarkskulturen wie in A nur ohne Rofecoxib behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei verschiedenen Ansätzen ± SEM.

Da der EP-2 Agonist die Induktion der COX-2 Expression am effektivsten inhibierte, wurde zusätzlich untersucht, wie effizient mit dieser Substanz die Prostaglandinsynthese gehemmt werden kann. Nanomolare Konzentrationen des EP-2 Agonisten inhibierten dosisabhängig die LPS induzierte Synthese von PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (Abb.3-26 B).

### **3.5.3 EP-2- und EP-4-Agonisten blockieren die LPS induzierte**

#### **Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Zytokinfreisetzung**

In den Versuchen aus Kapitel 3.5.2 wurden die EP-2- und EP-4-Agonisten zu Beginn der LPS Stimulation appliziert. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung dieser EP-Rezeptoren nicht nur die Hochregulierung sondern auch eine bereits vorhandene COX-2 und mPGES-1 Expression reduzieren kann, wurden vorstimulierte Rückenmarkskulturen nachträglich mit den Rezeptoragonisten behandelt. Bei einer Vorstimulierung der Rückenmarkskulturen für 15 Stunden mit LPS, konnte 1 μM ONO-AE1-259-01 (EP-2-Agonist) die COX-2- und mPGES-1-Expression nicht reduzieren (Abbildung 3-27 A). Nach drei Stunden Inkubation erhöhte ONO-AE1-259-01 die COX-2 Expression sogar. Zu späteren Zeitpunkten (6 und 24 Stunden) wurde keine weitere Veränderung der COX-2- und mPGES-1-Expression beobachtet. Die PGE<sub>2</sub> vermittelte negative Rückkopplung scheint daher über einen Mechanismus einzugreifen, der zu Beginn der Induktionskaskade von COX-2 und mPGES-1 abläuft. Ein erster Schritt der LPS stimulierten Prostaglandinsynthese ist die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine von Gliazellen. Um zu prüfen, ob PGE<sub>2</sub> noch „downstream“ der Zytokinfreisetzung die COX-2-Expression reduzieren kann, wurden die Zellen anstatt mit LPS direkt mit TNFα stimuliert. 1 μM ONO-AE1-259-01 (EP-2 Agonist) hatte auf die TNFα stimulierte COX-2- und mPGES-1-Expression keinen Einfluss (Abbildung 3-27 B). Es ist daher anzunehmen, dass PGE<sub>2</sub> schon die LPS induzierte Freisetzung von TNFα blockiert.

Um den Einfluss der Aktivierung der Prostaglandinrezeptoren auf die TNFα-Freisetzung zu untersuchen, wurden Rückenmarkskulturen mit LPS, Rofecoxib und unterschiedlichen Konzentrationen der Rezeptoragonisten für 3 Stunden inkubiert und anschließend die TNFα Konzentrationen im Medium bestimmt. EP-2- und EP-4-Agonisten hemmten die TNFα-Synthese schon mit IC<sub>50</sub> Werten von jeweils 3 nM und 1,7 nM (Abbildung 3-27 C). Für Cicaprost und PGF<sub>2α</sub> lagen die IC<sub>50</sub> Werte bei 1,8 μM bzw. 5,5 μM und damit relativ hoch. Für EP-1-, EP-3-Agonisten und PGD<sub>2</sub> waren die gemessenen IC<sub>50</sub> Werte nicht bestimmbar, da keine signifikante Abnahme der TNFα-Synthese erfolgte.

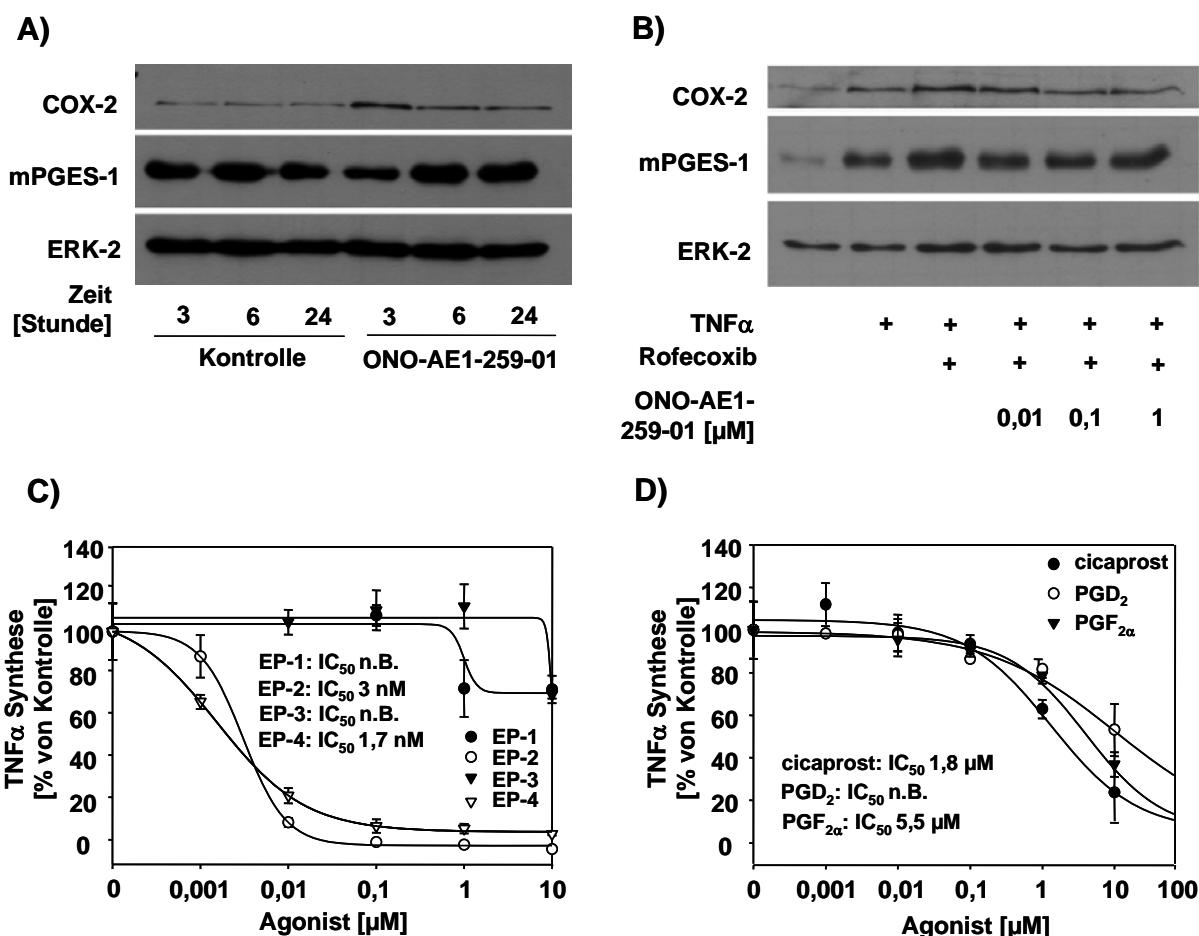


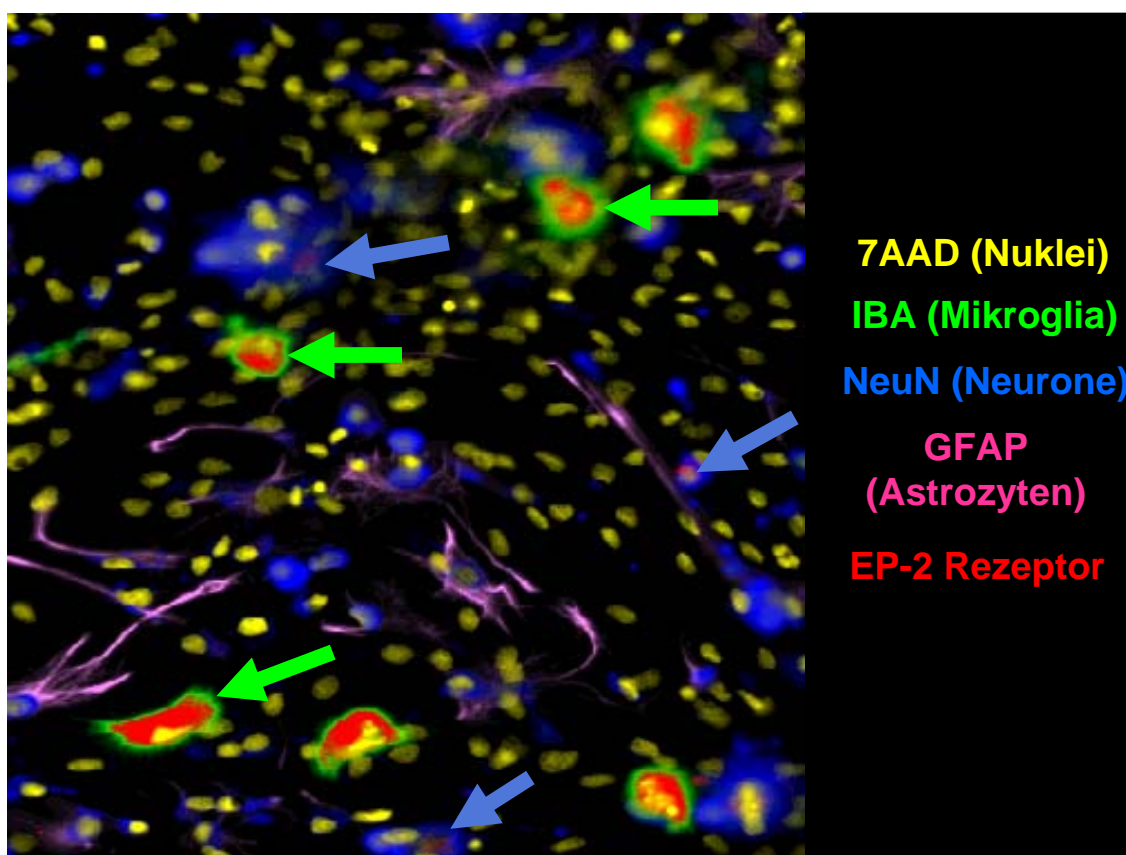
Abbildung 3-27: EP-2- und EP-4-Agonisten inhibieren die LPS induzierte TNF $\alpha$ -Synthese.

(A) Effekt des EP-2-Agonisten nach Vorstimulierung mit LPS. Rückenmarkszellen wurden für 15 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml LPS vorstimuliert und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte mit 1  $\mu$ g/ml LPS und 1  $\mu$ M ONO-AE1-259-01 (EP-2-Agonist) inkubiert. (B) Effekt des EP-2-Agonisten auf die COX-2- und mPGES-1-Expression nach TNF $\alpha$  Stimulierung. Rückenmarkszellen wurden für 21 Stunden mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  und den angegebenen Konzentrationen ONO-AE1-259-01 (EP-2-Agonist) inkubiert. (C) Effekte der verschiedenen EP-Agonisten auf die LPS induzierte TNF $\alpha$ -Synthese. Rückenmarkszellen wurden für 3 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml LPS und den angegebenen Konzentrationen der EP-Agonisten inkubiert und anschließend die TNF $\alpha$ -Konzentration im Medium bestimmt. Die EP-2- und EP-4-Kurven wurden mit der Funktion „hill fourth parameter“ und die für EP-1 und EP-3 mit der Funktion „four parameter logistic“ berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2-6 Ansätzen. (D) Gleiches Experiment wie in C mit Cicaprost, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Die Kurven wurden mit der Funktion „four parameter logistic“ berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2-6 Ansätzen.

### 3.5.4 EP-2-Rezeptoren werden in Mikroglia exprimiert

Proinflammatorische Prostaglandine können im Rückenmark von Astrozyten oder von Mikroglia synthetisiert werden (119, 120). Um herauszufinden in welchen Zelltypen im Rückenmark durch PGE<sub>2</sub> die LPS induzierte Zytokinfreisetzung unterdrückt werden kann,

wurden die Rückenmarkskulturen mittels MELK untersucht. Hierbei wurde die Expression der EP-2-Rezeptoren mit den Markern 7AAD für Zellkerne, NeuN für Neuronenkerne, GFAP für Astrozyten und IBA für Mikroglia verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die EP-2-Rezeptoren sehr stark in Mikroglia und vereinzelt in Neuronen exprimiert werden (Abbildung 3-28). Mikroglia stammen entwicklungsbiologisch von den gleichen Vorläuferzellen wie Makrophagen. Da  $\text{PGE}_2$  in Makrophagen die Zytokinsynthese hemmt (121), ist nicht unwahrscheinlich, dass es auch im Rückenmark in den verwandten Mikrogliazellen ähnliche Effekte zeigt.



**Abbildung 3-28: Expression der EP-2 Rezeptoren in Mikroglia und Neuronen.** MELK „Multi-Epitop-Ligand-Kartographie“ Analyse von Rückenmarkskulturen. GFAP = Astrozyten (rosa), 7AAD = Zellkerne (gelb), NeuN = Neuronenkerne (blau), IBA = Mikroglia (grün), EP-2 Rezeptoren (rot). Grüne Pfeile markieren EP-2 Rezeptoren in Mikroglia. Blaue Pfeile markieren EP-2 Rezeptoren in Neuronen.

Da die antiinflammatorischen Effekte nur von EP-Rezeptoren vermittelt werden, lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine selektive Reduktion der  $\text{PGE}_2$  Konzentration durch mPGES-1-Hemmung die LPS stimulierte  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung durch Mikroglia erhöht und damit die COX-2-Expression und die Synthese von  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGI}_2$  längerfristig zusätzlich erhöhen kann.

## 4 Diskussion

### 4.1 Regulation der PGE<sub>2</sub> Synthese im Rückenmark

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der PGE-Synthasen bei der spinalen Prostaglandinsynthese und die Konsequenzen einer mPGES-1-Hemmung für das Schmerzenverhalten funktionell charakterisiert. Zahlreiche Arbeiten beschrieben bereits, dass nach entzündlichen Schmerzen im Rückenmark die COX-2-Expression sowie eine erhöhte Prostaglandinsynthese induziert werden (38, 40, 122). Obwohl anerkannt ist, dass dort von Astro- und Mikroglia proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden (119, 120), war bislang unklar in welchen Zelltypen die Prostaglandinsynthese induziert wird und welche Rolle hierbei die verschiedenen terminalen Prostaglandinsynthasen spielen.

Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  wird bei neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen im Rückenmark freigesetzt (123). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  in Rückenmarkskulturen zunächst eine COX-2 und dann, um 10 Stunden verzögert, eine mPGES-1 Expression induziert. Die Verzögerung der mPGES-1 Expression stimmt mit dem von Kojima et. al postulierten Modell überein (26). Nach diesem Mechanismus muss zunächst durch COX-2 und mPGES-2 ausreichend PGE<sub>2</sub> synthetisiert werden, damit über eine Aktivierung von EP-2 und EP-4 Rezeptoren der Transkriptionsfaktor EGR-1 (27) zum Kern transloziert und dort gemeinsam mit NF $\kappa$ B die mPGES-1 Expression induzieren kann.

TNF $\alpha$  konnte in neuronenfremen Rückenmarkskulturen weder die Expression von COX-2 und mPGES-1 noch die Synthese von PGE<sub>2</sub> induzieren. Durch immunohistochemische Untersuchungen wurde zudem eine Expression von mPGES-1 und der TNF $\alpha$  Rezeptoren 1 (p55) (124) in Rückenmarksneuronen beobachtet. Die Daten weisen daher in mehrfacher Hinsicht darauf hin, dass die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub>-Synthese in Neuronen stattfindet. Samad et al. beobachteten bereits im CFA-Modell eine IL-1 $\beta$  vermittelte Induktion der COX-2 in Rückenmarksneuronen (41). Es ist daher anzunehmen, dass mPGES-1 nach chronischen Schmerzen in Rückenmarksneuronen funktionell mit COX-2 gekoppelt ist und beide Enzyme gemeinsam die induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese vermitteln (Abbildung 4-2 A).

Mit Hilfe des selektiven COX-2 Inhibitors Rofecoxib konnte gezeigt werden, dass die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese in den Rückenmarkskulturen COX-2 abhängig ist. Die herausragende Bedeutung von COX-2 an der zytokinvermittelten Prostaglandinsynthese im Rückenmark wurde bereits in der Vergangenheit durch die intrathekale Gabe von Coxiben

oder der Charakterisierung von COX-2<sup>-/-</sup> Mäusen in inflammatorischen Schmerzmodellen demonstriert (43).

## **4.2 COX-Isoform Selektivität von SC-560**

Trotz der Rolle von COX-2 bei der zytokininduzierten Prostaglandinsynthese im Rückenmark, hemmte der „COX-1-selektive“ Inhibitor SC-560 in Rückenmarkskulturen die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese mit ähnlichen Konzentrationen wie das COX-2-selektive Rofecoxib. Diese unerwartete Beobachtung führte zur Annahme, dass in Rückenmarkskulturen entweder die COX-1-Aktivität für die COX-2 vermittelten PGE<sub>2</sub> Synthese von Bedeutung ist, oder dass SC-560 noch auf andere Faktoren der PGE<sub>2</sub>-Synthesekaskade außer COX-1 direkt hemmend wirken kann.

Für eine Hemmung der TNF $\alpha$  stimulierten PGE<sub>2</sub> Synthese durch SC-560 kommen mehrere Mechanismen in Frage. Da in Makrophagen beobachtet wurde, dass die COX-1-Aktivität für die effiziente COX-2 Expression notwendig ist (86, 125), wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ausgeschlossen, dass SC-560 die TNF $\alpha$  induzierte COX-2 oder mPGES-1 Expression reduziert. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist, dass SC-560 die Freisetzung von Arachidonsäure durch Inhibierung der Phospholipasen blockiert. Weder die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> noch die direkte Applikation von exogener Arachidonsäure konnte jedoch die Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese durch SC-560 aufheben. Eine Blockierung der PGE<sub>2</sub>-Synthesekaskade oberhalb der COX-2 ist daher auszuschließen. In weiteren Experimenten wurden anschließend Effekte auf die PGE-Synthaseaktivität und den PGE<sub>2</sub>-Transport ausgeschlossen. Da SC-560 auf alle diese Faktoren der PGE<sub>2</sub> Synthesekaskade keinen Einfluss hat, muss die PGE<sub>2</sub> Synthese durch Hemmung der COX-2 Aktivität blockiert werden.

Eine COX-1 anhängige COX-2 Aktivität könnte auf der Existenz von COX-1/COX-2 Heterodimeren beruhen. Yu et al. (126) generierten transgene Mäuse, denen die Cyclooxygenaseaktivität nicht aber die Peroxydaseaktivität von COX-1 oder COX-2 fehlt. Obwohl die Peroxydaseaktivität der COX-2 alleine zu keiner Prostaglandinsynthese in der Lage war, verstärkte sie dennoch die Prostaglandinsynthese von COX-1. Diese Syntheseleistung als Heterodimer konnte *in vitro* nach Zugabe größerer Mengen Arachidonsäure gezeigt werden. Die Tatsache, dass in den Rückenmarkskulturen die Hemmung der COX-2-Cyclooxygenaseaktivität durch Rofecoxib die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese komplett blockiert, weist jedoch eher darauf hin, dass die COX-1-Cyclooxygenaseaktivität keine Funktion bei der COX-2 vermittelten PGE<sub>2</sub> Synthese besitzt.

Um endgültig zu klären, ob die Wirkung von SC-560 COX-1 abhängig ist, wurden Rückenmarkskulturen von COX-1 defizienten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass für die TNF $\alpha$  induzierte PGE<sub>2</sub> Synthese COX-1 keine Rolle spielt. Zudem hemmte SC-560 in den COX-1<sup>-/-</sup> Zellen die TNF $\alpha$  stimulierte PGE<sub>2</sub> Synthese genauso wie in den Wildtypzellen. Da alle anderen Mechanismen zur Inhibierung der PGE<sub>2</sub> Synthesekaskade zuvor ausgeschlossen wurden, bleibt nur noch die Möglichkeit, dass SC-560 COX-2 direkt hemmt.

Eine direkte Hemmung der COX-2-Aktivität durch SC-560 steht jedoch mit der von Smith et al. beobachteten COX-1-Selektivität im Widerspruch (68). Dort wurde gezeigt, dass SC-560 die gereinigte COX-1 bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen hemmt als COX-2, wobei Rouzer et al. bereits spekulierten, dass SC-560 in Zellkulturexperimenten seine Selektivität verliert (127). Durch den direkten Vergleich der Wirkung von SC-560 in Zellkultur und in der zellfreien *in vitro* Synthese, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SC-560 tatsächlich nur in intakten Zellen ein unselektiver COX Inhibitor ist. Nach Zerstörung der zellulären Verhältnisse durch Ultraschall wurde die COX-1 selektive Eigenschaft von SC-560 wieder hergestellt.

Aufgrund dieser Beobachtung drängt sich die Frage auf, wie es nach Einbindung der COX-2 in ein intaktes Zellsystem zur gesteigerten Hemmung durch SC-560 kommen kann. Nach dem kinetischen Modell von Walker et al. (69) findet SC-560 aufgrund seiner diarylheterocyclischen Struktur zu den hydrophoben Taschen beider COX-Isoformen Zugang. Da es jedoch im Gegensatz zu Rofecoxib oder Valdecoxib keine Phenylsulfonseitengruppe besitzt, kann es mit der Bindungstasche von COX-2 keinen festen Komplex bilden. COX-2 selektive Hemmstoffe bilden durch diese Seitengruppe mit dem aktiven Zentrum der COX-2 Wasserstoffbrücken aus und es entsteht ein fester Enzym-Inhibitor Komplex. Dies bedeutet, dass SC-560 zwar mit gleicher Affinität wie Coxibe an COX-2 bindet, aber wieder dissoziiert bevor es zu einer wirksamen Hemmung kommen kann.

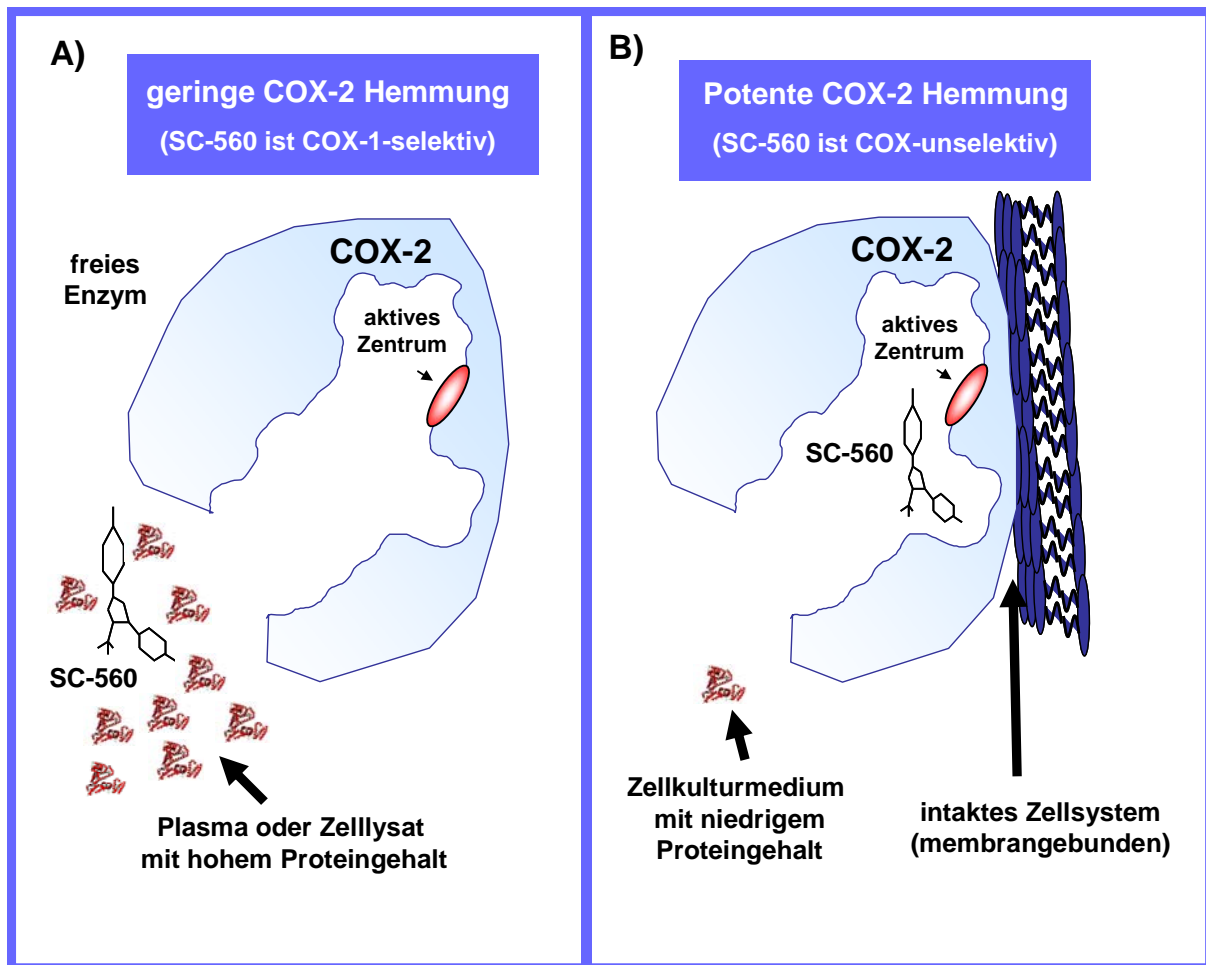
Da Teile der COX-2-Bindetasche aus Alphahelices bestehen die zur Membranbindedomäne gehören, ist nicht auszuschließen, dass die Freiheitsgrade einer Konformationsänderung durch eine Einbindung in der Zellmembran beeinflusst werden. Die Flexibilität von COX-2 könnte für die Inhibierung durch SC-560 entscheidend sein. Im zellbasierten Experiment könnte die Tertiärstruktur und die Beweglichkeit der hydrophoben Bindetasche so verändert werden, dass SC-560 das aktive Zentrum nicht verlassen kann und somit COX-2 mit wesentlich geringeren halbmaximalen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) inhibiert wird als in zellfreien Experimenten mit gereinigten Enzymen.

Die Experimente dieser Arbeit zeigten für SC-560 neben der zellfreien *in vitro* PGE<sub>2</sub> Synthese auch im Vollbluttest eine COX-1 Selektivität. Die von Warner et al. (89) veröffentlichten Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung. Da die Prostaglandinsynthese im Vollbluttest, genauso wie bei den Versuchen mit Rückenmarkskulturen und RAW-Makrophagen in intakten Zellen stattfindet, kann hier der Verlust des zellulären Systems nicht die COX-1 Selektivität von SC-560 erklären.

Bei dem Vollbluttest stellt jedoch der hohe Proteingehalt im Plasma einen wesentlichen Unterschied zum Zellkulturmedium dar. Eine Charakterisierung von COX Inhibitoren zeigte bereits, dass der Serumalbumin (BSA)-Gehalt im Medium einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität nehmen kann (89). Um gezielt den Einfluss von Plasma und Zellkulturmedium zu analysieren, wurde die Selektivität von SC-560 im Vollbluttest und in gewaschenen kultivierten Blutzellen verglichen. Die Versuche zeigten, dass sich in gewaschenen Blutzellen sowohl für SC-560 als auch für Rofecoxib der IC<sub>50</sub> (COX-2) um etwa das 100fache erniedrigte. Dadurch besitzt SC-560 keine COX-1 Selektivität mehr. Da sich die Experimente in Bezug auf Zelltyp (Blutzellen) und Stimulationsart (LPS) nicht unterschieden, können diese Faktoren als Erklärung für die unterschiedlichen IC<sub>50</sub>(COX-2)-Werte ausgeschlossen werden. Da aber SC-560 und Rofecoxib eine starke Proteinbindeeeigenschaft (>85%) besitzen, kann die hohe Proteinkonzentration im Plasma die freien Inhibitormoleküle abfangen. Stellen dagegen, wie in Zellkultur, die Zellen die einzigen Proteine im Testansatz dar, kann es dort zu einer Hemmstoffakkumulation kommen.

Die Experimente mit SC-560 zeigen, dass die COX-Isoform-Selektivität von Inhibitoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen stark variieren kann (Abbildung 4-1). Die halbmaximalen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) für die COX-2-Hemmung können durch die unterschiedliche zelluläre Eingebundenheit der Enzyme und die Proteinkonzentration im Medium verändert werden. Am Beispiel von SC-560 wird daher deutlich, dass von den berechneten Selektivitäten einer zellfreien *in vitro* Synthese oder dem klassischen Vollbluttest nicht auf die Selektivität der Substanzen in Zellkulturversuchen geschlossen werden kann. Um die Rolle der COX Isoformen in Zellkulturversuchen pharmakologisch zu analysieren, müsste daher eine Selektivitätsbestimmung in einem zellbasierten Test mit gleichem extrazellulären Medium und gegebenenfalls Kontrollen mit COX-1- und COX-2-defizienten Zellen vorliegen.





**Abbildung 4-1: Selektivität von SC-560.** (A) Bedingungen unter denen SC-560 COX-1-selektiv wirkt. Ist COX-2 nicht im zellulären System eingebunden und befinden sich im Medium (Plasma) hohe Proteinmengen kann COX-2 durch niedrige SC-560 Konzentrationen nicht gehemmt werden. (B) Bedingungen unter denen SC-560 COX-unselektiv wirkt. Ist COX-2 in einem intakten Zellsystem an der Zellmembran gebunden und das extrazelluläre Medium proteinarm, kann SC-560 schon mit niedrigen Konzentrationen COX-2 hemmen.

### 4.3 mPGES-1: Ein Zielprotein für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente ?

Rund 10 Jahre nach der Entdeckung der induzierbaren COX-2 wurden für die Therapie entzündlicher Erkrankungen selektive COX-2 Inhibitoren zugelassen. Mit den Phase-III-Studien CLASS (128) und VIGOR (72) konnte gezeigt werden, dass die COX-2 selektiven Hemmstoffe Celecoxib und Rofecoxib gegenüber den traditionellen NSAIDs in Bezug auf die gastrointestinale Toxizität einige Vorteile besitzen. Gleichzeitig zeigte die VIGOR Studie jedoch, dass insbesondere bei Risikopatienten mit Herzerkrankungen nach einer Behandlung mit Rofecoxib häufiger thromboembolische Ereignisse auftreten als nach einer Behandlung

mit dem klassischen NSAID Naproxen (129). Diese Komplikationen führten schließlich zur Rücknahme von Rofecoxib (Vioox<sup>TM</sup>) und Valdecoxib (Bextra<sup>TM</sup>) vom Arzneimittelmarkt.

Derzeit wird diskutiert, ob die kardiovaskulären Nebenwirkungen substanzspezifisch sind oder generell durch eine Hemmung und einer damit verbundenen Hemmung des Prostacyclins hervorgerufen werden (73). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass COX-2 nicht, wie ursprünglich von Vane postuliert (130), ausschließlich für die pathophysiologische Prostaglandinsynthese verantwortlich ist. Eine konstitutive COX-2-Aktivität ist beispielsweise auch für die Prostacyclin vermittelte Regulation des Gefäßtonus von Bedeutung.

Um selektiv nur die PGE<sub>2</sub> vermittelte Pathogenese von Schmerz, Fieber und Entzündung zu hemmen, wird derzeit diskutiert, ob mPGES-1 ein geeigneteres Zielprotein als COX-2 darstellt. In Modellen für rheumatoide Arthritis (74) und für Fieber (76) zeigten mPGES-1-defiziente Mäusen weniger Krankheitssymptome als Wildtypiere. Darüber hinaus traten bei den Tieren im Gegensatz zu COX-2<sup>-/-</sup> Mäusen keine kardiovaskulären Komplikationen auf (90). Da das Schmerzverhalten der mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse bisher nur mit dem „Writhing Test“ für visceralen Schmerz untersucht wurde, ist noch nicht klar, ob mPGES-1 Inhibitoren auch antihyperalgetisch wirksam sind und für die symptomatische Therapie inflammatorischer Schmerzen in Frage kommen.

#### **4.3.1 Die Bedeutung von mPGES-1 für das nozizeptive Verhalten**

In der vorliegenden Arbeit wurden mPGES-1-defiziente Mäuse in Modellen für akute, inflammatorische und neuropathische Schmerzen untersucht. Im „Hot-Plate“- und „Tail-Flick“-Test für akuten Schmerz wurde bei Wildtyp- und mPGES-1-defizienten Mäusen ein identisches nozizeptives Verhalten beobachtet. Dies war zu erwarten, da die mPGES-1 Expression erst durch Entzündungen induziert werden muss und außerdem PGE<sub>2</sub> im akuten Schmerz keine Rolle zu spielen scheint.

Mabuchi et al. (106) beobachteten bei mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäusen im „Spinal-Nerve-Ligation (SNL)“ Modell für neuropathische Schmerzen eine reduzierte Allodynie und Hyperalgesie. Dies war überraschend, da im gleichen Modell COX-2 Hemmstoffe keine Wirkung zeigen. Darüber hinaus werden Coxibe wegen ihrer geringen Wirksamkeit zur Therapie neuropathischer Schmerzen normalerweise nicht eingesetzt. Da bei dem SNL Modell eine inflammatorische Komponente nicht auszuschließen ist, könnte das reduzierte Schmerzverhalten der mPGES-1-defizienten Mäuse auf eine Entzündung zurückzuführen sein. In dem von uns untersuchten SNI Modell war das Schmerzverhalten der mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse

nur gering reduziert. Durch Scheinoperationen ohne eine Durchtrennung der Nerven wurde zuvor demonstriert, dass die beobachtete mechanische Allodynie ausschließlich auf die Verletzung des Nervengewebes zurückzuführen ist. Eine entzündliche Komponente ist daher unwahrscheinlich. Da die geringen Unterschiede, die in diesem Modell zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren beobachtet wurden erst sehr spät auftraten, ist anzunehmen, dass mPGES-1 eher bei Heilungsprozessen als bei der Entstehung der Neuropathie eine Rolle spielt.

Im Writhing-Test zeigten, in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen (74, 75), mPGES-1<sup>-/-</sup> Mäuse ein signifikant reduziertes Schmerzverhalten. In diesem Test werden durch intraperitoneale Injektion von Essigsäure viscerale Schmerzen hervorgerufen. Bei dem Schmerzverhalten in diesem Modell konnte zwar eine PGE<sub>2</sub> Abhängigkeit, jedoch keine Beteiligung einer zentralen Sensibilisierung nachgewiesen werden. Mit diesem Modell kann daher keine Aussage getroffen werden, ob mPGES-1 eine Rolle bei der Entwicklung der zentralen Hyperalgesie spielt.

Im Formalin-Test zeigten die Tiere dagegen kein signifikant reduziertes Schmerzverhalten. Im Gegensatz zum „Writhing Test“ konnte in diesem Modell bereits eine PGE<sub>2</sub> vermittelte zentrale Sensibilisierung beschrieben werden (40). Eine Beteiligung von COX-2 ist jedoch unklar. Während manche Studien Hinweise auf eine COX-2-Abhängigkeit beobachteten (131), deuteten andere Studien auf ein COX-1 (38) und cPGES (39) vermitteltes Schmerzverhalten hin. Da die mPGES-1 Expression und Aktivität in allen bisher untersuchten Zellen funktionell mit COX-2 gekoppelt vorgefunden wurde, ist nur in einem COX-2 abhängigen Modell eine Rolle von mPGES-1 zu erwarten.

In der Zymosan induzierten mechanischen Hyperalgesie konnte schließlich, wie bereits in mehreren Studien veröffentlicht (43), durch die Gabe des selektiven COX-2 Inhibitors Etoricoxib eine COX-2-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigten die mPGES-1-defizienten Mäuse auch in diesem Modell kein reduziertes Schmerzverhalten. Bestimmungen der Prostaglandinkonzentrationen im Rückenmarksgewebe zeigten aber, dass die PGE<sub>2</sub> Konzentration in mPGES-1-defizienten Mäusen signifikant reduziert war. Die Ergebnisse zeigen daher, dass die selektive Blockade der PGE<sub>2</sub> Synthese durch mPGES-1-Deletion im Gegensatz zur Inhibierung der gesamten Prostaglandinsynthese durch COX-2-Hemmung das Schmerzverhalten im Zymosan-Modell nicht reduziert.

#### **4.3.2 Shift der Prostaglandinsynthese bei mPGES-1-defizienten Mäusen**

Wie bereits für das Gefäßsystem, den Gastrointestinaltrakt und für LPS stimulierte Makrophagen beschrieben, wurde in dieser Arbeit auch im Rückenmark ein Shift der

Prostaglandinsynthese bei Abwesenheit von mPGES-1 beobachtet. Bei reduzierter PGE<sub>2</sub> Synthese konnten im Rückenmark und in Rückenmarkskulturen erhöhte PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> Konzentrationen gemessen werden (Abbildung 4-2 C). Die Versuche zeigten, dass der Shift nur nach Induktion der COX-2-Expression durch LPS Stimulierung, nicht aber bei Messung der basalen Prostaglandinmengen statistische Signifikanz erreichte. Dies weist darauf hin, dass die bei Abwesenheit von mPGES-1 verstärkt gebildeten Prostaglandine vor allem über COX-2 metabolisiert werden. Da die Cyclooxygenase-Reaktion nicht reversibel ablaufen kann, steht das instabile PGH<sub>2</sub> anderen terminalen Prostaglandinsynthasen als Substrat zur Verfügung. Die Umleitung zu PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> zeigt, dass in den Rückenmarkskulturen die PGDS, PGFS und PGIS in den gleichen Zellen wie COX-2 und mPGES-1 lokalisiert ist. Eine Metabolisierung ohne Beteiligung von Enzymen ist unwahrscheinlich, da beispielsweise mPGES-1-defiziente peritoneale Makrophagen kein PGF<sub>2α</sub> aber dafür mehr TxA<sub>2</sub> synthetisieren. Die zelluläre Ausstattung an terminalen Prostaglandinsynthasen entscheidet über das Schicksal von PGH<sub>2</sub>. Qualitative Unterschiede, bei denen die Umleitung in verschiedene Richtungen lief, konnten sogar bei peritonealen Makrophagen von verschiedenen Mausstämmen nachgewiesen werden (35). Dies macht deutlich, dass die Umleitung nach mPGES-1 Hemmung zelltypspezifisch, speziesspezifisch und sogar abhängig vom individuellen genetischen Hintergrund sein kann. Eine Vorhersage der Umleitung der Prostaglandinsynthese ohne experimentelle Befunde ist daher nicht möglich. Bei einer pharmakologischen Therapie durch einen mPGES-1 Hemmstoff kann die Richtung dieses Shifts jedoch entscheidend für die physiologischen Konsequenzen sein. Die Konsequenzen sind wiederum von der Anwesenheit und Funktion der Prostaglandinrezeptoren in den umliegenden Zellen abhängig. Die von Cheng et al. (90) beobachtete Umleitung zu Prostacyclin im Blut wirkte sich beispielsweise hinsichtlich kardiovaskulärer Komplikationen protektiv aus. Auch in Modellen für die Kollagen-induzierte Arthritis zeigten mPGES-1<sup>-/-</sup>-Mäuse (75), dass sich der Shift der Prostaglandinsynthese im entzündeten Gelenk nicht negativ auf die Pathogenese auswirkt.

Im Rückenmark wird PGH<sub>2</sub> zu PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> umgeleitet. Die intrathekale Applikation sowohl von PGI<sub>2</sub> (52) als auch von PGD<sub>2</sub> (132) und PGF<sub>2α</sub> (54, 133) induzierte in den Versuchstieren eine Allodynie. Da PGDS defiziente Mäuse keine PGE<sub>2</sub> induzierte Allodynie entwickeln können (132), wird zudem vermutet, dass PGD<sub>2</sub> für die PGE<sub>2</sub> induzierte Allodynie eine vermittelnde Rolle spielt. Weiterhin kann durch einen Prostacyclin-Rezeptor-Antagonisten die Größe des zymosaninduzierten Pfotenödems, die thermale Hyperalgesie und die Entwicklung entzündlicher Schmerzen signifikant reduziert werden. Da für alle der drei

Prostaglandine also bereits pronozizeptive Wirkungen beschrieben wurden, ist für die Schmerztherapie ein Nutzen der mPGES-1 Hemmung fraglich.

Die Befunde machen deutlich, dass nach mPGES-1 Hemmung im Rückenmark ein Shift der Prostaglandinsynthese stattfindet, der hinsichtlich der zentralen Sensibilisierung die Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese kompensieren könnte. Dies könnte erklären, warum eine mPGES-1-Defizienz im Gegensatz zur COX-2 Hemmung das Schmerzverhalten bei der Zymosan induzierten mechanischen Hyperalgesie nicht reduziert.

### 4.3.3 Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit durch Prostacyclin

Die immunohistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit demonstrierten, dass die IP, FP und DP Rezeptoren in Lamina I- und Lamina II Neuronen des Rückenmarks lokalisiert sind. Da die primär afferenten Schmerzfasern auf Neurone in diesem Bereich projizieren, könnte dort durch PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> oder PGF<sub>2α</sub> eine Steigerung der neuronalen Erregbarkeit und als Folge eine zentrale Sensibilisierung verursacht werden.

Elektrophysiologische Studien an akuten Rückenmarksschnitten zeigten, dass PGE<sub>2</sub> über eine Aktivierung des EP-2 Rezeptors in glutamatergen Lamina II Neuronen durch Inhibierung der Gly $\alpha$ R3 Rezeptor die Hyperpolarisation hemmt (43, 57) (Abbildung 4-2 B). Die Applikation aller anderen getesteten Prostaglandine (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) beeinflussten die Gly $\alpha$ R3 Rezeptoren nicht (134). Die Verschiebung des Prostaglandingleichgewichts im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse sollte daher über diesen Mechanismus antinozizeptiv wirken.

In dieser Arbeit wurde mittels „Calcium Imaging“ Experimenten gezeigt, dass der selektive IP-Rezeptor-Agonist Cicaprost den NMDA induzierten Calciumeinstrom erhöht (Abbildung 4-2 D). Ein NMDA Rezeptor vermittelter Calciumeinstrom wurde bisher häufig in Zusammenhang mit einer Veränderung der neuronalen Plastizität bzw. der Ausbildung einer LTP gebracht (95). Die LTP wird wiederum, sofern sie an schmerzrelevanten Synapsen im Rückenmark stattfindet, als Mechanismus der zentralen Sensibilisierung diskutiert. Die Bedeutung der NMDA Rezeptoren für die zentrale Sensibilisierung wird vor allem dadurch verdeutlicht, dass die intrathekale Applikation von NMDA Rezeptor Antagonisten die Formalin oder Zymosan induzierte Hyperalgesie, nicht aber den akuten Schmerz reduziert (9). Sensibilisiert Cicaprost die NMDA Rezeptoren an schmerzprojizierenden, glutamatergen Neuronen im Rückenmark, könnte hierdurch eine Hyperalgesie ausgelöst werden.

Ein zentraler Regulationsmechanismus für die Permeabilität des NMDA Rezeptors ist die spannungsabhängige Blockade durch Magnesiumionen und die allosterische Aktivierung durch Glycinionen. Der Einfluss dieser Ionen wurde in den durchgeführten „Calcium

Imaging“ Experimenten demonstriert. Dies verdeutlicht, dass tatsächlich NMDA Rezeptor vermittelte Calciumströme gemessen wurden und unter den Versuchsbedingungen eine Sensibilisierung des NMDA Rezeptors nachweisbar ist.

Zahlreiche Neuromodulatoren können die Erregbarkeit des NMDA Rezeptors über eine Phosphorylierung durch PKA oder PKC erhöhen (98, 99, 135). Die hier vorgestellten Versuche zeigten, dass durch die Inkubation mit Cicaprost an der NR1 Untereinheit des NMDA Rezeptors eine Phosphorylierung durch PKA und PKC ausgelöst wird. Der Maus IP Rezeptor kann sowohl mit  $G_{\alpha s}$  als auch mit  $G_{\alpha q}$  koppeln, wobei die Aktivierung von  $G_{\alpha q}$  abhängig von der PKA Aktivität ist (104). Die Aktivierung der PKC ist also biochemisch „downstream“ von der PKA Aktivierung. Es ist daher wahrscheinlich, dass in Rückenmarksneuronen die Cicaprost induzierten Phosphorylierungen des NMDA Rezeptors großteils PKA abhängig sind.

Die Phosphorylierung des spinalen NMDA Rezeptors durch PKA und PKC konnte bereits als ein Mechanismus identifiziert werden, der die Capsaizin induzierte Hyperalgesie vermittelt (100, 136, 137). Um jedoch die hier beobachtete Sensibilisierung des NMDA Rezeptors in direkten Zusammenhang mit der nozizeptiven Transmission im Rückenmark zu bringen, müssten die gemessenen Neuronen als schmerzrelevant identifiziert werden. Eine wichtige Voraussetzung wäre hier zum Beispiel, dass die Neurone exzitatorisch und in Lamina I oder II lokalisiert sind. Mit den „Calcium Imaging“ Experimenten an dissoziierten Neuronenkulturen kann hierüber keine Aussage gemacht werden. Da jedoch die NMDA Rezeptoren von über 60 % der untersuchten Neurone durch Cicaprost sensibilisiert wurden, ist eine Beteiligung schmerzrelevanter Neurone nicht unwahrscheinlich. Um die Zelltypen klarer zu definieren, müssten die „Calcium Imaging“ Experimente an akuten Rückenmarksschnitten durchgeführt und die gemessenen Neurone anschließend immunohistochemisch charakterisiert werden. Ein geeigneter Marker wäre hier beispielsweise der Neurokinin-1 (NK-1) Rezeptor, der eine restriktive Expression in schmerzprojizierenden Lamina I-Neuronen zeigt (7).

Außer mit Cicaprost konnte weder mit  $PGE_2$ ,  $PGD_2$  noch  $PGF_{2\alpha}$  eine Sensibilisierung des NMDA Rezeptors induziert werden. Die Resultate deuten daher darauf hin, dass der beschriebene Shift der Prostaglandinsynthese im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse die Sensitivität des NMDA Rezeptors erhöht und dadurch die Weiterleitung nozizeptiver Reize erleichtert wird. Da in Neuronen des Hinterhorns auch FP und DP Rezeptoren lokalisiert sind und  $PGD_2$  und  $PGF_{2\alpha}$  ebenfalls pronozizeptiv wirken, ist davon auszugehen, dass auch hierüber die Umleitung der Prostaglandinsynthese durch bisher noch nicht beschriebene Mechanismen die nozizeptive Transmission im Rückenmark verstärken kann.

#### 4.3.4 Negative Rückkopplungsregulation durch PGE<sub>2</sub>

Seit 1987 ist bekannt, dass Prostaglandine in verschiedenen Zelltypen wie z.B. in Monozyten die TNF $\alpha$  Freisetzung hemmen können (121). Diesem Mechanismus wird vor allem bei der Entzündungsauflösung eine wichtige Rolle zugesprochen. So kann die starke und lang anhaltende Aktivität von COX-2 dazu führen, dass Immunzellen von einem pro- zu einem antiinflammatorischen Phänotyp wechseln. COX-2 ist somit an einer sich selbst limitierenden antiinflammatorischen Antwort beteiligt (138). Durch Versuche mit Coxiben konnte bereits gezeigt werden, dass COX-2 nach einer LPS Stimulierung ohne die COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese verstärkt exprimiert wird (116).

Sacco et al. postulierten, dass dieser negative Rückkopplungsmechanismus nur in der Peripherie, nicht aber im ZNS existiert (116). Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine COX-2 Hemmung auch in Rückenmarkskulturen eine erhöhte COX-2- und mPGES-1-Expression verursacht. Dies deutet darauf hin, dass der Eingriff in die Prostaglandinsynthese auch im Rückenmark den längeren Verlauf der LPS induzierten Entzündungsreaktion beeinflussen kann.

Ob die Umleitung der Prostaglandinsynthese in mPGES-1-defizienten Rückenmarkszellen die Zytokinsynthese hemmt, hängt davon ab, welche der Prostaglandinrezeptoren an den zytokinproduzierenden Mikroglia eine solche Funktion ausüben können. Für Monozyten und dendritische Knochenmarkszellen wurde beschrieben, dass sowohl die Aktivierung der EP-2- und EP-4-Rezeptoren, als auch der DP und IP Rezeptoren die TNF $\alpha$  Freisetzung inhibiert (114, 115). In den Rückenmarkskulturen konnte nur mit EP-2- und EP-4-Agonisten ein solcher Effekt gefunden werden. Es ist daher anzunehmen, dass nach selektiver Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese, der negative Rückkopplungsmechanismus auf die Zytokinfreisetzung geschwächt wird und es damit nach LPS Stimulation zu einer erhöhten COX-2- und mPGES-1-Expression kommt.

Während bei einer COX-2-Hemmung die erhöhte Expression von COX-2 keine Folgen hat, kann nach selektiver Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese in mPGES-1<sup>-/-</sup>-defizienten Mäusen die Synthese der anderen Prostaglandine verstärkt werden. Die verstärkte PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und PGD<sub>2</sub> Synthese im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse könnte daher neben der anfänglich direkten biochemischen Umleitung von PGH<sub>2</sub> auch Ursache der verstärkten COX-2 Expression sein.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt, dass die Umleitung der Prostaglandinsynthese in mPGES-1<sup>-/-</sup> Fibroblasten genau das Gegenteil, nämlich eine Reduktion der COX-2 Expression, bewirkt (139). Im Unterschied zu den eigenen Versuchen

---

wurde hier anstatt mit LPS direkt mit proinflammatorischen Zytokinen stimuliert. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus von PGE<sub>2</sub> auf die zytokininduzierte COX-2 Expression wurde schon mehrfach beschrieben (26, 86) und konnte auch in dieser Arbeit in Rückenmarkskulturen beobachtet werden. In Anbetracht der gegenläufigen Effekte von PGE<sub>2</sub> auf die COX-2 Expression stellt sich nun die Frage, welcher der beiden Effekte physiologisch größere Relevanz besitzt.

*In vivo* beginnt die Entzündungskaskade normalerweise mit einem Reiz, der zunächst die Synthese proinflammatorischer Zytokine auslöst. Diese Situation wird bei der Gabe von LPS nachgeahmt. Zunächst werden Zytokine freigesetzt und dadurch die COX-2- und mPGES-1-Expression und die PGE<sub>2</sub> Synthese stimuliert. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kommt es in Rückenmarkszellen bei Anwesenheit hoher PGE<sub>2</sub> Konzentrationen nicht zur Zytokinfreisetzung. Dem positiven Effekt von PGE<sub>2</sub> auf die COX-2-Expression nach Zytokinstimulation kommt dann nur noch eine geringe Bedeutung zu.

Boulet et al. (78) erwähnten bereits, ohne hierbei auf diesen Mechanismus einzugehen, dass es nach LPS Stimulation in mPGES-1-defizienten Makrophagen zur erhöhten COX-2 Expression kommt. Wie sich die Umleitung der Prostaglandinsynthese im Rückenmark längerfristig auf die COX-2 Expression auswirkt, muss allerdings noch durch Versuche an mPGES-1-defizienten Rückenmarkskulturen untersucht werden.



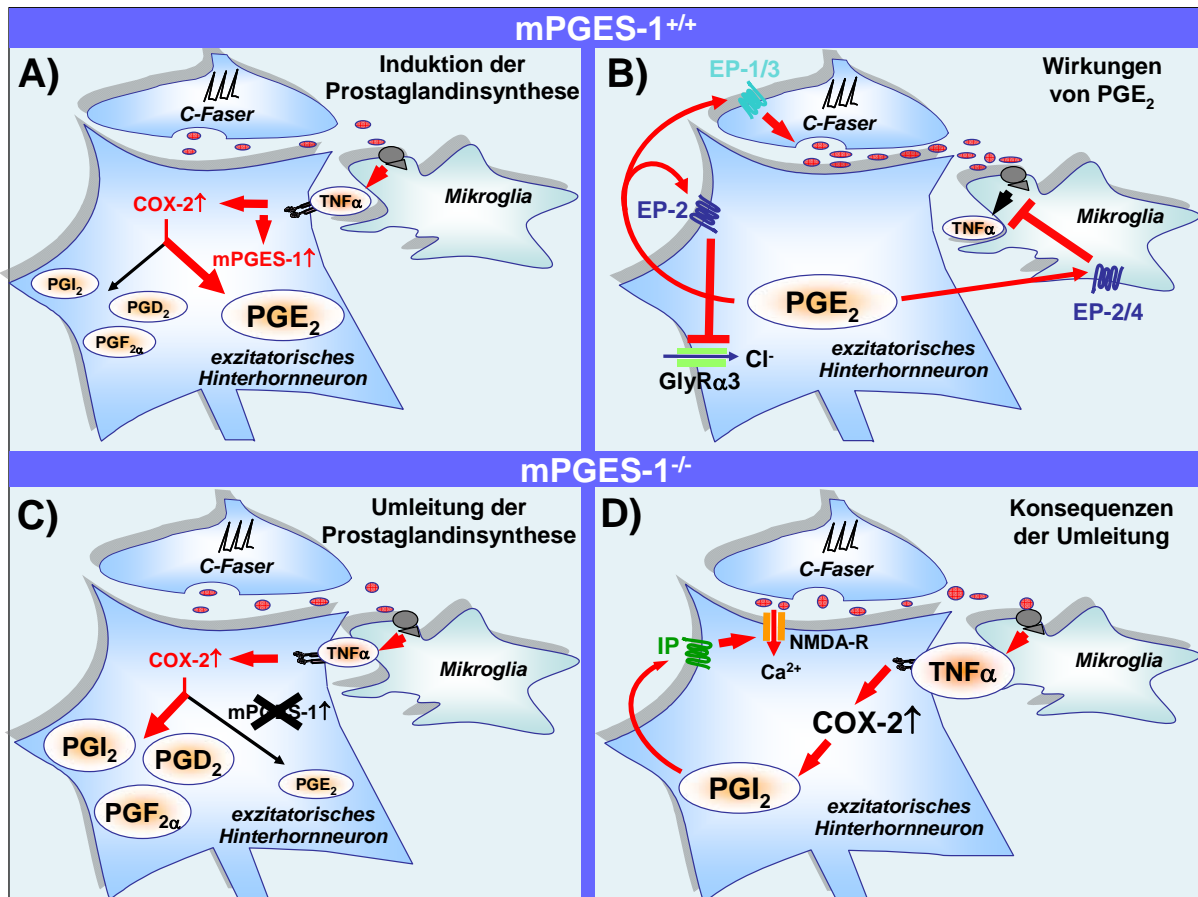


Abbildung 4-2: Folgen einer mPGES-1-Hemmung bei inflammatorischen Schmerzen im Rückenmark. (A) Induktion der Prostaglandinsynthese. Durch erhöhte C-Faser-Aktivität werden Transmitter (Glutamat, Neuropeptide) freigesetzt die Mikroglia zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ ) stimulieren. TNF $\alpha$  induziert in Neuronen eine erhöhte COX-2- und mPGES-1-Expression und damit vorwiegend eine PGE<sub>2</sub> Synthese. (B) Wirkungen von PGE<sub>2</sub> auf die nozizeptive Transmission. PGE<sub>2</sub> kann postsynaptisch über EP-2 Rezeptoren die GlyR $\alpha$ 3 Rezeptoren inhibieren, präsynaptisch über EP-1- und EP-3-Rezeptoren die Transmitterausschüttung verstärken und in Mikroglia über EP-2- und EP-4-Rezeptoren die TNF $\alpha$ -Freisetzung inhibieren. (C) Umleitung der Prostaglandinsynthese nach mPGES-1-Hemmung. Wird in Rückenmarksneuronen die COX-2-Expression induziert und gleichzeitig die mPGES-1-Aktivität gehemmt, kommt es zur Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese und zur verstärkten Synthese von PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . (D) Konsequenzen der Umleitung der Prostaglandinsynthese. Fehlt PGE<sub>2</sub>, wird die TNF $\alpha$  Synthese von Mikroglia nicht mehr gehemmt. Durch erhöhte TNF $\alpha$  Konzentrationen kommt es zur verstärkten COX-2 Expression. PGI<sub>2</sub>, das durch die Umleitung der Prostaglandinsynthese verstärkt gebildet wird, kann über IP Rezeptoren die NMDA-Rezeptoren sensibilisieren und so die antihyperalgetischen Effekte von PGE-Synthesehemmung kompensieren.

## 5 Zusammenfassung

Bei inflammatorischen Schmerzen kann durch Hemmung der COX-2 im Rückenmark die zentrale Sensibilisierung reduziert werden. Da die Hemmung der gesamten COX-2 vermittelten Prostaglandinsynthese jedoch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen verursacht, wird in jüngster Zeit diskutiert, ob eine selektive Hemmung der PGE<sub>2</sub> Synthese auf Ebene der mPGES-1 für die Therapie passagerer Schmerzen sinnvoller ist. Um die funktionellen Rollen von COX-2 und mPGES-1 im Rückenmark zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Folgen einer COX-Inhibierung und mPGES-1-Deletion auf den spinalen Eicosanoidmetabolismus, die neuronale Erregbarkeit, die Synthese proinflammatorischer Zytokine und das nozizeptive Verhalten untersucht.

Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  induzierte in primären Rückenmarksneuronen eine COX-2- und mPGES-1-Expression und eine erhöhte PGE<sub>2</sub> Synthese. Diese Induktion der PGE<sub>2</sub> Synthese konnte durch den selektiven COX-2 Inhibitor Rofecoxib und den „selektiven COX-1 Inhibitor“ SC-560 gleichermaßen potent gehemmt werden. Da der Effekt von SC-560 unerwartet war, wurde sein Wirkmechanismus genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass SC-560 in Rückenmarkskulturen weder die COX-2 und mPGES-1 Expression, die PLA<sub>2</sub> Aktivität, die mPGES-1 Aktivität noch den PGE<sub>2</sub> Transport hemmte. Durch Experimente mit Zellen aus COX-1<sup>-/-</sup> Mäusen konnte gezeigt werden, dass SC-560 in Rückenmarkskulturen die COX-2 unabhängig von COX-1 in nanomolaren Konzentrationen inhibiert. Da dieses Ergebnis den postulierten COX-1-selektiven Eigenschaften von SC-560 widersprach, wurde nach der Ursache für den Verlust der COX-1-Selektivität gesucht. Es zeigte sich, dass SC-560 in einer zellfreien *in vitro* Synthese und im Vollbluttest mit klarer Selektivität COX-1 hemmt. In kultivierten Rückenmarkszellen, RAW-Makrophagen und Blutzellen (Monozyten und Thrombozyten) inhibiert SC-560 allerdings die beide COX-Isoformen potent. Es wurde dadurch deutlich, dass die zelluläre Einbindung von COX-2 sowie ein niedriger Proteingehalt im extrazellulären Medium die halbmaximalen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) für die COX-2-Hemmung durch SC-560 stark reduzieren kann und hierdurch die COX-1-Selektivität der Substanz verloren geht.

Neben einer COX-2 Hemmung verursachte auch eine mPGES-1-Deletion in Rückenmarkskulturen sowie im adulten Rückenmark eine Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese. Überraschenderweise bewirkte jedoch die mPGES-1-Defizienz im Gegensatz zur COX-2 Hemmung durch Etoricoxib im Zymosanmodell keine Reduktion der mechanischen Hyperalgesie.

Um die Ursache für die unterschiedliche antihyperalgetische Wirkung der COX-2-Hemmung und mPGES-1-Deletion zu finden, wurden zunächst die Konsequenzen für die gesamte Prostaglandinsynthese untersucht. Die Analyse mittels LC-MS/MS zeigte, dass im Rückenmark mPGES-1-defizienter Mäuse verstärkt PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> synthetisiert wird. Da für alle drei Prostaglandine bereits pronozizeptive Effekte beschrieben wurden, wurde die Expression von den entsprechenden Rezeptoren im Rückenmark und die Konsequenzen der Rezeptoraktivierung auf die neuronale Erregbarkeit untersucht. Eine MELK Analyse zeigte, dass in Neuronen der schmerzrelevanten Laminae des Hinterhorns sowohl FP, DP als auch IP Rezeptoren lokalisiert sind. Mittels „calcium imaging“ wurde demonstriert, dass selektive IP Rezeptoragonisten in Rückenmarksneuronen eine PKA und PKC vermittelte Phosphorylierung der NMDA Rezeptoren verursachen und die Aktivierbarkeit der NMDA Rezeptoren sensibilisieren. Eine Verstärkung des NMDA induzierten Calciumeinstromes konnte nach Applikation der anderen Prostaglandine nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen daher, dass in mPGES-1-defizienten Mäusen durch die Umleitung der Prostaglandinsynthese zu Prostacyclin die exzitatorischen NMDA Rezeptoren sensibilisiert und hierdurch die antihyperalgetische Wirkung von PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung kompensiert werden kann.

Da die COX-2-abhängige Prostaglandinsynthese unter bestimmten Umständen auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hemmen kann, wurde untersucht welche Prostaglandine in Rückenmarkskulturen die LPS induzierte TNFα-Synthese unterdrücken können. Die Versuche zeigten, dass eine Aktivierung der EP-2 und EP-4 Rezeptoren nicht aber der EP-1, EP-3, IP, FP oder DP Rezeptoren in Mikroglia die LPS induzierte TNFα Synthese und die COX-2- und mPGES-1-Expression blockiert. Eine selektive Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese kann daher längerfristig die COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese verstärken.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass mPGES-1 als Zielmolekül für die Schmerztherapie eher nicht eignet ist. mPGES-1-defiziente Tiere zeigten in inflammatorischen Schmerzmodellen ein normales nozizeptives Verhalten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es nach einer mPGES-1 Deletion im Rückenmark zwar zur Reduktion der PGE<sub>2</sub> Synthese aber auch gleichzeitig zur verstärkten Synthese anderer pronozizeptiv wirkender Prostaglandine kommt. Weiterhin wurde deutlich, dass PGE<sub>2</sub> neben seiner pronozizeptiven Wirkung auf Neurone auch eine antinozizeptive auf Mikroglia hat und somit mPGES-1 zu späteren Zeitpunkten auch zur Terminierung der Hyperalgesie beitragen kann.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CaMKII	Calmodulinkinase II
CGRP	Calcitonine-Gen-Related-Peptide
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Hinterwurzelganglion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR-1	Early-Growth-Response-Factor-1
ERK-2	Extracellular-signal-regulated Proteinkinase-2
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GlyR $\alpha$ 3	Glycinrezeptor $\alpha$ 3
IB-4	Isolectin B-4
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-Phosphat
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LZP	Langzeitpotenzierung
MAPEG	membrane associated protein involved in eicosanoid and glutathion metabolism)
MELK	Multi-Epitope-Ligand-Kartographie
NGF	Nerve Growth Faktor
NK-1	Neukinin-1 Rezeptor
NK- $\kappa$ B	Nuklear-Faktor-kappa-B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
PAG	peraqueduktales Grau
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
POX	Peroxygenase
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
TEMED	N, N, N, N- Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRPV-1	Transient-Receptor-Vanilloidrezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R. F., Schaible, H. G. (2001) *Neuro- und Sinnersphysiologie* (Springer).
2. Vanegas, H. & Schaible, H. G. (2001) *Prog Neurobiol* **64**, 327-63.
3. Woolf, C. J. (2004) *Life Sci* **74**, 2605-10.
4. Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S. & Tominaga, M. (2005) *Mol Pain* **1**, 3.
5. Schaible, H. G., Ebersberger, A. & Von Banchet, G. S. (2002) *Ann N Y Acad Sci* **966**, 343-54.
6. Lopshire, J. C. & Nicol, G. D. (1998) *J Neurosci* **18**, 6081-92.
7. Ikeda, H., Stark, J., Fischer, H., Wagner, M., Drdla, R., Jager, T. & Sandkuhler, J. (2006) *Science* **312**, 1659-62.
8. Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R. & Sandkuhler, J. (2003) *Science* **299**, 1237-40.
9. Chaplan, S. R., Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. (1997) *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 829-38.
10. Vasko, M. R., Campbell, W. B. & Waite, K. J. (1994) *J Neurosci* **14**, 4987-97.
11. Neugebauer, V., Lucke, T. & Schaible, H. G. (1993) *J Neurophysiol* **70**, 1365-77.
12. Barria, A., Derkach, V. & Soderling, T. (1997) *J Biol Chem* **272**, 32727-30.
13. Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. (1993) *Nature* **361**, 31-9.
14. Park, Y. H., Shin, C. Y., Lee, T. S., Huh, I. H. & Sohn, U. D. (2000) *J Pharm Pharmacol* **52**, 431-6.
15. Lu, G., Tsai, A. L., Van Wart, H. E. & Kulmacz, R. J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 16162-7.
16. Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T. & Kudo, I. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 383-99.
17. Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. (1998) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120.
18. Levin, G., Duffin, K. L., Obukowicz, M. G., Hummert, S. L., Fujiwara, H., Needleman, P. & Raz, A. (2002) *Biochem J* **365**, 489-96.
19. Sang, N. & Chen, C. (2006) *Neuroscientist* **12**, 425-34.
20. Kuwata, H., Nakatani, Y., Murakami, M. & Kudo, I. (1998) *J Biol Chem* **273**, 1733-40.
21. Dixon, D. A. (2004) *Curr Pharm Des* **10**, 635-46.
22. Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. & Kudo, I. (2000) *J Biol Chem* **275**, 32775-82.
23. Thoren, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschold, C., Pettersson, P. L., Samuelsson, B., Hebert, H., Hamberg, M., Morgenstern, R. & Jakobsson, P. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 22199-209.
24. Jakobsson, P. J., Thoren, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7220-5.
25. Thoren, S. & Jakobsson, P. J. (2000) *Eur J Biochem* **267**, 6428-34.

26. Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Beppu, M., Aoki, H. & Kawai, S. (2003) *Arthritis Rheum* **48**, 2819-28.
27. Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-Ishi, S. & Tanabe, T. (2002) *J Biol Chem* **277**, 28601-8.
28. Degousee, N., Angoulvant, D., Fazel, S., Stefanski, E., Saha, S., Iliescu, K., Lindsay, T. F., Fish, J. E., Marsden, P. A., Li, R. K., Audoly, L. P., Jakobsson, P. J. & Rubin, B. B. (2006) *J Biol Chem* **281**, 16443-52.
29. Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K. & Kudo, I. (2003) *J Biol Chem* **278**, 37937-47.
30. Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, K. & Urade, Y. (1988) *Arch Biochem Biophys* **264**, 428-37.
31. Wong, P. Y. (1981) *Biochim Biophys Acta* **659**, 169-78.
32. Wu, K. K. & Liou, J. Y. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 45-52.
33. Onguru, O., Casey, M. B., Kajita, S., Nakamura, N. & Lloyd, R. V. (2005) *Endocr Pathol* **16**, 253-77.
34. Kanaoka, Y. & Urade, Y. (2003) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**, 163-7.
35. Scholich, K. & Geisslinger, G. (2006) *Trends Pharmacol Sci* **27**, 399-401.
36. Schneider, A., Zhang, Y., Zhang, M., Lu, W. J., Rao, R., Fan, X., Redha, R., Davis, L., Breyer, R. M., Harris, R., Guan, Y. & Breyer, M. D. (2004) *Kidney Int* **65**, 1205-13.
37. Claveau, D., Sirinyan, M., Guay, J., Gordon, R., Chan, C. C., Bureau, Y., Riendeau, D. & Mancini, J. A. (2003) *J Immunol* **170**, 4738-44.
38. Tegeder, I., Niederberger, E., Vetter, G., Brautigam, L. & Geisslinger, G. (2001) *J Neurochem* **79**, 777-86.
39. Hofacker, A., Coste, O., Nguyen, H. V., Marian, C., Scholich, K. & Geisslinger, G. (2005) *J Neurosci* **25**, 9005-9.
40. Vetter, G., Geisslinger, G. & Tegeder, I. (2001) *Pain* **92**, 213-8.
41. Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V. & Woolf, C. J. (2001) *Nature* **410**, 471-5.
42. Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J. & Riendeau, D. (2004) *J Biol Chem* **279**, 24866-72.
43. Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U. B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., Pahl, A., Brune, K., Narumiya, S., Muller, U. & Zeilhofer, H. U. (2005) *J Clin Invest* **115**, 673-9.
44. Engblom, D., Ek, M., Andersson, I. M., Saha, S., Dahlstrom, M., Jakobsson, P. J., Ericsson-Dahlstrand, A. & Blomqvist, A. (2002) *J Comp Neurol* **452**, 205-14.
45. Ek, M., Engblom, D., Saha, S., Blomqvist, A., Jakobsson, P. J. & Ericsson-Dahlstrand, A. (2001) *Nature* **410**, 430-1.
46. Engblom, D., Ek, M., Saha, S., Ericsson-Dahlstrand, A., Jakobsson, P. J. & Blomqvist, A. (2002) *J Mol Med* **80**, 5-15.
47. Zeilhofer, H. U. (2006) *Biochem Pharmacol*.

48. Lin, C. R., Amaya, F., Barrett, L., Wang, H., Takada, J., Samad, T. A. & Woolf, C. J. (2006) *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1096-103.
49. Akopian, A. N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., Smith, A., Kerr, B. J., McMahon, S. B., Boyce, S., Hill, R., Stanfa, L. C., Dickenson, A. H. & Wood, J. N. (1999) *Nat Neurosci* **2**, 541-8.
50. Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S. & Narumiya, S. (1997) *Nature* **388**, 678-82.
51. Smith, J. A., Amagasu, S. M., Eglen, R. M., Hunter, J. C. & Bley, K. R. (1998) *Br J Pharmacol* **124**, 513-23.
52. Doi, Y., Minami, T., Nishizawa, M., Mabuchi, T., Mori, H. & Ito, S. (2002) *Neuroreport* **13**, 93-6.
53. Minami, T., Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M. & Hayaishi, O. (1992) *Pain* **50**, 223-9.
54. Turnbach, M. E., Spraggins, D. S. & Randich, A. (2002) *Pain* **97**, 33-45.
55. Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M. & Hayaishi, O. (1990) *Brain Res* **510**, 26-32.
56. Baba, H., Kohno, T., Moore, K. A. & Woolf, C. J. (2001) *J Neurosci* **21**, 1750-6.
57. Harvey, R. J., Depner, U. B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U. & Muller, U. (2004) *Science* **304**, 884-7.
58. Kawamura, T., Yamauchi, T., Koyama, M., Maruyama, T., Akira, T. & Nakamura, N. (1997) *Life Sci* **61**, 2111-6.
59. Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Hori, Y., Sakuma, S., Sugimoto, T., Sakimura, K., Mishina, M. & Ito, S. (1999) *Eur J Neurosci* **11**, 1849-56.
60. Oida, H., Namba, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1995) *Br J Pharmacol* **116**, 2828-37.
61. Wright, D. H., Nantel, F., Metters, K. M. & Ford-Hutchinson, A. W. (1999) *Eur J Pharmacol* **377**, 101-15.
62. Vane, J. R. (1971) *Nat New Biol* **231**, 232-5.
63. Bombardier, C. (2002) *Am J Cardiol* **89**, 3D-9D.
64. Ryseck, R. P., Raynoschek, C., Macdonald-Bravo, H., Dorfman, K., Mattei, M. G. & Bravo, R. (1992) *Cell Growth Differ* **3**, 443-50.
65. Coruzzi, G., Menozzi, A. & Dobrilla, G. (2004) *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**, 43-61.
66. DeWitt, D. L. (1999) *Mol Pharmacol* **55**, 625-31.
67. Brune, K. & Hinz, B. (2004) *Scand J Rheumatol* **33**, 1-6.
68. Smith, C. J., Zhang, Y., Koboldt, C. M., Muhammad, J., Zweifel, B. S., Shaffer, A., Talley, J. J., Masferrer, J. L., Seibert, K. & Isakson, P. C. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13313-8.
69. Walker, M. C., Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., Moreland, K. T., Koboldt, C. M., Isakson, P. C., Seibert, K. & Gierse, J. K. (2001) *Biochem J* **357**, 709-18.
70. Tegeder, I. & Geisslinger, G. (2006) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **373**, 1-17.

71. Wang, D., Wang, M., Cheng, Y. & Fitzgerald, G. A. (2005) *Curr Opin Pharmacol* **5**, 204-10.
72. Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M. B., Hawkey, C. J., Hochberg, M. C., Kvien, T. K. & Schnitzer, T. J. (2000) *N Engl J Med* **343**, 1520-8, 2 p following 1528.
73. Fitzgerald, G. A. (2004) *J Clin Rheumatol* **10**, S12-7.
74. Trebino, C. E., Stock, J. L., Gibbons, C. P., Naiman, B. M., Wachtmann, T. S., Umland, J. P., Pandher, K., Lapointe, J. M., Saha, S., Roach, M. L., Carter, D., Thomas, N. A., Durtschi, B. A., McNeish, J. D., Hambor, J. E., Jakobsson, P. J., Carty, T. J., Perez, J. R. & Audoly, L. P. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9044-9.
75. Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-Ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. & Kudo, I. (2004) *J Biol Chem* **279**, 33684-95.
76. Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L. P., Jakobsson, P. J. & Blomqvist, A. (2003) *Nat Neurosci* **6**, 1137-8.
77. Trebino, C. E., Eskra, J. D., Wachtmann, T. S., Perez, J. R., Carty, T. J. & Audoly, L. P. (2005) *J Biol Chem*.
78. Boulet, L., Ouellet, M., Bateman, K. P., Ethier, D., Percival, M. D., Riendeau, D., Mancini, J. A. & Methot, N. (2004) *J Biol Chem* **279**, 23229-37.
79. Gierse, J. K., Zhang, Y., Hood, W. F., Walker, M. C., Trigg, J. S., Maziasz, T. J., Koboldt, C. M., Muhammad, J. L., Zweifel, B. S., Masferrer, J. L., Isakson, P. C. & Seibert, K. (2005) *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 1206-12.
80. Tegeder, I., Del Turco, D., Schmidtko, A., Sausbier, M., Feil, R., Hofmann, F., Deller, T., Ruth, P. & Geisslinger, G. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3253-7.
81. Decosterd, I. & Woolf, C. J. (2000) *Pain* **87**, 149-58.
82. Chan, C. C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A. W., Forrest, M. J., Gauthier, J. Y., Gordon, R., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Kennedy, B., Leblanc, Y., Leger, S., Mancini, J., O'Neill, G. P., Ouellet, M., Patrick, D., Percival, M. D., Perrier, H., Prasit, P., Rodger, I. & et al. (1999) *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 551-60.
83. Minghetti, L., Walsh, D. T., Levi, G. & Perry, V. H. (1999) *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 1184-91.
84. Mark, K. S., Trickler, W. J. & Miller, D. W. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 1051-8.
85. Mitchell, J. A. & Evans, T. W. (1998) *Inflamm Res* **47 Suppl 2**, S88-92.
86. Hinz, B., Brune, K. & Pahl, A. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 744-8.
87. Riendeau, D., Aspiotis, R., Ethier, D., Gareau, Y., Grimm, E. L., Guay, J., Guiral, S., Juteau, H., Mancini, J. A., Methot, N., Rubin, J. & Friesen, R. W. (2005) *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 3352-5.
88. Blain, H., Boileau, C., Lapique, F., Nedelec, E., Loeuille, D., Guillaume, C., Gaucher, A., Jeandel, C., Netter, P. & Jouzeau, J. Y. (2002) *Br J Clin Pharmacol* **53**, 255-65.
89. Warner, T. D., Vojnovic, I., Bishop-Bailey, D. & Mitchell, J. A. (2006) *Faseb J* **20**, 542-4.
90. Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C. D. & Fitzgerald, G. A. (2006) *J Clin Invest* **116**, 1391-9.



91. DeVito, J., Devlin, E., Schroeder, K., Engle, S., Swinton, P., Sinha, K., Bruno, J., Souness, J. & Guehring, H. (2004) *Inflamm Res* **53**, 228.
92. DuBois, R. N. (2003) *Clin Cancer Res* **9**, 1577-8.
93. Meller, S. T. & Gebhart, G. F. (1997) *Eur J Pain* **1**, 43-52.
94. Schubert, W., Bonnekoh, B., Pommer, A. J., Philipsen, L., Bockelmann, R., Malykh, Y., Gollnick, H., Friedenberger, M., Bode, M. & Dress, A. W. (2006) *Nat Biotechnol* **24**, 1270-8.
95. Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. (1999) *Science* **285**, 1870-4.
96. Koles, L., Wirkner, K. & Illes, P. (2001) *Neurochem Res* **26**, 925-32.
97. Foster, A. C. & Fagg, G. E. (1987) *Nature* **329**, 395-6.
98. Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T. & Huganir, R. L. (1997) *J Biol Chem* **272**, 5157-66.
99. Brenner, G. J., Ji, R. R., Shaffer, S. & Woolf, C. J. (2004) *Eur J Neurosci* **20**, 375-84.
100. Zou, X., Lin, Q. & Willis, W. D. (2002) *Neuroscience* **115**, 775-86.
101. Chen, L. & Huang, L. Y. (1992) *Nature* **356**, 521-3.
102. Zheng, X., Zhang, L., Wang, A. P., Bennett, M. V. & Zukin, R. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15262-7.
103. Raman, I. M., Tong, G. & Jahr, C. E. (1996) *Neuron* **16**, 415-21.
104. Lawler, O. A., Miggin, S. M. & Kinsella, B. T. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33596-607.
105. Jett, M. F., Ramesha, C. S., Brown, C. D., Chiu, S., Emmett, C., Voronin, T., Sun, T., O'Yang, C., Hunter, J. C., Eglen, R. M. & Johnson, R. M. (1999) *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 1288-97.
106. Mabuchi, T., Kojima, H., Abe, T., Takagi, K., Sakurai, M., Ohmiya, Y., Uematsu, S., Akira, S., Watanabe, K. & Ito, S. (2004) *Neuroreport* **15**, 1395-8.
107. Broom, D. C., Samad, T. A., Kohno, T., Tegeder, I., Geisslinger, G. & Woolf, C. J. (2004) *Neuroscience* **124**, 891-900.
108. Dirig, D. M., Konin, G. P., Isakson, P. C. & Yaksh, T. L. (1997) *Eur J Pharmacol* **331**, 155-60.
109. Yamamoto, T. & Nozaki-Taguchi, N. (2002) *Anesth Analg* **94**, 962-7, table of contents.
110. Riendeau, D., Percival, M. D., Brideau, C., Charleson, S., Dube, D., Ethier, D., Falguyret, J. P., Friesen, R. W., Gordon, R., Greig, G., Guay, J., Mancini, J., Ouellet, M., Wong, E., Xu, L., Boyce, S., Visco, D., Girard, Y., Prasit, P., Zamboni, R., Rodger, I. W., Gresser, M., Ford-Hutchinson, A. W., Young, R. N. & Chan, C. C. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 558-66.
111. Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J. & Willoughby, D. A. (1999) *Nat Med* **5**, 698-701.
112. Kunkel, S. L., Spengler, M., May, M. A., Spengler, R., Larrick, J. & Remick, D. (1988) *J Biol Chem* **263**, 5380-4.
113. Fennekohl, A., Sugimoto, Y., Segi, E., Maruyama, T., Ichikawa, A. & Puschel, G. P. (2002) *J Hepatol* **36**, 328-34.

- 
114. Jozefowski, S., Bobek, M. & Marcinkiewicz, J. (2003) *Int Immunopharmacol* **3**, 865-78.
115. Meja, K. K., Barnes, P. J. & Giembycz, M. A. (1997) *Br J Pharmacol* **122**, 149-57.
116. Sacco, S., Agnello, D., Sottocorno, M., Lozza, G., Monopoli, A., Villa, P. & Ghezzi, P. (1998) *J Neurochem* **71**, 2063-70.
117. Birrell, G. J., McQueen, D. S., Iggo, A., Coleman, R. A. & Grubb, B. D. (1991) *Neurosci Lett* **124**, 5-8.
118. Oka, T., Oka, K. & Saper, C. B. (2003) *Brain Res* **968**, 256-62.
119. Aschner, M. (1998) *Neurotoxicology* **19**, 269-81.
120. Hanisch, U. K. (2002) *Glia* **40**, 140-55.
121. Kunkel, S. L., Remick, D. G., Spengler, M. & Chensue, S. W. (1987) *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **17A**, 155-8.
122. Geisslinger, G., Muth-Selbach, U., Coste, O., Vetter, G., Schrodter, A., Schaible, H. G., Brune, K. & Tegeder, I. (2000) *J Neurochem* **74**, 2094-100.
123. Schafers, M., Marziniak, M., Sorkin, L. S., Yaksh, T. L. & Sommer, C. (2004) *Exp Neurol* **185**, 160-8.
124. Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H. & Myers, R. R. (2004) *Spine* **29**, 1082-8.
125. Hinz, B., Brune, K. & Pahl, A. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 790-6.
126. Yu, Y., Fan, J., Chen, X. S., Wang, D., Klein-Szanto, A. J., Campbell, R. L., FitzGerald, G. A. & Funk, C. D. (2006) *Nat Med* **12**, 699-704.
127. Rouzer, C. A., Kingsley, P. J., Wang, H., Zhang, H., Morrow, J. D., Dey, S. K. & Marnett, L. J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 34256-68.
128. Bensen, W. G., Fiechtner, J. J., McMillen, J. I., Zhao, W. W., Yu, S. S., Woods, E. M., Hubbard, R. C., Isakson, P. C., Verburg, K. M. & Geis, G. S. (1999) *Mayo Clin Proc* **74**, 1095-105.
129. Schmidt, H., Woodcock, B. G. & Geisslinger, G. (2004) *Drug Saf* **27**, 185-96.
130. Vane, J. (1994) *Nature* **367**, 215-6.
131. Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. (1995) *J Neurosci* **15**, 2768-76.
132. Eguchi, N., Minami, T., Shirafuji, N., Kanaoka, Y., Tanaka, T., Nagata, A., Yoshida, N., Urade, Y., Ito, S. & Hayaishi, O. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 726-30.
133. Muratani, T., Nishizawa, M., Matsumura, S., Mabuchi, T., Abe, K., Shimamoto, K., Minami, T. & Ito, S. (2003) *J Neurochem* **86**, 374-82.
134. Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L. & Zeilhofer, H. U. (2002) *Nat Neurosci* **5**, 34-40.
135. Westphal, R. S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D., Langeberg, L. K., Sheng, M. & Scott, J. D. (1999) *Science* **285**, 93-6.
136. Sluka, K. A. & Willis, W. D. (1997) *Pain* **71**, 165-78.
137. Zou, X., Lin, Q. & Willis, W. D. (2004) *Brain Res* **1020**, 95-105.

138. James, M. J., Penglis, P. S., Caughey, G. E., Demasi, M. & Cleland, L. G. (2001) *Inflamm Res* **50**, 249-53.
139. Kapoor, M., Kojima, F., Qian, M., Yang, L. & Crofford, L. J. (2006) *J Biol Chem*.

## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichungen

Stephanie S. Breher, Eleftheria Mavridou, Christian Brenneis, Alexander Froese, Hans-Henning Arnold, Thomas Brand

“Popeye domain containing gene 2 (*Popdc2*) is a myocyte-specific differentiation marker during chick heart development” *Dev Dyn.* 2004 Mar; 229(3):695-702

Christian Brenneis, Klaus Scholich, Gerd Geisslinger

“Neurons are the source of tumor necrosis factor alpha induced spinal prostaglandin synthesis” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006 March; 372 (Suppl. 1):45

Christian Brenneis, Thorsten J. Maier, Ronald Schmidt, Annette Hofacker, Lars Zulauf, Per-Johan Jakobsson, Klaus Scholich and Gerd Geisslinger

“Inhibition of prostaglandin  $E_2$  synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition” *FASEB* 2006 Jul; 20(9):1352-60.

Klaus Scholich, Sandra Pierre, Ronald Schmidt, Christian Brenneis, Martin Michaelis, and Gerd Geisslinger

“Inhibition of Prostaglandin  $H_2$  Synthases by Dipyrone” *Br J Pharmacol.* 2007 Jun; 151(4):494-503.

Christian Brenneis, Ovidiu Coste, Ronald Schmidt, Carlo Angioni, Laura Popp, Rolf M. Nusing, Klaus Scholich and Gerd Geisslinger

“Consequences of altered eicosanoid patterns for nociceptive processing in mPGES-1-deficient mice”, *J Cell Mol Med.*, 2007 Nov; 11(5):1-10, in press

Ovidiu Coste, Sandra Pierre, Claudiu Marian, Christian Brenneis, Carlo Angioni, Laura Popp, Gerd Geisslinger, and Klaus Scholich

“Antinociceptive activity of the *S1P*-receptor agonist *FTY720*”, “*J Cell Mol Med*”, 2007 Nov., in press

Ovidiu Coste, Christian Brenneis, Sandra Pierre, Bona Linke, Claudiu Marian, Christian Maeurer, Helmut Schmidt, Corina Ehnert, Gerd Geisslinger, and Klaus Scholich

“*Sphingosine-1-Phosphate modulates spinal nociceptive processing*” eingereicht

## **8.2 Poster-Präsentationen**

Christian Brenneis, Klaus Scholich, Gerd Geisslinger

“*Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition*”, Frühjahrstagung Mainz, März 2006

Christian Brenneis, Bona Linke, Wiebke Becker, Sandra Pierre, Sabrina Holland, Gerd Geisslinger, Klaus Scholich

“*Analysis of nociceptive signalling combining calcium imaging, FRET based cAMP imaging and multi epitope ligand cartography (MELC)*”; wissenschaftliches “meeting” des “interdisciplinary centre for neuroscience (ICN)”, April 2007, Frankfurt

Christian Brenneis, Ovidiu Coste, Ronald Schmidt R, Klaus Scholich and Gerd Geisslinger

“*Consequences of altered eicosanoid pattern for nociceptive processing in mPGES-1-deficient mice*” world congress of neuroscience, 2007 July, Melbourne (Australia)

Die Kongressreise nach Melbourne wurde von der „international brain research organisation (IBRO)“ und der Firma Cayman finanziel unterstützt.

### **8.3 Danksagung**

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

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

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

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

Für technische und beratende Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Wiebke Becker, Herrn Dr. Ronald Schmidt, Herrn Carlo Angioni, Herrn Dr. Thorsten Maier, Herrn Lars Zulauf, Frau Melanie Friedrich, Frau Dr. Laura Pop, Frau Dr. Sandra Pierre und Herrn Prof. Dr. Rolf Nüsing

Für die allwöchentliche konstruktive Kritik im Apfelwein Dax danke ich Herrn Dr. Achim Schmidtko und Herrn Christian Mäurer

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Scholich, Herrn Christian Mäurer und bei meiner Ehefrau Mariam Brenneis

## 8.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Christian Brenneis

Abtsgässchen 10

60594 Frankfurt am Main

geboren am 06.06.78 in Alzenau in Unterfranken

verheiratet

### Schulbildung

---

1984 – 1988

Brentanoschule in Kleinostheim

1988 – 1989

Kettlerschule in Kleinostheim

1989 – 1998

Franziskaner Gymnasium Kreuzburg in Großkrotzenburg

1998

Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung

---

1998 – 2003

Studium der Biologie

an der Technischen Universität Braunschweig

Sep. 2003

Abschluss der Diplomarbeit

2003 – 2007

Naturwissenschaftliche Promotion

am Institut für Klinische Pharmakologie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Geißlinger