

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Interleukin-1 $\beta$  induziert Cyclooxygenase-2-abhängig eine  
Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> mit anschließender Sekretion  
des Proteins CGRP in einer Zellkultur aus trigeminalen  
Ganglienzellen der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Hellen

aus Gerolstein

Datum der Promotion: 26.02.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstrakt (deutsch)</b>	<b>5</b>
<b>Abstrakt (englisch)</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Klinik der Migräne	7
1.2 Therapie der Migräne	8
1.2.1 Akuttherapie	8
1.2.2 Präventionstherapie	10
1.3 Pathophysiologie der Migräne	11
1.3.1 Die vaskuläre Hypothese	12
1.3.2 Die Hypothese der neurogenen Inflammation	13
1.3.3 Die neuronale Hypothese	13
1.3.4 Die <i>cortical spreading depression</i> (CSD)	14
1.3.5 Die periphere und zentrale Sensibilisierung	15
1.4 Das Ganglion trigeminale in der Migräne	16
1.4.1 <i>Calcitonin gene-related peptide</i> (CGRP)	16
1.4.2 Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	17
1.4.3 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	17
1.5 Fragestellung	18
<b>2. Material</b>	<b>20</b>
2.1. Tiere und Zellkultur	20
2.2. Stimmulations- und Inhibitionsexperimente	20
2.3. Immunhistochemie	21
2.4. Enzym-Immunoassay	21
2.5. Westernblot	21
2.6. Relative quantitative reverse Transkriptase mit <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion	22
2.7. Auswertung und Statistik	23
<b>3. Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Tiere und Zellkultur	24
3.2 Stimmulations- und Inhibitionsexperimente	25
3.3 Immunhistochemie	26
3.4 Enzym-Immunoassay	27
3.5 Westernblot	28
3.6 Relative quantitative reverse Transkriptase mit <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion	30
3.7 Auswertung und Statistik	36

<b>4. Resultate</b>	<b>37</b>
4.1 IL-1 $\beta$ induziert die CGRP-Sekretion in einer trigeminalen Zellkultur	37
4.1.1 IL-1 $\beta$ führt zu einer zeitlich verzögerten Sekretion von CGRP	37
4.1.2 Die IL-1 $\beta$ -induzierte Sekretion von CGRP ist abhängig von COX-2	37
4.1.3 Neuronale Zellen sind die Quelle der IL-1 $\beta$ -induzierten CGRP-Sekretion	38
4.1.4 IL-1 $\beta$ führt nicht zu einer Induktion der CGRP-mRNA	39
4.2 PGE <sub>2</sub> induziert die CGRP-Sekretion in der trigeminalen Zellkultur	40
4.2.1 PGE <sub>2</sub> führt zu einer frühen Sekretion von CGRP	40
4.2.2 Die PGE <sub>2</sub> -induzierte CGRP-Sekretion ist weder COX-2-abhängig	41
4.2.3 Eine Expression der CGRP-mRNA durch PGE <sub>2</sub> ist nicht nachweisbar	41
4.3 IL-1 $\beta$ -induziert die PGE <sub>2</sub> -Synthese	41
4.3.1 Die IL-1 $\beta$ -induzierte Synthese von PGE <sub>2</sub> ist zeitabhängig	41
4.3.2 Die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE <sub>2</sub> -Synthese ist abhängig von COX-2	42
4.4 IL-1 $\beta$ induziert die COX-2-Expression in trigeminalen Zellen	43
4.4.1 Die Induktion der COX-2-mRNA durch IL-1 $\beta$ ist zeitabhängig	43
4.4.2 IL-1 $\beta$ induziert COX-2, nicht aber COX-1	44
4.4.3 IL-1 $\beta$ induziert die COX-2-Protein-Synthese	44
4.4.4 IL-1 $\beta$ induziert COX-2-Proteinsynthese in neuronalen und glialen Zellen	46
4.4.5 Koexpression von CGRP und COX-2 in trigeminalen Zellen	47
4.5 Die Wirkung von Methylprednisolon, Sumatriptan, Metoprolol und Topiramate	48
4.5.1 Methylprednisolon blockiert die IL-1 $\beta$ -, nicht aber die PGE <sub>2</sub> -induzierte CGRP-Sekretion	48
4.5.2 Sumatriptan hat keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - und PGE <sub>2</sub> -induzierte CGRP-Sekretion	49
4.5.3 Metoprolol und Topiramate zeigen ebenfalls keine Wirkung auf CGRP-Sekretion	50
<b>5. Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1 Zusammenfassung	52
5.2 Experimentelle Methoden	52
5.2.1 Die Ratte als Migränemodell	52
5.2.3 Bedingungen in einer trigeminalen Zellkultur	53
5.2.4 Additive in der trigeminalen Zellkultur	55
5.2.5 Vergleichbarkeit mit anderen Zellkulturmodellen des Ganglion trigeminale	56
5.3 Diskussion der Ergebnisse	56
5.3.1 IL1 $\beta$ führt zu einer verzögerten CGRP-Ausschüttung	56
5.3.1.1 Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne	56
5.3.1.2 IL-1 $\beta$ -abhängige CGRP-Ausschüttung aus neuronalen Zellen	57
5.3.1.3 COX-2-Abhängigkeit der CGRP-Sekretion	58
5.3.1.4 Induktion der CGRP-mRNA durch IL-1 $\beta$	58

5.3.2 PGE <sub>2</sub> führt zu einer frühen CGRP-Ausschüttung	59
5.3.2.1 Bedeutung von PGE <sub>2</sub> in der Pathophysiologie der Migräne	59
5.3.2.2 PGE <sub>2</sub> -abhängige CGRP-Sekretion	59
5.3.2.3 Die CGRP-mRNA lässt sich nicht durch PGE <sub>2</sub> induzieren	60
5.3.2.4 CGRP-Sekretion im Ganglion trigeminale	61
5.3.3 IL-1 $\beta$ induziert eine COX-2-Expression mit konsekutiver PGE <sub>2</sub> -Synthese	61
5.3.3.1 Bedeutung von IL-1 $\beta$ in der Pathophysiologie der Migräne	61
5.3.3.2 IL-1 $\beta$ -abhängige Expression des COX-2-Proteins	62
5.3.3.3 IL-1 $\beta$ -abhängige PGE <sub>2</sub> -Synthese	63
5.3.3.4 Spezifische Induktion der COX-2	63
5.3.4 Wirkung antimigränöser Medikamente auf die CGRP-Sekretion	65
5.3.4.1 Methylprednisolon blockiert die IL-1 $\beta$ -induzierte CGRP-Sekretion	65
5.3.4.2 Sumatriptan hat keinen Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung	65
5.3.4.3 Topiramate ist ohne Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung	66
5.3.4.4 Metoprolol zeigt keinen Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung	68
5.4 Schlussfolgerung	69
<b>6. Literatur</b>	<b>72</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>82</b>
<b>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>84</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>

**Abstrakt (deutsch)**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Sekretion des Neuropeptids *cacitonin gene-related peptide* (CGRP) in einer trigeminalen Zellkultur der Ratte.

**Einleitung:** CGRP nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Migräne ein. Primärer Bestandteil der Migräne sind Kopfschmerzen mit einem charakteristischen klinischen Erscheinungsbild. Für die nozizeptive Innervation migränerelevanter Strukturen des Kopfes ist das Ganglion trigeminale verantwortlich. In der Migräneentstehung lässt sich eine neuronale Sensibilisierung im trigeminalen System feststellen. An deren Etablierung sind verschiedene proinflammatorische Substanzen, wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Prostagalandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), beteiligt. Die Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die CGRP-Sekretion und die Wirkweise verschiedener Migränemedikamente im Ganglion trigeminale waren Gegenstand dieser Arbeit.

**Ergebnisse:** IL-1 $\beta$  führte zu einer Expression von COX-2 in neuronalen und glialen Zellen der trigeminalen Zellkultur und löste nachfolgend eine Sekretion von PGE<sub>2</sub> in den Überstand der trigeminalen Zellkultur aus. Des weiteren verursachte sowohl PGE<sub>2</sub> (nach 1 h) als auch IL-1 $\beta$  (nach 24 h) eine Sekretion von CGRP aus den neuronalen Zellen des Ganglion trigeminale. Die IL-1 $\beta$ -abhängige PGE<sub>2</sub>- und die CGRP-Sekretion konnten durch spezifische COX-2-Hemmer unterbunden werden. Zudem reduzierte Methylprednisolon die IL-1 $\beta$  induzierte CGRP-Sekretion. Sumatriptan, Metoprolol und Topiramamat zeigten allerdings keine Wirkung auf die CGRP-Sekretion.

**Schlussfolgerung:** Der IL-1 $\beta$ -abhängigen CGRP-Sekretion aus neuronalen Zellen ging eine COX-2-Induktion mit PGE<sub>2</sub>-Synthese in glialen und neuronalen Zellen voraus. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der neuro-glialen Interaktion und der neuronalen Sensibilisierung im Ganglion trigeminale für die Entstehung der Migräne. Zudem bietet die vorliegende Arbeit weitere Erklärungsansätze für die Wirkweise von Migränemedikamente. So sind die Triptane, im Gegensatz zu COX-2-Hemmern, schlecht wirksam bei Migränepatienten, bei denen bereits eine neuronale Sensibilisierung sattgefunden hat. Der fehlende Effekt von Metoprolol und Topiramamat auf das Ganglion trigeminale steht in Einklang mit der These einer überwiegend zentralen Wirkweise dieser beiden Medikamente in der Migränetherapie.

**Abstrakt (englisch)**

The present study investigated the regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) secretion in a murine trigeminal cell culture.

**Introduction:** CGRP plays a pivotal role in the pathophysiology of migraine. Headache is the fundamental expression of migraine. The trigeminal ganglion innervates migraine-related structures of the head and transmits nozizeptive signals to the brainstem. During the development of migraine a neural sensitization takes place in the trigeminal system. Proinflammatory substances, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Prostagalandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), are involved in the establishment of neuronal sensitization. Therefore, the effect of IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> on CGRP secretion and the mode of action of selected migraine drugs in the trigeminal ganglion are analyzed in this thesis.

**Results:** IL-1 $\beta$  caused an expression of COX-2 in neuronal and glial cells of trigeminal cell culture. PGE<sub>2</sub> was measured in the supernatant of trigeminal cell culture 4 h after IL-1 $\beta$  administration. Furthermore PGE<sub>2</sub> (after 1 h) and IL-1 $\beta$  (after 24 h) induced a secretion of CGRP into the supernatant. The IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> and CGRP secretion was almost completely blocked by selective COX-2 inhibitors. Methylprednisolone was able to reduce the IL-1 $\beta$ -induced CGRP secretion solely. Neither sumatriptane, nor metoprolol or topiramate had any effect on the CGRP secretion.

**Conclusion:** The IL-1 $\beta$ -dependent CGRP secretion from neuronal cells was advanced by a COX-2-induced PGE<sub>2</sub> synthesis in glial and neuronal cells. These results highlight the importance of neuro-glial interaction and neuronal sensitization in the trigeminal ganglion for the development of migraine. In addition, the present study provide further explanations, how specific drugs might act in migraine therapy. Triptans for example are in contrary to COX-2-inhibitors poorly effective in migraine treatment after neuronal sensitization has been established. The failure of metoprolol and topiramate is consistent with the assumption of a predominantly central mode of action for these two drugs in migraine therapy.

## 1. Einleitung

Das Neuropeptid *calcitonin gene-related peptid* (CGRP) ist von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der Migräne im Menschen [1]. Die vorliegende Arbeit untersucht die Regulation der CGRP-Sekretion in einer murinen Zellkultur des Ganglion trigeminale. Hierbei wird Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zur Stimulation trigeminaler Zellen eingesetzt und dessen Effekt auf die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die Freisetzung von CGRP untersucht. Ferner wird die Wirkung akuter wie präventiver Migränemedikamente in diesem Modell geprüft.

### 1.1 Klinik der Migräne

Die Migräne ist eine häufige neurologische Erkrankung mit weltweiter Verbreitung [2]. Innerhalb der deutschen Bevölkerung beträgt die Ein-Jahres-Prävalenz 11 %. Junge Frauen im Alter zwischen 18 und 29 Jahren sind mit 23 % am häufigsten betroffen [3].

Migräne ist eine primäre Kopfschmerzform, d.h. symptomatische Ursachen, die den Schmerzen zugrunde liegen, können nicht nachgewiesen werden. Diagnostisch werden die Migräne und ihre Subtypen durch die Kriterien der *International Society of Headache* (IHS) definiert [4]. Migräne zeichnet sich demnach durch einen episodisch wiederkehrenden Kopfschmerz mit einer Attackendauer von 4 h bis 72 h aus. Die Schmerzen sind typischerweise charakterisiert durch eine hemikranielle Lokalisation, eine pulsierende Schmerzqualität und eine moderate bis starke Schmerzintensität, die durch körperliche Aktivität verstärkt werden kann. Vegetative Symptome, wie Licht- oder Lärmempfindlichkeit sowie Übelkeit und Erbrechen, treten zusätzlich auf (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Migräne ohne Aura nach den Kriterien der IHS [4].

#### Diagnostische Kriterien der Migräne ohne Aura

- A. mindestens 5 Attacken
- B. Dauer 4 h bis 72 h
- C. Schmerzcharakter (mindestens 2 Kriterien müssen erfüllt sein)
  - 1. unilateral
  - 2. pulsierend
  - 3. moderat bis intensiv
  - 4. bewegungsabhängig
- D. Begleitsymptom (mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein)
  - 1. Übelkeit/Erbrechen
  - 2. Photophobie/Phonophobie
- E. Ausschluss anderer ursächlicher Erkrankungen

Zudem berichten zwei Drittel aller Patienten von Phänomenen wie der Allodynie, eine Schmerzempfindung auf nicht nozizeptive Reize, oder der Hyperalgesie, eine gesteigerte Schmerzempfindung [5]. Bei einem Drittel aller Migränepatienten lassen

sich fokale neurologische Defizite, die sogenannte Migräne-Aura, feststellen [3]. Aura-Symptome treten zumeist vor Beginn der Schmerzen auf, sind Ausdruck einer kortikalen Dysfunktion und können visueller, sensorischer oder motorischer Natur sein. Die mit ca. 90% weitaus häufigste Manifestationsform, die visuelle Aura, ist gekennzeichnet durch szintillierende Lichteffekte und Skotome. Diese breiten sich vom Zentrum des Gesichtsfeldes zur Peripherie hin aus [6].

## 1.2 Therapie der Migräne

In der Behandlung der Migräne unterscheidet man akute und präventive Therapieverfahren [7].

### 1.2.1 Akuttherapie

Bei der akuten Behandlung einer Migräneattacke werden in erster Linie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Serotonin-Agonisten (Triptane) verwendet. Bei lang anhaltenden, therapierefraktären Kopfschmerzen können auch Glucocorticoide zum Einsatz kommen.

**Tabelle 2:** Substanzen der ersten Wahl zur Akuttherapie der Migräne [7].

Klasse	Substanzen	Wirkweise
<b>Triptane</b>	Sumatriptan, Zolmitriptan, Naratriptan, Rizatriptan, Almotriptan, Eletriptan, Frovatriptan	5-HT <sub>1B/1D</sub> -Agonismus
<b>NSAR</b>	Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac	unspezifische Hemmung der Cyclooxygenase

**Serotonin-Agonisten (Triptane):** Die Triptane wurden speziell für die Behandlung der Migräne entwickelt [7]. Ihre antimigränöse Wirkung entfalten sie durch eine Aktivierung bestimmter Serotoninrezeptoren innerhalb des nozizeptiven, trigeminalen Systems [8].

Eine Metaanalyse zur Wirksamkeit verschiedener Triptanepreparate untersuchte 53 Studien mit insgesamt 24089 Patienten [9]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine orale Applikation von 100 mg Sumatriptan nach 2 h eine signifikante Schmerzreduktion bei 59 % der Patienten gegenüber der Placebogruppe mit 30% erzielte. Die unterschiedlichen Triptanederivate waren alle sehr effektiv in der Akuttherapie der Migräne, unterschieden sich aber hinsichtlich der Geschwindigkeit ihres Wirkungseintritts, der Halbwertszeit und der Nebenwirkungen. Diesbezüglich ist die subkutane Applikation von Sumatriptan der oralen Applikation deutlich überlegen. In einer multizentrischen, placebokontrollierten Studie mit 278 Patienten konnte mittels



6 mg Sumatriptan s.c. eine signifikante Schmerzreduktion nach 2 h bei 91 % der Migränepatienten gegenüber der Placebogruppe mit 24 % erzielt werden [10].

**Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR):** NSAR, wie Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac, Naproxen und Paracetamol, sind Medikamente der ersten Wahl in der Behandlung moderater Migränekopfschmerzen [7]. Ihre Wirkung beruht auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Deren Isoenzyme COX-1 und COX-2 werden dabei in unterschiedlichem Maße inhibiert.

Eine Metaanalyse zur Akuttherapie von Migränekopfschmerzen mit ASS hatte 2027 Patienten aus sechs doppelblinden, randomisierten Studien zur Grundlage [11]. Nach oraler Applikation von 1000 mg ASS zeigte sich eine signifikante Reduktion der Schmerzen nach 2 h bei 54 % der Migränepatienten gegenüber 32 % in der Placebogruppe. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass eine subkutane Applikation von 6 mg Sumatriptan nur geringfügig wirksamer ist als eine intravenöse Applikation von 1000 mg ASS [10]. Dass für die Schmerzreduktion in erster Linie das Isoenzym COX-2 verantwortlich ist, konnte in klinischen Studien gezeigt werden. So wurde in einer doppelblinden, randomisierten Studie nachgewiesen, dass die orale Applikation von 40 mg Valdecoxib, einem spezifischen Hemmer der COX-2, wirksam ist in der Therapie der akuten Migräne [12].

**Glucocorticoide:** Glucocorticoide, wie Prednisolon oder Dexamethason, sind im Falle therapierefraktärer, anhaltender Migränekopfschmerzen indiziert [7]. Ihre Wirkung entfalten Glucocorticoide auf vielfältige Weise. Unter anderem vermindern Glucocorticoide die Expression proinflammatorischer Gene. Sie können aber auch direkt auf die Signalwege der Zelle Einfluss nehmen [13]. Hierzu zählt auch die Inhibition migränerelevanter Enzyme, wie der COX-2.

Die Studienlage zur Wirksamkeit von Glucocorticoiden in der Migränetherapie ist allerdings widersprüchlich. In einer doppelblinden, randomisierten Studie konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit von Placebos gegenüber Dexamethason in der Therapie von Migränekopfschmerzen gezeigt werden [14]. Allerdings gelang einer großen Metanalyse der Nachweis, dass eine gute Wirksamkeit von Glucocorticoiden als Supportivum im Rahmen einer Migränetherapie mit Triptanen oder NSAR besteht. So konnte die Rückfallrate durch Zugabe von Dexamethason zur Standardtherapie in den ersten 72 h signifikant reduziert werden [15]. Im Rahmen eines Expertenkonsenses wird

schließlich die einmalige Gabe von Prednison bzw. Dexamethason in der Therapie des Status migraenosus, eines anhaltenden therapierefraktären Migränekopfschmerzes über 72 h, empfohlen [7].

### 1.2.2 Präventionstherapie

Zur Prophylaxe der Migräne werden Betablocker (Metoprolol und Propranolol), Antikonvulsiva (Topiramat und Valproinsäure) und ein Calciumantagonist (Flunarizin) als Mittel der ersten Wahl eingesetzt. Andere Medikamente, wie Antidepressiva oder Angiotensinrezeptorantagonisten, sind Medikamente der zweiten Wahl [7].

**Tabelle 3:** Substanzen der ersten Wahl zur Migräneprävention [7].

Klasse	Substanz	Wirkweise
<b>Betablocker</b>	Metoprolol	spezifischer $\beta_1$ -Rezeptorantagonist
	Propranolol	unspezifischer $\beta$ -Rezeptorantagonist
<b>Antikonvulsiva</b>	Topiramat	Hemmung liganden- und spannungsabhängiger Ionenkanäle
	Valproinsäure	
<b>Calciumantagonisten</b>	Flunarizin	unspezifischer $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker

**Betablocker:** In der Vergangenheit untersuchte man in klinischen Studien zur Prophylaxe der Migräne vorwiegend die Wirksamkeit von Betalockern wie Metroprolol, einem spezifischen  $\beta_1$ -Rezeptor-Antagonisten, und Propranolol, einem unspezifischen  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten [7]. Verlässliche Daten zu anderen Betablockern sind selten. Die genaue Wirkweise von Betablockern in der Migränetherapie ist weitestgehend unbekannt. Neben den  $\beta_1$ -Rezeptor-vermittelten Effekten wurden Interaktionen mit dem adrenergen und serotonergen System beschrieben [16]. Eine hemmende Modulation der nozizeptiven Signaltransduktion und der kortikalen Signalverarbeitung wird vermutet.

In einer Metaanalyse zur Wirksamkeit von Propranolol wurden 58 Studien mit 5072 Patienten berücksichtigt [17]. Hiervon ließen lediglich neun placebokontrollierte, doppelblinde Studien einen direkten Vergleich zwischen Placebo und Propranolol zu. Propranolol führte hierbei in Migränepatienten signifikant häufiger zu einer Reduktion der Attackenfrequenz um über 50 % innerhalb eines dreimonatigen Therapieintervalls. Metroprolol war in seiner Wirksamkeit mit Propranolol vergleichbar. In einer weiteren placebokontrollierten, doppelblinden Studie konnte Metroprolol die Dauer, die Frequenz und die Schmerzintensität von Migräneattacken signifikant senken [18].

**Antikonvulsiva:** Unter den Antikonvulsiva sind Valproinsäure und Topiramat wirksam in der präventiven Therapie der Migräne [7]. Ihre genaue Wirkweise in der

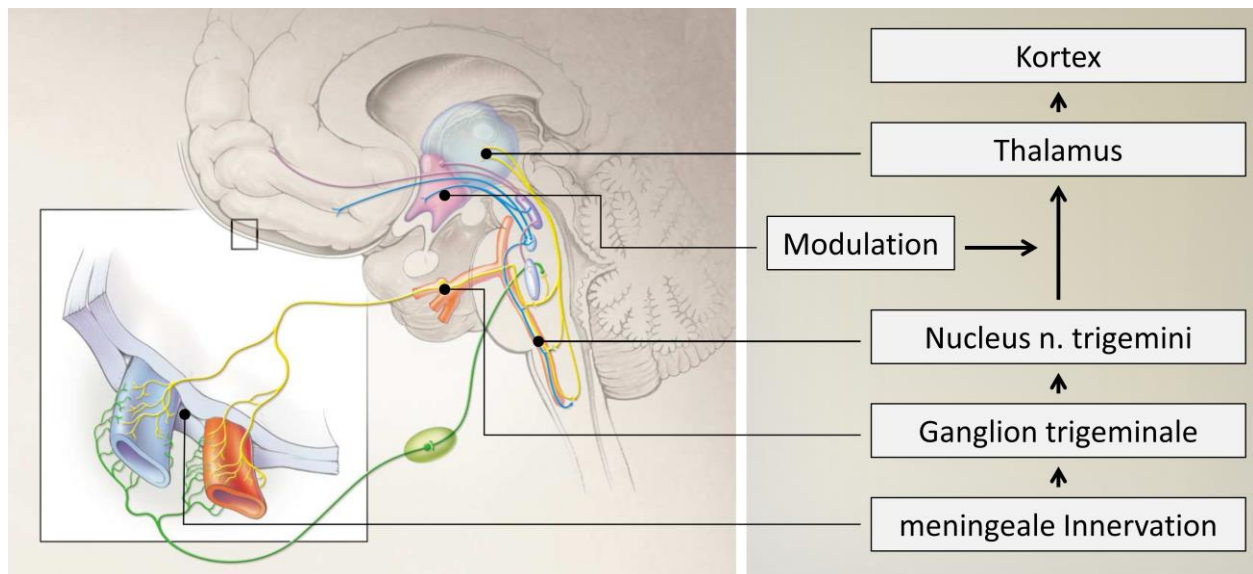
Migräneprävention ist weitestgehend unbekannt. Eine hemmende Modulation des nozizeptiven Systems wird diskutiert [16].

Eine Metaanalyse untersuchte sechs randomisierte und doppelblinde Studien mit 898 Patienten [19]. Hier zeigte sich eine signifikante Überlegenheit von Topiramat gegenüber der Placebogruppe. Topiramat reduzierte die Attackenfrequenz um mehr als 50 %. In kleineren randomisierten und doppelblinden Studien konnte darüber hinaus kein Unterschied zwischen Topiramat und Valproinsäure [20] oder zwischen Topiramat und Propranolol [21] festgestellt werden. In der klinischen Anwendung gewinnt das unterschiedliche Nebenwirkungsspektrum zwischen antikonvulsiven und anderen Medikamenten in der Migräneprophylaxe besondere Bedeutung. In Studien mit Topiramat traten neben unspezifischen Symptomen, wie Parästhesien, Müdigkeit und Gewichtsverlust, auch kognitive Einschränkungen auf. In tierexperimentellen Studien ist sogar eine teratogene Wirkung von Topiramat beschrieben worden [22].

### **1.3 Pathophysiologie der Migräne**

Das Symptom Kopfschmerz in seiner typischen Charakteristik ist immanenter Bestandteil der Migräne. Schmerzensible Strukturen finden sich extrakraniell (Haut, Muskeln, Periost und Gefäße) sowie intrakraniell (meningeale und cerebrale Gefäße, venöse Blutleiter und Meningen). Diese Strukturen werden hauptsächlich durch primäre nozizeptive Neurone aus dem Ganglion trigeminale innerviert und in geringerem Maße durch die Spinalganglia der oberen cervicalen Segmente. Die perivaskuläre Nozizeption pialer, duraler und extrakranieller Arterien spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Migränekopfschmerzen [1]. Eine nozizeptive Reizung duraler perivaskulärer Afferenzen führt über die Aktivierung des Ganglion trigeminale zu einer Depolarisation sekundärer trigeminaler Neurone im Nucleus spinalis n. trigemini Pars caudalis [23]. Die nozizeptive Information gelangt über den Thalamus (insbesondere über den Nucleus ventralis posterioromedialis) zum primären und sekundären somatosensorischen Kortex und schließlich zur bewussten Schmerzwahrnehmung. Im Rahmen der trigeminalen Schmerzverarbeitung findet eine komplexe bidirektionale Wechselwirkung zwischen dem Nucleus spinalis n. trigemini Pars caudalis und einer Vielzahl modulierender Zentren in Hirnstamm, Hypothalamus und Kortex statt [1]. Eine Aktivierung beispielsweise des periaquäduktalen Graus [24], des hypothalamischen Nucleus periventricularis [25] oder der kontralateralen Insel und des

somatosensorischen Kortex [26] bewirkt eine Hemmung sekundärer trigeminaler Neurone während einer duralen Stimulation (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Nozizeptive Signaltransduktion trigeminaler Afferenzen (modifiziert aus [1, 4]).** Die nozizeptive Innervation migränerelevanter Strukturen des Kopfes erfolgt durch das Ganglion trigeminale. Die nozizeptiven Signale werden weiter über den Hirnstamm und den Thalamus zum Kortex geleitet. Verschiedene schmerzmodulierende Zentren haben Einfluss auf die Weiterleitung und Verarbeitung der nozizeptiven Signaltransduktion.

Die Wahrnehmung von Kopfschmerzen in der Migräne ist somit in der Aktivierung des trigeminalen Systems begründet. Wie diese Aktivierung in der Entstehung der Migräne von statten geht, ist Gegenstand einer Vielzahl von Publikationen und wird bis heute kontrovers diskutiert. Frühe Studien legten eine periphere Ursache der Schmerzentstehung nahe, bei der piale undurale Gefäße als Ursprung der Migräneschmerzen angesehen wurden. Aktuelle Studien vertreten allerdings eine zentrale Genese. Es wird primär von einer neuronalen Dysfunktion subkortikaler oder kortikaler Zentren ausgegangen, die sekundär Einfluss nimmt auf die Regulierung des Gefäßtonus und die Verarbeitung nozizeptiver, trigeminaler Signale [1].

### 1.3.1 Die vaskuläre Hypothese

Wolff et al. untersuchten bereits 1940 die Schmerzempfindlichkeit intrakranieller Strukturen in intraoperativen Studien an Menschen [27]. Eine perivaskuläre Stimulation der Dura mater, insbesondere im Bereich der A. meningea media, durch mechanische, elektrische und thermische Reize konnte zur Auslösung von Kopfschmerzen führen. Die Schmerzen waren einseitig und temporofrontal lokalisiert, ähnlich den

Migränekopfschmerzen. Darüber hinaus konnten Wolff et al. zeigen, dass eine Vasodilatation dieser Gefäße Kopfschmerzen auslöst, eine Vasokonstriktion hingegen zu einer Linderung führen kann [28]. Diese Erkenntnisse führten schließlich zur Theorie, dass eine Vasodilatation cerebraler und meningealer Arterien ursächlich für den Migräneschmerz sei.

Eine rein vaskuläre Genese der Migräne ist aus heutiger Sicht aber wenig wahrscheinlich. Magnetresonanztomografische Untersuchungen konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen Änderungen im Gefäßdurchmesser und Kopfschmerzen bei Migränepatienten feststellen [29]. Nichtsdestoweniger führte diese Theorie zur Entwicklung neuer hochwirksamer Migränemedikamente, den Triptanen. Deren antimigränöse Wirksamkeit wurde initial ihrer vasokonstriktiven Eigenschaften zugeschrieben. Allerdings werden selektive Triptane, wie beispielsweise reine 5-HT<sub>1F</sub>-Agonisten, bereits erfolgreich in der Therapie der akuten Migräne eingesetzt, ohne den Tonus intrakranieller Gefäße zu beeinflussen [8].

### **1.3.2 Die Hypothese der neurogenen Inflammation**

In tierexperimentellen Studien entwickelten Moskowitz et al. in den 1990er Jahren die Hypothese einer sterilen neurogenen Inflammation innerhalb der Dura mater als Auslöser für eine Aktivierung und Sensibilisierung trigeminaler Nervenendigungen. Hauptbestandteile der neurogenen Inflammation sind eine Vasodilatation, eine Plasmaproteinextraversion und eine Aktivierung von Mastzellen innerhalb der Dura mater. Unterhalten wird dieser Prozess durch eine antidrome Sekretion von Neuropeptiden aus den perivaskulären Endigungen des Ganglion trigeminale [30].

Nichtsteroidale Antirheumatika [31], Triptane [32] und Antikonvulsiva [33] können die neurogene Inflammation durch Inhibition der Neuropeptidsekretion unterbinden. Allerdings zeigt die fehlende klinische Wirksamkeit spezifischer Hemmer der neurogenen Inflammation, wie beispielsweise des Neurokinin-1-Antagonisten, in der akuten [34] und präventiven [35] Migränetherapie, dass auch diese Theorie die Entstehung der Schmerzen in der Migräne nicht endgültig zu erklären vermag.

### **1.3.3 Die neuronale Hypothese**

Neben den peripheren, neurovaskulären Erklärungsansätzen werden aktuell verstärkt zentrale Mechanismen in der Migränegenese postuliert. Hierbei wird eine neuronale

Dysfunktion entweder der schmerzmodulierenden Zentren von Hirnstamm und Zwischenhirn [36] oder des Kortex [37] diskutiert.

**Subkortikale Dysfunktion:** Erste klinische Hinweise für die Bedeutung des Hirnstamms in der Entstehung der Migräne wurden bereits in den 1980er Jahren von Raskin et al. gefunden [38]. Hier konnte bei einzelnen Patienten gezeigt werden, dass eine elektrische Stimulation des periaquäduktalen Graus zur Auslösung migräneartiger Kopfschmerzen führt. In weiterführenden klinischen Studien ließ sich bei Migränepatienten auch eine Aktivierung anderer schmerzmodulierender Zentren im Hirnstamm, Mittelhirn und Zwischenhirn feststellen. Eine primäre Dysfunktion schmerzmodulierender Zentren soll demnach sekundär zur Aktivierung des trigeminalen, nozizeptiven Systems führen [36]. Letztlich ist auch diese Hypothese nicht plausibel. In einer neueren Studie mit funktioneller Magnetresonanztomografie zeigte sich eine Aktivierung schmerzmodulierender Zentren des Hirnstamms nur während der Schmerzphase, nicht aber vorher [39]. Antimigränöse Medikamente können nichtsdestoweniger Einfluss nehmen auf die subkortikalen schmerzverarbeitenden Kerngebiete. Eine lokale Injektion von Triptanen in das periaquäduktale Grau führt zur einer Inhibition der nozizeptiven Neurone im Nucleus spinalis n. trigemini Pars caudalis während einer duralen Stimulation [40].

**Kortikale Dysfunktion:** Photophobie und Phonophobie sind häufige Begleitsymptome der Migräne. Sie sind Ausdruck einer Übererregbarkeit des Migränepatienten auf sensorische und sensible Stimuli [37]. In neurophysiologischen Studien ließ sich eine verzögerte Habituation auf visuell und auditorisch evozierte Potentiale in Migränepatienten im kopfschmerzfreen Intervall feststellen [41]. Diesen Phänomenen soll eine erhöhte Antwortbereitschaft des Kortex zugrunde liegen [37]. Eine prophylaktische Medikation von Migränepatienten mit Betablockern [42] und Topiramaten [43] kann die kortikale Übererregbarkeit signifikant reduzieren. Die aktuelle Studienlage hinsichtlich einer kortikalen Dysfunktion in der Migräneentstehung ist allerdings nicht eindeutig und teilweise widersprüchlich.

### 1.3.4 Die *cortical spreading depression* (CSD)

Als mögliches Bindeglied zwischen zentralen und peripheren Vorgängen in der Entstehung der Migräne wird die *cortical spreading depression* (CSD) diskutiert. Die CSD ist das pathophysiologische Korrelat der Migräne-Aura und wurde erstmals 1944

von Leão et al. am Kaninchenkortex beschrieben [44]. Hierbei handelt es sich um eine Depolarisation glialer und neuronaler Zellen, die sich wellenförmig über den Kortex ausbreitet, und gefolgt wird von einer Periode der Inaktivität. Bolay et al. konnten eine direkte Aktivierung des trigeminalen Systems durch eine CSD nachweisen [45]. Das Auslösen einer CSD in einem Rattenmodell in vivo bewirkte eine Vasodilatation duraler, pialer und cortikaler Arterien sowie eine Aktivierung sekundärer trigeminaler Neurone im Hirnstamm. Ähnliche Veränderungen ließen sich auch im Menschen mittels funktioneller Magnetresonanztomografie nachweisen. So konnte eine wellenförmig fortschreitende Aktivitätsänderungen im visuellen Kortex von Migränepatienten während einer Auraphase nachgewiesen werden [46]. Vor allem Medikamente, die in der präventiven Therapie der Migräne erfolgreich zum Einsatz kommen, zeichnen sich in diesem Modell durch eine gute Wirksamkeit aus. Eine prophylaktische Gabe von Antikonvulsiva und Betablockern führte im Rattenmodell zur verminderten Auslösbarkeit und Frequenz der CSD [47].

### 1.3.5 Die periphere und zentrale Sensibilisierung

Burstein et al. haben in den letzten Jahren in tierexperimentellen und klinischen Versuchen die Bedeutung der neuronalen Sensibilisierung in der Migräneentstehung aufgezeigt [48].

**Die periphere Sensibilisierung:** Die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren spielt in der Entstehung von Schmerzen im Allgemeinen und in der Entstehung des Migränekopfschmerzes im Speziellen eine wichtige Rolle. So senkt eine durale Applikation von inflammatorischen Substanzen (Histamin, Serotonin, Bradykinin, Prostaglandin E<sub>2</sub>) in der Ratte die Schwelle für der Erregbarkeit durch mechanische Stimuli in den trigeminalen Neuronen in vivo [49]. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit klinischen Beobachtungen. Die Bewegungsabhängigkeit und der pulsierender Charakter der Kopfschmerzen sind typische Phänomene während einer Migräneattacke [48].

**Die zentrale Sensibilisierung:** Neben einer peripheren kann ebenso eine zentrale Sensibilisierung sekundärer und tertiärer Neurone im trigeminalen, nozizeptiven System bei Migränepatienten nachgewiesen werden [5]. Die durale Applikation des oben genannten, inflammatorischen Cocktails im Rattenmodell führt zu einer Aktivitätssteigerung sekundärer Neurone im Nucleus spinalis nach thermischer und

mechanischer Stimulation der Kopfhaut [50]. In tierexperimentellen Studien und bei Migränepatienten findet die zentrale Sensibilisierung ihren Ausdruck in der Allodynie [5].

Cyclooxygenasehemmer inhibieren die periphere [51] und zentrale [52] Sensibilisierung trigeminaler Neurone in einem Migränemodell der Ratte. Desweiteren sprechen Migränepatienten mit Allodynie gut auf eine intravenöse Therapie mit Cyclooxygenasehemmern an [53].

#### **1.4 Das Ganglion trigeminale in der Migräne**

Keine der oben genannten Hypothesen kann die Entstehung der Migräne vollständig erklären. Dennoch ist allen die zentrale Funktion des trigeminalen Systems in der Entstehung und Weiterleitung der Migränekopfschmerzen gemein. Das Ganglion trigeminale nimmt hierbei eine Schlüsselrolle in der nozizeptiven Perzeption ein.

Die primären nozizeptiven Neurone des N. trigeminus befinden sich im Ganglion trigeminale. Dieses stellt das kraniale Pendant des Spinalganglions dar und befindet sich innerhalb einer Duraduplikatur, dem Cavum Meckeli, am Boden der mittleren Schädelgrube. Das Ganglion besteht aus neuronalen und glialen Zellen. Die nozizeptive Signaltransduktion erfolgt überwiegend über kleine (20-30 µm), dorsomedial innerhalb des Ganglions gelegene Neurone [54]. Diese Neurone sind vollständig von speziellen Gliazellen, den Satellitenzellen, umhüllt. Gemeinsam bilden sie eine funktionelle Einheit, die eine neuro-gliale und neuro-neuronale Kommunikation im Ganglion ermöglicht. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt über *gap-junction* oder auf parakrine Weise. Axodentritische Verbindungen zwischen den neuro-glialen Einheiten finden sich nicht. Verschiedene Mediatoren sind an der parakrinen Kommunikation beteiligt. Hierzu zählen unter anderem das *calcitonin gene-related peptide* [55].

##### **1.4.1 *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP)**

*Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) ist ein Neuropeptid und entsteht durch alternatives Splicing des Calcitonin-Gens [56]. Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Studien belegt die Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne. CGRP besitzt starke vasodilatatorische Eigenschaften an intrakraniellen Arterien und trägt so zur neurogenen Inflammation bei [30]. Neben der neuro-glialen Interaktion im Ganglion trigeminale, ist es auch an der peripheren und zentralen



neuronalen Sensibilisierung beteiligt [57]. Bei Migränepatienten kann eine intravenöse Injektion von CGRP migräneartige Kopfschmerzen auslösen [58].

CGRP und seine Rezeptoren lassen sich im gesamten trigeminalen System nachweisen. Im Ganglion trigeminale kommt CGRP vorwiegend in den kleinen, nozizeptiven Neuronen vor [59]. In den letzten Jahren konnte große Fortschritte beim Verständnis der Rolle von CGRP im Ganglion trigeminale gemacht werden. Dabei erwiesen sich vor allem die Arbeiten von Durham et al. als wegweisend. Deren In-vitro-Versuche an trigeminalen Zellkulturen der Ratte zeigten, dass eine Sekretion von CGRP in den Überstand der Zellkultur durch verschiedene Substanzen ausgelöst werden kann, unter anderem durch einen Cocktail bestehend aus proinflammatorischen Mediatoren (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Histamin, Serotonin und Bradykinin) [60]. Die gesteigerte CGRP-Sekretion ließ sich durch Sumatriptan [60] und Topiramate [61] inhibieren.

#### **1.4.2 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

Prostaglandine und das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese, die Cyclooxygenase (COX), sind an den Prozessen der neurogenen Inflammation und der neuronalen Sensibilisierung in der Migräneentstehung beteiligt. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ist dabei der wichtigste Mediator unter den Prostanoiden [62]. In klinischen Studien konnte eine intravenöse Injektion von PGE<sub>2</sub> eine Vasodilatation extrakranieller Arterien und Kopfschmerzen im Menschen auslösen [63].

Derzeit existieren nur wenige Arbeiten über die Funktion von PGE<sub>2</sub> und COX im Ganglion trigeminale. Allerdings konnte eine Stimulation des Ganglion trigeminale mit thermischen und chemischen Stimuli in vitro eine vermehrte PGE<sub>2</sub>-Sekretion auslösen [64]. In einer trigeminale Zellkultur führte die Applikation von PGE<sub>2</sub> zu einer Aktivitätssteigerung der kleinen, nozizeptiven Neurone [65] und zu einer vermehrten CGRP-Sekretion [66].

#### **1.4.3 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

Proinflammatorische Cytokine, wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), spielen eine wichtige Rolle nicht nur bei Entzündungsreaktionen, sondern auch bei Entstehung von Schmerzen [67]. Während der neurogenen Inflammation kann IL-1 $\beta$  in der Dura mater der Ratte nachgewiesen werden [68]. Im Rahmen der inflammatorischen Schmerzreaktion wird IL-1 $\beta$  frühzeitig exprimiert und steht am Anfang einer Kaskade, die in eine neurogene

Inflammation und eine peripheren und zentralen neuronalen Sensibilisierung des nozizeptiven Systems mündet [67].

Die Rolle von IL-1 $\beta$  im Ganglion trigeminale ist weitestgehend unklar. Allerdings wurden diesbezüglich in den letzten Jahren vor allem durch Takeda et al. vermehrt tierexperimentelle Studien durchgeführt. So führte im Rahmen einer neurogenen Inflammation die zusätzliche Gabe von IL-1 $\beta$  zu einer Aktivitätssteigerung nozizeptiver Neurone im Ganglion trigeminale der Ratte in vivo [69]. IL-1 $\beta$  kann eine intraganglionäre CGRP-Sekretion auslösen [70].

### 1.5 Fragestellung

In der Pathophysiologie der Migräne kommen periphere und zentrale Mechanismen zum Tragen. Das Ganglion trigeminale fungiert als Bindeglied zwischen den peripheren und den zentralen Vorgängen in der Migräneentstehung. In meiner Arbeit werden daher Mechanismen in der trigeminalen Zellkultur der Ratte untersucht, die in der Schmerzvermittlung und Therapie der Migräne von Bedeutung sind.

Ein entscheidender Mechanismus in der nozizeptiven Signaltransduktion des trigeminalen Systems stellt die komplexe Interaktion zwischen neuronalen und glialen Zellen im Ganglion trigeminale dar. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt hierbei unter anderem durch CGRP, IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub>. Gerade die Bedeutung von CGRP in der Migränepathophysiologie wird durch eine Vielzahl klinischer und experimenteller Untersuchungen unterstrichen. Meine Arbeit versucht die Sekretion von CGRP in einer trigeminalen Zellkultur vor dem Hintergrund der neuro-glialen Wechselwirkung näher zu untersuchen. In dieser Hinsicht ist das Schlüsselenzym der PGE<sub>2</sub>-Synthese, die Cyclooxygenase, von besonderem Interesse. Nicht zuletzt zeigen spezifische und unspezifische COX-Hemmer eine hervorragende klinische Wirksamkeit in der Akutherapie der Migräne.

Darüber hinaus kommen weitere Medikamente in der Migränetherapie zum Einsatz, deren genaue Wirkmechanismen nur ansatzweise verstanden sind. In einigen experimentellen Studien ist das Ganglion trigeminale selbst als möglicher Angriffspunkt für antimigränöse Medikamente beschrieben worden. In meiner Arbeit werden daher akute und präventive Medikamente der Migränetherapie hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf den CGRP-Haushalt im Ganglion trigeminale untersucht.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Führt die Stimulation einer trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  zur Sekretion von CGRP? Welche Zellen sind die Quelle dieser CGRP-Sekretion? Ist die CGRP-Sekretion abhängig von COX? Wird das Isoenzym COX-2 induziert? Welche Zellen in der trigeminalen Zellkultur exprimieren COX-2?
2. Kann die CGRP-Sekretion in einer trigeminalen Zellkultur durch Medikamente (Sumatriptan, Parecoxib, Indometacin, Methylprednisolon, Topiramat, Metoprolol), die in der akuten und präventiven Migränetherapie eingesetzt werden, beeinflusst werden?

## 2. Material

### 2.1. Tiere und Zellkultur

Produkt	Hersteller
Ratten (Sprague Dawley)	Charles River Laboratories, Sulzfeld
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Phosphatgepufferte Lösung (PBS) 0,1M	Biochrom AG, Berlin
Plastikware	Eppendorf GmbH, Hamburg Brand GmbH und Co-KG, Wertheim
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin
Kollagen-Medium	
- Minimal Essential Medium (MEM) Flüssigmedium	Biochrom AG, Berlin
- 5% Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
- 1% Penicillin/Streptomycin (10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
- 1% Hydroxy-ethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure (HEPES 1M)	Biochrom AG, Berlin
- 1% Kollagen G	Biochrom AG, Berlin
Dissoziations-Medium	
- Minimal Essential Medium (MEM) Flüssigmedium	Biochrom AG, Berlin
- 10% Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
- 1% Penicillin/Streptomycin (10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
- 1% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
- 0,25% humanes Insulin	Biochrom AG, Berlin
- 1% Hydroxy-ethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure (HEPES 1M)	Biochrom AG, Berlin
- 0,8% D-(+)-Glucose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Collagenase/Dispase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom AG, Berlin
Zentrifuge	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Starter-Medium	
- Neurobasal-Medium 10888-022	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 1% Penicillin/Streptomycin (10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
- 0,25% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
- 2% B27-Supplement	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 0,1% Glutamat (25 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 100ng/ml NGF-β (Ratte)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	LO Labor-Optik GmbH, Friedrichsdorf
Licht-Mikroskop	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Cytosin-β-D-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Inkubations-Medium	
- Neurobasal-Medium 10888-022	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 1% Penicillin/Streptomycin (10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
- 0,25% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
- 2% B27-Supplement	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 100ng/ml NGF-β (Ratte)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glia Fibrillary Acid Protein (GFAP)-Antikörper	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
β-Tubulin-III-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.2. Stimulations- und Inhibitionsexperimente

Produkt	Hersteller
rekombinantes Interleukin 1β (IL-1β)	R&D systems GmbH, Wiesbaden

rekombinanter Antagonist IL-1ra	R&D systems GmbH, Wiesbaden
Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Parecoxib-Natrium	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Indometazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sumatriptan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Metoprolol-Tartrat	AstraZeneca GmbH, Wedel
Methylprednisolon	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Topiramamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.3. Immunhistochemie

Produkt	Hersteller
Methanol (100%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Block-Lösung	
- 10% normal donkey serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 0,3% Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- in Phosphat-Puffer (PBS) 0,1 M	Biochrom AG, Berlin
Primärantikörper gegen COX-2	Cayman Chemical Company, AnnArbor, USA
Primärantikörper gegen CGRP (Hase)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Primärantikörper gegen CGRP (Ziege)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Primärantikörper gegen $\beta$ -Tubulin-III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Primärantikörper gegen Neurofilament-200	Dianova GmbH, Hamburg
Primärantikörper-Lösung	
- 3% normal donkey serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 0,3% Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- in Phosphat-Puffer (PBS) 0,1M	Biochrom AG, Berlin
Alexa Fluor 594 anti-Maus-IgG-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 anti-Hase-IgG-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 anti-Hase-IgG-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 anti-Ziege-IgG-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bedeckungsmedium - MOWIOL 4-88	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
Fluoreszenzmikroskop - DMRA2	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzkamera - DC300F	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar

### 2.4. Enzym-Immunoassay

Produkt	Hersteller
EIA zur PGE <sub>2</sub> -Bestimmung	Cayman Chemical Company, AnnArbor, USA
EIA zur CGRP-Bestimmung	SPIbio, Montigny le Bretonneux, Frankreich
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies, Chantilly, USA

### 2.5. Westernblot

Produkt	Hersteller
Extraktions-Puffer	
- 10 mM Hydroxy-ethyl-piperazin-ethan-sulfon-säure (HEPES)	Biochrom AG, Berlin
- 0,42 mM Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 5 mM Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK
- 1 mM Ethylendinitrilotetra-essigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 1 mM Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 1 mM Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Protease-Inhibitor-Cocktail (1:50)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Elektrophorese-Apparaturen (Criterion)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-Glycin Gel-System mit 10% SDS (Novex)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lauf-Puffer	

- 48 mM Trishydroxymethylamino-methanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 386 mM Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 10% Natriumduodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Transfer-Puffer	
- Lauf-Puffer	
- 20% Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Filter-Papier (Whatman)	GE Healthcare Europe GmbH, München
ECL-Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Europe GmbH, München
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	
- 24,2 g Trishydroxymethylamino-methanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 87,7g Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- pH 7,3 pro 1l	
Milchpulver (5%)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Molekulargewicht-(MW)-Marker (BenchMark)	GE Healthcare Europe GmbH, München
Primärantikörper gegen COX-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
Primärantikörper gegen $\beta$ -Aktin-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Enhanced Chemolumineszenz-(ECL)-Western-Blot-System	GE Healthcare Europe GmbH, München
ECL-anti-Hasen meerrettich-peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper	GE Healthcare Europe GmbH, München
ECL-anti-Maus meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper	GE Healthcare Europe GmbH, München
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ECL Detektions-Reagenz	GE Healthcare Europe GmbH, München
ECL-Hyperfilm	GE Healthcare Europe GmbH, München
Scanner (Typhoon)	GE Healthcare Europe GmbH, München
Mäuse-Makrophagen plus IFN $\gamma$ /LPS Zelllysat	Becton Dickson GmbH, Heidelberg

## 2.6. Relative quantitative reverse Transkriptase mit *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

Produkt	Hersteller
<b>Trizol-Extraktion</b>	
DEPC-H <sub>2</sub> O	
- H <sub>2</sub> O (steril)	
- 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 12 h Inkubation bei 37 °C	
- 15 min Autoklavieren	
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>RNA-Isolierung</b>	
RQ1-Puffer	Promega GmbH, Mannheim
RNAasin	Promega GmbH, Mannheim
RQ1-DNAse	Promega GmbH, Mannheim
Thermocycler (Trio)	Biometra GmbH, Göttingen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<b>Reverse Transkription</b>	
Random hexamers	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Transkriptionspuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Nukleotide (dNTP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Moloney-Murine-Leukemievirus (M-MLV)-reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	
GAPDH-Primer	Promega GmbH, Mannheim

Ampli-Taq-Polymerase mit PCR-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Nukleotide (dNTP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Thermocycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
<b>Agarosegelelektrophorese</b>	
Agarosepulver	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris-Borat mit EDTA (TBE-Puffer)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sybr-Gold-Farbe	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Orange G-Farbe	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
DNA-Marker	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>relative quantitative real-time PCR</b>	
GAPDH-Primer	Promega GmbH, Mannheim
CGRP-Primer	Promega GmbH, Mannheim
COX-1-Primer	Promega GmbH, Mannheim
COX-2-Primer	Promega GmbH, Mannheim
Light-Cycler 2.0 real-time PCR-System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Light-Cycler Software 4.05	
- Light-Cycler FastStart DNA Master Sybr Green I kit	

## 2.7. Auswertung und Statistik

Produkt	Hersteller
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
SigmaStat 3.5	SystatSoftware Inc., Chicago, USA

### 3. Methoden

#### 3.1 Tiere und Zellkultur

Für die Experimente wurden 3 bis 4 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung und mit einem fest etablierten 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. In einem Käfig lebten jeweils ein Muttertier und 10 Jungen zusammen. Die Tierexperimente standen dabei in Einklang mit der European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC). Die für die Genehmigung zuständige Anstalt war das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo; T0322/96).

Die Herstellung einer Zellkultur aus dem Ganglion trigeminale der Ratte erfolgte auf Grundlage des Protokolls von Baccaglini et al. mit leichten Modifikationen [71]. Die Tiere wurden durch einen Isofluran-Verdampfer (4 %) anästhesiert und mittels einer Schere dekapitiert. Anschließend wurden die Ganglien unter sterilen Bedingungen frei präpariert und in eine Petrischale mit Dissoziations-Medium überführt. Nach Entfernung des überschüssigen Bindegewebes folgte eine Inkubation im Wasserbad über 90 min bei 37 °C in 10 ml Dissoziations-Medium und Collagenase/Dispase (Endkonzentration 100 µg/ml), sowie über 30 min bei 37 °C mit 5 ml Trypsin/EDTA. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Ganglien mit einer phosphatgepufferten Lösung (PBS) gespült. Die Dissoziation der trigeminalen Zellen erfolgte in 2 ml Dissoziations-Medium unter Verwendung zweier unterschiedlich kaliberstarker Pasteur-Glaspipetten. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1200 rpm über 2 min zentrifugiert, und die Zellen wurden in 3 ml Starter-Medium resuspendiert. 20 µl dieser Suspension wurden mit 180 µl Trypanblau in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. In einer vorher beschichteten 24-*well*-Platte wurden die Zellen mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^5$  pro  $\text{cm}^2$  in 500 µl Starter-Medium ausgesät. Die Beschichtung der Platte erfolgte mit 300 µl Poly-L-Lysin, inkubiert über 90 min bei 4 °C, und 300 µl Kollagen-Medium, inkubiert über 90 min bei 37 °C. Für die immunhistochemischen Experimente wurden zuvor Glasträger in die *wells* gelegt. Nach jedem Zwischenschritt wurde zweimal mit PBS gespült. Zur Unterbindung eines Wachstums nicht-neuronaler Zellen wurde Cytosin-Arabinosid (Endkonzentration 10 µM) nach dem Aussähen und am zweiten Tag hinzugefügt.



Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (37 °C, 95 % Luft, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Nach dem zweiten und fünften Tag wurden 50 % des alten Mediums gegen Inkubations-Medium ausgetauscht. Die Bedingungen in der Zellkultur wurden lichtmikroskopisch überwacht. Mit Hilfe von GFAP-Antikörpern gegen Astroglia und  $\beta$ -Tubulin-III-Antikörpern gegen Neuronen konnte ein Neuronen-Anteil von ca. 10 % nach 7 Tagen Inkubation festgestellt werden.

### 3.2 Stimulations- und Inhibitionsexperimente

Alle Versuche fanden am sechsten Tag nach Präparation statt und wurden parallel in zwei *wells* ausgeführt. Nach vollständigem Austausch des Überstandes gegen NGF $\beta$ - und Calcium-haltiges Inkubations-Medium folgte eine einstündige Ruhezeit im Inkubator. Stimulanzen und Inhibitoren wurden in PBS gelöst.

**Zur Bestimmung der mRNA:** Die Bestimmung der relativen Genexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) erfolgte nach Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  (1 pg/ml, 100 pg/ml, 10 ng/ml). Zu bestimmten Zeitpunkten (1,5 h, 3 h und 6 h) wurde das Medium entfernt und die Zellen einer RNA-Isolierung unterzogen. Als Kontrolle diente eine Zellkultur unter gleichen Bedingungen, die mit PBS behandelt wurde. Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR. Die Bestimmung der relativen Genexpression der COX-1 wurde nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) über 3 h analog durchgeführt. Die Bestimmung der COX-2 nach Hemmung des IL-1 $\beta$ -Rezeptors durch eine 15-minütige Präinkubation mit dem IL-1-Antagonisten IL-1-ra (1  $\mu$ g/ml) erfolgte nach dem gleichen Schema. Ebenso wurde die CGRP-mRNA nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) zu den Zeitpunkten (1 h, 2 h und 4 h) und nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) zu den Zeitpunkten (4 h, 10 h und 24 h) in gleicher Weise bestimmt. Die Hemmung des IL-1 $\beta$ -Rezeptors erfolgte durch eine 15-minütige Präinkubation mit dem IL-1-Antagonisten IL-1-ra (1  $\mu$ g/ml).

**Zur Bestimmung der Proteinsynthese:** Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Westernblot und Immunhistochemie nach 6-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml).

**Zur Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese:** Die Zellen wurden über 30 min und 4 h mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder mit PBS als Negativ-Kontrolle stimuliert. Anschließend wurde der PGE<sub>2</sub>-Gehalt im Überstand der Zellkultur (50  $\mu$ l/well) mittels eines Enzymimmunoassays (EIA) gemessen. Für die Inhibitionsversuche erfolgte eine 15-

minütige Präinkubation mit Indometacin (10  $\mu$ M), Parecoxib (10  $\mu$ M) und Sumatriptan (10  $\mu$ M).

**Zur Bestimmung der CGRP-Sekretion:** Die Messung der CGRP-Sekretion erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Die Zellkultur wurde mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M, 100 nM) über (1 h und 4 h) und mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) über (1 h, 4 h, 10 h und 24 h) stimuliert. Der Überstand (50  $\mu$ l/well) der Zellkultur wurde mittels EIA auf die CGRP-Konzentration hin untersucht. Für die Negativkontrolle dienten mit PBS behandelte Kulturen unter gleichen Bedingungen. Als Positivkontrolle wurde jede Zellkultur mit KCl (60 mM) stimuliert [61]. KCl löst durch eine unspezifische Depolarisation ein starke Ausschüttung von CGRP aus. Die Ergebnisse einer Zellkultur wurden nur dann statistisch ausgewertet, wenn die Positivkontrolle eine mindestens 2-fache Erhöhung der CGRP-Konzentration gegenüber der Negativkontrolle aufwies. Für die Inhibitionsexperimente wurde die CGRP-Konzentration nach 45-minütiger Präinkubation mit Indometacin (10  $\mu$ M), Parecoxib (10  $\mu$ M) und Sumatriptan (10  $\mu$ M) gemessen. Die Präinkubation mit Methylprednisolon (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M), Metoprolol-Tartrat (10  $\mu$ M) und Topiramamat (100  $\mu$ M) erfolgte über 45 min bzw. 24 h.

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Grundprinzip

Zur immunhistochemischen Charakterisierung der Zellkultur wurde ein kommerzielles Fluoreszenz-Farbstoff-System verwendet. Hierbei erfolgt die Identifizierung der gesuchten Proteine durch eine initiale Sondierung mit primären Antikörpern. Anschließend werden die Zellen mit einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, gefärbt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können die Proben angeregt und das Emissionslicht detektiert werden. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Emissionswellenlängen ermöglichen eine Färbung verschiedener Proteine in derselben Probe.

#### 3.3.2 Durchführung

Die trigeminale Zellkultur wurde mit PBS (0,1 M) gespült und anschließend mit Methanol (100 %) für 20 min bei -20 °C fixiert. Die Zellen wurden dreimal für 10 min mit PBS (0,1 M) gewaschen und für 2 h mit einer Block-Lösung behandelt. Zur Bestimmung der COX-2 wurden die Zellen über Nacht unter ständigem Schütteln bei 4 °C mit Primärantikörpern gegen COX-2 (Herkunft: Hase), gegen GFAP (Herkunft: Maus),

einem spezifischen Marker glialer Zellen, und  $\beta$ -Tubulin-III (Herkunft: Maus), einem spezifischen neuronalen Marker, zusammen mit einer Primärantikörper-Lösung inkubiert. Die Proben wurden anschließend dreimal für 10 min mit PBS (0,1 M) gespült und für 90 min mit Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG und Alexa Fluor 594 Anti-Hase-IgG bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung von CGRP und Neuronen wurden analog dem oben beschriebenen Prozedere mit Anti-CGRP-Antikörpern (Herkunft: Hase) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor 594 Anti-Hase-IgG und Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG verwendet. Die COX-2- und CGRP-Ko-Färbung wurde mit Anti-COX-2- (Herkunft: Hase) und Anti-CGRP-Antikörpern (Herkunft: Maus) nach obigem Schema durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor 594 Anti-Hase-IgG und Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG verwendet. Die Deckplättchen wurden luftgetrocknet und mit glycerolhaltigem Bedeckungsmedium beschichtet. Die Proben wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht und nach der Digitalisierung ausgewertet. In der Negativ-Kontrolle wurde die nicht spezifische Reaktion der Sekundärantikörper getestet, indem die oben aufgeführte Prozedur mit Auslassung der Primärantikörper-Gabe durchgeführt wurde (siehe Tab. 4).

**Tabelle 4:** Antikörper zur immunhistochemischen Bestimmung von COX-2 und CGRP

	<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primär:</b>	Anti-COX-2	Hase	1:300
	Anti-CGRP	Hase	1:200
	Anti-CGRP	Maus	1:400
	Anti- $\beta$ -Tubulin-III	Maus	1:600
<b>Sekundär:</b>	Alexa Fluor 488 Anti-Maus	Esel	1:400
	Alexa Fluor 594 Anti-Hase	Esel	1:400

### 3.4 Enzym-Immunoassay

#### 3.4.1 Grundprinzip

Zur Bestimmung der Konzentration von CGRP und PGE<sub>2</sub> im Überstand der trigeminalen Zellkultur wurden zwei kommerzielle Enzymimmunoassays (EIA) verwendet.

Der CGRP-EIA funktioniert nach dem „Sandwich-Prinzip“ [72]. Das freie CGRP der Probe wird gleichzeitig von zwei Antikörpern gebunden: von einem an der Wand des *wells* fixierten Antikörper sowie von einem Acetylcholinesterase-(AChE-)gekoppelten Antikörper. Die CGRP-Konzentration wird anhand der AChE-Aktivität bestimmt. Die Esterase bewirkt mit Hilfe des Ellmans Reagenz einen Farbumschlag. Die Intensität der Farbe, die Proportional zur Konzentration von CGRP ist, wird mit einem Spektrophotometer gemessen.

Die Funktionsweise des PGE<sub>2</sub>-EIA weicht von dem oben beschriebenen Prinzip ab und beruht auf dem kompetitiven Verhalten zwischen freiem PGE<sub>2</sub> einerseits und AchE-gekoppeltem PGE<sub>2</sub> andererseits in Bezug auf einen primären Anti-PGE<sub>2</sub>-Antikörper. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe binden in kompetitiver Weise an die mit dem *well* beschichteten sekundären Antikörpern. Gemessen wird ebenfalls die Intensität des mit Hilfe des Ellmans Reagenz ausgelösten Farbumschlages.

### 3.4.2 Durchführung

Zur Bestimmung der CGRP-Konzentration wurden aus 2 *wells* der Zellkultur jeweils 50 µl Überstand vor bzw. nach Stimulation entnommen. Die Anwendung des EIA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach einer Entwicklungszeit von 1 h bei Raumtemperatur unter völligem Lichtabschluss und kontinuierlichem Schütteln wurde die Messung mit einem Spektrophotometer bei 405 nm durchgeführt. Der Mittelwert aus 5 aufeinanderfolgenden Messungen (im Abstand von 20 s) wurde für die Auswertung verwandt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Excel. Zunächst wurden die CGRP-Konzentrationen der Standardreihe in pg/ml (y-Achse) grafisch gegen die Extinktion in mAU (x-Achse) aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Anhand der Regressionsgerade wurden die CGRP-Konzentrationen der Proben berechnet. Bei CGRP-Konzentrationen über 500 pg/ml wurde der Assay mit entsprechend verdünntem Überstand wiederholt.

Die Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration wurde analog dem oben beschriebenen Prozedere durchgeführt. Unterschiedlich ist lediglich die Bestimmung der Regressionsgeraden. Hier wird zunächst das Verhältnis der Extinktion einer Nullprobe (ohne freies PGE<sub>2</sub>) und der Extinktion einer Standardreihe gebildet.

## 3.5 Westernblot

### 3.5.1 Grundprinzip

Die Methode des Westernblots ist ein effektives Verfahren zur Bestimmung von Proteinen, wie der Cyclooxygenase 2 [73]. Zur Anwendung kommen eine diskontinuierliche Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Immundetektion und Visualisierung mittels eines kommerziellen Chemoluminiszenzsystems. Die Proteine der Probe werden mit einem SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt. Das anionische Detergenz SDS bewirkt bei den Proteinen eine fast vollständige Denaturierung und Aufhebung der ursprünglichen Ladung. Aufgrund

der nun einheitlichen negativen Ladung wird die Bewegung der SDS-Proteine entlang des elektrischen Feldes lediglich durch die unterschiedlichen Molekulargrößen bestimmt. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine erfolgt mittels *electroblotting* auf eine Nitrozellulosemembran. Zur Identifizierung wird die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Ein sekundärer Antikörper ist mit Peroxidase gekoppelt und ermöglicht die Visualisierung des Proteins in Form einer Bande. Bei der verstärkten Chemilumineszenz-Methode (ECL) bewirkt das Reaktionsprodukt der Peroxidase die Oxidation des Lumineszenz-Farbstoffes, Luminol. Die anschließende Lichtemission des Farbstoffes wird chemisch durch Phenole verstärkt und erreicht ihr Maximum bei 428 nm nach 5 bis 20 min. Das ausgesandte Licht ermöglicht durch die Belichtung eines für den blauen Wellenlängenbereich sensitiven Films die Visualisierung des Proteins als Bande im Niveau seines Molekulargewichts.

### 3.5.2 Durchführung

Die Homogenisierung der Ganglion-trigeminale-Zellkultur wurde nach dem zuvor beschriebenen, leicht modifizierten Protokoll [74] durchgeführt. Die Zellen wurden auf Eis in 250 µl Extraktions-Puffer homogenisiert und bei 4 °C mit 20800 rpm über 30 min zentrifugiert, und der Überstand wurde abpipettiert. Der Extrakt wurde mit Proben-Puffer verdünnt. Nach Bestückung der Elektrophoresekammer mit einem Tris-Glycin-Gel und Lauf-Puffer wurden die Proben aufgetragen und elektrophoretisch für ungefähr 100 min bei 25 mA aufgetrennt. Die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels *semi-dry-blotting* bei 200 mA über 30 min. Hierbei werden die Nitrozellulosemembran und die Gelplatte horizontal zwischen zwei an Elektroden angeschlossene Filterpapiere eingespannt. Gel-Platte, Membran und Blotting-Papier wurden zuvor mit Transfer-Puffer behandelt. Nach Abschluss des Blottings wurde der Aufbau in TBS gewaschen und 1 h in 5%-igen milchpulverhaltigen TBS-Lösung geblockt, um freie Proteinbindungsstellen zu sättigen. Die Blots wurden anschließend über Nacht mit einem primären Anti-COX-2-Antikörper unter kontinuierlichem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in TBS-Lösung. Danach wurde der Blot in 0,05%-iger Tween-20-haltiger TBS-Lösung gewaschen. Zur Sondierung des Blots wurde ein sekundärer peroxidase-gekoppelter Antikörper aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen mit TBS-Lösung wurde eine ECL-Detektions-Lösung zugeführt. Zur Aufzeichnung der Chemolumineszenz-Reaktion wurde ein ECL-Hyperfilm für ungefähr

1 min belichtet. Nach abgelaufener Entwicklung wurde das Blotbild mit einem Typhon-Scanner aufgenommen. Anschließend wurde die optische Dichte der COX-2-Bande in Bezug auf die  $\beta$ -Aktin-Bande, ein konstant exprimiertes sogenanntes Housekeeping-Protein, bestimmt. Die Zuordnung des Molekulargewichtes von COX-2 (72 kDa) und  $\beta$ -Aktin (42 kDa) erfolgte mit Hilfe eines mitgeführten Molekulargewicht-Markers. Zur Kontrolle wurde die Membran mit Stripping-Puffer behandelt, mit TBS Lösung gespült, mit milchpulverhaltiger Lösung geblockt, und eine erneute Sondierung wurde mittels Anti- $\beta$ -Actin-Antikörper durchgeführt. Sekundär wurde ein peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Magrophagen-IFN $\gamma$ -LPS-Zelllysate verwendet (siehe Tab. 5).

**Tabelle 5:** Antikörper zur Bestimmung von COX-2 im Westernblot

	<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primär:</b>	Anti-COX-2	Hase	1:1250
	Anti- $\beta$ -Actin	Maus	1:5000
<b>Sekundär:</b>	ECL-Anti-Hase + Peroxidase	Esel	1:7500
	ECL-Anti-Maus + Peroxidase	Schaf	1:7500

### 3.6 Relative quantitative reverse Transkriptase mit *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

#### 3.6.1 Grundprinzip

Zur Bestimmung der Genexpression mittels relativer Quantifizierung der mRNA von COX und CGRP wurde eine reverse Transkription (RT) mit anschließender *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe des Light-Cycler-Systems durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Extraktion der RNA aus der Zellkultur und anschließend eine Umschreibung in eine komplementäre DNA (cDNA) als Template für die anschließende PCR. Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe einer temperaturstabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq). Die Eingrenzung des gesuchten DNA-Abschnitts erfolgt durch Anlagerung komplementärer Oligonukleotide, der sogenannten Primer.

Die quantitative *real-time* PCR mittels Light-Cycler ermöglicht die relative Quantifizierung der mRNA eines zu untersuchenden Gens (hier: COX und CGRP). Das Grundprinzip der Methode beruht auf der Bindung von SYBR-Grün-I, einem Fluoreszenzfarbstoff, an doppelsträngige DNA. Durch Anregung der Probe mit Licht der Wellenlänge 530 nm und durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität lässt sich der DNA-Gehalt des amplifizierten Teilstücks am Ende jedes PCR-Zyklus bestimmen. Um den DNA-Gehalt der Proben zu vergleichen, wird die Intensität der Fluoreszenz gegen

die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen und der *crossing point* (CP) bestimmt. Der CP-Wert bezeichnet diejenige Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz-Emission aus dem Hintergrund tritt. Der CP-Wert spiegelt den Umstand wider, dass zu Beginn der Amplifikationsphase nur eine geringe Menge an cDNA vorhanden ist - mit der Folge einer suboptimalen Vervielfältigung der DNA-Fragmente. Eine exponentielle Beziehung zwischen Zykluszahl und Fluoreszenzintensität, die Grundlage für die Berechnung der relativen Expressionsrate, wird nur in der mittleren Phase der Amplifikation erreicht. Grundsätzlich geht eine hohe DNA-Ausgangskonzentration in der Probe mit einer geringen Zykluszahl einher.

### 3.6.2 Durchführung:

Zur Vermeidung einer RNase-Kontamination wurden alle Arbeitsflächen mit DEPEC behandelt und RNase-freie Lösungen, Einmalhandschuhe und sterile Pipettenspitzen verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

**Trizol-/Chloroform-Extraktion:** Zur RNA-Extraktion wurden 2 *wells* der Zellkultur mit 1 ml Trizol lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abscheidung der DNA/RNA-Fraktion erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm mit anschließender Überführung der RNA-haltigen wässrigen Oberphase in ein RNase-freies Eppendorfgefäß. Eine 10-minütige Inkubation in 500 µl Isopropylalkohol mit anschließender Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C über 10 min schloss sich an. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Zugabe von 75%-igem Ethanol erneut für 3 min bei 4 °C und 7500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur 10 min getrocknet, um es anschließend in 20 µl DEPC-Wasser zu lösen.

**RNA-Isolierung:** Um eine Kontamination mit DNA auszuschließen, erfolgte eine Behandlung mit RNA-qualified-(RQ1-)DNase (siehe Tab. 6). Die Proben wurden in einem Thermocycler bei 37 °C für 20 min inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Für die Phenol/Chloroform-Extraktion wurden 165 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 200 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (in der Zusammensetzung 25:24:1) zugeführt und bei 10000 rpm und 10 °C für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und mit 200 µl Chloroform/Isopropylalkohol (in der Zusammensetzung 24:1) gemischt und erneut bei 10000 rpm und 10 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen Oberphase sowie Überführung in 20 µl LiCl<sub>2</sub>

(8 M) und 550 µl Ethanol wurden die Proben 1 h bei -70 °C präzipitiert, um anschließend bei 0 °C mit 11000 rpm für 30 min zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit 600 µl einer 75%-igem Ethanol gewaschen und mit 8000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt, das Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl DEPEC-H<sub>2</sub>O gelöst.

**Tabelle 6:** RNA-Isolierung

Reagenz	Menge
DNA/RNA-Probe	20 µl
RQ1-Puffer	3,5 µl
RNAsin (40 U/µl)	1 µl
RQ1-DNAse (1 U/µl)	3 µl
DEPEC-H <sub>2</sub> O (0,1 %)	7,5 µl
<b>Totalvolumen</b>	<b>35 µl</b>

**Reverse Transkription (RT):** Die reverse Transkription (RT) dient der Umschreibung der instabilen mRNA in einen stabileren, komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA). Hierzu ist die Zugabe von Oligonukleotid-Hexameren mit zufälligen Sequenzen (*random hexamer primer*) nötig. Zur Anbindung der *random hexamers* an die RNA wurden 10 µl der extrahierten RNA mit 100 ng *random hexamers* sowie DEPEC-H<sub>2</sub>O auf 15 µl Endvolumen gemischt und im Thermocycler für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C herunter gekühlt. Zur Umschreibung von mRNA in cDNA wird eine reverse Transkriptase aus dem Maus-Leukämievirus (M-MLV) verwendet (siehe Tab. 7). Zur Kontrolle einer Kontamination mit Fremd-DNA wurden zwei Ansätze hergestellt: ein positiver mit und ein negativer ohne M-MLV-Reverse-Transkriptase. Der Reagenzansatz wurde 5 min bei 21 °C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte über 45 min bei 37 °C. Um die Reverse-Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt.

**Tabelle 7:** Ansatz für die reverse Transkription

Reagenz	Menge
RNA-Probe	15 µl
Transkriptionspuffer	6 µl
dNTP (10 mM)	3 µl
M-MLV-Reverse-Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
DEPEC-H <sub>2</sub> O	5 µl
<b>Totalvolumen</b>	<b>30 µl</b>

**Evaluation der Negativ-Kontrolle:** Um eine mögliche Kontamination mit unerwünschter Fremd-DNA auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu dient eine PCR mit thermophiler Taq-Polymerase (siehe Tab. 8).



**Tabelle 8:** PCR-Ansatz zur Evaluation der Negativ-Kontrolle

Reagenz	Menge
cDNA-Probe	2 µl
PCR-Puffer	5 µl
dNTP (2,5 mM)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
GAPDH-Primer sense (20 µM)	1,25 µl
GAPDH-Primer antisense (20 µM)	1,25 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	33 µl
<b>Totalvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Die PCR wurde in einem Thermocycler nach folgendem Prozedere durchgeführt (siehe Tab. 9). Die DNA wurde initial bei 94 °C komplett denaturiert. Anschließend folgten 30 PCR-Zyklen. In der Denaturierungsphase werden die DNA-Doppelstränge nach jeder Synthesephase bei 94 °C für 1 min aufgetrennt. Die Hybridisierungsphase erfolgte bei 63 °C, dem Temperaturoptimum der GAPDH-Primer, für 1 min und erlaubt die Anlagerung des Primers an den DNA-Einzelstrang. Die Elongationsphase wurde mit 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, für 1 min durchgeführt; sie stellt die eigentliche Produktion komplementärer DNA-Abschnitte dar. Zur Sicherstellung der Vervollständigung aller begonnenen Syntheseprodukte schloss sich an das Ende des 30. Zyklus eine Terminierungsphase von 10 min bei 72 °C an.

**Tabelle 9:** PCR-Zyklen zur Evaluation der Negativkontrolle

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>Initiale Denaturierung</b>	94 °C	3 min	
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	<b>30 Zyklen</b>
<b>Hybridisierung</b>	63 °C	30 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	30 s	
<b>Terminale Elongation</b>	72 °C	10 min	

Anschließend wurden 6 µl des PCR-Produktes in einer Agarosegelelektrophorese visualisiert. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1 g Agarosepulver auf 100 ml TAE-Puffer verwandt und unter Erhitzung in einer Mikrowelle gelöst. Anschließend wurden 3 µl Sybr-Gold zugefügt und das Gel in einen Träger gegossen. Nach Abkühlung wurde die Gelplatte in eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer gegeben. Die PCR-Proben wurden mit 6 µl Orange-G-Farbe gemischt. Die Gel-Taschen werden mit 6 µl der PCR-Farb-Lösung und mit 5 µl eines DNA-Markers bestückt. Bei 110 V über 35 min erfolgte die Auftrennung etwaiger negativ geladener DNA-Produkte entlang des elektrischen Feldes. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die Fluoreszenz mittels eines Gelscanners bestimmt.

**Light-Cycler-PCR:** Der Reaktionsansatz für die quantitative *real-time* PCR wird mit Hilfe des Light-Cycler-Fast-Start-Kit erstellt (siehe Tab. 10). Um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen, wurden jeweils eine Negativ-Kontrolle ohne FSM und eine Wasserkontrolle mitgeführt.

**Tabelle 10:** Reaktionsansatz der Light-Cycler PCR

Reagenz	Menge
DNA-Probe	2 µl
Primer sense	0,5 µl
Primer antisense	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,1 µl
Fast-Start-Mix (FSM)	2 µl
H <sub>2</sub> O	12,9 µl
<b>Totalvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Das Light-Cycler-PCR-Protokoll beinhaltet verschiedene Schritte (siehe Tab. 11). In der Präinkubationsphase werden die Fast-Start-DNA-Polymerase aktiviert und die DNA der Probe denaturiert. In der Amplifikationsphase finden die Vervielfältigung der Ziel-DNA und deren anschließende Fluoreszenzmessung statt. Während der Denaturierungsphase wird die Probe kurzzeitig auf 95°C erhitzt, um eine vollständige Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge zu gewährleisten. Die Temperatur der Anlagerungsphase ist Primer-spezifisch. Idealerweise sollte sie sich etwas unterhalb der Schmelz-Temperatur der Primer befinden. Die Temperatur in der Elongationsphase beträgt 72 °C, um die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA oder Primer-Dimere zu verhindern. Die optimale Temperatur zur Fluoreszenz-Messung befindet sich knapp unterhalb der Schmelztemperatur des PCR-Produkts.

**Tabelle 11:** Light-Cycler-PCR-Protokoll

		Temperatur	Zeit
<b>Amplifikation -CGRP-</b>	Präinkubation	95 °C	10 min
	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung	66 °C	10 s
	Elongation	72 °C	15 s
	Messung	87 °C	einmalig
<b>Amplifikation -COX-1-</b>	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung	58 °C	10 s
	Elongation	72 °C	15 s
	Messung	87 °C	einmalig
<b>Amplifikation -COX-2-</b>	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung	63 °C	10 s
	Elongation	72 °C	10 s
	Messung	83 °C	einmalig
<b>Amplifikation -GAPDH-</b>	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung	63 °C	10 s
	Elongation	72 °C	10 s
	Messung	87 °C	einmalig

Zur Überprüfung der Produktreinheit wurde nach jeder abgeschlossenen PCR eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Durch die unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes kann nicht zwischen Primer-Dimeren oder der DNA des PCR-Produkts unterschieden werden. Deshalb wurde die DNA-Fragmente durch Anheben der Temperatur von 70 °C auf 95 °C unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenzintensität schrittweise denaturiert. Die kürzeren Primer-Dimere denaturieren bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als die längere Ziel-DNA. Des Weiteren dient die Schmelzkurven-Analyse zur Bestimmung der optimalen Temperatur für die Primer-Anlagerung und Fluoreszenz-Messung [75].

Für die *real-time* PCR wurden im Labor etablierte Primer verwendet, deren Spezifität durch Sequenzierung in einem auswärtigen Labor verifiziert wurden (siehe Tab. 12).

**Tabelle 12:** Primer

Gen	Primer (5' - 3')	Effizienz (E)
<b>CGRP</b>	Sense AAG TTC TCC CCT TTC CTG GT	<b>1,918552</b>
	Antisense GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC	
<b>COX-1</b>	Sense TAA GTA CCA GGT GCT GGA TGG	<b>1,965670</b>
	Antisense GGT TTC CCC TAT AAG GAT GAT GAG	
<b>COX-2</b>	Sense TGA TCG AAG ACT ACG TGC AAC AC	<b>1,702342</b>
	Antisense CAG CAA TCT GTC TGG TGA ATG AC	
<b>GABDH</b>	Sense AGA TTG TCA GCA ATG CAT CCT GC	<b>1,816696</b>
	Antisense CCT TCT TGA TGT CAT CAT ACT TGG	

**Relative Quantifizierung:** Die Effizienz (E) der Primer wurde mittels Light-Cycler-PCR einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100) festgestellt. Die cDNA-Konzentrationen wurden in einem logarithmischen Maßstab auf die korrespondierenden *crossing points* aufgetragen und eine Regressionsgerade gebildet. Die Effizienz (E) errechnet sich aus:

$$\text{Effizienz (E)} = 10^{-1/\text{Steigung der Regressionsgeraden}}$$

Zur relativen Quantifizierung muss die relative Expression des Zielgens mit der relativen Expression eines nicht induzierten Referenzgens, des sogenannten *housekeeping*-Gens, normalisiert werden. Hierzu wird eine Light-Cycler-PCR mit Primern für das Ziel-Gen (hier: COX-1, COX-2 und CGRP) und mit Primern für das Housekeeping-Gen (hier: GAPDH), dessen Expression als konstant angenommen wird, durchgeführt. Als Maß für die relative Quantifizierung der Start-DNA dient der jeweilige *crossing point* (CP) einer Probe. Der CP-Wert beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen, bei der die

Fluoreszenzintensität erstmals signifikant aus dem Hintergrund tritt und die DNA-Konzentration in der Probe exponentiell ansteigt.

Die relative Expression eines Zielgens bzw. *housekeeping*-Gens errechnet sich aus der Differenz der jeweiligen CP-Werte zwischen der Kontroll-Probe (keine Stimulierung, 0-h-Wert) oder der Behandlungs-Probe (Stimulierung mit IL-1 $\beta$  bzw. PGE<sub>2</sub>) als Potenz zur Effizienz (E) des Primers:

$$\text{relative Expression} = E^{\Delta\text{CP}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}$$

Zur Berechnung der Expressionsratio wird die relative Expression des Zielgens mit der relativen Expression des *housekeeping*-Gens normalisiert und mittels folgender Formel berechnet [76]:

$$\text{Expressionsratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{CP}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})_{\text{Zielgen}}}}{E_{\text{housekeeping-Gen}}^{\Delta\text{CP}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})_{\text{housekeeping-Gen}}}}$$

Idealerweise wird das *housekeeping*-Gen nicht reguliert und es findet sich kein Unterschied zwischen der unbehandelten und der stimulierten Probe. Die Expressionsratio wäre somit ausschließlich von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig.

### 3.7 Auswertung und Statistik

Die Bilder der Immunhistologie und des Westernblots wurden mittels des Programms Photoshop aufgearbeitet. Aus den Ergebnissen der *real-time* PCR und der EIA wurden die Mittelwerte gebildet und der Standardfehler (SEM) berechnet und mittels Balkendiagramme grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat. Die *real-time* PCR-Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse mit Benferroni-Korrektur ausgewertet. Die EIA-Ergebnisse wurden zunächst auf eine Normalverteilung hin geprüft. Normalverteilte Werte wurden mit einem t-Test (einseitig, nicht-paarweise) und nicht-normalverteilte Werte mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde ein  $p < 0,05$  akzeptiert. Im Falle der CGRP-Bestimmung wurden nur diejenigen Werte statistisch berücksichtigt, bei denen eine Verdopplung der CGRP-Konzentration nach Stimulation mit KCL im Vergleich zur PBS-Kontrolle nachweisbar war.

## 4. Resultate

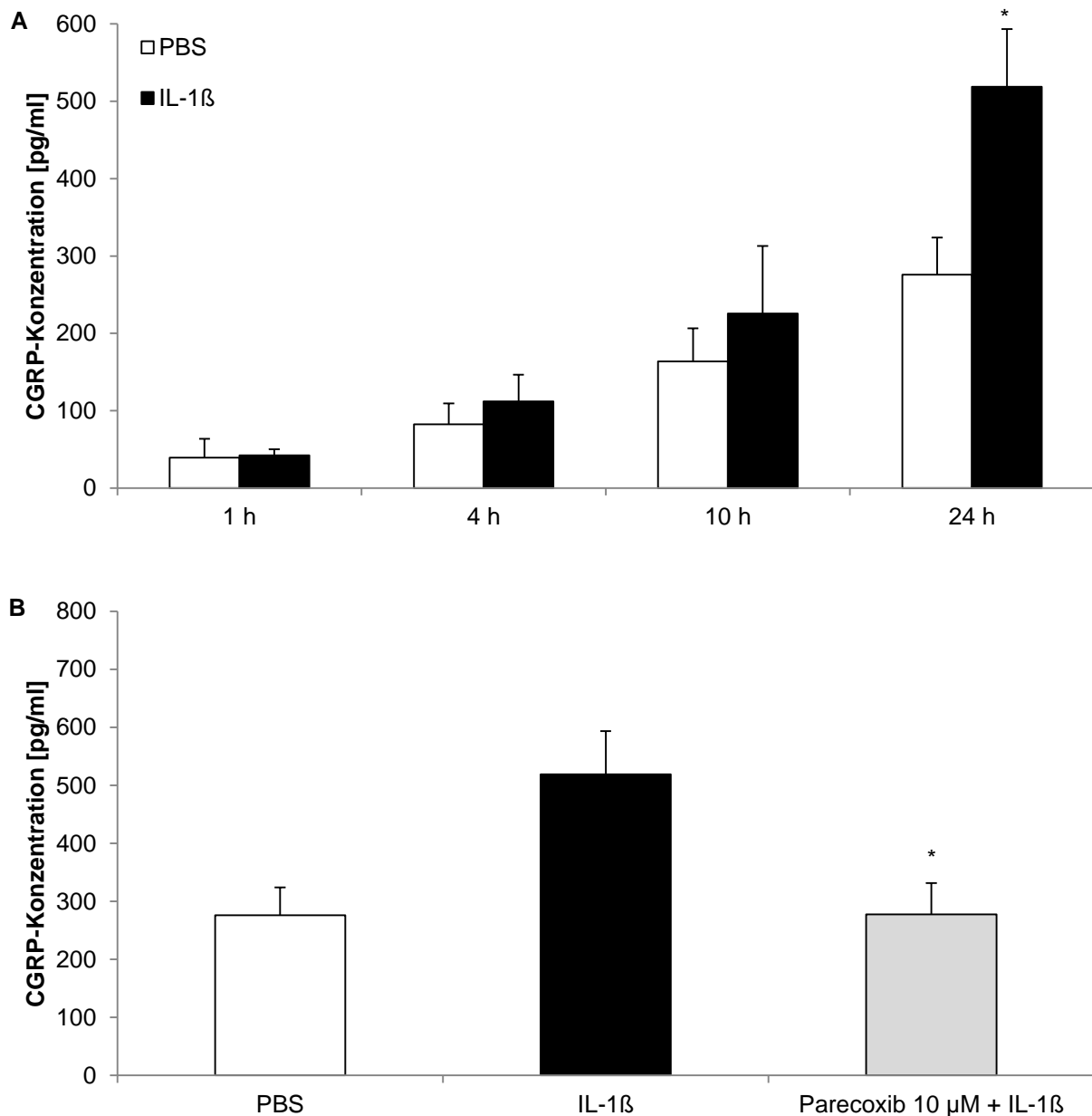
### 4.1 IL-1 $\beta$ induziert die CGRP-Sekretion in einer trigeminalen Zellkultur

#### 4.1.1 IL-1 $\beta$ führt zu einer zeitlich verzögerten Sekretion von CGRP

Im Spinalganglion der Ratte konnte IL-1 $\beta$  eine CGRP-Sekretion auslösen [70]. Um zu überprüfen, ob IL-1 $\beta$  in trigeminalen Zellen eine CGRP-Sekretion auslösen kann, wurde eine trigeminale Zellkultur mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) inkubiert und die CGRP-Konzentration im Überstand mittels EIA nach 1 h, 4 h, 10 h und 24 h gemessen (Abb. 2.a). Nach einstündiger Inkubation konnte kein Unterschied zwischen der PBS-Kontrolle und den mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen festgestellt werden. Nach 4 h und 10 h zeigte sich bereits ein Trend hin zu einer vermehrten CGRP-Ausschüttung, der allerdings noch nicht signifikant war. Erst nach 24 h konnte ein signifikanter ( $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ) Anstieg der CGRP-Konzentration im Überstand nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  ( $519 \text{ pg/ml} \pm 75 \text{ pg/ml SEM}$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrolle ( $276 \text{ pg/ml} \pm 48 \text{ pg/ml SEM}$ ) nachgewiesen werden.

#### 4.1.2 Die IL-1 $\beta$ -induzierte Sekretion von CGRP ist abhängig von COX-2

Um die Bedeutung der Cyclooxygenase in diesem Modell zu testen, applizierte ich 45 min vor Stimulation mit IL-1 $\beta$  den spezifischen COX-2-Hemmer Parecoxib (10  $\mu\text{M}$ ) auf die trigeminale Zellkultur. Die CGRP-Konzentration im Überstand wurde dann 24 h nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  mittels EIA gemessen (Abb. 2.b). Der spezifische COX-2-Hemmer, Parecoxib ( $278 \text{ pg/ml} \pm 54 \text{ pg/ml SEM}$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ), konnte die IL-1 $\beta$ -induzierte CGRP-Sekretion ( $482 \text{ pg/ml} \pm 70 \text{ pg/ml SEM}$ ,  $n = 10$ ) blockieren.

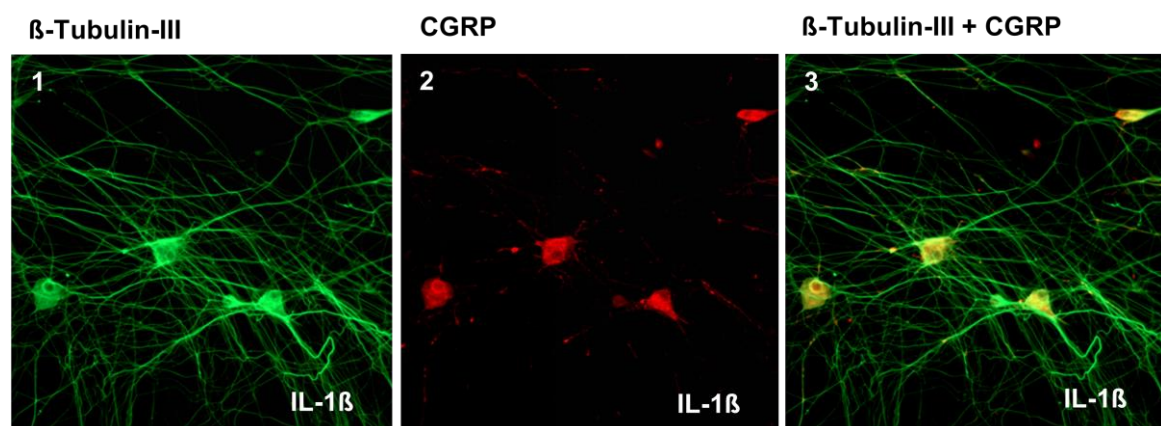


**Abbildung 2 illustriert die CGRP-Freisetzung nach IL-1 $\beta$ -Stimulation.** A: Während nach 1 h noch kein Unterschied zwischen PBS und IL-1 $\beta$  festzustellen war, zeichnete sich nach 4 h und 10 h ein Trend hin zur vermehrten CGRP-Ausschüttung durch IL-1 $\beta$  ab (schwarze Säulen). Erst nach 24 h konnte eine signifikante CGRP-Sekretion im Vergleich zur PBS-Kontrolle nachgewiesen werden. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der CGRP-Konzentration gemessen in pg/ml (nach 1 h, 4 h, 10 h: je n = 4, nach 24 h: n = 8, mit \*p < 0,05 für IL-1 $\beta$  vs. PBS). B: Der spezifische COX-2-Hemmer Parecoxib kann die nach 24 h auftretende CGRP-Sekretion signifikant inhibieren. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der CGRP-Konzentration gemessen in pg/ml (Parecoxib + IL1 $\beta$ : n = 8, mit #p < 0,05 für IL-1 $\beta$  vs. Parecoxib).

#### 4.1.3 Neuronale Zellen sind die Quelle der IL-1 $\beta$ -induzierten CGRP-Sekretion

Nun stellt sich die Frage, aus welchen Zellen CGRP nach IL1 $\beta$ -Gabe in der trigeminalen Zellkultur sezerniert wird. Hierzu habe ich die trigeminale Zellkultur 24 h nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) immunhistochemisch untersucht (n = 3). Die

Proben wurden mit Antikörpern gegen CGRP und gegen  $\beta$ -Tubulin-III, einen neuronenspezifischen Marker, gefärbt. Die sekundären Antikörper für CGRP waren mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff versehen und die für  $\beta$ -Tubulin-III mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff. Zunächst konnten grün fluoreszierende Neurone mit einem dichten Netzwerk neuronaler Fortsätze nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Als Ausdruck eines vermehrten CGRP-Gehalts, färbten sich einzelne Zellkörper und punktuell auch deren Fortsätze rot (Abb. 3.2). Die Doppelfärbung zeigt, dass sich CGRP hauptsächlich in Neuronen (orange Färbung in Abb. 3.3) nachweisen lässt. CGRP befand sich sowohl innerhalb der Zellkörper, als auch innerhalb der neuronalen Fortsätze.



**Abbildung 3 zeigt, dass CGRP in der trigeminalen Zellkultur von Neuronen exprimiert wird.** 24 h nach Inkubation der trigeminalen Zellkultur ( $n = 3$ ) mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CGRP (rot in Abb. 3.2) und  $\beta$ -Tubulin-III, einem neuronalen Marker, aus der Maus (grün in Abb. 1.1), markiert. Zur Visualisierung wurden sekundäre fluoreszierende Antikörper verwendet. Die Doppelfärbung zeigt, dass CGRP-positive Zellen ebenfalls positiv für  $\beta$ -Tubulin-III waren (orange in Abb. 3.3). CGRP wird somit in neuronalen Zellen des Ganglion trigeminale exprimiert.

#### 4.1.4 IL-1 $\beta$ führt nicht zu einer Induktion der CGRP-mRNA

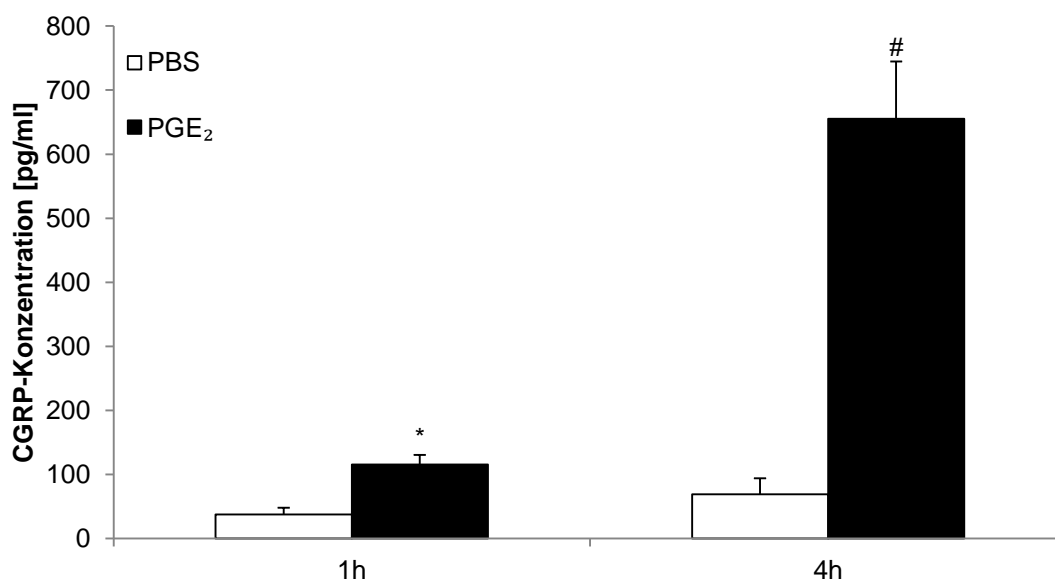
Zur Überprüfung, ob der verzögerten IL-1 $\beta$ -abhängigen CGRP-Sekretion eventuell eine vermehrte Transkription der CGRP-mRNA voraus geht, führte ich eine *real-time* PCR 4 h, 10 h und 24 h nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  durch. Hierbei wurde die relative Expressionsrate der CGRP-mRNA mit der konstitutiven Expression der mRNA des *housekeeping*-Gens GAPDH verglichen. Zu den gemessenen Zeitpunkten konnte keine signifikante (jeweils  $n = 4$ ) Erhöhung der CGRP-mRNA-Expression zwischen der Stimulation mit IL-1 $\beta$  (relative Expression für 4 h: 0,19; für 10 h: 0,27; für 24 h: 0,29) und PBS (relative Expression für 4 h: 0,23; für 10 h: 0,23; für 24 h: 0,24) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.2 PGE<sub>2</sub> induziert die CGRP-Sekretion in der trigeminalen Zellkultur

Wie oben gezeigt, können COX-2-Hemmer die IL1- $\beta$ -induzierte CGRP-Sekretion inhibieren. Hieraus ergibt sich die Frage, ob eines der wichtigsten Syntheseprodukte der Cyclooxygenase, nämlich PGE<sub>2</sub>, ebenfalls eine CGRP-Sekretion in der trigeminalen Zellkultur auslösen kann.

### 4.2.1 PGE<sub>2</sub> führt zu einer frühen Sekretion von CGRP

Hierzu inkubierte ich die trigeminale Zellkultur für 1 h und 4 h mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M). Die Konzentration von CGRP wurde anschließend im Überstand der Zellkultur mittels EIA gemessen. Die Stimulation mit PGE<sub>2</sub> führte sowohl nach einer als auch nach 4 h zu einer signifikanten Erhöhung der CGRP-Sekretion (Abb. 4). Bereits eine einstündige Inkubation mit 10  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> löste einen signifikanten CGRP-Anstieg aus (10  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> mit 116 pg/ml  $\pm$  25 pg/ml SEM zu PBS mit 37 pg/ml  $\pm$  11 pg/ml SEM pg/ml;  $p < 0,05$ ; je  $n = 7$ ). Die CGRP-Ausschüttung konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 4 h weiter gesteigert werden (10  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>: 655 pg/ml  $\pm$  90 pg/ml SEM mit  $n = 8$  vs. PBS: 69 pg/ml  $\pm$  15 pg/ml SEM je  $n = 8$ ;  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4 veranschaulicht die zeitabhängige CGRP-Sekretion nach PGE<sub>2</sub>-Applikation.** Die Stimulation einer trigeminalen Zellkultur mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) über verschiedene Zeiträume (1 h, 4 h) führte zu einer signifikanten Konzentrationssteigerung von CGRP im Überstand der Zellkultur. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM der CGRP-Konzentration im Überstand, gemessen in pg/ml. (nach 1 h:  $n = 7$ , \* $p < 0,05$  für PGE<sub>2</sub> vs. PBS; und nach 4 h:  $n = 8$ , # $p < 0,05$  für PGE<sub>2</sub> vs. PBS)



#### 4.2.2 Die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion ist weder COX-2-abhängig

In Analogie zu den Experimenten mit IL-1 $\beta$  prüfte ich den Einfluss eines COX-2-Inhibitors auf die PGE<sub>2</sub>-abhängige CGRP-Sekretion. Hierzu fügte ich der trigeminalen Zellkultur Parecoxib (10  $\mu$ M) 45 min vor Stimulationsbeginn mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) zu. Die Behandlung mit Parecoxib (10  $\mu$ M) führte zu keiner signifikanten Reduktion der CGRP-Ausschüttung (Parecoxib: 436 pg/ml  $\pm$  21 pg/ml SEM vs. PGE<sub>2</sub>: 373 pg/ml  $\pm$  62 pg/ml, n = 3, p > 0,05) nach 4-stündiger Stimulation mit PGE<sub>2</sub> (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.3 Eine Expression der CGRP-mRNA durch PGE<sub>2</sub> ist nicht nachweisbar

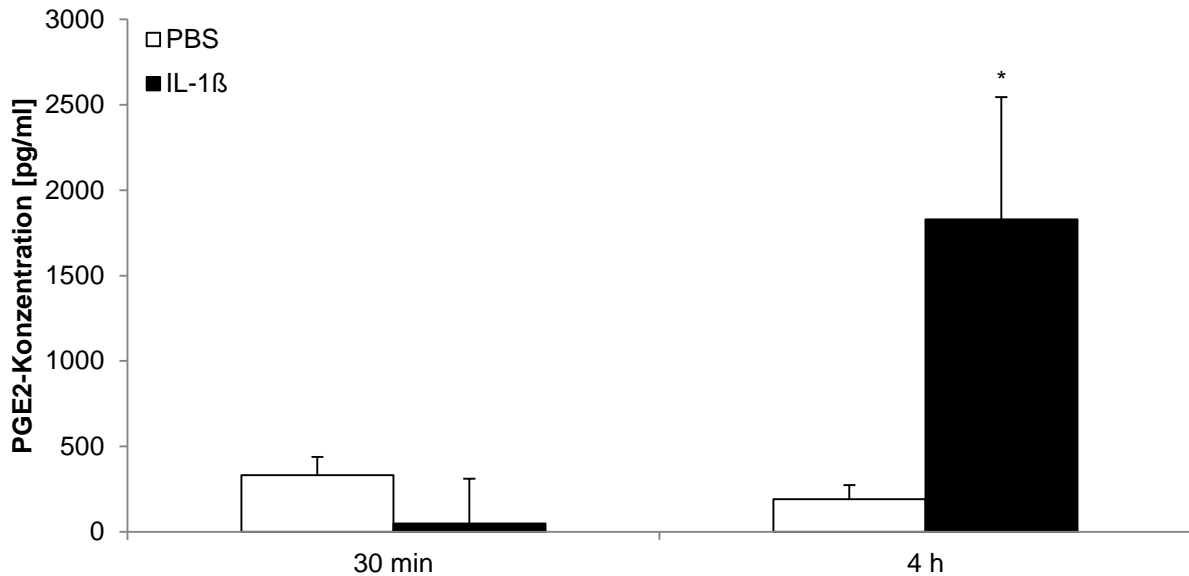
Da eine vermehrte Induktion der CGRP-mRNA durch PGE<sub>2</sub> denkbar ist, wurde abermals eine *real-time* PCR zur Bestimmung der relativen Expressionsrate der CGRP-mRNA nach 1-, 2- und 4-stündiger Inkubation mit PGE<sub>2</sub> durchgeführt. Es konnte allerdings zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante (jeweils n = 4, p > 0,05) Expression der CGRP-mRNA bei den PGE<sub>2</sub>-stimulierten Zellen (1 h: 0,19; 2 h: 0,16; 4 h: 0,25) im Vergleich zu einer PBS-Kontrolle (1 h: 0,18; 2 h: 0,17; 4 h: 0,2) gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 IL-1 $\beta$ -induziert die PGE<sub>2</sub>-Synthese

IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> können, wie in den bisherigen Versuchen gezeigt wurde, eine CGRP-Sekretion in einer trigeminalen Zellkultur auslösen - interessanterweise mit deutlich unterschiedlicher Kinetik. IL-1 $\beta$  erreicht das Maximum seiner CGRP-Sekretion nach 24 h, PGE<sub>2</sub> schon nach 4 h. Hinsichtlich dieser zeitlichen Diskrepanz und vor dem Hintergrund der COX-2-Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -induzierten CGRP-Sekretion stellt sich die Frage, ob IL-1 $\beta$  möglicherweise direkt eine PGE<sub>2</sub>-Synthese auslösen kann.

#### 4.3.1 Die IL-1 $\beta$ -induzierte Synthese von PGE<sub>2</sub> ist zeitabhängig

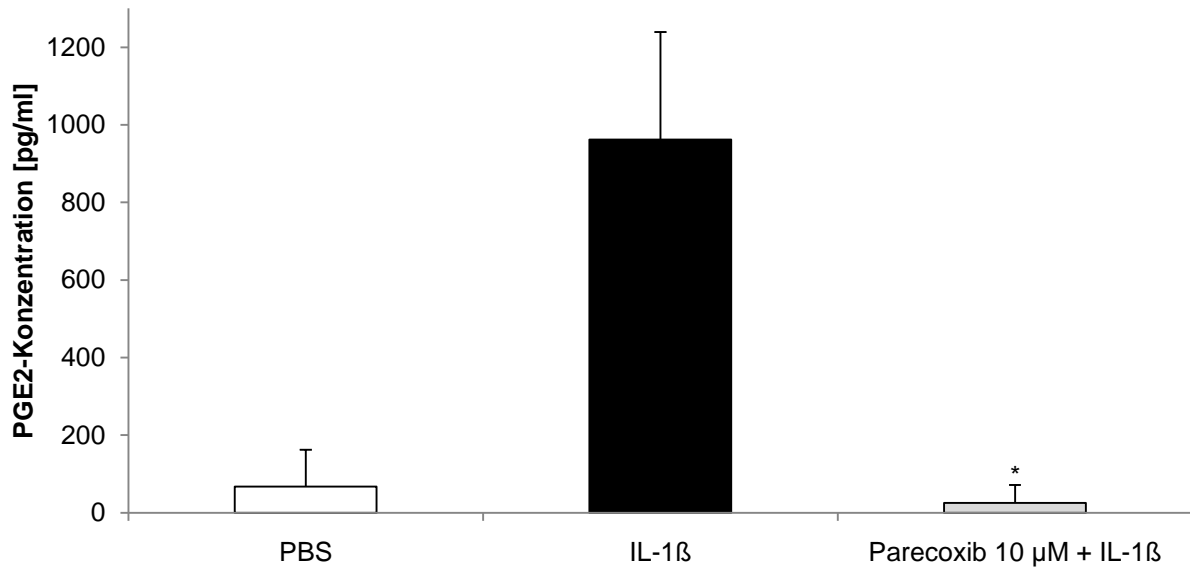
Hierzu stimulierte ich die trigeminale Zellkultur erneut mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und bestimmte die Konzentration von PGE<sub>2</sub> nach 30 min und nach 4 h im Überstand mittels EIA (Abb. 5). 30 min nach IL-1 $\beta$ -Gabe (10 ng/ml) war keine Änderung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration (48 pg/ml  $\pm$  105 pg/ml SEM, n = 3, p > 0,05) im Vergleich zur PBS-Gabe (332 pg/ml  $\pm$  106 SEM, n = 3) feststellbar. Nach 4 h konnte allerdings ein signifikanter (n = 4, p < 0,05) Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentration (1829 pg/ml  $\pm$  717 pg/ml SEM) im Vergleich zur PBS-Kontrolle (191 pg/ml  $\pm$  82 pg/ml SEM) verzeichnet werden.



**Abbildung 5 zeigt die zeitabhängige PGE<sub>2</sub>-Sekretion nach IL-1β-Applikation.** Nach 4-stündiger Inkubation der trigeminalen Zellkultur mit IL-1β (10 ng/ml) ist ein signifikanter Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand der Kultur erkennbar (n = 4, \*p < 0,05 für IL-1β vs. PBS). Nach 30-minütiger Stimulation ließ sich kein Unterschied zwischen der PBS- und der IL-1β-Probe feststellen (n = 3). Aufgetragen sind die Mittelwerte der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand in pg/ml mit SEM.

#### 4.3.2 Die IL-1β-induzierte PGE<sub>2</sub>-Synthese ist abhängig von COX-2

Um zu zeigen, welches Isoenzym der Cyclooxygenase für die IL-1β-induzierte PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung verantwortlich ist, wurde die trigeminale Zellkultur 15 min vor einer 4-stündigen IL-1β-Stimulation mit einem Cyclooxygenase-2-Hemmer präinkubiert (siehe Abb. 6). Die Präinkubation mit dem selektiven COX-2-Hemmer, Parecoxib (10 μM), blockierte die PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung in den Überstand vollständig (IL1β: 962 pg/ml ± 277 pg/ml SEM, Parecoxib + IL-1β: 26 pg/ml ± 47 pg/ml SEM, je n = 3, p < 0,05).



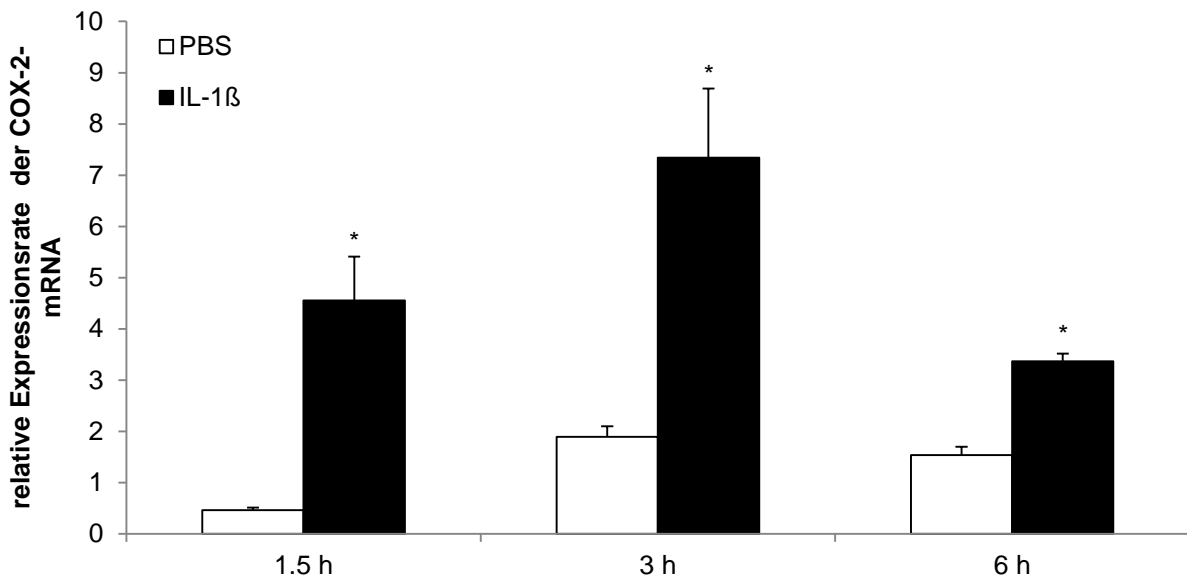
**Abbildung 6 illustriert die COX-2-spezifische Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung.** Eine 15-minütige Inkubation mit dem spezifischen COX-2-Hemmer Parecoxib inhibiert die PGE<sub>2</sub>-Sekretion nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Angegeben sind die Mittelwerte der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand in pg/ml mit zugehörigem SEM (n = 3; \*p < 0,05 für IL-1 $\beta$  vs. Parecoxib + IL-1 $\beta$ ).

#### 4.4 IL-1 $\beta$ induziert die COX-2-Expression in trigeminalen Zellen

Die oben dargestellten Versuche haben gezeigt, dass IL-1 $\beta$  seine Wirkung auf die CGRP- und PGE<sub>2</sub>-Sekretion über das Enzym COX-2 vermittelt.

##### 4.4.1 Die Induktion der COX-2-mRNA durch IL-1 $\beta$ ist zeitabhängig

Um zu zeigen, dass IL-1 $\beta$  zu einer vermehrten COX-2-Expression führt, wurde die trigeminale Zellkultur mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 1,5 h, 3 h und 6 h stimuliert und die COX-2-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt (Abb. 7). Nach 1,5 h zeigte sich eine ca. 4,5-fache Erhöhung der COX-2-mRNA-Expressionsrate nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle (relative Expressionsrate von IL-1 $\beta$  nach 1,5 h:  $4,55 \pm 0,86$  SEM vs. PBS:  $0,46 \pm 0,05$  SEM; n = 4, p < 0,05). Nach 3 h wurde ein Induktionsmaximum mit einer ca. 7-fach erhöhten mRNA-Expressionsrate erreicht (IL-1 $\beta$  nach 3 h:  $7,34 \pm 1,34$  SEM vs PBS:  $1,89 \pm 0,2$  SEM; n = 5; p < 0,05). Die Expressionsrate nahm im weiteren Verlauf ab, blieb jedoch nach 6 h Inkubationszeit weiterhin signifikant erhöht (IL-1 $\beta$  nach 6 h:  $3,37 \pm 0,15$  SEM vs. PBS:  $1,53 \pm 0,17$ ; n = 4; p < 0,05).



**Abbildung 7 zeigt die zeitabhängige Induktion von COX-2-mRNA.** Nach Stimulation einer trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) konnte eine vermehrte Induktion von COX-2-mRNA nachgewiesen werden. Die COX-2-Expressionstrategie erreichte ihr Maximum nach 3 h. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM aus den Quotienten der Expression von COX-2 zu GAPDH. Die Expressionssteigerung der COX-2-mRNA ist zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant gegenüber der PBS-Kontrolle erhöht (1,5 h mit  $n = 4$ ; 3 h mit  $n = 5$ ; 6 h mit  $n = 4$ ; \* $p < 0,05$  für Stimulation mit IL-1 $\beta$  vs. PBS).

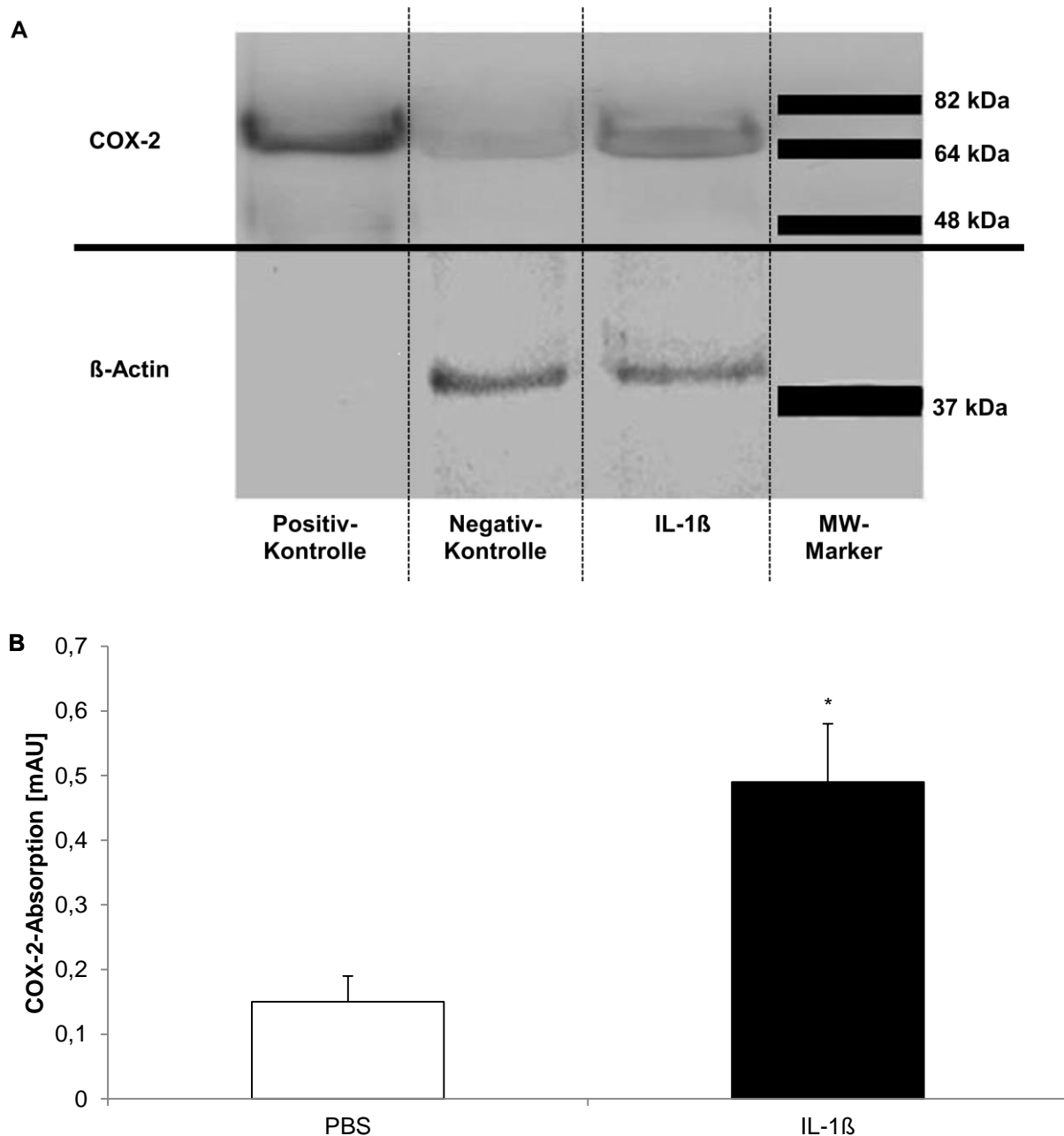
#### 4.4.2 IL- $\beta$ induziert COX-2, nicht aber COX-1

Die Cyclooxygenase besteht aus den zwei Isoenzymen COX-1 und COX-2. Es stellt sich daher die Frage, ob IL-1 $\beta$  zu einer spezifischen COX-2-Induktion führt. Hierfür stimulierte ich die trigeminale Zellkultur erneut mit IL-1 $\beta$  und bestimmte die relative Expressionsrate der COX-1-mRNA. Nach 3-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) konnte keine signifikante Induktion der COX-1-mRNA im Vergleich zur Kontrolle nach PBS-Stimulation festgestellt werden (IL-1 $\beta$  nach 3 h:  $0,49 \pm 0,02$  SEM vs. PBS:  $0,34 \pm 0,01$ ;  $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ).

#### 4.4.3 IL-1 $\beta$ induziert die COX-2-Protein-Synthese

Um nachzuweisen, dass der vermehrten Expression der COX-2-mRNA auch eine gesteigerte Proteinsynthese von COX-2 zugrunde liegt, untersuchte ich die trigeminale Zellkultur mittels Westernblot. Als Negativ-Kontrolle diente eine mit PBS stimulierte Zellkultur. Für die Positiv-Kontrolle fand ein kommerziell hergestelltes Zelllysate aus aktivierten COX-2 exprimierenden Makrophagen Verwendung. Nach elektrophoretischer Auftrennung der einzelnen Proben wurde die optische Dichte der Banden nach Visualisierung durch spezifische Antikörper gemessen (Abb. 8). Im

Niveau der 70-kDa-Bande konnte in der Positiv-Kontrolle (aktivierte Makrophagen) und in der mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellkultur eine COX-2 korrespondierende Bande (Molekulargewicht COX-2: 72 kDa) festgestellt werden. In der Negativ-Kontrolle zeigte sich eine sehr schwache COX-2-Bande. Die optische Analyse der Banden zeigte signifikant ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) höhere Dichtewerte für die IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellkultur (optische Dichte  $0,49 \text{ mAU} \pm 0,09 \text{ mAU SEM}$ ) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (optische Dichte  $0,15 \text{ mAU} \pm 0,04 \text{ mAU SEM}$ ).

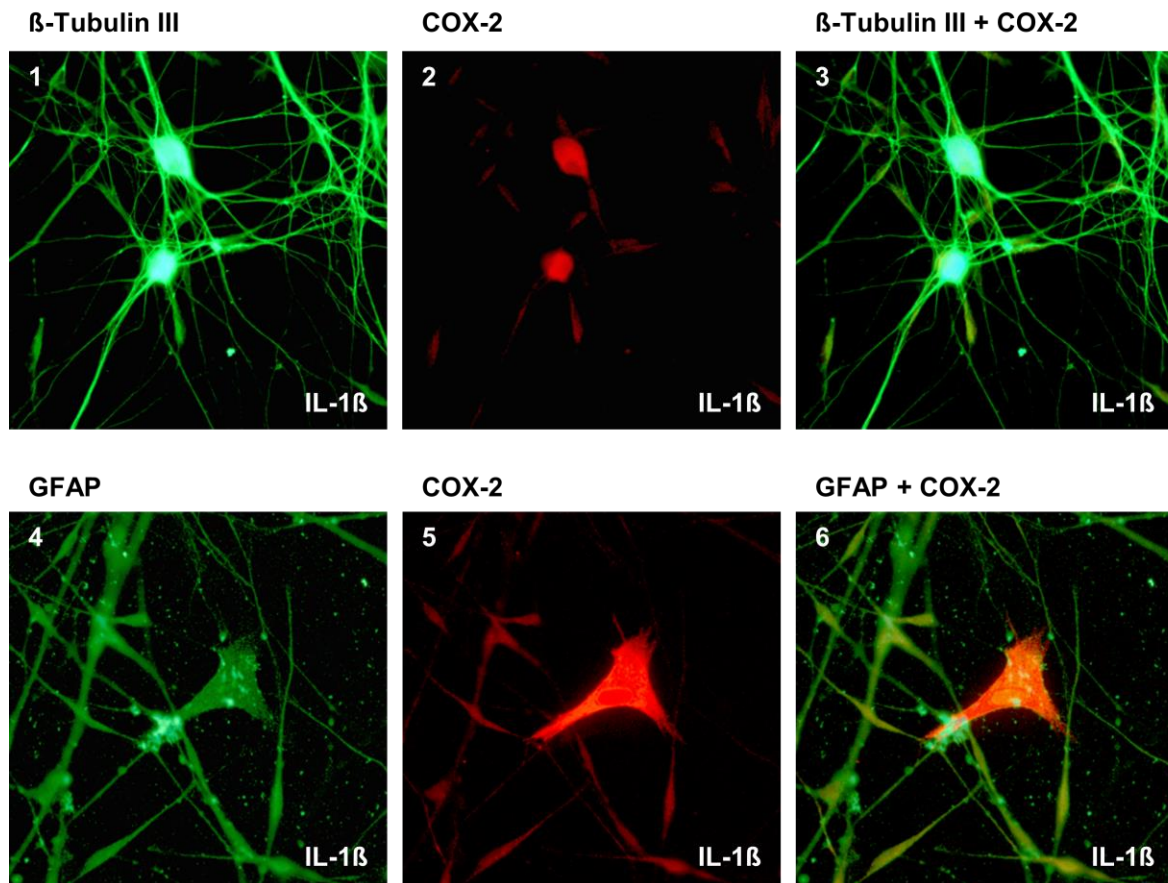


**Abbildung 8: IL-1 $\beta$ -abhängige COX-2-Proteinexpression.** (A) Exemplarische Abbildung eines Westernblotts nach 6-stündiger Inkubation einer trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Knapp oberhalb der 64-kDa-Bande zeigte sich eine kräftige Anfärbung nach IL-1 $\beta$ -Stimulation. Das Zellysate aus

den trigeminalen Zellen und die Positiv-Kontrolle (aktivierte Makrophagen) zeigte eine deutliche Bande bei ca. 70 kDA, korrespondierend zum COX-2-Protein. (B) Nach Analyse der optischen Dichte zeigte sich ein signifikant höherer Wert nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  im Vergleich zur Stimulation mit PBS. Angegeben ist der Mittelwert des Quotienten der optischen Dichte der COX-2-Bande zur  $\beta$ -Aktin-Bande nach Applikation von PBS und IL-1 $\beta$ . Als Positiv-Kontrolle diente ein aktiviertes Makrophagen-Zellysat. Die Fehlerindikatoren sind als SEM dargestellt (je n = 3; \*p < 0,05 für IL-1 $\beta$  vs. PBS).

#### **4.4.4 IL-1 $\beta$ induziert COX-2-Proteinsynthese in neuronalen und glialen Zellen**

Um zu bestimmen, welche Zellen innerhalb der trigeminalen Zellkultur verantwortlich sind für die vermehrte COX-2-Proteinexpression, habe ich nach 6-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt (n = 3). Zunächst ließ sich mit Hilfe von  $\beta$ -Tubulin-III-Antikörpern ein Netzwerk aus spindelförmigen Zellkörpern und deren Fortsätzen nachweisen (grün dargestellt in Abb 9.1). Hierbei handelte es sich um neuronale Zellen. Eine COX-2-spezifische Färbung zeigte lediglich eine flauere Anfärbung innerhalb einzelner Zellkörper (rot dargestellt in Abb. 9.2). Eine Kombination aus beiden Antikörpern konnte nachweisen, dass sich COX-2 überwiegend in neuronalen Zellkörpern und weniger in deren Dendriten befindet (orange dargestellt in Abb. 9.3). In Ergänzung führte ich eine weitere immunhistochemische Untersuchung mit einem spezifischen Antikörper gegen GFAP durch. Hierbei wurden gliale Zellen grün gefärbt (Abb. 9.4). In einer Doppelfärbung von GFAP und COX-2 konnte COX-2 ebenfalls in glialen Zellen nachgewiesen werden (orange dargestellt in Abb. 9.3.).

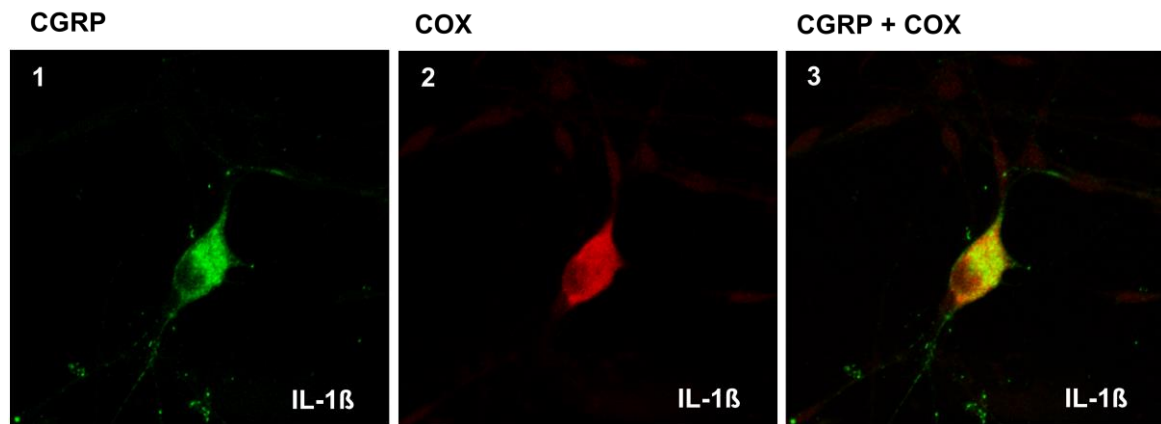


**Abbildung 9 zeigt eine IL-1 $\beta$ -abhängige COX-2-Proteinexpression in neuronalen und glialen Zellen.** Nach 6-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) wurde die Zellkultur mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin-III zur Detektion neuronaler Zellen (grün abgebildet in Abb. 9.1) und mit Antikörpern gegen GFAP zur Detektion glialer Zellen (ebenfalls grün abgebildet in Abb. 9.4) behandelt. Nach Kombination mit Antikörpern gegen das COX-2-Protein (rot abgebildet in Abb. 9.2 und Abb. 9.5) ließ sich das COX-2-Protein sowohl in neuronalen Zellen (orange in Abb. 9.3) als auch in glialen Zellen (orange in Abb. 9.6) nachweisen.

#### 4.4.5 Koexpression von CGRP und COX-2 in trigeminalen Zellen

Interessanterweise lässt sich COX-2 sowohl in neuronalen als auch in glialen Zellen nachweisen. Zuvor habe ich gezeigt, dass CGRP hauptsächlich in neuronalen Zellen der trigeminalen Zellkultur exprimiert wurde. Hieraus ergibt sich nun die Frage, ob COX-2 und CGRP simultan in der gleichen Zellpopulation nachweisbar sind. Hierzu führte ich erneut eine immunhistochemische Untersuchung nach 6-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) durch ( $n = 3$ ). Im Unterschied zu der vorangegangenen Untersuchung fluoreszierten CGRP-positive Zellen unter Verwendung eines anderen sekundären Antikörpers grün (Abb. 10.1). COX-2 positive Zellen sind erneut rot dargestellt (Abb. 10.2). In der Doppelfärbung waren orange gefärbte Zellen nachweisbar (Abb. 10.3). Also konnten CGRP-positive Zellen innerhalb der trigeminalen Zellkultur ebenfalls COX-

2 exprimieren. COX-2 ließ sich darüber hinaus noch in anderen Zellen, die nicht CGRP-positiv waren, feststellen.



**Abbildung 10: Koexpression von CGRP und COX-2 in Neuronen der trigeminalen Zellkultur.** Nach Inkubation der trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 6 h erfolgte die Anfärbung mit Primärantikörpern gegen COX-2 und CGRP. Als fluorisierende Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor 488 gegen CGRP (grün in Abb. 10.1) und Alexa Fluor 594 gegen COX-2 (rot in Abb. 10.2) verwendet. Nach Kombination der beiden Antikörper ließ sich COX-2 vor allem in CGRP-exprimierenden Zellen nachweisen (orange in Abb. 10.3). Allerdings konnte COX-2 auch in nicht CGRP-positiven Zellen gefunden werden.

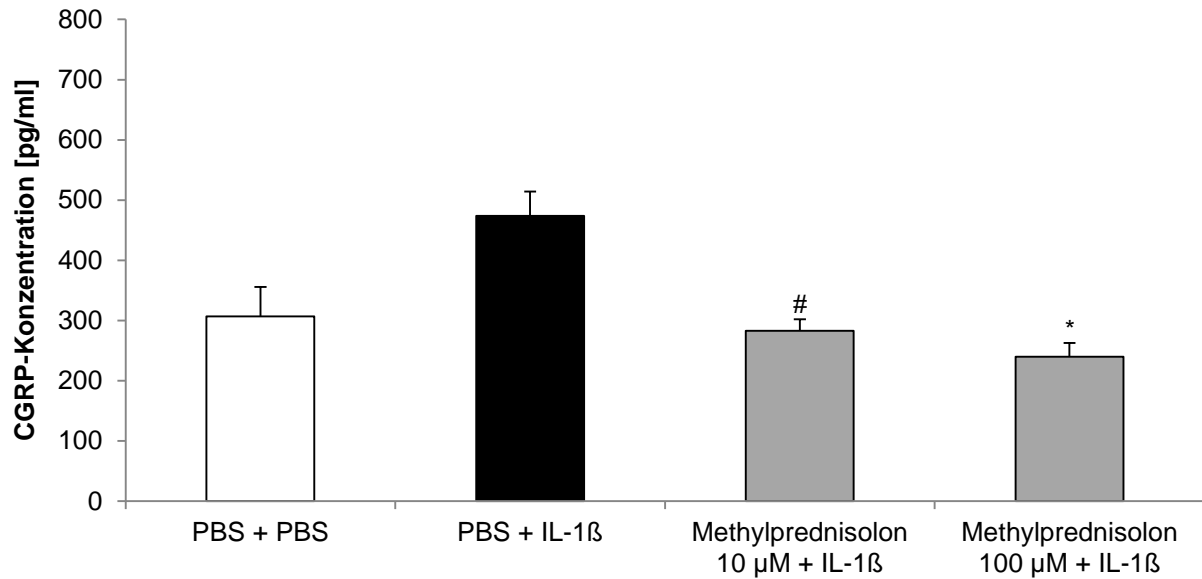
#### 4.5 Die Wirkung von Methylprednisolon, Sumatriptan, Metoprolol und Topiramaten

In den vorangegangenen Experimenten konnte ich eine inhibierende Wirkung von COX-2-Hemmern auf die CGRP-Sekretion in der trigeminalen Zellkultur nachweisen. Eine ähnliche Wirkung durch andere Medikamente, die in der Therapie der Migräne zum Einsatz kommen, auf dieses System ist denkbar.

##### 4.5.1 Methylprednisolon blockiert die IL-1 $\beta$ -, nicht aber die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion

Um die Wirkung anti-inflammatorischer Medikamente auf die IL-1 $\beta$ -induzierte CGRP-Sekretion zu testen, wurde die trigeminale Zellkultur mit Methylprednisolon (10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) für 45 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) über 24 h. Die CGRP-Konzentration wurde im Überstand mittels EIA gemessen. Methylprednisolon konnte die IL-1 $\beta$ -induzierte CGRP-Ausschüttung deutlich reduzieren (Abb. 11). Methylprednisolon senkte die CGRP-Konzentration (10  $\mu$ M: 283 pg/ml  $\pm$  19 pg/ml SEM; n = 5; p < 0,05 und 100  $\mu$ M: 240 pg/ml  $\pm$  23 pg/ml SEM; n = 5; p < 0,05) signifikant im Vergleich zur alleinigen IL-1 $\beta$ -Stimulation (474 pg/ml  $\pm$  40 pg/ml SEM, n = 5).





**Abbildung 11: Inhibition der IL-1 $\beta$ -abhängigen CGRP-Sekretion durch Methylprednisolon.** Eine 45-minütige Inkubation der trigeminalen Zellkultur mit Methylprednisolon in den Konzentrationen 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M vor einer 24-stündigen Exposition mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) blockierte die CGRP-Induktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der CGRP-Konzentration im Überstand, gemessen in pg/ml (jeweils n = 5 mit #p < 0,05 für Methylprednisolon 10  $\mu$ M und \*p < 0,05 für Methylprednisolon 100  $\mu$ M + IL-1 $\beta$  gegenüber PBS + IL-1 $\beta$ ).

Als Nächstes untersuchte ich den Einfluss von Methylprednisolon auf die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion. Hierzu wurde die trigeminale Zellkultur vorab nicht nur für 45 min sondern auch für 24 h mit Methylprednisolon in unterschiedlichen Konzentrationen (10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) inkubiert. Die CGRP-Konzentration wurde jeweils 4 h nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) im Überstand der trigeminalen Zellkultur gemessen. Hierbei zeigte sich, dass Methylprednisolon keinen Einfluss auf die CGRP-Sekretion hatte. Zwischen der Inkubation mit 100  $\mu$ M Methylprednisolon (über 45 min: 295 pg/ml  $\pm$  104 pg/ml SEM und über 24 h: 780 pg/ml  $\pm$  218 pg/ml SEM) und der Inkubation mit PBS (über 45 min: 418 pg/ml  $\pm$  115 pg/ml SEM und über 24 h: 770 pg/ml  $\pm$  282 pg/ml SEM) konnte kein signifikanter (45 min: n = 6 und p > 0,05 bzw. 24 h: n = 5 und p > 0,05; Daten nicht gezeigt) Unterschied festgestellt werden.

#### 4.5.2 Sumatriptan hat keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - und PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion

Nach der erfolgreichen Reduktion der IL-1 $\beta$ -abhängigen CGRP-Sekretion durch Methylprednisolon stellte sich nun die Frage, ob andere in der Migränetherapie eingesetzten Medikamente ebenfalls Einfluss nehmen können auf die IL-1 $\beta$ -induzierte

CGRP-Sekretion. Hierzu wurde die trigeminale Zellkultur für 45 min mit Sumatriptan inkubiert. Die CGRP-Konzentration wurde im Überstand mittels EIA 24 h nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und 4 h nach Inkubation mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) gemessen. Sumatriptan (10  $\mu$ M), hatte ebenso wenig Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -abhängige CGRP-Sekretion (Sumatriptan + IL-1 $\beta$ : 405 pg/ml  $\pm$  122 pg/ml SEM gegenüber PBS + IL-1 $\beta$  482 pg/ml  $\pm$  70 pg/ml SEM, je mit n = 5 und p > 0,05; Daten nicht gezeigt) wie auf die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion (PGE<sub>2</sub>: 373 pg/ml  $\pm$  51 pg/ml SEM vs. Sumatriptan: 433 pg/ml  $\pm$  26 pg/ml SEM mit n = 3; p > 0,05; Daten nicht gezeigt).

#### **4.5.3 Metoprolol und Topiramate zeigen ebenfalls keine Wirkung auf CGRP-Sekretion**

Zum Überprüfen, der in der präventiven Migränetherapie gebräuchlichen Medikamente Metoprolol und Topiramate wurden die oben beschriebenen Versuche wiederholt. Hierzu unterzog ich die trigeminale Zellkultur erneut einer Vorbehandlung mit Metoprolol und Topiramate für 45 min, um anschließend die CGRP-Konzentration im Überstand mittels EIA nach 24-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und nach 4-stündiger Inkubation mit PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) zu messen.

Weder Metoprolol (10  $\mu$ M: 349 pg/ml  $\pm$  49 pg/ml; n = 4) noch Topiramate (100  $\mu$ M: 382 pg/ml  $\pm$  99 pg/ml; n = 3) führten zu einer signifikanten Änderung der CGRP-Konzentration nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  im Überstand der trigeminalen Zellen im Vergleich zur Inkubation mit PBS (Metoprolol: 396 pg/ml  $\pm$  36 pg/ml; n = 4; p > 0,05 und Topiramate: 473 pg/ml  $\pm$  72 pg/ml; n = 3; p > 0,05; Daten nicht gezeigt).

Auch die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion konnte in den von mir gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten nicht durch Metoprolol oder Topiramate reduziert werden. Weder unter Topiramate (100  $\mu$ M) noch unter Metoprolol (10  $\mu$ M) konnte ein signifikanter Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion nachgewiesen werden. Allein bei kurzfristiger Inkubation über 45 min mit Metoprolol (10  $\mu$ M) konnte ein Trend hin zur Reduktion der CGRP-Sekretion festgestellt werden. Dieser erwies sich allerdings nach statistischer Auswertung als nicht signifikant (Metoprolol/PGE<sub>2</sub>: 268 pg/ml  $\pm$  156 pg/ml SEM versus PBS/PGE<sub>2</sub>: 608 pg/ml  $\pm$  170 pg/ml SEM, n = 4, p > 0,05; Daten nicht gezeigt). Bei längerer Inkubationszeit (24 h) blieb Metoprolol ohne Wirkung (Metoprolol: 872 pg/ml  $\pm$  266 pg/ml versus PGE<sub>2</sub> 799 pg/ml  $\pm$  316 pg/ml; n = 6; p > 0,05; Daten nicht gezeigt). Topiramate erzielte unter den von mir gemessenen

Zeitpunkten und Konzentration ebenfalls keine Reduktion der CGRP-Sekretion (Topiramat 45 min: 527 pg/ml  $\pm$  103 pg/ml zu PGE<sub>2</sub>: 542 pg/ml  $\pm$  146 pg/ml; n = 4; p > 0,05 bzw. Topiramat 24 h: 436 pg/ml  $\pm$  101 pg/ml SEM gegenüber 423 pg/ml  $\pm$  112 pg/ml SEM; n = 8; p > 0,05; Daten nicht gezeigt).

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Neurone und Gliazellen von kultivierten primären trigeminalen Ganglionzellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  das Enzym COX-2 dosis- und zeitabhängig synthetisieren. Hieraus resultiert eine zeitnahe PGE<sub>2</sub>-Synthese und eine verzögerte CGRP-Sekretion. Die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE<sub>2</sub>- und CGRP-Freisetzung kann durch selektive und unselektive COX-2-Inhibitoren, Indometacin und Parecoxib, unterbunden werden. Das Glucocorticoid Methylprednisolon führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 $\beta$ -abhängigen, nicht jedoch der PGE<sub>2</sub>-induzierten CGRP-Sekretion. Eine Aktivierung von Serotonin-Rezeptoren beeinflusst die PGE<sub>2</sub>- und CGRP-Freisetzung nicht. Andere in der Migräneprophylaxe eingesetzte Medikamente, Metoprolol und Topiramat, haben keinen Effekt auf die IL-1 $\beta$ -abhängige CGRP-Sekretion.

### 5.2 Experimentelle Methoden

#### 5.2.1 Die Ratte als Migränemodell

Grundsätzlich ist eine Übertragung tierexperimentell gewonnener Erkenntnisse auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich. Nichtsdestoweniger eignet sich die Ratte als Modell für die Migräne im besonderen Maße. Es liegen ähnliche anatomischen Grundlagen vor. Die vaskuläre und nervale Versorgung der Dura mater entspricht der des Menschen [77]. Die peripheren und basalen zentralen Strukturen zur Verarbeitung nozizeptiver Signale sind äquivalent angelegt [78]. Experimentelle Erkenntnisse in der Ratte über Mechanismen, die in der Pathophysiologie der Migräne von Bedeutung sind (z. B. Änderungen in der Vasomotorik, in der cerebralen Perfusion oder in der Aktivität corticaler und subcorticaler Strukturen), können mit Hilfe moderner bildgebender Verfahren auch im Menschen reproduziert werden [79].

Das trigeminale nozizeptive System weist in anatomischer und physiologischer Hinsicht also eine große Ähnlichkeit zwischen den Spezies Mensch und Ratte auf. Dennoch dürfen die Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies nicht vernachlässigt werden. So lassen sich beispielsweise geringgradige Differenzen in der Neuropeptidverteilung im Ganglion trigeminale ausmachen. In Post-mortem-Studien am humanen Ganglion trigeminale in vitro waren 49% der trigeminalen Neurone positiv für CGRP [59],

wohingegen In-vitro-Studien der Ratte einen Anteil von 44% aufzeigten [80]. Auch lassen sich Unterschiede in der Verarbeitung nozizeptiver Informationen in den höheren neuroanatomischen Strukturen feststellen. Für die bewusste Wahrnehmung von Schmerzen im Menschen sind thalamo-insuläre Bahnsysteme von Bedeutung, welche weder in Nagetieren noch in Primaten nachweisbar sind [81]. Ob diese neuroanatomischen Unterschiede letztlich für das pathophysiologische Verständnis der Migräne von Relevanz sind, hängt somit stark von den zu untersuchenden Strukturen und dem Versuchsaufbau ab.

### **5.2.2 Die trigeminale Zellkultur als Modell der Migräne**

Ein Tiermodell kann nicht alle Aspekte der Migräne in toto abbilden. Allerdings konnten in den letzten Jahren durch die Konzentration auf verschiedene pathophysiologisch relevante Komponenten große Fortschritte im Verständnis der Migräne gemacht werden. In der Entstehung der Migräne spielt das Ganglion trigeminale eine entscheidende Rolle [1]. Durham et al. erzielten unter Verwendung einer primären trigeminalen Ganglionzellkultur der Ratte weitreichende Erkenntnisse hinsichtlich der Pathophysiologie und Therapie der Migräne [60, 61, 82]. Im Zentrum dieser Arbeiten standen vor allem die Regulation des CGRP-Haushalts in trigeminalen Zellen und die Wirksamkeit verschiedener antimigränöser Medikamente, wie Sumatriptan und Topiramate. Allerdings müssen hinsichtlich der trigeminale Ganglionzellkultur auch bedeutenden Limitierungen Beachtung finden.

### **5.2.3 Bedingungen in einer trigeminalen Zellkultur**

Das Überführen des Ganglion trigeminale in eine Zellkultur ist ein traumatischer Vorgang. Das Ganglion wird aus dem Cavum Meckeli reseziert, und seine Zellen werden anschließend dissoziiert. Dieses Prozedere führt initial bereits zum Verlust trigeminaler Zellen [64].

Die Axotomie führt zu erheblichen intrazellulären Veränderungen. Verschiedene für die Nozizeption nötigen Proteine und Gene werden aktiviert und können so Einfluss auf die Sensitivität der Neurone nehmen [83]. Der gerichtete axonale Transport ist gestört. Nichtsdestoweniger zeigten CGRP-positive Neurone in trigeminalen Zellkulturen ein rasches axonales Wachstum und wiesen bereits nach 48 h ein dichtes Netz an neuronalen Fortsätzen auf [84].

Das Ganglion trigeminale in vivo erhält Afferenzen aus verschiedenen Geweben, die durchaus unterschiedliche nozizeptive Eigenschaften besitzen können. So konnten bei In-vitro-Versuchen der Ratte elektrophysiologische Unterschiede in der Innervation des Musculus temporalis gegenüber der Innervation der Dura mater nachgewiesen werden [85]. In einer trigeminalen Zellkultur ist eine Differenzierung hinsichtlich verschiedener Innervationsgebiete nicht möglich.

Das Alter der Ratten zum Zeitpunkt der Resektion ist von Bedeutung. So zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Erregbarkeit des trigeminalen Systems in vivo bei adoleszenten gegenüber adulten Ratten [86]. Eine intracisternale Applikation des Reizstoffes Capsaicin führte bei älteren Ratten zu einer geringeren CGRP-Expression im Ganglion trigeminale und einer verminderten CGRP-Sekretion an den peripheren trigeminalen Endigungen innerhalb der Dura mater [87]. In meinen Experimenten wurden ausschließlich neonatale Ratten im Alter zwischen drei und vier Tagen verwendet.

Im Zuge der Inkubation ändert sich die zelluläre Zusammensetzung der trigeminalen Zellkultur teilweise erheblich. Der Anteil an CGRP-positiven Zellen nimmt stetig zu. Nach 48-stündiger Inkubationszeit einer trigeminalen Zellkultur der Ratte konnte eine Zunahme von 7 % nachgewiesen werden [84]. Ursache für diesen Anstieg ist zum einen ein selektiver Überlebensvorteil von CGRP-positiven Neuronen durch die Bedingungen der Zellkultur und zum anderen eine vermehrte Synthese sowie Expression von CGRP innerhalb der Neurone. So konnte in einer trigeminalen Zellkultur der Ratte, ein gesteigerte Induktion der CGRP-mRNA auch ohne die Zugabe von Stimulanzien, wie IL-1 $\beta$ , gezeigt werden [88]. 12 h nach Einbringen des Ganglion trigeminale in eine Zellkultur wurde eine signifikante Erhöhung der CGRP-mRNA festgestellt - ein Effekt, der nach 24 h und 48 h nicht mehr nachweisbar war. Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden nach sechs Tagen durchgeführt, zu einem Zeitpunkt also an dem dieser frühe Effekt auf die CGRP-Synthese keine Rolle mehr spielen sollte.

Allerdings lässt sich bei längeren Inkubationszeiten ein allmähliches Abwandern der Satellitenzellen weg von ihren Ursprungsneuronen feststellen. Eine hieraus resultierende Störung der neuro-glialen Interaktion ist anzunehmen [89]. Die Lokalisation der Satellitenzellen wurde in meiner Arbeit nicht untersucht. In der von mir

verwendeten Zellkultur exprimierten nach sieben Tagen über 90% der trigeminalen Neurone CGRP. Der Gesamtanteil an Neuronen lag in meiner Zellkultur bei ca. 10%, der Rest der Zellpopulation bestand hauptsächlich aus GFAP-positiven Astrozyten (Daten nicht gezeigt).

Bei langer Dauer der Experimente, wie bei der 24-stündigen Inkubation mit IL-1 $\beta$ , fiel eine erhebliche Streuung der CGRP-Konzentrationen auf. Ein protrahierter Versuchsablauf könnte die Anfälligkeit für Apoptosevorgänge in der trigeminalen Zellkultur verstärken - ein Problem, das generell in Versuchen mit Zellkulturen auftritt und auch in den Experimenten von Durham et al. beschrieben wurde. Zur Reduktion der interexperimentellen Schwankungen führte ich bei jedem Experiment eine Positivkontrolle mittels KCl-Stimulation durch. Die Behandlung mit KCl führt zu einer Depolarisation mit unspezifischer Exocytose der intrazellulären Vesikel [60]. Nur Experimente mit einer mindestens 2-fach erhöhten CGRP-Ausschüttung nach 4-stündiger KCl-Stimulation gegenüber der Negativkontrolle (PBS) wurden für die statistische Auswertung berücksichtigt.

#### 5.2.4 Additive in der trigeminalen Zellkultur

Einige Substanzen, die für die Entwicklung und das Überleben der Zellkultur notwendig sind, wirken sich auf den PGE<sub>2</sub>- und CGRP-Haushalt der trigeminalen Zellen selbst aus.

**Nervenwachstumsfaktor:** Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) hat keinen direkten Einfluss auf die CGRP-Sekretion trigeminaler Neurone. Dennoch lässt sich nach mehrtägiger Präinkubation mit NGF eine erhöhte Sensibilisierung von nozizeptiven Neuronen [90] und eine damit einhergehende Steigerung der CGRP-Sekretion aus trigeminalen Zellen nach Stimulation [91] feststellen. Hinweise für einen Einfluss von NGF auf die Prostaglandinsynthese finden sich ebenfalls. So konnte in vitro eine deutliche Induktion der COX-2 in Mastzellen der Dura mater der Ratte durch NGF-Gabe nachgewiesen werden [92]. In meiner Arbeit kommen keine Mastzellen in der trigeminalen Zellkultur vor. In Spinalganglien der Ratte konnte außerdem gezeigt werden, dass NGF weder Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -abhängige Induktion von COX-2 [93] noch auf die EP<sub>2</sub>-vermittelte Wirkung von PGE<sub>2</sub> [94] hatte. Die von mir verwendeten Zellkulturen zeigten keinen Unterschied bezüglich der CGRP-Sekretion im Überstand zwischen Zellkulturen, die mit oder ohne NGF-haltiges Medium gezüchtet worden sind (Daten nicht gezeigt). Da NGF aber entscheidend zum Überleben und zur

Differenzierung CGRP-positiver Neurone beiträgt [95], habe ich mich in meinen Experimenten für ein NGF-haltiges Serum entschieden. Dieses Vorgehen steht in Einklang mit den Protokollen anderer Zellkulturstudien, auch bei den Versuchen von Durham et al. kamen NGF-haltige Medien zum Einsatz [60].

**Cytosin-Arabinosid:** Um das Wachstum nicht neuronaler Zellen in der trigeminalen Zellkultur einzudämmen, wurde das Chemotherapeutikum Cytosin-Arabinosid verwendet. Allerdings kann dieses sich negativ auf das Überleben der trigeminalen Neurone auswirken und möglicherweise die Funktionsweise der neuro-glialen Einheit stören. Dieser Effekt kann auch durch die Zufuhr trophischer Faktoren, wie NGF, nur unvollständig ausgeglichen werden [91]. Aufgrund der langen Inkubationszeiten in den Experimenten, konnte allerdings nicht auf dieses Additiv verzichtet werden.

### **5.2.5 Vergleichbarkeit mit anderen Zellkulturmodellen des Ganglion trigeminale**

Durham et al. verwendeten in ihren wegweisenden Studien zum CGRP-Haushalt im Ganglion trigeminale ebenfalls neonatale (drei bis vier Tage alte) Ratten [60, 61, 82]. Die Überführung des Ganglions in eine trigeminale Zellkultur erfolgte in vergleichbarer Weise. Die Inkubation fand unter ähnlichen Bedingungen statt. Die Dichte der Zellaussaat war allerdings mit einem Ganglion pro *well* geringer als in meinen Versuchen mit ca. zwei Ganglion pro *well*. Die Messungen der CGRP-Sekretion erfolgte im Gegensatz zu meinem Vorgehen bereits nach eintägiger Inkubation mit einem Radioimmunoassay. In der vorliegenden Arbeit wurde einer initialen Konsolidierung der Zellkultur den Vorzug gegeben und die Stimulationsversuche erst am sechsten Tag in Zellkultur durchgeführt. Die Messung der CGRP-Konzentration erfolgte mit einem Enzymimmunoassay. Diese Unterschiede belegen, dass die beiden Versuchsmodelle nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar sind.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 IL1 $\beta$ führt zu einer verzögerten CGRP-Ausschüttung**

#### **5.3.1.1 Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne**

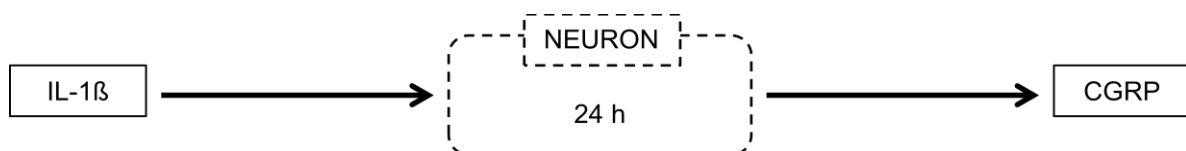
Das Neuropeptid CGRP nimmt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Migräne ein. CGRP beeinflusst die gesamte nozizeptive Signalverarbeitung des trigeminalen Systems und ist entscheidend beteiligt an der peripheren und zentralen Sensibilisierung



[57]. Eine Vielzahl klinischer Beobachtungen in Migränepatienten unterstützt die Bedeutung von CGRP in der Migräneentstehung. Eine Erhöhung der CGRP-Konzentration im venösen Blut der V. jugularis externa - nicht aber in Proben der cubitalen Venen - konnte während der Kopfschmerzphase einer spontanen Migräne nachgewiesen werden [96]. Auch finden sich bei der durch Stickstoffmonoxid ausgelösten Migräne [97] erhöhte CGRP-Werte im Blutplasma. Sumatriptan führt parallel zur Reduktion der Kopfschmerzen und zum Rückgang der erhöhten Plasma-CGRP-Konzentration im Rahmen einer Migräneattacke. Die Plasmakonzentration von CGRP fällt dabei proportional zur Schmerzintensität ab [98]. Eine intravenöse Infusion von CGRP kann Migräne-typische Kopfschmerzen bei Migränepatienten auslösen [58]. Den endgültigen Beweis für eine zentrale Rolle von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne liefern erste klinische Studien. So konnten spezifische CGRP-Rezeptor-Antagonisten [99] effektiv in der Behandlung einer akuten Migräneattacke und spezielle CGRP-Antikörper [100] in der Migräneprävention eingesetzt werden.

### 5.3.1.2 IL-1 $\beta$ -abhängige CGRP-Ausschüttung aus neuronalen Zellen

IL-1 $\beta$  führt in meiner Arbeit zu einer späten Ausschüttung von CGRP nach 24 h in den Überstand der trigeminalen Zellkultur (siehe Abb. 12). In einer Studie mit Zellkulturen des Spinalganglions der Ratte löste bereits 1 ng/ml IL-1 $\beta$  eine späte CGRP-Ausschüttung mit einem Maximum nach 48 h aus [70]. Die CGRP-Konzentrationen im Überstand stehen dabei im Einklang mit meinen Ergebnissen. Allerdings ist die lange Verzögerung in der CGRP-Sekretion unerwartet. Hier scheinen Transkriptions- und Translationsvorgänge vorangestellt zu sein. Als Hauptquelle des CGRP konnten in meiner Arbeit neuronale Zellen ausgemacht werden. Dieses Ergebnis wird durch In-vitro-Studien in menschlichen Ganglien bestätigt [59]. Hier ließ sich CGRP in 49 % der menschlichen Neurone, nicht jedoch in glialen Zellen nachweisen.



**Abbildung 12:** IL-1 $\beta$  führt zu einer verzögerten CGRP-Ausschüttung aus neuronalen Zellen einer trigeminalen Zellkultur.

### 5.3.1.3 COX-2-Abhängigkeit der CGRP-Sekretion

Die IL-1 $\beta$ -abhängige CGRP-Sekretion kann in meinen Experimenten vollständig durch spezifische COX-2-Hemmer inhibiert werden. Eine COX-2-Abhängigkeit in der CGRP-Sekretion findet in ähnlich aufgebauten Studien ihre Bestätigung. So inhibierten spezifische und unspezifische COX-Hemmer eine IL-1 $\beta$ -induzierte Neuropeptid-Sekretion aus Zellen des Ganglion spinale [101]. Die CGRP-Sekretion aus trigeminalen Endigungen der Dura mater der Ratte, zeigte ebenfalls eine COX-2-Abhängigkeit [102]. COX-2-Hemmer können die neurogene Inflammation innerhalb der Dura mater sowie die neuronale Aktivierung im Nucleus spinalis n. trigemini (Pars caudalis) unterbinden [31]. Die zeitliche Latenz und COX-2-Abhängigkeit spricht gegen eine unmittelbare Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die trigeminale Neurone. Möglicherweise müssen zunächst COX-2-abhängige Induktions- und Syntheseschritte zwischen geschaltet sein, die eine sekundäre protrahierte CGRP-Sekretion vermitteln.

### 5.3.1.4 Induktion der CGRP-mRNA durch IL-1 $\beta$

Eine Induktion der CGRP-mRNA durch IL-1 $\beta$  konnte in meiner Arbeit jedenfalls nicht gezeigt werden. Verschiedene Studien mit anderen Schmerzmodellen bestätigen dieses Ergebnis. Untersuchungen an einem intakten Ganglion trigeminale stellten nach Auslösung einer CGRP-Sekretion durch proinflammatorische Substanzen keine Expressionssteigerung der CGRP-mRNA fest [103]. Ein anderes Modell mit Zellkulturen aus Spinalganglien der Ratte zeigten ebenfalls keine Induktion der CGRP-mRNA nach IL-1 $\beta$ -Stimulation [101].

Die Regulierung der CGRP-mRNA in der trigeminalen Zellkultur ist allerdings komplex. Denn im Gegensatz zu meinen Resultaten gelang es Hou et al. in einer Zellkultur aus Spinalganglienzellen zu zeigen, dass eine Inkubation mit IL-1 $\beta$  neben einer gesteigerten CGRP-Sekretion nach 24 h auch einen signifikanten Anstieg der CGRP-mRNA bereits nach 6 h auslösen konnte [70]. In meiner Arbeit habe ich keine Messungen nach 6 h durchgeführt (sondern nach 4 h, 10 h und 24 h). Interessanterweise wurde in der oben genannten Studie zu den übrigen Zeitpunkten (3 h und 12 h) ebenfalls keine signifikante Induktion gemessen. Eine weitere Studie von Lei et al. untersuchte eine trigeminale Zellkultur 24 h nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  (25 ng/ml) und wies eine signifikante Erhöhung der CGRP-mRNA nach [88]. Allerdings hatten andere Konzentrationen von IL-1 $\beta$  (5 ng/ml und 50 ng/ml) keine Wirkung auf die

CGRP-mRNA-Konzentration. Die fehlende Induktion der CGRP-mRNA in meinen Versuchen könnte somit in der Wahl der Konzentration und der Dauer der Inkubation von IL-1 $\beta$  begründet sein. Das Fehlen einer mRNA-Induktion würde aber auch für eine direkte Sekretion von CGRP aus den trigeminalen Neuronen ohne das Vorhandensein einer vorangestellten De-novo-Synthese sprechen.

### **5.3.2 PGE<sub>2</sub> führt zu einer frühen CGRP-Ausschüttung**

#### **5.3.2.1 Bedeutung von PGE<sub>2</sub> in der Pathophysiologie der Migräne**

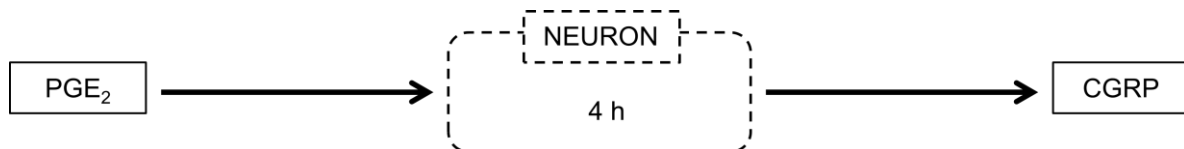
An der Initiierung und Aufrechterhaltung der neuronalen Sensibilisierung im nozizeptiven System und innerhalb des Ganglion trigeminale ist PGE<sub>2</sub> beteiligt [62]. Für die Bedeutung von PGE<sub>2</sub> in der Entstehung der Migräne gibt es klinische Hinweise. So konnte eine erhöhte Konzentration von PGE<sub>2</sub> im Blut der Vena jugularis [104] bei Menschen während einer Migräneattacke nachgewiesen werden. Die Inhibition der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenasehemmer wird schon seit Langem erfolgreich in der Behandlung der Migräne eingesetzt [7]. Eine direkte intravenöse Infusion von PGE<sub>2</sub> kann unspezifische Kopfschmerzen bei gesunden Probanden [63] und migräneartige Kopfschmerzen bei Migränepatienten [105] auslösen.

#### **5.3.2.2 PGE<sub>2</sub>-abhängige CGRP-Sekretion**

In meiner Arbeit führte PGE<sub>2</sub> zeit- und konzentrationsabhängig zu einer CGRP-Ausschüttung in den Überstand der trigeminalen Zellkultur. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M und einer 4-stündigen Inkubation erzielte PGE<sub>2</sub> seine maximale Wirkung (siehe Abb. 13). Eine PGE<sub>2</sub>-Abhängigkeit in der Ausschüttung von CGRP ließ sich in einer vergleichbaren Studie in einer trigeminalen Zellkultur der Ratte bestätigen [66]. Die Zellkultur wurde mit PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) stimuliert und eine signifikante CGRP-Sekretion nach 1 h gemessen. Eine weitere Studie mit Zellkulturen aus dem Spinalganglion der Ratte zeigte eine signifikante Konzentrationssteigerung von CGRP im Überstand 6 h nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) [106]. In meiner Arbeit wurde eine signifikante CGRP-Sekretion bereits nach 1 h mit einer niedrigeren Konzentration von PGE<sub>2</sub> (100 nM) gemessen.

Eine PGE<sub>2</sub>-vermittelte CGRP-Sekretion kann im Ganglion trigeminale selbst, aber auch an den peripheren und zentralen Endigungen des Ganglions stattfinden. In einem In-vitro-Modell an einem nicht dissoziierten Ganglion trigeminale löste 30 min nach

Resektion ein inflammatorischer Cocktail, der unter anderem auch PGE<sub>2</sub> (10 µM) enthielt, eine signifikante CGRP-Sekretion in den Überstand aus [64]. An trigeminalen Endigungen der Haut in einem Modell für inflammatorische Schmerzen bei Ratten führte PGE<sub>2</sub> (100 µM) zu einer Zunahme der neuronalen Aktivität und zu einer gesteigerten CGRP-Sekretion [107]. In einem anderen Versuchsaufbau ließ sich in histologischen Schnitten des Nucleus spinalis n. trigemini von Ratten eine vermehrte Expression von CGRP nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub> nachweisen [108].



**Abbildung 13:** PGE<sub>2</sub> führt zu einer frühen CGRP-Ausschüttung aus neuronalen Zellen einer trigeminalen Zellkultur.

### 5.3.2.3 Die CGRP-mRNA lässt sich nicht durch PGE<sub>2</sub> induzieren

In meiner Arbeit konnte eine Induktion der CGRP-mRNA durch PGE<sub>2</sub> nicht festgestellt werden. In Versuchen mit Zellkulturen aus Spinalganglien der Ratte gelang es ebenso wenig eine Induktion der CGRP-mRNA nach 24-stündiger Inkubation mit PGE<sub>2</sub> (1 µM) auszulösen [109]. Bradykinin dagegen führte in der selben Studie zu einer deutlichen Induktion der CGRP-mRNA. Die unterschiedliche Wirkung verschiedener proinflammatorischer Substanzen lässt auf das Vorhandensein einer Reihe alternativer Signalwege schließen. Daher sind die Versuche, bei denen unspezifische inflammatorische Cocktails zur Anwendung kommen, nicht uneingeschränkt vergleichbar mit den Ergebnissen meiner Arbeit.

Allerdings konnte in einer anderen Studie mit Spinalganglionzellen sehr wohl eine signifikante Induktion der CGRP-mRNA durch PGE<sub>2</sub> nach 6 h ausgelöst werden [106]. Der späteste Zeitpunkt, an dem in meiner Arbeit die CGRP-mRNA gemessen wurde, war nach 4 h. Da die Halbwertszeit von PGE<sub>2</sub> nur wenige Minuten beträgt [110], habe ich auf spätere Messungen verzichtet. In der oben genannten Studie hingegen wurde ein modifiziertes PGE<sub>2</sub>-Molekül mit einer weitaus längeren Halbwertszeit eingesetzt [106].

Zusammenfassend spricht die fehlende Induktion der CGRP-mRNA sowohl durch PGE<sub>2</sub> als auch durch IL-1β in meiner Arbeit für eine direkte Rezeptor-vermittelte Sekretion von

CGRP durch Exocytose und gegen eine De-novo-Synthese in den beobachteten Zeiträumen.

#### **5.3.2.4 CGRP-Sekretion im Ganglion trigeminale**

Die Ausschüttung von CGRP innerhalb der trigeminalen Zellkultur erfolgt über einen Exocytosemechanismus. Dafür sprechen die insgesamt moderate CGRP-Sekretion durch PGE<sub>2</sub> bzw. IL-1 $\beta$  im Vergleich zur Positivkontrolle KCL und die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit in meiner Arbeit (Daten nicht gezeigt). KCL führt zu einer vollständigen Depolarisation der Zelle mit konsekutivem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und unspezifischer Exocytose [60]. Dabei wird lediglich ein Bruchteil des insgesamt im Ganglion trigeminale vorhandenen CGRP ausgeschüttet [64]. Botulinumtoxin A verhindert die Exocytose in neuronalen Zellen und kann in einer Zellkultur des Ganglion trigeminale die CGRP-Sekretion signifikant senken [82]. Die Exocytose findet nicht nur an den peripheren und zentralen Endigungen der trigeminalen Neuronen statt, CGRP-Vesikel lassen sich zusätzlich innerhalb der Somata nozizeptiver Neurone des Ganglion trigeminale nachweisen [59]. Mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik ließ sich eine Sekretion von Neuropeptiden aus trigeminalen Perikarya in vivo nach Stimulation mit KCL, Capsaicin und elektrischen Reizen nachweisen [111].

#### **5.3.3 IL-1 $\beta$ induziert eine COX-2-Expression mit konsekutiver PGE<sub>2</sub>-Synthese**

##### **5.3.3.1 Bedeutung von IL-1 $\beta$ in der Pathophysiologie der Migräne**

Zur Stimulation der trigeminalen Zellkultur wurde das proinflammatorische Cytokin IL-1 $\beta$  verwendet. IL-1 $\beta$  spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung inflammatorischer Schmerzen und in der Aufrechterhaltung der neuronalen Sensibilisierung [67]. In klinischen Studien konnte während einer Migräneattacke im Menschen ein erhöhter IL-1 $\beta$ -Spiegel im venösen Blutplasma nachgewiesen werden [112]. Eine intravenöse Applikation von IL-1 $\beta$ , eingesetzt als myeloprotektive Substanz im Rahmen von Chemotherapien, führt häufig zu Kopfschmerzen [113]. Nach erfolgreicher Therapie mit präventiven Migränemedikamenten, unter anderem mit Betablockern und Calciumantagonisten, konnte neben einer Reduktion von Schwere und Häufigkeit der Migräneattacken auch eine signifikante Reduktion des Plasmaspiegels von IL-1 $\beta$  erreicht werden [114]. Ein Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ -abhängigen

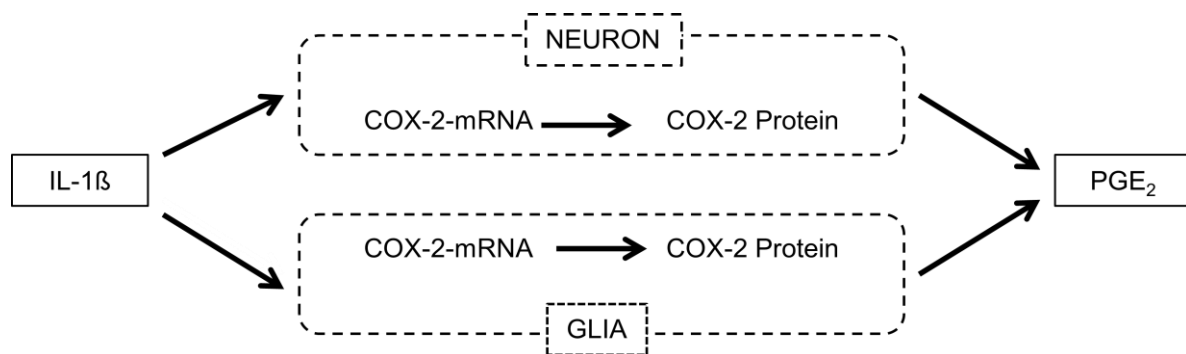
Schmerzprozessen und Migräne-assoziierten Kopfschmerzen liegt also nahe und unterstützt somit den Einsatz von IL-1 $\beta$  in diesem Modell.

### 5.3.3.2 IL-1 $\beta$ -abhängige Expression des COX-2-Proteins

In meiner Arbeit führte die Stimulation einer trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  zu einer zeitabhängigen Expression von COX-2-mRNA (siehe Abb. 14). Eine IL-1 $\beta$ -induzierte COX-2-Expression konnte in experimentellen Studien mit anderen Tiermodellen bestätigt werden. So führte die Stimulierung einer Kultur trigeminaler Satellitenzellen der Ratte mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) zu einer maximalen COX-2-mRNA-Expression nach 4 h [115]. Ebenso ließ sich in einer gemischten Zellkultur des Spinalganglions der Ratte eine IL-1 $\beta$ -abhängige COX-2-mRNA-Induktion mit einem Maximum nach 3 h feststellen [101]. Kinetik und Ausprägung der COX-2-mRNA-Induktion stehen dabei in Einklang mit meinen Ergebnissen.

Eine vermehrte Expression von COX-2 konnte in meiner Arbeit sowohl in neuronalen als auch in glialen Zellen der trigeminalen Zellkultur nachgewiesen werden (siehe Abb. 14). Bestätigung findet dieses Ergebnis in Studien an Spinalganglienzellen der Ratte [93]. Dort wies die COX-2-Expression nach Applikation von IL-1 $\beta$  eine Zeit- und Dosisabhängigkeit auf. Ein Maximum wurde nach 24-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  sowohl in glialen als auch in neuronalen Zellen erreicht. In meiner Arbeit erreichte eine 6-stündige Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  eine robuste Expression des COX-2-Proteins. Längere Inkubationszeiten hätten keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn versprochen. Auf eine Bestimmung der COX-2-Expression zu späteren Zeitpunkten habe ich daher verzichtet.

Im Ganglion trigeminale existieren neben den Neuronen zwei verschiedene Arten von Gliazellen, Satelliten- und Schwannzellen [54]. In meiner Arbeit wurde keine Differenzierung zwischen den beiden Zelltypen vorgenommen. Andere Studien allerdings, die speziell die Funktion von Satellitenzellen im Ganglion trigeminale untersuchten, konnten insbesondere in den Satellitenzellen eine spezifische Induktion des COX-2-Proteins beschreiben [115].



**Abbildung 14:** IL-1 $\beta$  induziert eine COX-2-Expression mit PGE<sub>2</sub>-Sekretion sowohl in glialen als auch in neuronalen Zellen in einer trigeminalen Zellkultur.

### 5.3.3.3 IL-1 $\beta$ -abhängige PGE<sub>2</sub>-Synthese

Die IL-1 $\beta$ -abhängige PGE<sub>2</sub>-Synthese in meiner Arbeit (siehe Abb. 14) steht in Einklang mit anderen Studien. So konnte in einer Zellkultur des Spinalganglions der Ratte eine 24-stündige Inkubation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) eine deutliche PGE<sub>2</sub>-Synthese auslösen [93]. Die Konzentration von PGE<sub>2</sub> im Überstand war dabei vergleichbar mit meinen Ergebnissen. Lediglich die Stimulationsdauer durch IL-1 $\beta$  (4 h in meiner Arbeit gegenüber 24 h in der oben genannten Publikation) divergierte. Neben IL-1 $\beta$  lösen auch andere Cytokine eine PGE<sub>2</sub>-Synthese aus. In einer In-vitro-Studie bewirkte beispielsweise die proinflammatorische Substanz Bradykinin eine PGE<sub>2</sub>-Sekretion aus den Zellen des Ganglion trigeminale [116]. Hier kam es nach 1 h zu einer signifikanten Synthese von PGE<sub>2</sub>, welche in Konzentration und Zeitkinetik in Einklang steht mit meinen Ergebnissen. Eine weitere Studie, die selektiv die Funktion der Satellitenzellen in einer trigeminalen Zellkultur untersuchte, zeigte nach 8-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ebenfalls eine signifikante Synthese von PGE<sub>2</sub> [115]. Die PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung ließ sich in allen drei Studien, wie auch in meiner Arbeit, durch spezifische Cyclooxygenase-2-Hemmer inhibieren [93, 115, 116]. Die IL-1 $\beta$ -abhängige PGE<sub>2</sub>-Synthese im Ganglion trigeminale ist somit abhängig von einer spezifischen Induktion der COX-2, welche in glialen und neuronalen Zellen stattfindet.

### 5.3.3.4 Spezifische Induktion der COX-2

Die Regulierung der COX-2 ist eingebunden in ein komplexes Netzwerk. Die Expression der COX-2-mRNA wird durch eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert, unter anderem vom *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) [117]. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B kann durch IL-1 $\beta$  aktiviert werden und so eine COX-2-Induktion auslösen [118]. Die Synthese von PGE<sub>2</sub> findet im gesamten

trigeminalen System statt: im Ganglion trigeminale selbst [64] und sowohl in den peripheren [119] als auch in den zentralen trigeminalen Endigungen [120].

In der Dura mater der Ratte konnte nach elektrischer Stimulation und Applikation eines inflammatorischen Cocktails (ohne IL-1 $\beta$ ) eine akute Ausschüttung von PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden [119]. Eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Synthese wurde bereits 15 min nach Stimulationsende gemessen. Ein ähnlich promptes Ansprechen der PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung auf IL-1 $\beta$  ist in dieser Arbeit nicht nachweisbar. Nach 30 min kann noch kein signifikanter Unterschied in der PGE<sub>2</sub>-Synthese gezeigt werden, und das Maximum der PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung ist erst nach 4 h erreicht worden. Eine De-novo-Synthese ist somit anzunehmen. Diese These wird durch andere Studien an trigeminalen Zellkulturen, die ebenfalls eine verzögerte PGE<sub>2</sub>-Synthese aufwiesen, gestützt [93, 115, 116].

Die Diskrepanz zwischen unmittelbarer und verzögerter PGE<sub>2</sub>-Sekretion könnte durch die unterschiedlichen Isoformen der Cyclooxygenase erklärt werden. Die konstitutiv exprimierte COX-1 kommt vor allem in Mast- und Endothelzellen vor, wohingegen die induzierbare COX-2 überwiegend in Makrophagen und in geringerem Maße in trigeminalen Afferenzen der Dura mater nachgewiesen werden [121]. Möglicherweise wird bei einer elektrischen und chemischen Stimulation der Meningen eine COX-1-abhängige akute PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung ausgelöst.

In-vivo-Versuche bei Ratten zeigten nach direkter intrathekaler IL-1 $\beta$ -Gabe eine rasche Sekretion von PGE<sub>2</sub> in den Liquor (zwischen 30 min und 3 h, mit einem Maximum nach 1 h) [120]. Nach Etablierung einer peripheren Inflammation erbrachte eine Wiederholung des gleichen Versuchs allerdings eine deutliche Prolongation und Augmentation der PGE<sub>2</sub>-Synthese über 5 h hinaus. Die gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Synthese unter den Bedingungen einer peripherer Inflammation konnte durch selektive COX-1-Hemmer kaum unterbunden werden, wohl aber durch spezifische COX-2-Hemmer. Auch in meiner Arbeit ließ sich die PGE<sub>2</sub>-Synthese durch spezifische COX-2-Hemmer vollständig inhibieren. Für die Prolongation der PGE<sub>2</sub>-Sekretion scheint somit die zusätzliche Induktion der COX-2 verantwortlich sein.



### 5.3.4 Wirkung antimigränöser Medikamente auf die CGRP-Sekretion

#### 5.3.4.1 Methylprednisolon blockiert die IL-1 $\beta$ -induzierte CGRP-Sekretion

In meiner Arbeit inhibiert das Glucocorticoid Methylprednisolon die IL-1 $\beta$ -, nicht aber die PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion. Eine Wirkung, die in erster Linie auf eine Inhibition der COX-2 zurückzuführen ist. Inoue et al. wiesen in einer Zellkultur des Spinalganglions der Ratte nach, dass das Glucocorticoide eine IL-1 $\beta$ -induzierte und COX-2-vermittelte Neuropeptid-Sekretion hemmen können [101]. In einer ähnlichen Studie wurde eine CGRP-mRNA-Induktion mit anschließender CGRP-Sekretion durch Glucocorticoide inhibiert [122]. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf In-vivo-Studien übertragen. So zeigten behaviorale Experimente an Ratten eine signifikante Reduktion der mechanischen Hyperalgesie-Reaktion unter Glucocorticoiden [123]. Hierbei spielt der Transskriptionsfaktor NF $\kappa$ B eine besondere Rolle. Glucocorticoide supprimieren die Induktion von COX-2 unter anderem durch eine Inhibition des Transskriptionsfaktors NF $\kappa$ B [13]. Demgegenüber kann IL-1 $\beta$  NF $\kappa$ B aktivieren und so eine Synthese der COX-2 auslösen [118]. In einem Migränemodell der Ratte ließ sich eine vermehrte Expression von NF $\kappa$ B in Makrophagen der Dura mater nachweisen [124]. Spezifische NF $\kappa$ B-Hemmer reduzierten die IL-1 $\beta$ -induzierte Sekretion von CGRP in einer Zellkultur des Spinalganglions der Ratte [70].

Die Wirksamkeit von Glucocorticoiden unterstreicht also die Bedeutung der COX-2 in der Migräneentstehung. Ferner spielt die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, sei es durch Glucocorticoide oder andere antimigränöse Medikamente, eine Rolle in der Migränetherapie [124].

#### 5.3.4.2 Sumatriptan hat keinen Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung

Sumatriptan, ein Serotoninrezeptoragonist, entfaltet seine antimigränöse Wirkung hauptsächlich durch die Aktivierung von 5-HT<sub>1B</sub>-, 5-HT<sub>1D</sub>- und 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptoren [8]. 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren lassen sich vornehmlich auf den glatten Muskelzellen intrakranielle Arterien nachweisen [125]. Sie bewirken hier eine Vasokonstriktion und inhibieren die neurogenen Inflammation [32]. 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren befinden sich auf trigeminalen Neuronen peripher an den perivaskulären Endigungen, ganglionär an den neuronalen Zellkörpern und schließlich zentral an den Endigungen im Nucleus spinalis n. trigemini Pars caudalis des Hirnstamms. Hier führt eine Aktivierung der 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren zur Reduktion der trigeminale CGRP-Sekretion [126]. Allerdings konnten erste klinische

Studien mit selektiven 5-HT<sub>1D</sub>-Blockern keine Wirksamkeit in Migränepatienten nachweisen [127]. Die 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptoren sind im gesamten trigeminalen System [126] und auch im Gehirn selbst [128], vor allem im Kortex von Groß- und Kleinhirn, nachweisbar. Die Aktivierung von 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptoren führt zwar nicht zur Vasokonstriktion. Allerdings verhindern 5-HT<sub>1F</sub>-Agonisten die Ausbildung einer neurogenen Inflammation [129] und reduzieren die CGRP-Sekretion im trigeminalen System [126]. Insgesamt scheinen 5-HT<sub>1F</sub>-agonistische Effekte aber vor allem auf die zentrale nozizeptive Verarbeitung Einfluss zu nehmen [8]. In neueren Studien konnten selektive 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptor-Agonisten erfolgreich bei der Behandlung der akuten Migräne eingesetzt werden [130].

Sumatriptan hatte in meiner Arbeit keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - und PGE<sub>2</sub>-induzierte CGRP-Sekretion innerhalb der trigeminalen Zellkultur. Durham et al. zeigten aber, dass eine einstündige Präinkubation mit 10  $\mu$ M Sumatriptan eine CGRP-Sekretion nach Stimulation mit einem inflammatorischen Cocktail (bestehend aus Histamin, Bradykinin, Serotonin und PGE<sub>2</sub>) sowie mit KCL signifikant inhibieren kann [60]. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen meiner Arbeit lässt sich möglicherweise durch die unspezifische Stimulierung der Zellkultur mit unterschiedlichen inflammatorischen Substanzen, die eine Aktivierung verschiedener Signalwege nach sich zieht, erklären. Zudem bestehen teils signifikante Unterschiede zwischen dem von mir verwendeten Modell aus trigeminalen Ganglienzellen und dem Modell von Durham et al (siehe 5.2.5). Andere Studien konnten nämlich eine alternative, von 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptor-unabhängige CGRP-Sekretion nachweisen. So führte Sumatriptan nicht zur Hemmung einer CGRP-Sekretion nach Stimulation eines Dura-mater-Explantats der Ratte mit einem inflammatorischen Cocktail (bestehend aus Bradykinin, Serotonin und Histamin) [102]. Allerdings zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass der Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration nach Applikation eines inflammatorischen Cocktails (bestehend aus PGE<sub>2</sub>, Bradykinin, Histamin und Serotonin) in die Cisterna magna in vivo durch Sumatriptan signifikant gesenkt wurde [131]. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Reihe weiterer Studien. So konnte Sumatriptan die CGRP-Sekretion nach elektrischer Stimulierung des Ganglion trigeminale in vivo signifikant reduzierte [132].

#### **5.3.4.3 Topiramat ist ohne Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung**

Das Antikonvulsivum Topiramat beeinflusst unter anderem die Wirkung der Neurotransmitter Glutamat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), die Aktivität von Natrium-

und Calciumkanälen sowie der Carboanhydrase [16]. Die genaue Wirkweise von Topiramamat in der Migräneprophylaxe ist allerdings nicht bekannt.

Überwiegend scheint Topiramamat seine antimigränöse Wirkung allerdings über zentrale Mechanismen zu entfalten. Topiramamat wirkt inhibierend auf spannungsabhängige Natriumkanäle. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Migräne mit Aura und in der familiären hemiplegischen Migräne (FHM). Die Wirksamkeit von Topiramamat in der Therapie der FHM konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden [133]. In der Pathophysiologie der Migräne mit Aura spielt die cortical spreading depression (CSD) eine entscheidende Rolle. Die CSD wurde in einem Rattenmodell *in vivo* durch eine Hemmung von Natriumkanälen inhibiert [134]. Es ist also denkbar, dass Topiramamat seine antimigränöse Wirkung über die Hemmung der CSD entfaltet. Passend hierzu existiert eine Vielzahl von klinischen Studien, die die präventive Wirksamkeit von Topiramamat in der Migräne mit Aura untermauern [135]. Darüber hinaus hemmt Topiramamat Calciumkanäle im periaquäduktalen Grau [136] und übt so Einfluss auf die Modulation trigeminaler Schmerzsignale aus. Die Inhibition der neuronalen Erregbarkeit erfolgt zudem durch eine antagonistische Wirkung auf Glutamat-Rezeptoren und eine agonistische Wirkung auf GABA-Rezeptoren [16]. Die neuronale Aktivität im Nucleus spinalis n. trigemini konnte nach Stimulation des Sinus sagittalis superior durch Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors inhibiert werden [137].

Neben der Wirksamkeit von Topiramamat auf zentrale Neurone, konnte ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf das periphere Nervensystem nachgewiesen werden. So bewirkte eine 4-wöchige Einnahme von Topiramamat in Migränepatienten eine deutliche Reduktion der Erregbarkeit peripherer Nerven in elektrophysiologischen Studien [138]. Dies trifft auch auf trigeminale Neurone zu. Eine durch elektrische Stimulation ausgelöste Vasodilatation duraler Gefäße konnte mit Topiramamat unterbunden werden, nicht aber die durch CGRP ausgelöste Vasodilatation [139]. Eine direkte Wirkung auf die Gefäßmuskulatur ist hier also weniger wahrscheinlich, vielmehr scheint die Inhibition trigeminaler Endigungen und die damit einhergehende Reduktion der CGRP-Sekretion ursächlich zu sein. In meiner Arbeit hatte Topiramamat aber keinen Einfluss auf die CGRP-Sekretion in der trigeminalen Zellkultur. Durham et al. allerdings wiesen im trigeminalen Ganglion nach, dass eine 24-stündige Präinkubation mit 10 µM Topiramamat eine CGRP-Ausschüttung, ausgelöst durch KCL und Stickstoffmonoxid (NO), signifikant reduziert [61]. Dies deutet auf Unterschiede in den Signalwegen der CGRP-Sekretion zwischen

der Stimulation durch KCL bzw. NO und der Stimulation durch IL-1 $\beta$  bzw. PGE<sub>2</sub> hin. In unserem Labor zeigte ein anderer Versuchsaufbau ebenfalls, dass eine gesteigerte CGRP-Plasma-Konzentration nach Applikation eines inflammatorischen Cocktails durch eine Prämedikation mit Topiramaten inhibiert wurde [131]. Allerdings enthielt der für die Stimulation verwendete Cocktail neben PGE<sub>2</sub> auch Bradykinin, Serotonin und Histamin, sodass ein direkter Vergleich zwischen den unterschiedlichen Versuchsmodellen nicht uneingeschränkt möglich ist.

#### **5.3.4.4 Metoprolol zeigt keinen Einfluss auf die CGRP-Ausschüttung**

Metoprolol ist ein Betablocker mit selektiver  $\beta_1$ -antagonistischer Wirkung. Trotz der jahrelangen Erfahrungen mit Betablockern in der Präventionstherapie der Migräne ist ihre genaue antimigränöse Wirkweise weitgehend unklar [16]. Eine Hemmung zentraler Mechanismen scheint im Vordergrund zu stehen. So inhibierten spezifische  $\beta_1$ -Antagonisten in einem In-vivo-Modell der Ratte Neurone im Thalamus nach Stimulation des Sinus sagittalis superior [140].  $\beta_1$ -Antagonisten supprimierten zudem die neuronale Aktivität in verschiedenen schmerzmodulierenden Zentren, wie dem periaquäduktalen Grau [141]. Auch die CSD ließ sich nach chronischer, nicht aber nach akuter Applikation von  $\beta_1$ -Antagonisten in einem In-vivo-Modell der Ratte reduzieren [47]. Tierexperimentell können  $\beta$ -Blocker zentrale adrenerge und serotonerge Systeme beeinflussen [16]. Neben der Modifikation subkortikaler Zentren, kann der Kortex selbst durch  $\beta$ -Blocker inhibiert werden. So war Metoprolol imstande evozierte auditorische Potentiale in Migränepatienten zu senken [42].

Metoprolol hat in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ - und PGE<sub>2</sub>-vermittelte CGRP-Sekretion. An peripheren trigeminalen Afferenzen konnten  $\beta_2$ -Agonisten allerdings die Capsaicin-induzierte CGRP-Sekretion signifikant hemmen [142]. Eine Co-Expression des  $\beta_2$ -Rezeptors und des Capsaicin-Rezeptors TRPV1 in den trigeminalen Afferenzen wird postuliert. In Bezug auf die Pathophysiologie der Migräne ist allerdings festzuhalten, dass die neurogene Inflammation nicht durch  $\beta$ -Blocker hemmbar war [143].

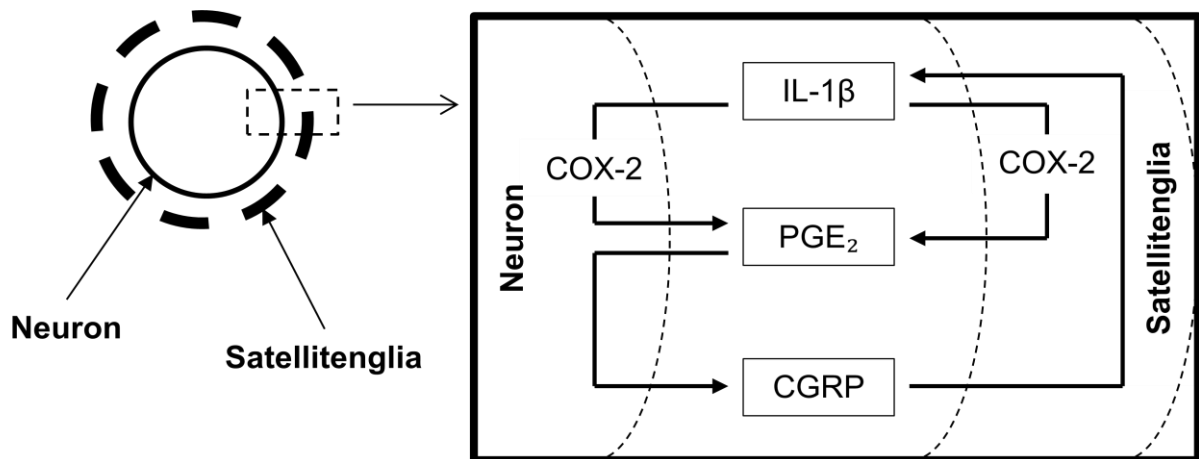
Letztlich bleibt hinsichtlich meines Versuchsaufbaus fraglich, ob eine 24-stündige Präinkubation mit prophylaktischen Medikamenten wie Topiramaten und Metoprolol überhaupt ausreichend ist. So ging anderen In-vivo-Versuchen aus unserem Labor nämlich eine 4-wöchige Prämedikation mit Topiramaten voraus [131]. Ayata et al. konnten

in ihren In-vivo-Versuchen zur Suppression der CSD sogar nachweisen, dass eine einstündige oder einwöchige Prämedikation mit Topiramat oder Propranolol wirkungslos blieb [47]. Wohingegen eine mehrwöchige Prämedikation sehr wohl zu einer signifikanten Reduktion der CSD führte. Allerdings zeigten die In-vitro-Experimente von Durham et al. eine signifikante Reduktion der CGRP-Sekretion bereits nach einstündiger Präinkubation mit Topiramat [61].

#### 5.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse meiner Arbeit untermauern die Bedeutung der neuronalen Sensibilisierung [48] und der neuro-glialen Kommunikation [55] im Ganglion trigeminale für die Entstehung der Migräne. Ausdruck der neuronalen Sensibilisierung im Menschen ist der pulsierende Schmerzcharakter und die Allodynie [48]. Sobald sich die Allodynie während einer Migräne etabliert hat, sind Triptane nur noch sehr schlecht wirksam [144]. Demgegenüber zeigen die Hemmer der COX eine gute Wirksamkeit in Migränepatienten mit Allodynie [53]. Dieses Phänomen spiegelt sich auch in den Ergebnissen meiner Arbeit wieder. Dabei findet die neuronale Sensibilisierung nicht nur an den peripheren [51] und zentralen [52] trigeminalen Endigungen statt, sondern auch im Ganglion trigeminale selbst. Hier ist die neuro-gliale Einheit, bestehend aus Neuronen und ihren Satellitenzellen, hauptverantwortlich für die Modulation der nozizeptiven Signaltransduktion. Die Kommunikation zwischen den Neuronen und ihren Satellitenzellen erfolgt zum einen direkt über *gab-junctions* und zum anderen indirekt über parakrine Mechanismen [55]. Die in meiner Arbeit untersuchten Mediatoren sind entscheidend beteiligt an der parakrinen Kommunikation im Ganglion trigeminale (siehe Abb. 15).

**PGE<sub>2</sub>:** In meinen Versuchen induzierte IL-1 $\beta$  eine Expression von COX-2 in glialen und neuronalen Zellen des Ganglion trigeminale. Diese führte zu einer anschließenden Synthese von PGE<sub>2</sub>. Weiterführende Studien, die sich speziell mit der Rolle der Satellitenzellen im Ganglion trigeminale beschäftigten, konnten eine COX-2-Induktion in trigeminalen Satellitenzellen nachweisen [115]. PGE<sub>2</sub> führte in vivo zur Aktivierung primärer und sekundärer Neurone des trigeminalen Systems [49, 52] und rezeptorvermittelt zu einer vermehrten Ausschüttung von CGRP aus trigeminalen Neuronen [66].



**Abbildung 15: COX-2- abhängige Sekretion von CGRP im Ganglion trigeminale.** Die Stimulation einer trigeminalen Zellkultur mit IL-1 $\beta$  führt zu einer Expression von COX-2 in neuronalen und glialen Zellen. Die anschließende Synthese von PGE<sub>2</sub> bewirkt eine protrahierte Sekretion von CGRP aus den neuronalen Zellen. Sowohl die PGE<sub>2</sub>- als auch die CGRP-Sekretion können durch COX-Hemmer inhibiert werden. Capuano et al. wiesen nach, dass die Satellitenzellen Quelle der PGE<sub>2</sub>-Synthese sind und CGRP eine IL-1 $\beta$ -Aussüttung aus den Satellitenzellen bewirken kann [115]. Diese neuro-gliale Interaktion könnte Bestandteil einer peripheren Sensibilisierung im Rahmen der Migräneentstehung sein.

**IL-1 $\beta$ :** Im Spinalganglion der Ratte konnte IL-1 $\beta$  in neuronalen und glialen Zellen, nicht aber in den nozizeptiven, CGRP-positiven Neuronen, nachgewiesen werden [145]. Nach neurogener Inflammation war eine vermehrte IL-1 $\beta$ -Expression in den Satellitenzellen des Ganglion trigeminale feststellbar [146]. IL-1 $\beta$  wirkt dabei exzitatorisch auf trigeminale Neurone. In einem Tiermodell inflammatorischer Schmerzen führte die Applikation von IL-1 $\beta$  rezeptorvermittelt zur Aktivitätssteigerung trigeminaler Neurone in vitro [69] und konsekutiv zu einer Hyperalgesiereaktion in vivo [147]. In meiner Arbeit löste IL-1 $\beta$  einer protrahierte CGRP-Sekretion aus trigeminalen Neuronen aus.

**CGRP:** In einer trigeminalen Zellkultur aktivierte CGRP Satellitenzellen und induzierte die Ausschüttung von IL-1 $\beta$  aus der Satellitenglia [148]. In Analogie zu meiner Arbeit, ließ sich in einer humanen Studie CGRP hauptsächlich in neuronalen Zellen des Ganglion trigeminale nachweisen und wurde dort vorwiegend von neuronalen Zellen sezerniert [59]. CGRP unterstützt hierbei einen sich selbst verstärkenden Mechanismus. So führte CGRP selbst zu einer vermehrten CGRP-Freisetzung aus Neuronen des Ganglion trigeminale [149]. In meiner Arbeit wurde CGRP sowohl durch PGE<sub>2</sub> als auch durch IL-1 $\beta$  ausgeschüttet werden.

Die komplexe Interaktion zwischen CGRP, IL1- $\beta$  und PGE<sub>2</sub> offenbart eine parakrine Wechselwirkung zwischen trigeminalen Neuronen und ihren Satellitenzellen. Diese Interaktion ist Bestandteil einer neuronalen Sensibilisierung der nozizeptiven Signaltransduktion auf ganglionärer Ebene und stellt einen grundlegenden Aspekt in der Entstehung der Migräne dar [48, 55].

## 6. Literatur

1. Goadsby, P.J., A.R. Charbit, A.P. Andreou, S. Akerman, and P.R. Holland, *Neurobiology of migraine*. Neuroscience, 2009. **161**(2): p. 327-41.
2. Stovner, L., K. Hagen, R. Jensen, Z. Katsarava, R. Lipton, A. Scher, T. Steiner, and J.A. Zwart, *The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide*. Cephalalgia, 2007. **27**(3): p. 193-210.
3. Radtke, A. and H. Neuhauser, *Prevalence and burden of headache and migraine in Germany*. Headache, 2009. **49**(1): p. 79-89.
4. Goadsby, P.J., R.B. Lipton, and M.D. Ferrari, *Migraine--current understanding and treatment*. N Engl J Med, 2002. **346**(4): p. 257-70.
5. Burstein, R., D. Yarnitsky, I. Goor-Aryeh, B.J. Ransil, and Z.H. Bajwa, *An association between migraine and cutaneous allodynia*. Annals of Neurology, 2000. **47**(5): p. 614-24.
6. Tfelt-Hansen, P.C., *History of migraine with aura and cortical spreading depression from 1941 and onwards*. Cephalalgia, 2010. **30**(7): p. 780-92.
7. Evers S., M.A., *Akuttherapie und Prophylaxe der Migräne - Leitlinie der Deutschen Migräne- und Kopfschmerzgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie Nervenheilkunde*, 2008. **27**(10): p. 933-949.
8. Neeb, L., J. Meents, and U. Reuter, *5-HT<sub>1F</sub> Receptor agonists: a new treatment option for migraine attacks?* Neurotherapeutics, 2010. **7**(2): p. 176-82.
9. Ferrari, M.D., K.I. Roon, R.B. Lipton, and P.J. Goadsby, *Oral triptans (serotonin 5-HT<sub>1B/1D</sub>) agonists) in acute migraine treatment: a meta-analysis of 53 trials*. Lancet, 2001. **358**(9294): p. 1668-75.
10. Diener, H.C., *Efficacy and safety of intravenous acetylsalicylic acid lysinate compared to subcutaneous sumatriptan and parenteral placebo in the acute treatment of migraine. A double-blind, double-dummy, randomized, multicenter, parallel group study. The ASASUMAMIG Study Group*. Cephalalgia, 1999. **19**(6): p. 581-8; discussion 542.
11. Kirthi, V., S. Derry, R.A. Moore, and H.J. McQuay, *Aspirin with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(4): p. CD008041.
12. Kudrow, D., H.M. Thomas, G. Ruoff, G. Ishkanian, G. Sands, V.H. Le, and M.T. Brown, *Valdecoxib for treatment of a single, acute, moderate to severe migraine headache*. Headache, 2005. **45**(9): p. 1151-62.
13. Croxtall, J.D., P.T. van Hal, Q. Choudhury, D.W. Gilroy, and R.J. Flower, *Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(2): p. 511-9.
14. Friedman, B.W., P. Greenwald, T.C. Bania, D. Esses, M. Hochberg, C. Solorzano, J. Corbo, J. Chu, E. Chew, P. Cheung, S. Fearon, J. Paternoster, A. Baccellieri, S. Clark, P.E. Bijur, R.B. Lipton, and E.J. Gallagher, *Randomized trial of IV dexamethasone for acute migraine in the emergency department*. Neurology, 2007. **69**(22): p. 2038-44.
15. Colman, I., B.W. Friedman, M.D. Brown, G.D. Innes, E. Grafstein, T.E. Roberts, and B.H. Rowe, *Parenteral dexamethasone for acute severe migraine headache: meta-analysis of randomised controlled trials for preventing recurrence*. BMJ, 2008. **336**(7657): p. 1359-61.



16. Galletti, F., L.M. Cupini, I. Corbelli, P. Calabresi, and P. Sarchielli, *Pathophysiological basis of migraine prophylaxis*. Prog Neurobiol, 2009. **89**(2): p. 176-92.
17. Linde, K. and K. Rosnagel, *Propranolol for migraine prophylaxis*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(2): p. CD003225.
18. Siniatchkin, M., F. Andrasik, P. Kropp, U. Niederberger, H. Streng, N. Averkina, V. Lindner, U. Stephani, and W.D. Gerber, *Central mechanisms of controlled-release metoprolol in migraine: a double-blind, placebo-controlled study*. Cephalalgia, 2007. **27**(9): p. 1024-32.
19. Mulleners, W.M. and E.P. Chronicle, *Anticonvulsants in migraine prophylaxis: a Cochrane review*. Cephalalgia, 2008. **28**(6): p. 585-97.
20. Shaygannejad, V., M. Janghorbani, A. Ghorbani, F. Ashtary, N. Zakizade, and V. Nasr, *Comparison of the effect of topiramate and sodium valproate in migraine prevention: a randomized blinded crossover study*. Headache, 2006. **46**(4): p. 642-8.
21. Diener, H.C., P. Tfelt-Hansen, C. Dahlof, M.J. Lainez, G. Sandrini, S.J. Wang, W. Neto, U. Vijapurkar, A. Doyle, and D. Jacobs, *Topiramate in migraine prophylaxis--results from a placebo-controlled trial with propranolol as an active control*. J Neurol, 2004. **251**(8): p. 943-50.
22. Naegel, S. and M. Obermann, *Topiramate in the prevention and treatment of migraine: efficacy, safety and patient preference*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2010. **6**: p. 17-28.
23. Strassman, A.M., S. Potrebic, and R.J. Maciewicz, *Anatomical properties of brainstem trigeminal neurons that respond to electrical stimulation of dural blood vessels*. J Comp Neurol, 1994. **346**(3): p. 349-65.
24. Knight, Y.E. and P.J. Goadsby, *The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine?* Neuroscience, 2001. **106**(4): p. 793-800.
25. Charbit, A.R., S. Akerman, P.R. Holland, and P.J. Goadsby, *Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study*. J Neurosci, 2009. **29**(40): p. 12532-41.
26. Nosedá, R., L. Constandil, L. Bourgeois, M. Chalus, and L. Villanueva, *Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain*. J Neurosci, 2010. **30**(43): p. 14420-9.
27. Ray, B.S. and H.G. Wolff, *Experimental studies on headache - Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache*. Archives of Surgery, 1940. **41**(4): p. 813-856.
28. Tunis, M.M. and H.G. Wolff, *Studies on headache; long-term observations of the reactivity of the cranial arteries in subjects with vascular headache of the migraine type*. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1953. **70**(5): p. 551-7.
29. Schoonman, G.G., J. van der Grond, C. Kortmann, R.J. van der Geest, G.M. Terwindt, and M.D. Ferrari, *Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation--a 3T magnetic resonance angiography study*. Brain, 2008. **131**(Pt 8): p. 2192-200.
30. Waeber, C. and M.A. Moskowitz, *Migraine as an inflammatory disorder*. Neurology, 2005. **64**(10 Suppl 2): p. S9-15.
31. Schuh-Hofer, S., M. Tayefeh, U. Reuter, U. Dirnagl, and G. Arnold, *Effects of parecoxib on plasma protein extravasation and c-fos expression in the rat*. Headache, 2006. **46**(2): p. 276-85.

32. Buzzi, M.G. and M.A. Moskowitz, *The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater*. Br J Pharmacol, 1990. **99**(1): p. 202-6.
33. Lee, W.S., V. Limmroth, C. Ayata, F.M. Cutrer, C. Waeber, X. Yu, and M.A. Moskowitz, *Peripheral GABAA receptor-mediated effects of sodium valproate on dural plasma protein extravasation to substance P and trigeminal stimulation*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(1): p. 1661-7.
34. Diener, H.C., *RPR100893, a substance-P antagonist, is not effective in the treatment of migraine attacks*. Cephalalgia, 2003. **23**(3): p. 183-5.
35. Goldstein, D.J., W.W. Offen, E.G. Klein, L.A. Phebus, P. Hipskind, K.W. Johnson, and R.E. Ryan, Jr., *Lanepitant, an NK-1 antagonist, in migraine prevention*. Cephalalgia, 2001. **21**(2): p. 102-6.
36. Akerman, S., P.R. Holland, and P.J. Goadsby, *Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(10): p. 570-84.
37. Coppola, G., F. Pierelli, and J. Schoenen, *Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine?* Cephalalgia, 2007. **27**(12): p. 1427-39.
38. Raskin, N.H., Y. Hosobuchi, and S. Lamb, *Headache may arise from perturbation of brain*. Headache, 1987. **27**(8): p. 416-20.
39. Stankewitz, A., D. Aderjan, F. Eippert, and A. May, *Trigeminal nociceptive transmission in migraineurs predicts migraine attacks*. J Neurosci, 2011. **31**(6): p. 1937-43.
40. Bartsch, T., Y.E. Knight, and P.J. Goadsby, *Activation of 5-HT(1B/1D) receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 371-81.
41. Afra, J., A. Proietti Cecchini, P.S. Sandor, and J. Schoenen, *Comparison of visual and auditory evoked cortical potentials in migraine patients between attacks*. Clin Neurophysiol, 2000. **111**(6): p. 1124-9.
42. Sandor, P.S., J. Afra, A. Ambrosini, and J. Schoenen, *Prophylactic treatment of migraine with beta-blockers and riboflavin: differential effects on the intensity dependence of auditory evoked cortical potentials*. Headache, 2000. **40**(1): p. 30-5.
43. Aurora, S.K., P.M. Barrodale, A.R. Vermaas, and C.B. Rudra, *Topiramate modulates excitability of the occipital cortex when measured by transcranial magnetic stimulation*. Cephalalgia, 2010. **30**(6): p. 648-54.
44. Leao, A.A.P., *Spreading depression of activity in the cerebral cortex*. Journal of Neurophysiology, 1944. **7**(6): p. 359-390.
45. Bolay, H., U. Reuter, A.K. Dunn, Z. Huang, D.A. Boas, and M.A. Moskowitz, *Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 136-42.
46. Hadjikhani, N., M. Sanchez Del Rio, O. Wu, D. Schwartz, D. Bakker, B. Fischl, K.K. Kwong, F.M. Cutrer, B.R. Rosen, R.B. Tootell, A.G. Sorensen, and M.A. Moskowitz, *Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4687-92.
47. Ayata, C., H. Jin, C. Kudo, T. Dalkara, and M.A. Moskowitz, *Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis*. Annals of Neurology, 2006. **59**(4): p. 652-61.

48. Burstein, R., M. Jakubowski, and S.D. Rauch, *The science of migraine*. J Vestib Res, 2011. **21**(6): p. 305-14.
49. Strassman, A.M., S.A. Raymond, and R. Burstein, *Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches*. Nature, 1996. **384**(6609): p. 560-4.
50. Burstein, R. and M. Jakubowski, *Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization*. Annals of Neurology, 2004. **55**(1): p. 27-36.
51. Levy, D., X.C. Zhang, M. Jakubowski, and R. Burstein, *Sensitization of meningeal nociceptors: inhibition by naproxen*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(4): p. 917-22.
52. Jakubowski, M., D. Levy, V. Kainz, X.C. Zhang, B. Kosaras, and R. Burstein, *Sensitization of central trigeminovascular neurons: blockade by intravenous naproxen infusion*. Neuroscience, 2007. **148**(2): p. 573-83.
53. Jakubowski, M., D. Levy, I. Goor-Aryeh, B. Collins, Z. Bajwa, and R. Burstein, *Terminating migraine with allodynia and ongoing central sensitization using parenteral administration of COX1/COX2 inhibitors*. Headache, 2005. **45**(7): p. 850-61.
54. Lazarov, N.E., *Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(1): p. 19-59.
55. Takeda, M., M. Takahashi, and S. Matsumoto, *Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain*. Neurosci Biobehav Rev, 2009. **33**(6): p. 784-92.
56. Amara, S.G., V. Jonas, M.G. Rosenfeld, E.S. Ong, and R.M. Evans, *Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products*. Nature, 1982. **298**(5871): p. 240-4.
57. Capuano, A., M.C. Greco, P. Navarra, and G. Tringali, *Correlation between algogenic effects of calcitonin-gene-related peptide (CGRP) and activation of trigeminal vascular system, in an in vivo experimental model of nitroglycerin-induced sensitization*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 97-102.
58. Lassen, L.H., P.A. Haderslev, V.B. Jacobsen, H.K. Iversen, B. Sperling, and J. Olesen, *CGRP may play a causative role in migraine*. Cephalalgia, 2002. **22**(1): p. 54-61.
59. Eftekhari, S., C.A. Salvatore, A. Calamari, S.A. Kane, J. Tajti, and L. Edvinsson, *Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion*. Neuroscience, 2010. **169**(2): p. 683-96.
60. Durham, P.L. and A.F. Russo, *Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion by a serotonergic antimigraine drug*. J Neurosci, 1999. **19**(9): p. 3423-9.
61. Durham, P.L., C. Niemann, and R. Cady, *Repression of stimulated calcitonin gene-related peptide secretion by topiramate*. Headache, 2006. **46**(8): p. 1291-5.
62. Antonova, M., T. Wienecke, J. Olesen, and M. Ashina, *Prostaglandins in migraine: update*. Curr Opin Neurol, 2013. **26**(3): p. 269-75.
63. Wienecke, T., J. Olesen, P.S. Oturai, and M. Ashina, *Prostaglandin E2(PGE2) induces headache in healthy subjects*. Cephalalgia, 2009. **29**(5): p. 509-19.
64. Eberhardt, M., T. Hoffmann, S.K. Sauer, K. Messlinger, P.W. Reeh, and M.J. Fischer, *Calcitonin gene-related peptide release from intact isolated dorsal root and trigeminal ganglia*. Neuropeptides, 2008. **42**(3): p. 311-7.

65. Kadoi, J., M. Takeda, and S. Matsumoto, *Prostaglandin E2 potentiates the excitability of small diameter trigeminal root ganglion neurons projecting onto the superficial layer of the cervical dorsal horn in rats*. *Exp Brain Res*, 2007. **176**(2): p. 227-36.
66. Jenkins, D.W., W. Feniuk, and P.P. Humphrey, *Characterization of the prostanoid receptor types involved in mediating calcitonin gene-related peptide release from cultured rat trigeminal neurones*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(6): p. 1296-302.
67. Ren, K. and R. Torres, *Role of interleukin-1beta during pain and inflammation*. *Brain Res Rev*, 2009. **60**(1): p. 57-64.
68. Reuter, U., H. Bolay, I. Jansen-Olesen, A. Chiarugi, M. Sanchez del Rio, R. Letourneau, T.C. Theoharides, C. Waeber, and M.A. Moskowitz, *Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology*. *Brain*, 2001. **124**(Pt 12): p. 2490-502.
69. Takeda, M., J. Kitagawa, M. Takahashi, and S. Matsumoto, *Activation of interleukin-1beta receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation*. *Pain*, 2008. **139**(3): p. 594-602.
70. Hou, L., W. Li, and X. Wang, *Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats*. *J Neurosci Res*, 2003. **73**(2): p. 188-97.
71. Baccaglini, P.I. and P.G. Hogan, *Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(2): p. 594-8.
72. Frobert, Y., M.C. Nevers, S. Amadesi, H. Volland, P. Brune, P. Geppetti, J. Grassi, and C. Creminon, *A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP): characterization and application*. *Peptides*, 1999. **20**(2): p. 275-84.
73. Guan, Z. and A.R. Morrison, *Assessment of cyclooxygenase protein expression by western blotting*. *Methods Mol Biol*, 1999. **120**: p. 67-76.
74. Matsushita, K., Y. Wu, J. Qiu, L. Lang-Lazdunski, L. Hirt, C. Waeber, B.T. Hyman, J. Yuan, and M.A. Moskowitz, *Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia*. *J Neurosci*, 2000. **20**(18): p. 6879-87.
75. Kubista, M., J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoberg, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric, *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
76. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
77. Fricke, B., K.H. Andres, and M. Von Doring, *Nerve fibers innervating the cranial and spinal meninges: morphology of nerve fiber terminals and their structural integration*. *Microsc Res Tech*, 2001. **53**(2): p. 96-105.
78. Usunoff, K.G., A. Popratiloff, O. Schmitt, and A. Wree, *Functional neuroanatomy of pain*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2006. **184**: p. 1-115.
79. May, A., *[The window into headache research : what have we learned from functional and structural neuroimaging]*. *Schmerz*, 2010. **24**(2): p. 130-6.
80. Lennerz, J.K., V. Ruhle, E.P. Ceppa, W.L. Neuhuber, N.W. Bunnett, E.F. Grady, and K. Messlinger, *Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1*

- (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol*, 2008. **507**(3): p. 1277-99.
81. Craig, A.D., *A rat is not a monkey is not a human: comment on Mogil (Nature Rev. Neurosci. 10, 283-294 (2009))*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(6): p. 466.
  82. Durham, P.L. and R. Cady, *Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy*. *Headache*, 2004. **44**(1): p. 35-42; discussion 42-3.
  83. Buschmann, T., A. Martin-Villalba, J.D. Kocsis, S.G. Waxman, M. Zimmermann, and T. Herdegen, *Expression of Jun, Fos, and ATF-2 proteins in axotomized explanted and cultured adult rat dorsal root ganglia*. *Neuroscience*, 1998. **84**(1): p. 163-76.
  84. Kuris, A., C.B. Xu, M.F. Zhou, J. Tajti, R. Uddman, and L. Edvinsson, *Enhanced expression of CGRP in rat trigeminal ganglion neurons during cell and organ culture*. *Brain Res*, 2007. **1173**: p. 6-13.
  85. Harriott, A.M. and M.S. Gold, *Electrophysiological properties of dural afferents in the absence and presence of inflammatory mediators*. *Journal of Neurophysiology*, 2009. **101**(6): p. 3126-34.
  86. Fan, P.C., P.H. Kuo, J.W. Hu, S.H. Chang, S.T. Hsieh, and L.C. Chiou, *Different trigeminovascular responsiveness between adolescent and adult rats in a migraine model*. *Cephalalgia*, 2012.
  87. Hoffmann, J., S. Wecker, L. Neeb, U. Dirnagl, and U. Reuter, *Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF*. *Cephalalgia*, 2012. **32**(9): p. 659-67.
  88. Lei, L., X. Yuan, S. Wang, F. Zhang, Y. Han, Q. Ning, G. Luo, and S. Lu, *Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways are Involved in the Upregulation of Calcitonin Gene-Related Peptide of Rat Trigeminal Ganglion After Organ Culture*. *J Mol Neurosci*, 2012.
  89. Belzer, V., N. Shraer, and M. Hanani, *Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia*. *Neuron Glia Biol*, 2010. **6**(4): p. 237-43.
  90. Bennett, D.L., *Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function*. *Neuroscientist*, 2001. **7**(1): p. 13-7.
  91. Price, T.J., M.D. Louria, D. Candelario-Soto, G.O. Dussor, N.A. Jeske, A.M. Patwardhan, A. Diogenes, A.A. Trott, K.M. Hargreaves, and C.M. Flores, *Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion*. *BMC Neurosci*, 2005. **6**: p. 4.
  92. Tada, K., M. Murakami, T. Kambe, and I. Kudo, *Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions*. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 5008-15.
  93. Fehrenbacher, J.C., T.H. Burkey, G.D. Nicol, and M.R. Vasko, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E2 receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells*. *Pain*, 2005. **113**(1-2): p. 113-22.

94. Rowlands, D.K., C. Kao, and H. Wise, *Regulation of prostacyclin and prostaglandin E(2) receptor mediated responses in adult rat dorsal root ganglion cells, in vitro*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(1): p. 13-22.
95. Patel, T.D., A. Jackman, F.L. Rice, J. Kucera, and W.D. Snider, *Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 345-57.
96. Goadsby, P.J., L. Edvinsson, and R. Ekman, *Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache*. Annals of Neurology, 1990. **28**(2): p. 183-7.
97. Juhasz, G., T. Zsombok, E.A. Modos, S. Olajos, B. Jakab, J. Nemeth, J. Szolcsanyi, J. Vitrai, and G. Bagdy, *NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release*. Pain, 2003. **106**(3): p. 461-70.
98. Juhasz, G., T. Zsombok, B. Jakab, J. Nemeth, J. Szolcsanyi, and G. Bagdy, *Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack*. Cephalalgia, 2005. **25**(3): p. 179-83.
99. Diener, H.C., P. Barbanti, C. Dahlof, U. Reuter, J. Habeck, and J. Podhorna, *BI 44370 TA, an oral CGRP antagonist for the treatment of acute migraine attacks: results from a phase II study*. Cephalalgia, 2011. **31**(5): p. 573-84.
100. Dodick, D.W., P.J. Goadsby, E.L. Spierings, J.C. Scherer, S.P. Sweeney, and D.S. Grayzel, *Safety and efficacy of LY2951742, a monoclonal antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of migraine: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study*. Lancet Neurol, 2014. **13**(9): p. 885-92.
101. Inoue, A., K. Ikoma, N. Morioka, K. Kumagai, T. Hashimoto, I. Hide, and Y. Nakata, *Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system*. J Neurochem, 1999. **73**(5): p. 2206-13.
102. Zimmermann, K., P.W. Reeh, and B. Averbeck, *S+ -flurbiprofen but not 5-HT1 agonists suppress basal and stimulated CGRP and PGE2 release from isolated rat dura mater*. Pain, 2003. **103**(3): p. 313-20.
103. Eberhardt, M., L. Neeb, E.M. Vogel, G. Tiegs, U. Reuter, K. Messlinger, and M.J. Fischer, *Glyceroltrinitrate facilitates stimulated CGRP release but not gene expression of CGRP or its receptor components in rat trigeminal ganglia*. Neuropeptides, 2009. **43**(6): p. 483-9.
104. Sarchielli, P., A. Alberti, M. Codini, A. Floridi, and V. Gallai, *Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks*. Cephalalgia, 2000. **20**(10): p. 907-18.
105. Antonova, M., T. Wienecke, J. Olesen, and M. Ashina, *Prostaglandin E(2) induces immediate migraine-like attack in migraine patients without aura*. Cephalalgia, 2012. **32**(11): p. 822-33.
106. Ma, W., *Chronic prostaglandin E2 treatment induces the synthesis of the pain-related peptide substance P and calcitonin gene-related peptide in cultured sensory ganglion explants*. J Neurochem, 2010. **115**(2): p. 363-72.
107. Derow, A., I. Izydorczyk, A. Kuhn, P.W. Reeh, and G. Petho, *Prostaglandin E(2) and I(2) facilitate noxious heat-induced spike discharge but not iCGRP release from rat cutaneous nociceptors*. Life Sci, 2007. **81**(25-26): p. 1685-93.

108. Jenkins, D.W., C.J. Langmead, A.A. Parsons, and P.J. Strijbos, *Regulation of calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal nucleus caudalis slices in vitro*. Neuroscience Letters, 2004. **366**(3): p. 241-4.
109. Supowit, S.C., H. Zhao, K.A. Katki, P. Gupta, and D.J. Dipette, *Bradykinin and prostaglandin E(1) regulate calcitonin gene-related peptide expression in cultured rat sensory neurons*. Regul Pept, 2011. **167**(1): p. 105-11.
110. Eguchi, N., H. Hayashi, Y. Urade, S. Ito, and O. Hayaishi, *Central action of prostaglandin E2 and its methyl ester in the induction of hyperthermia after their systemic administration in urethane-anesthetized rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **247**(2): p. 671-9.
111. Neubert, J.K., N.T. Maidment, Y. Matsuka, D.W. Adelson, L. Kruger, and I. Spigelman, *Inflammation-induced changes in primary afferent-evoked release of substance P within trigeminal ganglia in vivo*. Brain Res, 2000. **871**(2): p. 181-91.
112. Perini, F., G. D'Andrea, E. Galloni, F. Pignatelli, G. Billo, S. Alba, G. Bussone, and V. Toso, *Plasma cytokine levels in migraineurs and controls*. Headache, 2005. **45**(7): p. 926-31.
113. Crown, J., A. Jakubowski, N. Kemeny, M. Gordon, C. Gasparetto, G. Wong, C. Sheridan, G. Toner, B. Meisenberg, J. Botet, and et al., *A phase I trial of recombinant human interleukin-1 beta alone and in combination with myelosuppressive doses of 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer*. Blood, 1991. **78**(6): p. 1420-7.
114. Hirfanoglu, T., A. Serdaroglu, O. Gulbahar, and A. Cansu, *Prophylactic drugs and cytokine and leptin levels in children with migraine*. Pediatr Neurol, 2009. **41**(4): p. 281-7.
115. Capuano, A., A. De Corato, L. Lisi, G. Tringali, P. Navarra, and C. Dello Russo, *Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology*. Mol Pain, 2009. **5**: p. 43.
116. Jenkins, D.W., L.A. Sellers, W. Feniuk, and P.P. Humphrey, *Characterization of bradykinin-induced prostaglandin E2 release from cultured rat trigeminal ganglion neurones*. Eur J Pharmacol, 2003. **469**(1-3): p. 29-36.
117. Tsatsanis, C., A. Androulidaki, M. Venihaki, and A.N. Margioris, *Signalling networks regulating cyclooxygenase-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1654-61.
118. Newton, R., L.M. Kuitert, M. Bergmann, I.M. Adcock, and P.J. Barnes, *Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(1): p. 28-32.
119. Ebersberger, A., B. Averbeck, K. Messlinger, and P.W. Reeh, *Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro*. Neuroscience, 1999. **89**(3): p. 901-7.
120. Shi, L., I. Smolders, V. Umbrain, M.H. Lauwers, S. Sarre, Y. Michotte, M. Zizi, and F. Camu, *Peripheral inflammation modifies the effect of intrathecal IL-1beta on spinal PGE2 production mainly through cyclooxygenase-2 activity. A spinal microdialysis study in freely moving rats*. Pain, 2006. **120**(3): p. 307-14.
121. Zhang, X.C., V. Kainz, M. Jakubowski, R. Burstein, A. Strassman, and D. Levy, *Localization of COX-1 and COX-2 in the intracranial dura mater of the rat*. Neuroscience Letters, 2009. **452**(1): p. 33-6.

122. Supowit, S.C., M.D. Christensen, K.N. Westlund, D.M. Hallman, and D.J. DiPette, *Dexamethasone and activators of the protein kinase A and C signal transduction pathways regulate neuronal calcitonin gene-related peptide expression and release*. *Brain Res*, 1995. **686**(1): p. 77-86.
123. Safieh-Garabedian, B., S. Poole, A. Allchorne, J. Winter, and C.J. Woolf, *Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia*. *Br J Pharmacol*, 1995. **115**(7): p. 1265-75.
124. Reuter, U., A. Chiarugi, H. Bolay, and M.A. Moskowitz, *Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy*. *Annals of Neurology*, 2002. **51**(4): p. 507-16.
125. Nilsson, T., J. Longmore, D. Shaw, I.J. Olesen, and L. Edvinsson, *Contractile 5-HT<sub>1B</sub> receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(6): p. 1133-40.
126. Amrutkar, D.V., K.B. Ploug, A. Hay-Schmidt, F. Porreca, J. Olesen, and I. Jansen-Olesen, *mRNA expression of 5-hydroxytryptamine 1B, 1D, and 1F receptors and their role in controlling the release of calcitonin gene-related peptide in the rat trigeminovascular system*. *Pain*, 2012. **153**(4): p. 830-8.
127. Gomez-Mancilla, B., N.R. Cutler, M.T. Leibowitz, E.L. Spierings, J.A. Klapper, S. Diamond, J. Goldstein, T. Smith, J.R. Couch, J. Fleishaker, N. Azie, and D.E. Blunt, *Safety and efficacy of PNU-142633, a selective 5-HT<sub>1D</sub> agonist, in patients with acute migraine*. *Cephalalgia*, 2001. **21**(7): p. 727-32.
128. Lucaites, V.L., J.H. Krushinski, J.M. Schaus, J.E. Audia, and D.L. Nelson, *[<sup>3</sup>H]LY334370, a novel radioligand for the 5-HT<sub>1F</sub> receptor. II. Autoradiographic localization in rat, guinea pig, monkey and human brain*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2005. **371**(3): p. 178-84.
129. Johnson, K.W., J.M. Schaus, M.M. Durkin, J.E. Audia, S.W. Kaldor, M.E. Flaugh, N. Adham, J.M. Zgombick, M.L. Cohen, T.A. Branchek, and L.A. Phebus, *5-HT<sub>1F</sub> receptor agonists inhibit neurogenic dural inflammation in guinea pigs*. *Neuroreport*, 1997. **8**(9-10): p. 2237-40.
130. Farkkila, M., H.C. Diener, G. Geraud, M. Lainez, J. Schoenen, N. Harner, A. Pilgrim, and U. Reuter, *Efficacy and tolerability of lasmiditan, an oral 5-HT<sub>1F</sub> receptor agonist, for the acute treatment of migraine: a phase 2 randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose-ranging study*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(5): p. 405-13.
131. Hoffmann, J., L. Neeb, H. Israel, F. Dannenberg, F. Triebe, U. Dirnagl, and U. Reuter, *Intracisternal injection of inflammatory soup activates the trigeminal nerve system*. *Cephalalgia*, 2009. **29**(11): p. 1212-7.
132. Wang, X., Y. Fang, J. Liang, Z. Yin, J. Miao, and N. Luo, *Selective inhibition of 5-HT<sub>7</sub> receptor reduces CGRP release in an experimental model for migraine*. *Headache*, 2010. **50**(4): p. 579-87.
133. Striano, P., F. Zara, F.M. Santorelli, and S. Striano, *Topiramate-associated worsening symptoms in a patient with familial hemiplegic migraine*. *J Neurol Sci*, 2008. **272**(1-2): p. 194-5.
134. Akerman, S., P.R. Holland, and P.J. Goadsby, *Mechanically-induced cortical spreading depression associated regional cerebral blood flow changes are blocked by Na<sup>+</sup> ion channel blockade*. *Brain Res*, 2008. **1229**: p. 27-36.
135. Reuter, U., M.S. Del Rio, H.C. Diener, G. Allais, B. Davies, A. Gendolla, J. Pfeil, S. Schwalen, B. Schauble, and J. van Oene, *Migraines with and without aura and their response to preventive therapy with topiramate*. *Cephalalgia*, 2010. **30**(5): p. 543-51.



136. Martella, G., C. Costa, A. Pisani, L.M. Cupini, G. Bernardi, and P. Calabresi, *Antiepileptic drugs on calcium currents recorded from cortical and PAG neurons: therapeutic implications for migraine*. Cephalalgia, 2008. **28**(12): p. 1315-26.
137. Storer, R.J., S. Akerman, K.G. Shields, and P.J. Goadsby, *GABAA receptor modulation of trigeminovascular nociceptive neurotransmission by midazolam is antagonized by flumazenil*. Brain Res, 2004. **1013**(2): p. 188-93.
138. Erdogan, C., M. Yucel, H. Akgun, T. Kaskc, V. Semai Bek, and Z. Gokcil, *Effects of topiramate on peripheral nerve excitability*. J Clin Neurophysiol, 2012. **29**(3): p. 268-70.
139. Akerman, S. and P.J. Goadsby, *Topiramate inhibits trigeminovascular activation: an intravital microscopy study*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(1): p. 7-14.
140. Shields, K.G. and P.J. Goadsby, *Propranolol modulates trigeminovascular responses in thalamic ventroposteromedial nucleus: a role in migraine?* Brain, 2005. **128**(Pt 1): p. 86-97.
141. Xiao, C., C. Zhou, G. Atlas, E. Delphin, and J.H. Ye, *Labetalol facilitates GABAergic transmission to rat periaqueductal gray neurons via antagonizing beta1-adrenergic receptors--a possible mechanism underlying labetalol-induced analgesia*. Brain Res, 2008. **1198**: p. 34-43.
142. Bowles, W.R., C.M. Flores, D.L. Jackson, and K.M. Hargreaves, *beta 2-Adrenoceptor regulation of CGRP release from capsaicin-sensitive neurons*. J Dent Res, 2003. **82**(4): p. 308-11.
143. Markowitz, S., K. Saito, and M.A. Moskowitz, *Neurogenically mediated plasma extravasation in dura mater: effect of ergot alkaloids. A possible mechanism of action in vascular headache*. Cephalalgia, 1988. **8**(2): p. 83-91.
144. Burstein, R., B. Collins, and M. Jakubowski, *Defeating migraine pain with triptans: a race against the development of cutaneous allodynia*. Annals of Neurology, 2004. **55**(1): p. 19-26.
145. Copray, J.C., I. Mantingh, N. Brouwer, K. Biber, B.M. Kust, R.S. Liem, I. Huitinga, F.J. Tilders, A.M. Van Dam, and H.W. Boddeke, *Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia*. J Neuroimmunol, 2001. **118**(2): p. 203-11.
146. Takeda, M., T. Tanimoto, J. Kadoi, M. Nasu, M. Takahashi, J. Kitagawa, and S. Matsumoto, *Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation*. Pain, 2007. **129**(1-2): p. 155-66.
147. Takeda, M., M. Takahashi, and S. Matsumoto, *Contribution of activated interleukin receptors in trigeminal ganglion neurons to hyperalgesia via satellite glial interleukin-1beta paracrine mechanism*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(7): p. 1016-23.
148. Thalakoti, S., V.V. Patil, S. Damodaram, C.V. Vause, L.E. Langford, S.E. Freeman, and P.L. Durham, *Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology*. Headache, 2007. **47**(7): p. 1008-23; discussion 24-5.
149. Zhang, Z., C.S. Winborn, B. Marquez de Prado, and A.F. Russo, *Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion*. J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2693-703.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Hellen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema - Interleukin-1 $\beta$  induziert Cyclooxygenase-2-abhängig eine Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> mit anschließender Sekretion des Proteins CGRP in einer Zellkultur aus trigeminalen Ganglienzellen der Ratte - selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen

Peter Hellen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Neeb L., Hellen P., Boehnke C., Hoffmann J., Schuh-Hofer S., Dirnagl U., Reuter U., *IL-1 $\beta$  stimulates COX-2 dependent PGE<sub>2</sub> synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglion cell*, PLoS One, 2011.

Beitrag im Einzelnen: Peter Hellen hat die Zellkulturen hergestellt sowie die Inhibitions- und Stimulationsversuche durchgeführt. Die EIA- und PCR-Analysen hat er selbständig geplant, ausgeführt und analysiert. Bei den Experimenten mit Western-Blot und Immunhistochemie wurde er von Sonja Blumenau (MTA) in Ausführung und Analyse begleitet und unterstützt.

Publikation 2: Neeb L., Hellen P., Hoffmann J., Dirnagl U., Reuter U., *Methylprednisolone blocks interleukin 1 beta induced CGRP release in trigeminal ganglia cells*, Molecular Pain, 2015 [in review].

Beitrag im Einzelnen: Peter Hellen hat die Zellkulturen hergestellt und die Inhibitionsversuche durchgeführt. Die EIA-Analysen hat er selbständig geplant, ausgeführt und analysiert.

Die Konzeption der beiden Studien und die Anfertigung des Manuskripts wurden von Uwe Reuter und Lars Neeb ausgeführt.

Datum

Unterschrift

---

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**Publikationsliste**

1. Neeb L., Hellen P., Boehnke C., Hoffmann J., Schuh-Hofer S., Dirnagl U., Reuter U., *IL-1 $\beta$  stimulates COX-2 dependent PGE<sub>2</sub> synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglion cell*, PLoS One, 2011.
2. Neeb L., Hellen P., Hoffmann J., Dirnagl U., Reuter U., *Methylprednisolone blocks interleukin 1 beta induced CGRP release in trigeminal ganglia cells*, Molecular Pain, 2015 [in review].

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Uwe Reuter, bei meinem Betreuer Lars Neeb und ganz besonders bei unserer medizinisch-technischen Assistentin Sonja Blumenau für die Ermöglichung meiner Promotion bedanken.