

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
der Experimentellen Anästhesiologie und Schmerzforschung,  
Klinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin,  
Uniklinik Köln**

**Veränderungen der intrazellulären  
schmerzsensibilisierenden Signaltransduktion  
sensorischer Neurone im Rattenmodell  
der diabetischen Neuropathie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Hanna Hammerich  
Tierärztin aus Köln**

**Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4048**







Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
der Experimentellen Anästhesiologie und Schmerzforschung,  
Klinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin,  
Uniklinik Köln

**Veränderungen der intrazellulären schmerzsensibilisierenden Signaltransduktion  
sensorischer Neurone im Rattenmodell der diabetischen Neuropathie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Hanna Hammerich**

Tierärztin aus Köln

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4048

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Tim Hucho  
Dritter Gutachter: PD Dr. Ann Kristin Barton

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

rats, animal models, hyperglycaemia, diabetic neuropathy, blood sugar,  
signal transduction, neuropathic pain

Tag der Promotion: 07.06.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-908-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Schmerz (akut und chronisch)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Neuroanatomie und Physiologie der Schmerzwahrnehmung	1
1.1.2	Modulierung von Schmerzsensitivität	4
1.1.3	Neurotrophine als schmerzsensibilisierende Faktoren	7
1.1.4	Die Proteinkinase A in der Schmerztransduktion	8
1.1.5	Die <i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i> in der Schmerztransduktion	10
<b>1.2</b>	<b>Diabetes &amp; Schmerz: Die diabetische Neuropathie</b>	<b>13</b>
1.2.1	Die diabetische Neuropathie in Zusammenhang mit ERK1/2	14
1.2.2	Diabetes Modelle in der Ratte: Das Streptozotocin-Modell	16
<b>1.3</b>	<b>Reduktion von Tierversuchen durch alternative Methoden – 3R</b>	<b>19</b>
1.3.1	Die <i>High Content Screening</i> Mikroskopie in der molekularen Schmerzforschung	19
1.3.2	Die <i>High Content Screening</i> Mikroskopie im Sinne der 3R	20
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	23
2.1.2	Puffer und Biochemikalien	24
2.1.3	Stammlösungen	24
2.1.4	Stimulantien	25
2.1.5	Antikörper	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Studiendesign	27
2.2.2	Tiere & Haltung	29
2.2.3	Diabetes mellitus Induktion durch Streptozotocin	29
2.2.4	Schmerzverhaltenstests	29
2.2.5	Isolation sensorischer Neurone	30

2.2.6	Stimulation und Fixation	31
2.2.7	Immunzytochemie	31
2.2.8	High Content Screening Mikroskopie	32
2.2.9	Statistische Analyse	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
3.1	Systemische Applikation von STZ induziert Hyperglykämie	34
3.2	Systemische Applikation von STZ induziert mechanische Hyperalgesie	35
3.3	Die Größenverteilung und die Expression des neuronalen Markers UCHL1 sind im STZ-Modell unverändert	36
3.4	Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten	37
3.5	Stimulation mit prototypischen inflammatorischen Mediatoren induziert im STZ-Modell eine höhere Variabilität in der schmerzrelevanten Signaltransduktion	39
3.6	STZ-Behandlung resultiert in erhöhter Neuronenzahl <i>in vitro</i>	42
3.7	Stimulation mit PG <sub>l</sub> <sub>2</sub> führt zu transienter Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp	43
3.8	Die NGF- und OSM-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 variiert im STZ-Modell	44
3.9	Die basale ERK1/2-Expression ist im STZ-Modell unverändert	46
3.10	Die NGF Dosis-Wirkungs-Kurve ist im STZ-Modell unverändert	48
3.11	Der NGF-Rezeptor TrkA wird vornehmlich in kleinen Nozizeptoren exprimiert und nicht durch STZ hochreguliert	51
3.12	Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig und korreliert mit der TrkA-Expression	53
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
4.1	Das Streptozotocin-Modell	57
4.2	Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten	59
4.3	STZ Behandlung resultiert in erhöhter Neuronenzahl <i>in vitro</i>	62
4.4	Stimulation mit PG <sub>l</sub> <sub>2</sub> führt zu transienter Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp	63
4.5	Die Variabilität der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation mit NGF und OSM	64
4.6	Einschränkungen der Arbeit und Ausblick	67



<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>83</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	83
8.2	Tabellenverzeichnis	86
8.3	Abbildungsverzeichnis	87
8.4	Publikationen	88
8.5	Danksagung	89
8.6	Selbständigkeitserklärung	90



# 1 Einleitung

## 1.1 Schmerz (akut und chronisch)

Die *International Association for the Study of Pain (IASP)* definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Die Wahrnehmung von akutem Schmerz ist eine überlebensnotwendige Schutzfunktion für den Körper von Mensch und Tier um etwaigen Gewebsschädigungen vorzubeugen. Hält der Schmerz allerdings über längere Zeit an, kommt es zu einer Beeinträchtigung der täglichen Lebensqualität. Etwa 20 % der Menschheit leiden an chronischen Schmerzen, meist verursacht durch Gewebsschädigungen, Operationen, Tumore oder systemische Krankheiten, wie z. B. Diabetes (Goldberg and McGee, 2011, Callaghan et al., 2012). Einen Aspekt der chronischen Schmerzen stellt der neuropathische Schmerz dar. Dieser wird durch direkte Nervenschädigung oder -dysfunktion hervorgerufen. Dabei werden vorrangig andauernde, stechende und brennende Schmerzen beschrieben, ohne dass am Innervationsgebiet eine Entzündung oder Gewebsschädigung vorliegt. Es entstehen Zustände der Allodynie (ein nicht schmerzhafter Reiz wird als schmerzhaft wahrgenommen) und Hyperalgesie (ein geringgradig schmerzhafter Reiz löst wesentlich stärkere Schmerzen aus) (Backonja and Stacey, 2004).

Viele dieser Patienten erhalten nur eine inadäquate Behandlung, da nicht-steroidale Antiphlogistika und Opioide meist keine ausreichende Wirkung zeigen, oder aufgrund der steigenden Nebenwirkungen nicht ausreichend hoch dosiert werden können (Sehgal et al., 2013, Dworkin et al., 2007).

### 1.1.1 Neuroanatomie und Physiologie der Schmerzwahrnehmung

Schmerz induzierende Signale werden über freie Nervenendigungen in der Haut wahrgenommen, in Aktionspotentiale umgewandelt und durch hintereinander geschaltete Neurone und ihre Axone über das Rückenmark zum Gehirn weitergeleitet (Abb. 1). Dieser Vorgang wird allgemein als Nozizeption bezeichnet. Die Zellkörper dieser primären Afferenzen der Haut liegen in den Spinalganglien im Wirbelkanal. Sie werden als pseudounipolare Nervenzellen bezeichnet, da sie am Perikaryon augenscheinlich nur einen Fortsatz aufweisen, es sich dabei aber eigentlich um zwei Fortsätze handelt, von denen ein Ast in die Peripherie (Haut) und ein zweiter Ast in das Dorsalhorn des Rückenmarkes führt (Basbaum et al., 2009). In der grauen Substanz des Zentralnervensystems wird das Signal

über eine Synapse an ein Neuron zweiter Ordnung weitergeleitet, dessen Axon auf der contra-lateralen Seite des Rückenmarks zu den Kernen im Thalamus läuft. Von dort leiten Neurone dritter Ordnung das Signal in verschiedene Hirnkortexareale weiter. Erst hier wird das Signal verarbeitet und als „Schmerz“ wahrgenommen (Mense, 2004, Apkarian et al., 2005). Die in der Haut ausgelösten Schmerzreize werden u. a. im Gyrus postcentralis verarbeitet und lokalisiert.

Die Afferenzen in der Haut werden je nach ihrer Beschaffenheit und Rezeptor-„Ausstattung“ sowohl durch mechanische, thermische sowie chemische Stimuli angeregt und können auch dementsprechend unterschieden werden. Auch die Intensität des Stimulus, der nötig ist, um eine Reaktion hervorzurufen, spielt eine Rolle. Mechano- und Thermorezeptoren leiten harmlose Reize weiter, sogenannte Nozizeptoren dagegen reagieren auf stärkere, schmerzhaft und potentiell gewebsschädigende Stimuli (Basbaum et al., 2009).

Die zugehörigen, leitenden Fasern der freien Nervenendigungen variieren morphologisch und funktionell, wobei nach ihrer Größe, Myelinisierung und der Weiterleitungsgeschwindigkeit unterschieden wird. Die A $\alpha$ / $\beta$ -Fasern sind die größten Fasern. Sie weisen einen hohen Myelinisierungsgrad auf und leiten Aktionspotentiale am schnellsten weiter. A $\delta$  Fasern sind kleiner, dünner myelinisiert und leiten mit einer mittleren Geschwindigkeit (> 2 m/s). Die dünnsten Fasern sind die unmyelinisierten C-Fasern. Sie leiten langsam (< 2 m/s) und werden vor allem mit spätem, „stumpfen“ Schmerz in Verbindung gebracht (Gold, 2013, Ringkamp et al., 2013). Die zuvor beschriebenen Nozizeptoren leiten ihre Signale vor allem über C-Fasern, aber auch über einige A $\delta$ -Fasern weiter (Cheng and Ji, 2008, Mense, 2004).

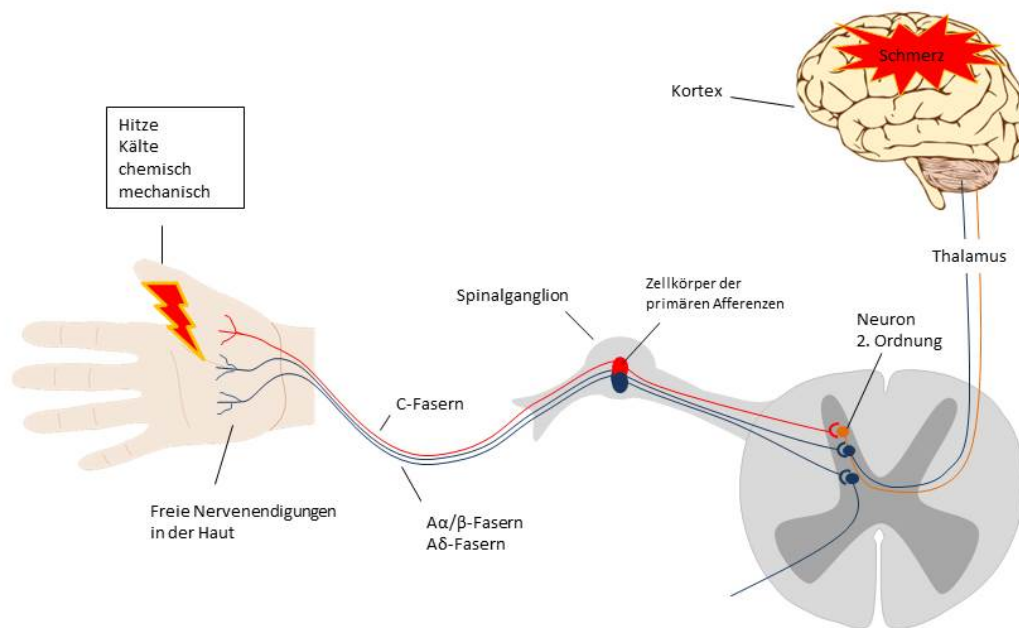
Die Gruppe der Nozizeptoren ist sehr heterogen und kann in weitere Subgruppen unterteilt werden. Diese Subgruppen stellen sich u. a. durch die Fähigkeit dar, Peptide bilden und sezernieren zu können, sowie durch die Expression bestimmter Ionenkanäle, Rezeptoren oder anderer Oberflächenproteine. Die über C-Fasern leitenden Nozizeptoren lassen sich in eine „peptiderge“ und eine „nicht-peptiderge“ Population einteilen. „Peptiderge“ Nozizeptoren haben die Fähigkeit Peptide zu bilden und zu sezernieren (Ringkamp et al., 2013, Gold, 2013, Dawes et al., 2013). Bekannte Neuropeptide, die von peptidergen Nozizeptoren gebildet werden sind z. B. Substanz P, ein Neurotransmitter und *Calcitonin Gene-Related Protein* (CGRP), eine stark vasodilatatorisch wirkende Substanz. Außerdem exprimieren sie die Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), die einen hochaffinen Rezeptor für *Nerve Growth Factor* (NGF) darstellt, einen Wachstumsfaktor, der für die Entwicklung und Differenzierung, aber auch für das Überleben pränataler Neurone unentbehrlich ist (Barbacid, 1995, Gavazzi et al., 1999).

„Nicht-peptidergen“ C-Faser-Nozizeptoren fehlt die Fähigkeit, Peptide zu sezernieren (Basbaum et al., 2009, Gascon and Moqrich, 2010). Diese Nozizeptoren sind

vergleichsweise klein und weisen eine hohe Affinität zu Isolektin B4 (IB4) auf, ein Lektin aus der Spezies *Bandeiraea simplicifolia*, das an  $\alpha$ -D-Galaktose-Moleküle bindet (Fang et al., 2006, Bogen et al., 2005).

Nozizeptoren exprimieren außerdem bestimmte Ionenkanäle, wie z. B. *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) und Nav1.8, denen verschiedene Funktionen in der Schmerzgenerierung zugeschrieben werden (Belmonte and Viana, 2008). TRPV1 ist ein hitzesensitiver Kalziumkanal, der unter anderem für Temperaturen über 42 °C und Capsaicin, einem Inhaltsstoff von Chilischoten, empfindlich ist. Nach entsprechender Stimulation kommt es durch Einstrom von divalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  zur Depolarisation der Zellmembran und somit zur Entstehung eines Aktionspotentials (Bishnoi et al., 2011). Nav1.8 gehört zu den Tetrodotoxin-resistenten, spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanälen (TTX-R), die insbesondere für die Weiterleitung von Aktionspotentialen und somit des nozizeptiven Signals von Bedeutung sind (Cheng and Ji, 2008, Gascon and Moqrish, 2010). 2014 konnte außerdem gezeigt werden, dass RII $\beta$ , eine regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), quasi ausschließlich in allen nozizeptiven Neuronen exprimiert wird (Isensee et al., 2014). Um die unmyelinisierten C-Faser-Nozizeptoren immunzytochemisch von myelinisierten A $\delta$ -Neuronen zu unterscheiden, kann Neurofilament 200 (NF-200) genutzt werden, da es mit 200 kDa das schwerste Neurofilament ist, und somit vor allem im Zytoskelett stärker myelinisierter Neurone nachweisbar ist (Cheng and Ji, 2008, Lawson and Waddell, 1991, Bae et al., 2015).

Die Zellkörper der primären Afferenzen liegen in den Spinalganglien (engl.: „*dorsal root ganglion*“, DRG). Anhand ihrer Isolation wurden bereits zahlreiche Erkenntnisse über Aufbau und Funktion der Nozizeptoren gewonnen. Um die Zusammensetzung dieser heterogenen Neuronengruppe zu bestimmen, können Antikörper für die genannten Proteine genutzt werden. Viele Neurone weisen allerdings eine Polymodalität auf, d. h. sie können durch mehrere Arten von Stimulation wie z. B. Druck und Hitze aktiviert werden. Diese Polymodalität reflektiert sich zu Teilen auch in der Zusammensetzung ihrer immunzytochemischen „Markerproteine“. Die Neurone exprimieren häufig mehrere Markerproteine und ein Großteil dieser Markerproteine wird auch von mehreren Subgruppen exprimiert. Anhand der Dichte und Verteilung ihrer Expression können jedoch trotzdem Subgruppen identifiziert und charakterisiert werden (Mense, 2004, Andres et al., 2010, Basbaum et al., 2009).



**Abbildung 1: Neuroanatomie der Nozizeption.** Freie Nervenendigungen in der Haut werden durch einen schmerzhaften und gewebsschädigenden Reiz erregt. Dieser kann thermischen, chemischen oder mechanischen Ursprungs sein. Über die Nervenfasern wird der Reiz bis in die Zellkörper der primären Affferenzen im Spinalganglion und von dort aus weiter in das Rückenmark geleitet. Nozizeptoren sind hauptsächlich C-Fasern, aber auch A $\delta$ -Fasern. Nach der Verschaltung im Hinterhorn werden die Reize über aufsteigende Bahnen zum Thalamus und dann in den Hirnkortex geleitet. Erst dort erfolgt die Schmerzempfindung.

### 1.1.2 Modulation von Schmerzsensitivität

Die Wahrnehmung von Schmerz im Gehirn durch das Signal eines Nozizeptors benötigt immer einen auslösenden Reiz, der einen bestimmten Schwellenwert an der freien Nervenendigung übersteigt und somit ein Aktionspotential auslöst. Dieser Schwellenwert ist allerdings nicht statisch, sondern kann in jedem Nozizeptor durch zahlreiche Einflüsse moduliert werden (Lewin, 1993, Khasar et al., 1999, Woolf and Salter, 2000, Basbaum et al., 2009, Hucho and Levine, 2007). Eine Verringerung des Schwellenwertes wird als Sensibilisierung bezeichnet. Ein solcher Einfluss kann ein zuvor erfolgter mechanischer oder thermischer Reiz sein, oder auch eine chemische Substanz, die exogen oder endogen z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion vermehrt gebildet wurde. Durch diese periphere Sensibilisierung wird der Schwellenwert der Nozizeptoren herabgesetzt und auch schwächere, normalerweise harmlose Reize führen zur Entstehung eines Aktionspotentials. Es kommt zu Allodynie und Hyperalgesie (Basbaum et al., 2009). Dieser Zustand kann als

Warnmechanismus im Körper dienen, wenn z. B. eine verletzte Körperstelle geschont werden soll, um den Heilungsprozess nicht zu beeinträchtigen. Hält die Hyperalgesie allerdings länger an, kommt es zu chronischen Schmerzen, die meist nicht mehr adäquat behandelt werden können und mehr und mehr zur Beeinträchtigung der Lebensqualität der betroffenen Person führen.

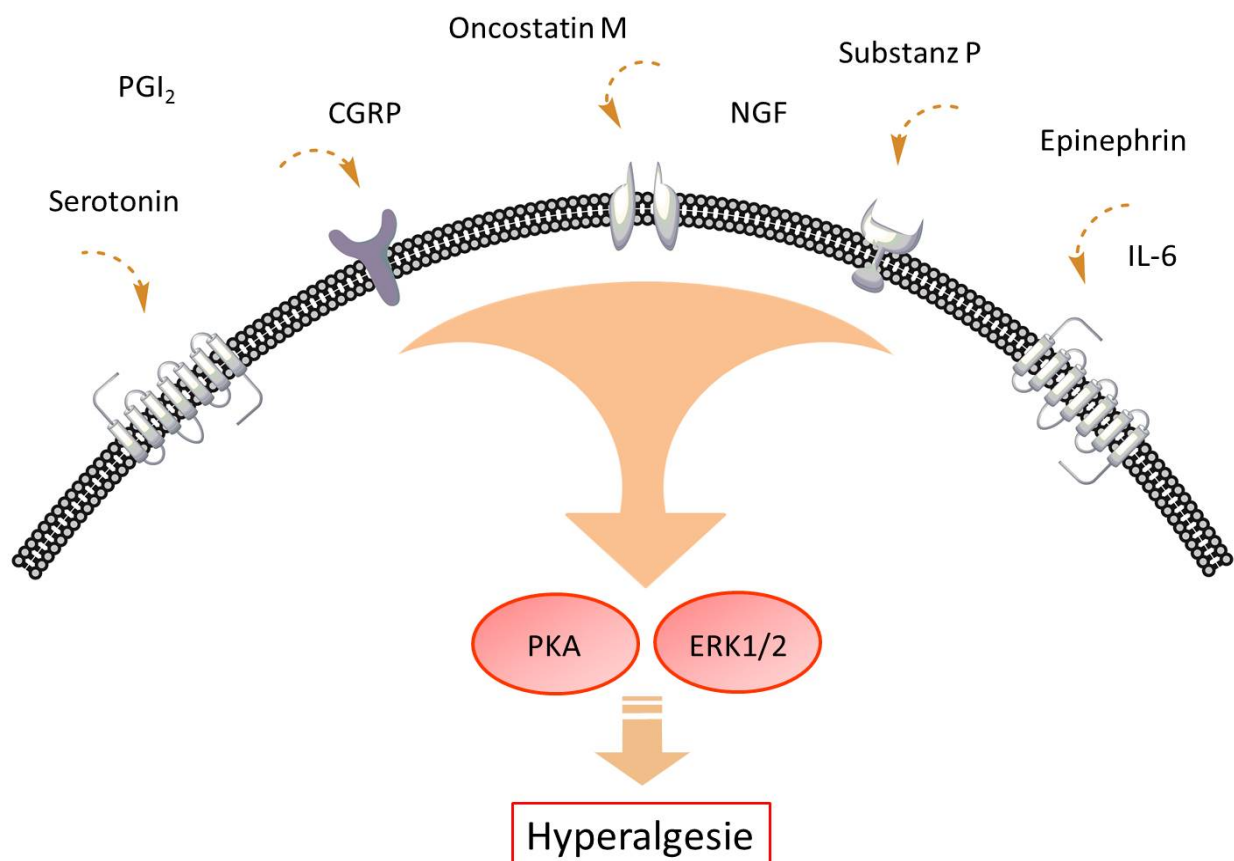
Die Schmerzsensibilität kann jedoch nicht nur durch Veränderung im peripheren Gewebe, sondern auch durch die Nozizeptoren selbst verändert werden. Kommt es zur Schädigung der Nervenfasern durch ein Trauma, Virus oder metabolische Veränderung wie z. B. Diabetes, sind sie in der Lage selbst Peptide wie CGRP und Substanz P in die Peripherie zu transportieren und dort zu sezernieren und können so eine neurogene Entzündung hervorrufen (Russo, 2015, Zochodne, 2015). Außerdem kommt es zu intrazellulären Veränderungen, die unter anderem zu einer Hochregulierung von Ionenkanälen und Rezeptoren führen, wodurch der Nerv sensibler wird. Beide Vorgänge werden als Mechanismen der Entstehung des neuropathischen Schmerzes diskutiert.

Die intrazellulären Mechanismen der Sensibilisierung sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist unter anderem, dass einige inflammatorische Mediatoren (z. B. Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ )) durch Bindung an entsprechende Rezeptoren zur Aktivierung von Adenylatzyklen und somit zur Freisetzung des sekundären Botenstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in Nozizeptoren führen (Bhave et al., 2002, Gold et al., 1998). Das freigesetzte cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche dann Ionenkanäle phosphoryliert und somit deren Öffnungswahrscheinlichkeit verändert. Auf diese Weise kann die neuronale Erregbarkeit und die Weiterleitung von Aktionspotentialen entlang der Axone moduliert werden. Die Aktivität von PKA ist in sensibilisierten Neuronen nachweislich erhöht und durch eine Hemmung mit spezifischen Inhibitoren kann die Hyperalgesie reduziert werden (Aley and Levine, 1999, Gold et al., 1998, Taiwo and Levine, 1991, Sachs et al., 2009).

Auch der *Extracellular-signal regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) wird eine Schlüsselfunktion für die Sensibilisierung von Nervenzellen zugeschrieben. Neben den Signalwegen über PKA und PKC konnte der Signalweg zu ERK1/2 als ein weiterer, unabhängiger Weg zur Sensibilisierung der Neurone beobachtet werden, auch wenn die von ihr regulierten Zielproteine noch weitestgehend unklar bleiben (Aley et al., 2001). Nach Stimulation membranständiger Tyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine aus dem peripheren Gewebe kommt es über verschiedene Signalwege zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK1/2 (Ji, 2004). Auf diese Weise aktiviert z. B. Adrenalin ERK1/2 in Neuronen der Spinalganglien über einen PKA unabhängigen Signalweg und führt zu Hyperalgesie (Aley et al., 2001). Diese kann durch Hemmung einzelner Komponenten des Signalweges zu ERK1/2 wieder reduziert werden. Auch eine direkte, schmerzhaft

Stimulation der Nozizeptoren führt im Tiermodell zu erhöhter ERK1/2-Phosphorylierung in den Neuronen (Galan, 2003, Donnerer and Liebmann, 2010).

Die Applikation von NGF führt ebenfalls zur Schmerzsensibilisierung und aktiviert in diesem Zusammenhang auch ERK1/2 (Impey et al., 1999, Ji et al., 2009, Obata and Noguchi, 2004, Lewin et al., 1994, Aley et al., 2001). Ebenso konnte nach Ligatur des N. ischiadicus erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung gemessen werden, die zu neuropathischen Schmerzen führt (Kiguchi et al., 2009). Diese entstandene Hyperalgesie kann entsprechend durch spezifische Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung verringert werden, (Dai et al., 2002) weshalb der schmerzinduzierende Signalweg zu ERK1/2 auch als Therapieansatz zur Behandlung neuropathischer Schmerzen diskutiert wird (Ji et al., 2009, Donnerer and Liebmann, 2010, Edelmayer et al., 2014).



**Abbildung 2: Modulation von Schmerzempfindlichkeit.** Entzündungsmediatoren und andere schmerzsensibilisierende Substanzen binden an verschiedene Rezeptorklassen, die wiederum unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Zentrale Konvergenzpunkte für die Schmerzsensibilisierung von nozizeptiven Neuronen sind dabei die Kinasen ERK1/2 und PKA. Aktivierung dieser Kinasen führt zur Hyperalgesie, da sie Ionenkanäle modulieren, in die Freisetzung von Neuropeptiden involviert sind und die Regulation schmerzrelevanter Gene bewirken (modifiziert nach Hucho 2007).



### 1.1.3 Neurotrophine als schmerzsensibilisierende Faktoren

Auf der Suche nach relevanten schmerzsensibilisierenden Faktoren gerieten neben Prostaglandinen und Zytokinen unter anderem Neurotrophine vermehrt in den Fokus der Forschung. Neurotrophine sind endogen gebildete Wachstumsfaktoren, die vor allem vom jeweiligen Zielgebiet der Innervation eines Nervs sezerniert werden und für Wachstum und Differenzierung des Nervensystems notwendig sind. In der Entwicklungsphase des peripheren Nervensystems konkurrieren die Zellen um diese nur limitiert vorhandenen Faktoren und nur Fasern, die genügend Neurotrophine binden können, überleben. Die übrigen Nervenzellen sterben durch Apoptose (Khan and Smith, 2015, Skaper, 2008, Lewin and Barde, 1996). Im ausdifferenzierten Nervensystem spielen Neurotrophine ebenfalls eine wichtige Rolle, z. B. in der Modulation der Schmerzsensibilität (Huang and Reichardt, 2001, Khan and Smith, 2015, Lewin, 1993, Gold and Gebhart, 2010). Inzwischen ist bekannt, dass sympathische Neurone auch selbst fähig sind Neurotrophine zu sezernieren und dadurch zu einer Steigerung der Konzentration dieser Faktoren in der Peripherie beitragen (Hasan et al., 2003).

Zur Gruppe der Neurotrophine gehören *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3, -4 und -5, (NT-3, NT-4, NT-5) sowie *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF). Sie werden alle zunächst als Vorläufermoleküle synthetisiert und dann durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt (Lee et al., 2001, Seidah et al., 1996). NGF wurde als erstes entdeckt und charakterisiert und gilt als prototypisches Neurotrophin (Levi-Montalcini and Angeletti, 1963). NGF bindet an die von Neuronen und anderen Zellen exprimierte Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), während BDNF, NT-4/-5 an Tropomyosinrezeptorkinase B (TrkB) und NT-3 an die Tropomyosinrezeptorkinase C (TrkC) binden (Huang and Reichardt, 2003). Diese Tyrosinkinase stellen die hochaffinen Rezeptoren für Neurotrophine dar (Clary and Reichardt, 1994, Benedetti et al., 1993). Es existiert noch ein weiterer Rezeptor, der p75<sup>NTR</sup>, der alle Neurotrophine mit niedriger Affinität bindet und eher eine regulatorische Rolle in Bezug auf die Trk-Bindung spielt (Barbacid, 1995, Khan and Smith, 2015, Skaper, 2012, Benedetti et al., 1993).

Nach Bindung von NGF an TrkA kommt es zur Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase. Diese wiederum aktiviert durch Phosphorylierung dann weitere, nachgeschaltete Proteine, wodurch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ablaufen (Ibáñez et al., 1993). Einer dieser Signalwege führt über Ras-Moleküle zur Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinasen), zu denen neben p38 und *c-Jun-N-terminal-kinase* (JNK) auch die ERK1/2 gehört (Cobb, 1999, Averill et al., 2001, Sammons et al., 2000, Bron et al., 2003).

Frühere Studien an Lepra-Patienten, aber auch bei Diabetikern, die an neuropathischen Symptomen litten, wiesen auf einen erniedrigten NGF-Gehalt in der Haut hin. Der Verlust von NGF wurde als Ursache für die Entstehung der Hypersensibilität und der neuropathischen Schmerzen diskutiert (Anand, 1996), die dementsprechend durch exogene NGF-Zufuhr als Therapeutikum revidiert werden kann (Aloe et al., 2000, Apfel and Kessler, 1996). Kontrovers dazu wird in neueren Studien eher von einer Steigerung der NGF-Expression oder aber einer verstärkten Wirkung von NGF ausgegangen. In verschiedenen neuropathischen Modellen wurde eine erhöhte NGF-Expression gezeigt (Cheng et al., 2009) und nach der intradermalen Injektion von NGF kommt es zu länger andauernder lokaler Hypersensibilität bezüglich Hitze, Kälte und mechanischen Einflüssen (Rukwied et al., 2010, Lewin and Mendell, 1993). Diese Sensibilisierung hängt vermutlich mit der NGF induzierten ERK1/2-Phosphorylierung zusammen. Eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung nach der Injektion von NGF wurde in hyperalgetischen Tiermodellen sowie im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen beim Menschen beobachtet. Dabei treten hyperalgetische Effekte sowohl lokal an der intradermalen oder intramuskulären Injektionsstelle auf, aber auch nach systemischer Applikation von NGF (Lewin, 2014, Averill et al., 2001, Malik-Hall et al., 2005, Svensson et al., 2003, Dyck et al., 1997, Lewin, 1993). Die Behandlung mit NGF-Antikörpern, sowie eine Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung führt zu einer Verminderung der Hypersensibilität (Marlin and Li, 2015, Edelmayer et al., 2014, Malik-Hall et al., 2005, Dai et al., 2002, Aley et al., 2001). Welche Zielproteine die erhöhte Erregbarkeit der Nozizeptoren schlussendlich beeinflussen, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber deutlich erkennbar, dass NGF und der intrazelluläre Signalweg zu ERK1/2 einen zentralen Mechanismus der Sensibilisierung darstellen.

#### **1.1.4 Die Proteinkinase A in der Schmerztransduktion**

Die Proteinkinase A (PKA) ist vermutlich die am besten untersuchte intrazelluläre Kinase. In Eukaryoten setzt sich die vollständige Kinase aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten zusammen, von denen jeweils verschiedene Isoformen existieren. Diese Isoformen haben verschiedenste Funktionen, wie z.B. die Modifikation von Synapsen und Ionenkanälen. Bisher wurden vier regulatorische (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) und vier katalytische Untereinheiten (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ , PrKX) identifiziert (Abb. 3). Je nach Gewebe und Funktion kommt es zur Bildung spezifischer Tetramere, die anhand der regulatorischen Untereinheiten in PKA-I (RI $\alpha$ , RI $\beta$ ) und PKA-II (RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) eingeteilt werden. Während RI $\alpha$  und RII $\alpha$  ubiquitär im Gewebe vorkommen, lassen sich im peripheren Nervensystem vor allem die  $\beta$ -Untereinheiten nachweisen. Dabei kommt der RII $\beta$  Untereinheit eine

Sonderstellung zu, da sie nur in der nozizeptiven Untergruppe der sensiblen Neuronen nachweisbar ist (Isensee et al., 2014).

Im inaktiven PKA-Holoenzym binden die katalytischen Untereinheiten eine inhibitorische Domäne (Inhibitor site, IS) der regulatorischen Untereinheiten. Diese inhibitorische Domäne stellt bei RI-Untereinheiten ein nicht-phosphorylierbares Pseudosubstrat dar. Im Gegensatz dazu beinhalten RII-Untereinheiten eine phosphorylierbare inhibitorische Domäne, die mit phospho-spezifischen Antikörpern detektiert werden kann (Isensee et al., 2014). Derzeit wird davon ausgegangen, dass je ein Dimer von RII-Untereinheiten mit der bereits ATP-geladenen katalytischen Untereinheit assoziiert vorliegt, was zur Autophosphorylierung der RII-Untereinheiten führt, jedoch noch keine Aktivität der katalytischen Untereinheit hervorruft (Zhang et al., 2012).

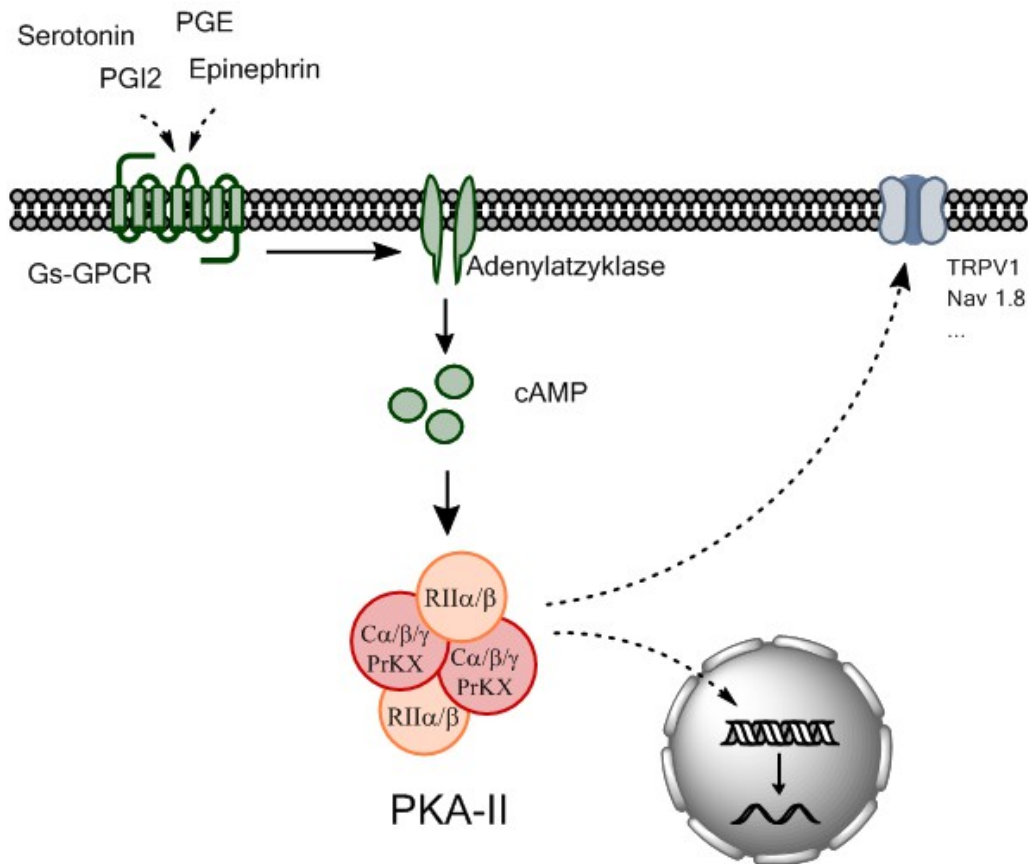
Nach Aktivierung von stimulierenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ( $G_s$ -GPCRs) durch Entzündungsmediatoren wie z. B. Prostazyklin ( $PGI_2$ ) oder Serotonin kommt es durch die Adenylatzyklase zur Bildung von cAMP. Je zwei Moleküle cAMP binden an eine RII-Untereinheit, was dann zur Dissoziation des PKA-Holoenzym führt (Abb. 3). Durch diesen Vorgang werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und somit aktiv. Bei der Dissoziation des Holoenzym wird zudem die inhibitorische Domäne der regulatorischen Untereinheit zugänglich und kann dann mit phospho-spezifischen Antikörpern detektiert werden (Isensee J, unpublizierte Resultate). Eine Erhöhung des Phospho-RII-Signals (pRII) korreliert daher mit der Dissoziation von PKA und somit auch mit ihrer Aktivität.

Die aktivierten, katalytischen Untereinheiten können nachgeschaltete Faktoren an ihrer Serin oder Threonin enthaltenden Sequenz erkennen und phosphorylieren. Somit kommt es unter anderem zu Modifikation von Transkriptionsfaktoren wie z. B. *cAMP response element binding protein* (CREB) (Thomson et al., 2008) und Ionenkanälen wie z. B. Nav1.8 und TRPV1, weshalb der PKA eine zentrale Rolle im Vorgang der Schmerzsensitivierung zugeschrieben wird (Aley and Levine, 1999, Sachs et al., 2009, Gold et al., 1998, Bhave et al., 2002, Thomson et al., 2008).

Schon 1989 konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass die Sensibilisierung primärer afferenter Neurone durch den cAMP-Signalweg vermittelt wird, eine Aktivierung von PKA auslöst und eine entsprechende Hemmung dieses Signalweges zu Verminderung der Hyperalgesie führt (Taiwo et al., 1989, Bhave et al., 2002). Dabei wurde auch erkannt, dass vor allem die Aktivierung der PKA einen wichtigen Drehpunkt darstellt, da sie auch ohne erneute Aktivierung durch cAMP über mehrere Tage aktiviert bleibt und so den Zustand der Hyperalgesie aufrecht erhält (Aley and Levine, 1999).

Weitere Forschungen zeigten, dass nicht dieser Weg alleine zur Sensibilisierung von Neuronen führt, sondern zahlreiche weitere, teilweise miteinander interagierende Kinasen

wie Proteinkinase C (PKC) und andere MAP-Kinasen eine Rolle spielen (Sachs et al., 2009, Aley et al., 2001).



**Abbildung 3: Die PKA-II Aktivierungskaskade:** Entzündungsmediatoren wie z. B. PGI<sub>2</sub> binden an stimulierende G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G<sub>s</sub>-GPCR). Diese aktivieren die Adenylatzyklase, welche cAMP generiert. Durch Bindung von je zwei cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten der PKA-II kommt es zur Dissoziation des Holoenzym und die katalytischen Untereinheiten werden freigesetzt. Diese phosphorylieren nachgeschaltete Serin und Threonin enthaltende Proteine wodurch es zur Modifikation von Ionenkanälen und Veränderungen in der Transkription kommt (Isensee et al., 2014).

### 1.1.5 Die *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* in der Schmerztransduktion

ERK1/2 ist eine Serin/Threoninkinase und gehört zu den MAP-Kinasen. Sie spielt eine Rolle bei Sensibilisierungsvorgängen in Neuronen, bei neuropathischen Schmerzen, sowie bei weiteren zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Proliferation, Lernprozessen und Erinnerung (Lewis et al., 1998, Widmann et al., 1999, Aley et al., 2001).

Der bisher bekannteste ERK1/2 aktivierende Signalweg beginnt mit der Stimulation der Nervenzelle durch Zytokine, Adrenalin oder aber Neurotrophine wie z. B. NGF. G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. Tyrosinkinasen führen über aktivierte Ras-Proteine zur Aktivierung von Raf-Kinasen. Diese wiederum phosphorylieren MAPK/ERK-Kinasen (MEK),

wodurch es schließlich zur Aktivierung von MAP-Kinasen kommt, zu denen neben p38 und c-JNK auch ERK1/2 gehört (Cobb, 1999, Huang and Reichardt, 2003, Ko et al., 2016) (Abb. 4).

Neben diesem Hauptweg wird auch noch die ERK1/2-Phosphorylierung durch die cAMP abhängige PKA, sowie die PKC diskutiert (Hundle et al., 1995, Ji et al., 2009).

In den Vorgängen der Sensibilisierung peripherer Neurone spielt die MAP-Kinase ERK1/2 eine zentrale Rolle. Phosphorylierte ERK1/2 (pERK) wurde vermehrt in durch NGF induzierten Zuständen der Hyperalgesie gemessen (Averill et al., 2001, Lewin et al., 1994, Kiguchi et al., 2009, Delcroix et al., 2003, Safieh-Garabedian et al., 1997, Aley et al., 2001). Nach Stimulation mit Adrenalin und damit einhergehender Sensibilisierung der primären Afferenzen wurde die PKA und PKC unabhängige ERK1/2-Phosphorylierung nachgewiesen, wodurch der zusätzliche Signalweg in den Fokus der Forschung rückte (Aley et al., 2001). Aber auch Bradykinin, ein weiterer Entzündungsmediator, der zu Hyperalgesie führt, induziert ERK1/2-Phosphorylierung (Clark and Murray, 1995). Bei Untersuchungen in primären Afferenzen wurde gezeigt, dass eine periphere Entzündung einen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung hervorruft. Diese Erhöhung wiederum führte zu persistierenden Schmerzen und wurde auch bei Modellen zur Untersuchung des neuropathischen Schmerzes beobachtet (Obata et al., 2004, Obata and Noguchi, 2004). Im Rattenmodell führten schädliche Kälte- und Hitzereize zu einem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung in den Spinalganglien (Donnerer and Liebmann, 2010).

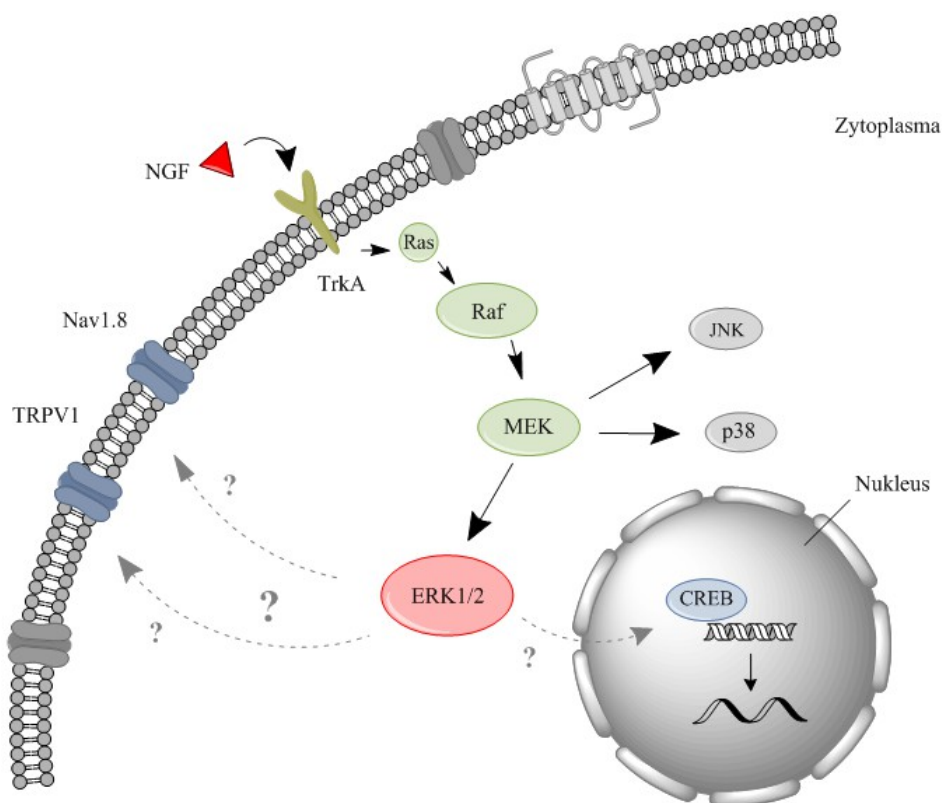
In Neuronen des Dorsalhorns im Rückenmark konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 normalerweise nur durch heftige, schmerzhafte und dementsprechend durch Nozizeptoren vermittelte Reize aktiviert wird. Solche Reize sind z. B. noxische Stimuli wie Formalin oder Capsaicin (Ji et al., 2009, Huang et al., 2000, Dai et al., 2002). Nach vorangegangener Nervenschädigung genügten jedoch bereits leichte, harmlose elektrische Signale, die unter normalen Umständen nicht für einen Reiz ausreichen würden, und führten zur ERK1/2-Phosphorylierung (Wang et al 2004).

Die mit der ERK1/2-Phosphorylierung entstandene Hypersensibilität der Neurone kann durch eine spezifische Inhibition dieser Kinase reduziert werden (Marlin and Li, 2015, Edelmayer et al., 2014, Aley et al., 2001). In einer Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die NGF induzierte Hochregulation von TRPV1, die eine erniedrigte Reizschwelle nach sich zieht, ebenfalls durch einen MEK-Inhibitor revidiert wird (Bron et al., 2003).

ERK1/2 stellt also einen zentralen Drehpunkt in sensiblen Neuronen dar, der durch viele verschiedene Mechanismen und Mediatoren beeinflusst wird. In Untersuchungen zu schmerzsensibilisierenden Einflüssen durch Zytokine oder Neurotrophine stellt sie einen

konvergierenden Punkt der Signalkaskaden dar und kann daher als integrative Messgröße für sensibilisierende Effekte herangezogen werden.

Die Zielproteine von ERK1/2 sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es ist jedoch bekannt, dass posttranslationale Faktoren, wie Ionenkanäle und weitere Kinasen beeinflusst werden, wodurch die schnellen, innerhalb weniger Minuten beginnenden Veränderungen erklärt werden können. Studien weisen darauf hin, dass ERK1/2 den Rezeptor TRPV1 und Natriumkanäle, insbesondere Nav1.8 modifiziert, wodurch ihre Öffnungswahrscheinlichkeit verändert wird und der Nozizeptor in einen hyperalgetischen Zustand überführt wird (Zhuang et al., 2004, Ji et al., 2002, Qiao, 2014, Bron et al., 2003). Des Weiteren findet die Translokation in den Zellkern statt und ERK1/2 reguliert dort Transkriptionsfaktoren wie z. B. CREB, was wiederum zu späteren, längerfristigen Veränderungen in den Neuronen führt (Obata and Noguchi, 2004, Bron et al., 2003).



**Abbildung 4: Die NGF – ERK1/2 Signalkaskade:** Nach Bindung von NGF an TrkA kommt es zu Dimerisierung der Tyrosinkinase und zur Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine. Über Ras, Raf und MEK wird ERK1/2 aktiviert. Es kommt zur Hyperalgesie. Die genauen Zielproteine von ERK1/2 sind noch nicht bekannt, die Modifikation von Ionenkanälen wie Nav1.8 und TRPV1, sowie die Aktivierung von CREB im Zellkern werden diskutiert (Malik-Hall et al., 2005, Andres et al., 2010)

## 1.2 Diabetes & Schmerz: Die diabetische Neuropathie

Die *American Diabetes Association* (ADA) definiert Diabetes als eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen, die klinisch durch Hyperglykämie charakterisiert wird und durch gestörte Insulinsekretion oder -metabolismus verursacht wird (Association, 2010). Dabei variieren die Erscheinungstypen von subklinisch bis zum Entgleisen der Stoffwechsellage in die Ketoazidose. Typische Symptome als Folge der Hyperglykämie sind Polyurie und Polydipsie, manchmal auch in Kombination mit Polyphagie. Es kann zu Einschränkungen im Sehvermögen kommen und oft wird eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen beobachtet. Als Langzeit-Komplikationen sind auch andere Organe wie Nieren, Nerven, Herz und Blutgefäße betroffen.

Laut der *International Diabetes Federation* (IDF) litten 2014 über 387 Millionen Menschen an Diabetes. Die Prävalenz lag bei 8,33 % und bis zum Jahr 2035 wurde ein Anstieg auf 592 Millionen Menschen prognostiziert. Die Zahl der Todesfälle aufgrund von Diabetes lag 2014 bei 4,9 Millionen Menschen. Allein in Deutschland wurde die Zahl der an Diabetes erkrankten Menschen auf 7,6 Millionen geschätzt (Beagley et al., 2014, Guariguata et al., 2014, da Rocha Fernandes et al., 2016).

In der Humanmedizin werden zwei Haupttypen von Diabetes unterschieden, wobei nicht jeder Patient immer eindeutig einer Gruppe zuzuordnen ist:

Diabetes mellitus Typ 1 oder auch Insulin-abhängiger Diabetes mellitus entsteht, wenn es zu einer Zerstörung oder Funktionsstörung des Pankreas kommt und nicht mehr genug Insulin gebildet bzw. sezerniert wird. Oft geschieht dies durch eine Autoimmunreaktion gegen die Insulin bildenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Dieser Typ tritt vor allem bei Patienten im Kindes- und Jugendalter auf und lässt sich in den meisten Fällen mit regelmäßigen Insulin Injektionen behandeln, bzw. kontrollieren (Atkinson and Maclaren, 1994).

Diabetes mellitus Typ 2 hingegen wird auch als Insulin-unabhängiger Typ bezeichnet, da der Pankreas prinzipiell genügend Insulin produziert, in den peripheren Zellen aber eine relative Insulinresistenz vorliegt und der Zucker nicht in die Zellen aufgenommen wird. Diabetes mellitus Typ 2 betrifft eher Erwachsene, die häufig gleichzeitig Adipositas zeigen. In diesem Fall ist die Behandlung mit exogener Insulinzufuhr normalerweise zunächst nicht indiziert. Die Therapie basiert vor allem auf Nahrungsumstellung, Steigerung der Aktivität und somit Gewichtsreduktion (Kahn, 2000). In beiden Fällen kann es zu Langzeit- bzw. Folgeschäden kommen, die in der Literatur in makro- und mikrovaskulär unterteilt werden (Forbes and Cooper, 2013, Fowler, 2008). Makrovaskuläre Komplikationen sind z. B. kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen sowie Myokardinfarkte. Sie werden durch Schäden an größeren Arterien verursacht. Die mikrovaskulären Erkrankungen entstehen vor allem durch Schäden an kleinen Gefäßen in der Peripherie. Hierzu zählen z. B. Retinopathie,

Nephropathie und auch die schmerzhafte Neuropathie (Fowler, 2008, Callaghan et al., 2012).

Ob und wann Folgekomplikationen entstehen ist noch nicht vollständig geklärt. Während genetische Faktoren und Polymorphismen diskutiert werden, steht momentan vor allem die späte Diagnose und damit lang andauernde Hyperglykämie bzw. die mangelhafte Einstellung des Blutzuckerspiegels als Prädisposition im Vordergrund (Forbes and Cooper, 2013, Fowler, 2008).

### **1.2.1 Die diabetische Neuropathie in Zusammenhang mit ERK1/2**

Die diabetische Neuropathie zählt neben Retinopathie und Nephropathie zu den häufigsten Komplikationen in diabetischen Patienten. Die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten variieren zwischen 20 – 50 % aller erkrankten Patienten (Forbes and Cooper, 2013, Ziegler et al., 2014). In Deutschland wurden 2014 für die Entwicklung einer Neuropathie Prävalenzen von 27 % in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 20 % in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ermittelt (Heller et al., 2014)

Die Symptome, Lokalisationen und Ausprägungen sind vielfältig und variieren von Hyperalgesie und Schmerz bis zu Taubheit. Diese Varianz erschwert eine klare Einteilung und eindeutige diagnostische Kriterien um eine frühe Diagnose zu gewährleisten. Veränderung in der Wahrnehmung von Vibration und die Detektion früher Veränderungen von Nervenfasern in der Cornea mit Hilfe der konfokalen Cornea Mikroskopie werden als Diagnostika herangezogen (Ahmed et al., 2012, Callaghan et al., 2012).

Es werden verschiedene Erscheinungsformen der diabetischen Neuropathie definiert, wobei es sich meist um eine lokalisationsbedingte Einteilung handelt. Die häufigste Form stellt die distale sensomotorische Polyneuropathie (DSP) dar. Die Symptome beginnen im Bereich der Zehen und Füße und breiten sich dann, meist symmetrisch, nach proximal aus. Daneben kommen aber auch Radikuloplexopathien, „*small-fiber predominant neuropathy*“ und Neuropathien des autonomen Nervensystems vor (Callaghan et al., 2012).

Die Symptome variieren von Patient zu Patient, lassen sich aber meist im frühen Stadium als Brennen oder Stechen bezeichnen. Im späten Stadium sind sie eher mit Taubheit verbunden, was auf ein Absterben der Nervenzellen hindeutet. Dabei leidet nicht jeder Patient zwangsweise an allen Symptomen. Oft zeigen die Patienten aber auch Hyperalgesie oder Allodynie, sowie nächtlichen Schmerz (Ziegler et al., 2014, Abbott et al., 2011, Callaghan et al., 2012)

Bei der DSP kommt es vor allem im distalen Bereich der Extremitäten zu Problemen in der sensorischen Wahrnehmung, wodurch die Gefahr von Fußverletzungen, Ulzerationen und Stürzen steigt. Diese Folgen führen zu deutlicher Reduktion der Lebensqualität und im



späteren Verlauf der Erkrankung nicht selten zur Amputation der distalen Gliedmaße (Ziegler et al., 2014).

Als Risikofaktoren für die Entstehung einer diabetischen Neuropathie gelten vor allem die Dauer der Erkrankung, das Alter, sowie die unzureichenden Kontrollen der Hyperglykämie und die dementsprechend mangelhafte Einstellung des Diabetes. Die Prävention der Neuropathie durch frühe Diagnose des Diabetes sowie die regelmäßige Glukosekontrolle und Korrektur der Hyperglykämie sind nach heutigem Stand der Wissenschaft enorm von Bedeutung, da die Therapiemöglichkeiten der diabetischen Neuropathie sehr begrenzt sind. (Callaghan et al., 2012, Ziegler et al., 2014, Peltier et al., 2014, Reichard et al., 1996). Andererseits zeigte sich in einigen Studien nur ein minimaler Effekt der engen Glukosekontrollen auf die Prävention der Neuropathie (Ismail-Beigi et al., 2010). Als symptomatische Therapie werden Opiode, nicht-steroidale Antiphlogistika und andere Schmerzmittel verwendet, um die schmerzhaften Phasen zu überbrücken. Diese zeigen aber häufig keine adäquate Wirkung und unterliegen außerdem dem Gewöhnungseffekt (Sehgal et al., 2013). Eine effektive Kausaltherapie auf Basis der Pathogenese der diabetischen Neuropathie ist noch nicht bekannt. Einige Wirkstoffe bzw. Ansätze sind jedoch in den letzten Jahren intensiv erforscht worden, sodass bereits präklinische und auch klinische Studien durchgeführt werden. Dabei handelt es sich insbesondere um Ionenkanalblocker (z. B. Nav1.7 und Nav1.8.), Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF und NGF) sowie Aldose-Reduktase-Blocker (Papanas and Ziegler, 2016, Hulse et al., 2015, Rivara and Zuliani, 2016, Bril and Buchanan, 2006).

Als Ursache der Neuropathie wurde lange vor allem die durch mikrovaskuläre Schädigung entstehende, lokale Ischämie im Bereich der Nervenendigungen gesehen. Unklar ist jedoch, was in den Neuronen passiert. Verschiedene intrazelluläre Signalwege scheinen an der Entstehung beteiligt zu sein. Viel diskutiert werden vor allem der Polyol-Signalweg, die erhöhten glykolisierten Endprodukte und der Hexosamin-Signalweg. Alle diese sind Konsequenzen der Hyperglykämie und führen zu oxidativem Stress und somit zu Apoptose (Leininger et al., 2004).

Zochodne fasste 2015 die verschiedenen bekannten molekularen Veränderungen in Neuronen zusammen und kam zu dem Schluss, dass die Ischämie nicht alleine die Ursache sein kann (Zochodne, 2015). Es gibt außerdem derzeit keine bekannten Studien, in denen die Durchblutung im Gewebe von absterbenden Nervenzellen gemessen wurde, bzw. mit der Entstehung einer Neuropathie in Korrelation gebracht werden konnte. Zudem wurde der Ischämie in weiteren Studien eher eine sekundäre Rolle in Folge der diabetischen Neuropathie zugeschrieben (Forbes and Cooper, 2013).

Auch Sima und Sugimoto schlussfolgerten schon 1999, dass nicht nur die Hyperglykämie Ursache der Neuropathie ist (Callaghan et al., 2012, Sima and Sugimoto, 1999).

Bei Untersuchungen zu Auswirkungen der diabetischen Neuropathie auf MAP-Kinasen liegen noch nicht viele Ergebnisse vor. In unterschiedlichen Tiermodellen neuropathischen Schmerzes wurde jedoch eine gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung gemessen, wie z. B. bei Untersuchungen in spinalen Neuronen des Dorsalhorns, in denen MEK-Kinasen als ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt identifiziert wurden. Das Maß der Hyperalgesie korrelierte mit der gesteigerten ERK1/2-Phosphorylierung. Die Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung revidierte die Allodynie (Zhuang et al., 2005, Ciruela et al., 2003). Zudem wurden in Fasern des N. ischiadicus, in dorsalen Wurzelganglien sowie in Colon innervierenden Neuronen hyperalgetischer Tiere ein erhöhter Gehalt an pERK gemessen (Stavniichuk et al., 2012, Stavniichuk et al., 2013, Grabauskas et al., 2011). Bei Menschen mit Neuropathie wurden ebenfalls vermehrt phosphorylierte MAP-Kinasen nachgewiesen (Purves et al., 2001). In STZ induzierten diabetischen Ratten korrelierte die gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung mit dem Maß der Hyperalgesie. Die Inhibition von ERK1/2 revidierte dabei ebenfalls die Allodynie (Ciruela et al., 2003).

Als bekannte Stimulantien von ERK1/2 und anderen intrazellulären Signalproteinen wurden auch Neurotrophine im Zusammenhang mit der diabetischen Neuropathie untersucht. Erniedrigte NGF-Serumkonzentrationen wurden in diabetischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden bereits vor vielen Jahren gemessen (Hellweg et al., 1991, Faradji and Sotelo, 1990) und es wurde eine negative Korrelation zwischen der NGF-Konzentration und der kornealen Nervenfasernlänge sowie -verzweigung beobachtet (Anand et al., 1996). Der verminderte Gehalt an Substanz P und CGRP in diabetischen Patienten ist vermutlich ebenfalls auf die Abwesenheit von NGF zurückzuführen, da NGF in gesunden Phänotypen die Produktion induziert (Sango et al., 1994, Diemel et al., 1994).

Die Forschung beschäftigte sich intensiv mit NGF als mögliche Therapieoptionen der Neuropathie und brachte vielversprechende Ergebnisse im Tiermodell und auch in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien (Tiaka et al., 2011).

### **1.2.2 Diabetes Modelle in der Ratte: Das Streptozotocin-Modell**

Schon in den 50er Jahren wurde mit Tiermodellen gearbeitet um menschliche Krankheits- und Symptomkomplexe aufzuarbeiten und nach Möglichkeit wirksame Behandlungsansätze zu entwickeln. Im Laufe der Jahre wurden dabei zahlreiche Rattenmodelle der diabetischen Neuropathie entwickelt. Die verschiedenen Modelle lassen sich in genetische Modelle, sowie substanz- und diätinduzierte Modelle einteilen. Zum Überblick sind die verschiedenen Modelle in Tabelle 1 dargestellt.

Alle Modelle weisen Vor- und Nachteile auf und viele Pathomechanismen sind noch nicht geklärt. Genetische Modelle basieren meist auf Mutationen und dem folglich fehlenden oder veränderten Rezeptor, der zu Verschiebungen in der Stoffwechsellage führt. Substanzinduzierte Modelle, wie das STZ-Modell, führen durch Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu Insulinmangel und es entwickelt sich ein Diabetes, der dem Typ 1 zugeordnet wird. Bei diätinduzierten Modellen werden die Tiere mit energie- bzw. fettreicher Diät gefüttert wodurch es zu Adipositas kommt. Es folgt die periphere Insulinresistenz, weshalb eher von einem Diabetes Typ 2 gesprochen wird. Die Erzeugung dieser Phänotypen dauert allerdings unter Umständen recht lange. Außerdem können die verschiedenen Methoden auch kombiniert werden, wie z. B. die Injektion von niedrig dosiertem Streptozotocin mit anschließender fettreicher Fütterung (Gao and Zheng, 2014). Die Einteilung in Modelle des Typ 1 oder Typ 2 Diabetes gestaltet sich teilweise etwas schwierig, da die Zuordnung nicht streng nach der Induktionsweise erfolgt, sondern auch klinische Erscheinungen berücksichtigt werden.

Das Streptozotocin-Modell ist ein etabliertes und weit genutztes Tiermodell zur Untersuchung diabetischer und neuropathischer Konditionen in Ratten sowie auch in Mäusen. Dabei kommt es zu irreversibler Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und folglich zu Insulinmangel im Tier (Lenzen, 2008).

Streptozotocin ist ein Glukoseanalogon und wurde ursprünglich als Antibiotikum aus *Streptomyces achromogenes* isoliert. Schon 1963 wurde von seiner diabetogenen Wirkung berichtet (Fox et al., 1999, Rakieten, 1963). Aufgrund der lipophilen, glukoseanalogen Struktur erfolgt der Eintritt in die  $\beta$ -Zelle selektiv über den GLUT2-Transporter. In der Zelle kommt es zur Alkylierung der DNA, Stickstoffmonoxid- und Peroxynitritgenerierung. Die fragmentierte DNA stimuliert die poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und führt so zu einem Verlust an ATP und  $\text{NAD}^+$  in der Zelle. Es folgt die Nekrose der  $\beta$ -Zelle (Tjälve and Wilander, 1976, Turk et al., 1993, Schnedl et al., 1994, Kröncke et al., 1995).

Je nach Dosis kommt es zur vollständigen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und somit zu einem Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1. Bei niedrigeren Dosen in Kombination mit entsprechender Diät oder Nikotinamid können auch Typ 2 Modelle entstehen (Gao and Zheng, 2014). Die Tiere entwickeln Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Polyphagie sowie Polyurie und Polydipsie (Akbarzadeh et al., 2007).

Die relativ einfache Erzeugung des Modells durch einmalige intraperitoneale oder intravenöse Injektion und das schnelle Auftreten von diabetischen Erscheinungen, hat das Streptozotocin-Modell als ein weit und häufig genutztes Tiermodell etabliert (Fox et al., 1999). Die zu verwendende Dosis richtet sich vor allem nach der Tierart, dem Alter und der jeweiligen Zuchtlinie (Gao and Zheng, 2014). Als Parameter zur Gewährleistung von

klinischem Diabetes wird die bereits nach 72 h messbare Hyperglykämie genutzt. Der Blutzuckerwert bleibt über mehrere Wochen konstant hoch und die entwicklungsgerechte Gewichtszunahme der Tiere bleibt aus (Gao and Zheng, 2014, Fox et al., 1999, Bishnoi et al., 2011).

Anzeichen einer diabetischen Neuropathie, wie Allodynie und Hyperalgesie nach mechanischen Stimuli sind bereits nach zwei Wochen messbar und bleiben über mehrere Wochen konstant (Malcangio and Tomlinson, 1998, Fox et al., 1999, Gao and Zheng, 2014, Hanani et al., 2014). Die Angaben über veränderte Schwellenwerte bei thermischen Stimuli variieren hingegen stark und reichen von Hyperalgesie bis zu Hypoalgesie (Fox et al., 1999, Kamei et al., 1991).

Gruppe	Modelle	Typ	Mechanismus	Quelle
genetisch	<i>Biobreeding Rat</i> (BB/BDP)	1	spontan autoimmun	(Nakhoda et al., 1977)
	<i>Long Evans Tokushima fatty Rat</i> (OLETf)	2	Hyperplasie, Fibrose, Atrophie der Inselzellen (nach 40 Wochen)	(Kawano et al., 1992)
	<i>Goto Kakizaki Rat</i> (GK)	2	neonatales $\beta$ -Zell Defizit; Insulindefizit	(Goto et al., 1976)
	<i>Zucker Diabetic Fatty Rat</i> (ZDF)	2	homozygote Mutation des Leptinrezeptors	(Clark et al., 1983)
substanz-induziert	Alloxan	1	$\beta$ -Zell Degeneration durch reaktive Sauerstoffspezies	(Dunn and McLetchie, 1943)
	Streptozotocin	1	$\beta$ -Zell Degeneration durch Alkylierung	(Rakieten, 1963)
diätinduziert	<i>Sandrat</i> ( <i>P. obesus</i> )	2	kalorienreiche Ernährung	(Hackel et al., 1966)
	<i>Tuco-Tuco</i> ( <i>C. talarum</i> )	2	kalorienreiche Ernährung, Inaktivität	(Wise et al., 1972)

**Tabelle 1 : Verschiedene Tiermodelle der diabetischen Neuropathie.** Es existieren zahlreiche Tiermodelle zur diabetischen Neuropathie. Hier werden einige Modelle dargestellt, die Anwendung in Ratten finden. Sie lassen sich nach ihrer Herstellung in genetische, substanzinduzierte oder diätinduzierte Modelle unterteilen und werden entweder Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 zugeordnet.

### **1.3 Reduktion von Tierversuchen durch alternative Methoden – 3R**

Im Jahr 1959 wurden von Russel und Burch die Grundlagen für Alternativmethoden zu Tierversuchen geschaffen (Russell and Burch, 1959). Heutzutage wird jeder Versuchsantrag nach den Regeln der 3R - „Reduce“, „Refine“, „Replace“ - geprüft. Die verwendeten Methoden basieren dabei z. B. auf Zellkulturen, Untersuchungen in Geweben oder Versuche am anästhesierten Tier.

Im Bereich der Schmerzforschung werden noch immer viele Tierversuche in Form von Verhaltensexperimenten durchgeführt, oft in Kombination mit anschließender elektrophysiologischer Messung oder mikroskopischer Analyse der Nervenzellen. Mit der in dieser Studie verwendeten *High Content Screening* Mikroskopie (HCS-Mikroskopie) könnte in Zukunft die Anzahl der benötigten Tiere für qualitative und auch quantitative Untersuchungen drastisch reduziert, bzw. ersetzt werden.

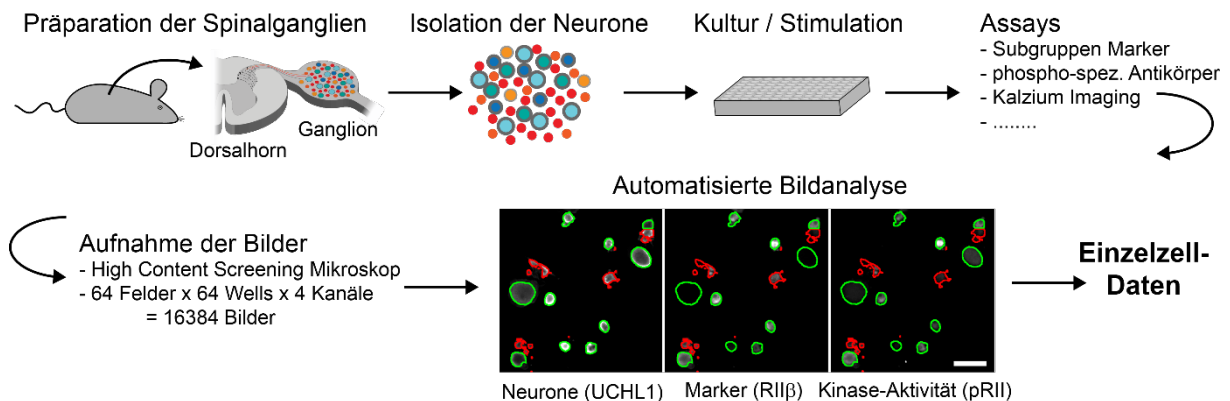
#### **1.3.1 Die *High Content Screening* Mikroskopie in der molekularen Schmerzforschung**

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist ein bekanntes und etabliertes Verfahren zur Analyse von Zellen sowie deren Bestandteile. Sie basiert, wie auch andere immunzytochemische Untersuchungen auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen, wodurch das relevante Zielprotein markiert wird. Werden dabei fluoreszierende Antikörper verwendet spricht man von Immunfluoreszenz. Die markierten Zellen werden mikroskopisch untersucht und beurteilt. Dabei erfolgt die Einordnung jeder einzelnen Zelle durch den Betrachter. In einem so heterogenen Zellmodell wie der aus dorsalen Wurzelganglien isolierten sensorischen Neurone wird entsprechend viel Zeit benötigt um eine repräsentative Stichprobengröße zu erlangen. Objektive Vergleiche zwischen Untersuchungen verschiedener Betrachter oder Forschungsgruppen sind nur schwierig durchzuführen.

Die automatische *High Content Screening* Mikroskopie, wie sie auch im Rahmen dieser Studie verwendet wurde, nutzt die Technik der Immunfluoreszenz, ermöglicht aber eine automatisierte und somit objektive Auswertung, die nicht durch den Betrachter beeinflusst wird. Die zu untersuchenden Zellen werden automatisch fotografiert und die Bilder mit spezieller Software anhand voreingestellter, charakteristischer Parameter analysiert. Dabei können sowohl verschiedene morphologische Aspekte, als auch funktionale Faktoren, wie Rezeptorexpression oder Phosphorylierung parallel untersucht werden. Die Daten werden archiviert und sind jederzeit für den Nutzer als Rohdaten verfügbar. Diese Rohdaten geben exakte Werte zu gemessenen Intensitäten der einzelnen Fluoreszenz-Intensitäten jeder Zelle wieder.

Durch die Nutzung mehrerer Fluoreszenzkanäle ist es unter anderem auch möglich Korrelationen zwischen verschiedenen Faktoren wie z. B. Rezeptorexpression, Zellgröße und Kinaseaktivität zu untersuchen.

In einem 4-Kanal-Protokoll zur Analyse der dorsalen Wurzelganglien werden für etwa 20.000 Neurone (eine Platte) ca. 4 - 5 Stunden benötigt. Dadurch können quantitativ repräsentative Stichprobengrößen erreicht werden und die subjektive Bewertungskomponente durch den Betrachter wird eliminiert.



**Abbildung 5: Experimenteller Aufbau zur *High Content Screening* basierten Analyse sensorischer Neurone.** Nach der Präparation der Spinalganglien werden die sensorischen Neurone vereinzelt und in Zellkulturplatten kultiviert. Anschließend folgt die Stimulation mit pro- oder antinozizeptiven Mediatoren und dann eine Fixierung. Durch immunzytochemische Färbung mit phospho-spezifischen Antikörpern können die Phospho-Intensitäten jedes Neurons quantifiziert werden. Die Bilder werden durch das *High Content Screening* Mikroskop aufgenommen und anhand des neuronalen Markers Ubiquitin-Carboxy-Terminal-Hydrolase 1 (UChL1) und spezifischen Objektselektionsparametern identifiziert. Im Bild stellen die grün umrandeten Objekte intakte Neurone dar, während rot umrandete Objekte nicht den Selektionsparametern entsprechen und aus der Analyse aussortiert werden. Die identifizierten Neurone werden dann einzeln weiter auf ihre jeweilige Markerintensität untersucht. Alternativ können auch rein morphologische, quantitative Untersuchungen durchgeführt werden, indem die Neurone direkt (ohne vorherige Stimulation) fixiert werden und dann mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt werden (Isensee and Hucho, 2017).

### 1.3.2 Die *High Content Screening* Mikroskopie im Sinne der 3R

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete HCS-Mikroskopie wurde von der AG Hucho erstmals in der Schmerzforschung angewandt und über die letzten Jahre weiterentwickelt und optimiert. Da die Methode noch nicht sehr verbreitet ist, sollen hier einige ihrer Vorteile, insbesondere in Bezug auf die 3R dargestellt werden

Bei herkömmlichen, manuellen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wird jede Zelle einzeln durch den Betrachter bewertet und analysiert. Dementsprechend viel Zeit wird benötigt um eine repräsentative Stichprobengröße zu erreichen. Um die biologische Variabilität zu berücksichtigen, sollten immer mehrere Individuen untersucht werden.

Dadurch ist es allerdings bei manueller Beurteilung praktisch unmöglich alle verfügbaren Zellen jedes Tieres zu nutzen (z. B. ca. 20.000 Neurone aus den lumbalen Spinalganglien einer Ratte). Es kommt also nicht zur optimalen Nutzung der Versuchstiere.

Die HCS-Mikroskopie hingegen ermöglicht die Analyse von 64 verschiedenen Konditionen in ca. 20.000 Zellen innerhalb von vier bis fünf Stunden, wodurch Zellen eines einzelnen Tieres parallel für verschiedene Untersuchungsaspekte zur Verfügung stehen und weitaus mehr Zellen eines einzelnen Tieres untersucht werden können. Die Gesamtzahl der benötigten Tiere kann somit drastisch reduziert werden („Reduce“), während gleichzeitig die Anzahl der analysierten Neurone wächst.

Im Vergleich zu Verhaltensexperimenten stellt sich die Reduktion der Tierzahl noch viel deutlicher dar. Pro Tier kann dabei nur eine Kondition untersucht werden und es werden immer mindestens drei bis vier Tiere pro Kondition benötigt. Daraus lässt sich schließen, dass bei 64 Konditionen im Verhaltensexperiment 256 Tiere benötigt würden (64 Konditionen x 4 Tiere = 256 Tiere). Bei der HCS-Mikroskopie können diese 64 Konditionen bereits aus der Untersuchung von lediglich 4 Tieren generiert werden, da die Zellen parallel auf mehrere Konditionen hin untersucht werden können („Reduce“).

Zudem stellt die Methode durch die quantitative, einzelzellbasierte Analyse eine sehr sensitive Methode dar („Refine“).

Durch die Entwicklung und Validierung zellulär orientierter Protokolle zum Nachweis von Hyperalgesie im Tiermodell, kann diese Methode in geraumer Zeit eine Alternative zu Verhaltenstests darstellen und somit zur Reduktion bzw. bestenfalls zur Elimination („Replace“) dieser Tests beitragen.

Ferner kann auf Grundlage der bisher generierten Daten davon ausgegangen werden, dass diese Methode auch auf Zelllinien oder z. B. stammzellabgeleitete Neurone Anwendung finden kann, und somit die Untersuchungen an tierischen Zellen, die postmortal entnommen werden müssen, überflüssig macht.

Bisher wurde die Methode jedoch hauptsächlich an Zellen von klinisch gesunden, unter standardisierten Bedingungen herangezüchteten Tieren und in einigen *knock-out*-Modellen angewendet. Die Untersuchungen hierzu zeigten dabei in einem *knock-out*-Modell des Tetrodotoxin-sensitiven Ionenkanals Nav1.7 relevante Ergebnisse zu Veränderungen der Schmerzsensitivität (Isensee et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode erstmals in einem komplexen substanzinduzierten Krankheitsmodell getestet. Es sollte parallel zum eigentlichen Studienansatz untersucht werden, ob die HCS-Mikroskopie auch in einem wesentlich variableren Modell entsprechend sinnvoll eingesetzt und validiert werden kann.

## 1.4 Fragestellung

Es ist bekannt, dass Diabetes zur Sensibilisierung von Neuronen und so zu chronischer Hyperalgesie führt. Die Behandlung der diabetischen Neuropathie stellt dabei nach wie vor eine Herausforderung dar. Die Mechanismen Ihrer Entstehung sind nur teilweise geklärt, was eine kausale Therapie unmöglich macht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vor allem Veränderungen in der intrazellulären Signaltransduktion der Nozizeptoren identifiziert werden. Dabei fokussierte sich die Arbeit auf die Signalwege zu den zwei intrazellulären Kinasen PKA-II und ERK1/2 und deren Aktivatoren Prostazyklin, NGF und Oncostatin M im STZ induzierten diabetischen Rattenmodell. Konkret wurden folgende Fragen untersucht: Verändert sich die Aktivität der Kinasen unter dem Einfluss der Hyperglykämie? Kommt es zu stärkerer Phosphorylierung und deshalb zur Hyperalgesie? Verändert sich die zeitliche Dynamik der Kinasen? Kommt es zu Verschiebungen in der Dosis-Wirkung der Aktivatoren?

Des Weiteren sollte durch quantitative, morphologische Untersuchungen die Stabilität des STZ induzierten Diabetes-Modells und die Anwendbarkeit der HCS-Mikroskopie auf ein komplexes Krankheitsmodell wie das der diabetischen Neuropathie untersucht werden. Führt die Hyperglykämie zum Verlust einzelner Subgruppen der heterogenen sensorischen Neuronen eines DRGs und lassen sich mit der HCS-Mikroskopie im STZ-Modell vergleichbare Ergebnisse erzeugen, wie im gesunden Phänotyp?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Guillotine	FMI Föhr Medical Instruments Ober-Beerbach
Rongeur	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
Medizinischer Seitenschneider	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
Gewebepinzette	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
gekrüvte Pinzette	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
gerade, kleine Pinzette	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
Mikrofederschere	F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
Skalpelli mit Wechselklinge	Swann-Morton Sheffield, England; F.S.T. Fine Science Tools Heidelberg
Petrischale (4 cm Durchmesser, 2x)	TPP Trasadingen, Schweiz
Pasteurpipette mit weiter Öffnung	Brand Wertheim, Deutschland
Pasteurpipette mit schmaler Öffnung	Brand Wertheim, Deutschland
Zentrifuge: Rotana 48R	Hettich, Königs-Wusterhausen Deutschland
8-Kanal-Pipette	Explorer Eppendorf Hamburg
Mikrotiterplatte: 96 well TC surface plate	Greiner !BioOne µClear Plate, Black, #655090;
Mikrotestplatte PS, 96er System V-Form, 0,3 ml 4.500 g, SBS Footprint: 127,4 x 85,8 mm; 10-111-000;	Nerbe Plus Winsen, Deutschland
Aluminium-Klebefolie: Aluminium sealing	Corning Inc., Costar, #6569
Cellomics Array scan XTI	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.2 Puffer und Biochemikalien

Tabelle 3: Puffer und Biochemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Katalog-Nr.</u>
B-27 Supplement (50X)	Invitrogen, #17504,
Neurobasal-A Medium (NB)	Invitrogen, #12349-015
Penicillin / Streptomycin, (10.000 U/ml)	Gibco, #15140_I22
L-Glutamine, (200 mM)	Sigma-Aldrich, # G6392
L-Glutamate, (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, # 27647
Minimum Essential Medium (MEM)	Invitrogen, #42360-024
Kollagenase P, (5 U/ml)	Roche, #1213857
Sigmacote	Sigma-Aldrich, # SL2-100ML
Poly-L-Ornithine Hydrochloride, (100 µg/ml)	Sigma, #P2533
Laminin, (5 µg/ml)	Invitrogen, #23017-015
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAA, cat# H15-002
Paraformaldehyde	Merck Millipore, cat# 104005
Normal goat serum	Dianova, cat# 005-000-121
Normal donkey serum	Dianova, cat # 017-000-121
Triton X100	Sigma, cat# T9284
Tween 20	Sigma, cat# P9416
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich, cat# A2153-100G
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Molecular Probes, Cat# D-1306

## 2.1.3 Stammlösungen

Tabelle 4: Stammlösungen

<u>Stammlösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
<b>NB-Medium</b>	Neurobasal-A-Medium, B-27 Supplement (50X) (2 % v/v) Penicillin / Streptomycin (100 µl/ml) L-Glutamine (500 µM/ml) L-Glutamate (25 µM =3,7 µg/ml)

<b>PFA</b>	80g PFA mit DPBS auf 1L aufgefüllt (8 % w/v) Erhitzen auf 80 °C, abkühlen auf 40 °C
<b>BSA</b>	(30% w/v), in DPBS
<b>Normal donkey serum blocking (NDSB)</b>	Normal donkey serum (2 % v/v) BSA (1 % w/v) Triton X-100 (0,1 % v/v) Tween 20 (0,05 % v/v) in DPBS, aliquotiert und gelagert bei – 20 °C.
<b>Normal goat serum blocking (NGSB)</b>	Normal goat serum, (2 % v/v) BSA (1 % w/v) Triton X-100 (0,1 % v/v) Tween 20 (0,05 % v/v) in DPBS, aliquotiert und gelagert bei – 20 °C.
<b>DAPI</b>	<b>Stammlösung</b> (5 mg/ml, 14,3 mM): DAPI in Dimethylformamide, aliquotiert und gelagert bei – 20 °C. <b>Gebrauchslösung</b> (50 µg/ml), in DPBS

#### 2.1.4 Stimulantien

Tabelle 5: Stammlösungen der Stimulantien

<u>Stimulanz</u>	<u>Herstellung, Katalog-Nr.</u>
<b>Nerve Growth Factor (NGF)</b>	mNGF 2.5S (Grade I), Alomone labs, #N-240, 26 kDa, 10 µg, 50 µg/ml, in Wasser (steril) mit BSA (0,1 % w/v)
<b>Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>)</b>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Cayman, #18220 374,5 kDa 10 mM, (1 mg in 267 µl PBS (pH 9.5))
<b>Oncostatin M (OSM)</b>	Rat Oncostatin M, PEPROTECH, Cat# 400-36, 24,4 kDa, 10 µg, 50 µg/ml, in Wasser (steril) mit BSA (0,1 % w/v)
<b>Forskolin (Fsk)</b>	Forskolin, Tocris, #1099, 10 mM, (10 mg in 2436 µl DMSO)

## 2.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Primär-Antikörper

<b><u>Antikörper</u></b>	<b><u>Spezies</u></b>	<b><u>Epitop</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>	<b><u>Hersteller, Katalog-Nr</u></b>
<b>ch-PGP</b>	Huhn	UCHL1/ PGP 9.5	1:4000	Novus, #NB110-58872
<b>mo-PGP</b>	Maus	UCHL1/ PGP 9.5	1:1000	MorphoSys, 7863-2004
<b>ra-pRII</b>	Kaninchen	phosphor RII $\alpha$ (S96)	1:1000	Abcam, #ab32390
<b>mo-pERK</b>	Maus	phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204)	1:250	NEB (Cell Signaling Technology), #9106S
<b>ra-pERK</b>	Kaninchen	phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204)	1:250	NEB (Cell Signaling Technology), #4370L
<b>go-TrkA</b>	Ziege	TrkA	1:500	R&D Systems, #AF1056
<b>ra-ERK1/2</b>	Kaninchen	p44/42MAPK (T202/Y204)	1:250	Cell Signaling, #4695S,
<b>mo-RII<math>\beta</math></b>	Maus	PKA RII $\beta$	1:2000	BD , #2160653,
<b>ra-NF200</b>	Kaninchen	NF200	1:500	Sigma, N4142
<b>ra-CGRP</b>	Kaninchen	CGRP	1:1000	Bachem, T-4032
<b>mo- CaMKII<math>\alpha</math></b>	Maus	CaMKII $\alpha$	1:2000	Thermo Scientific, #MA1- 048
<b>Tritic-IB4</b>	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	$\alpha$ -D-Galaktose	1:1000	Sigma, #L5264
<b>ra-TRPV1</b>	Kaninchen	TRPV1	1:1000	Alomone, ACC-030
<b>mo-NaV1.8</b>	Maus	NAV1.8	1:1000	Neuromab Facility, 2KS 61

Tabelle 7: Sekundär-Antikörper

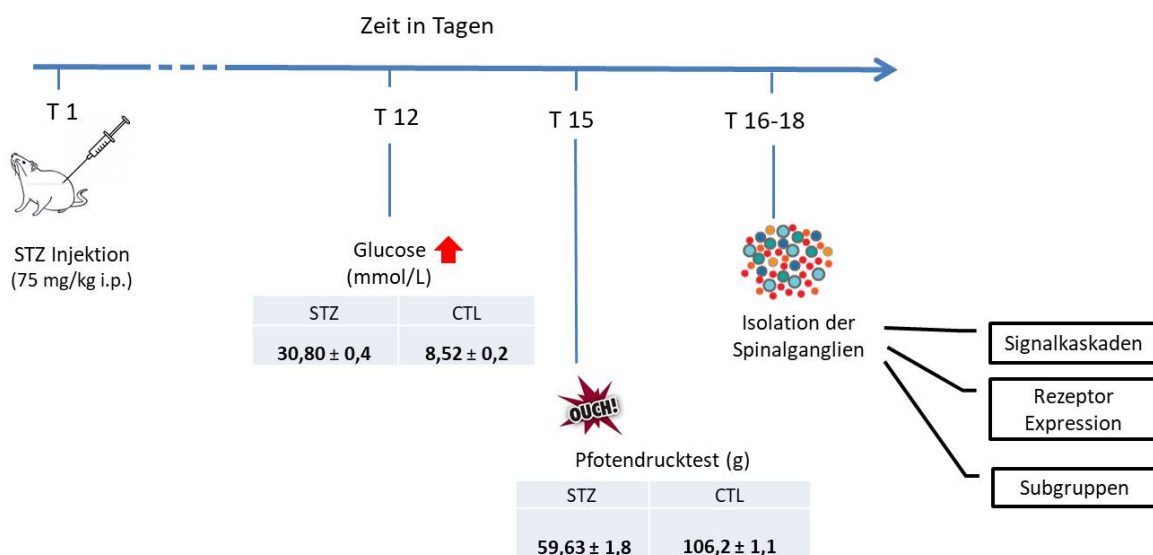
<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Epitop</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller, Katalog-Nr.</u>
<b>go-A488-ch</b>	Ziege	Huhn IgG	1:1000	Invitrogen, #A11039
<b>go-A568-ra</b>	Ziege	Kaninchen IgG	1:1000	Life Technologies, #A11036
<b>do-A647-mo</b>	Esel	Maus IgG	1:1000	Invitrogen, #A31571
<b>do-A488-mo</b>	Esel	Maus IgG	1:1000	Life Technologies, #A21202
<b>ch-A594-go</b>	Huhn	Ziegen IgG	1:1000	Invitrogen, #A21468
<b>ch-A647-ra</b>	Huhn	Kaninchen IgG	1:1000	Invitrogen, #A21443

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studiendesign

Diese Studie wurde im Rahmen eines Kollaborationstests zwischen der Experimentellen Anästhesie des Instituts für Anästhesiologie und Schmerzforschung der Uniklinik Köln und der Firma Grünenthal (Aachen) durchgeführt. Die verwendeten Zellen stammten im Sinne der 3R von Tieren aus Kontrollgruppen laufender, interner Substanztestungen der Firma Grünenthal. Die Erzeugung des STZ-Modells, die Tierhaltung, sowie die Glukosemessungen und die Schmerzverhaltenstests wurden folglich durch Mitarbeiter der Firma Grünenthal durchgeführt. Die Kontrolltiere (N = 25) sowie die diabetische Tiere (N = 27) und auch die der Non-Gruppe zugeordneten Tiere (also die Tiere, die STZ erhalten hatten, aber keine ausreichende Hyperglykämie entwickelten) (N = 8) wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten und an jedem experimentellen Tag wurden immer beide (bzw. alle drei) Phänotypen parallel untersucht. Nach der Diabetesinduktion durch Streptozotocin (siehe 2.2.3) folgte nach 12 Tagen die Blutglukosemessung und anschließend der Randall-Selitto-Pfotendrucktest (siehe 2.2.4) zur Validierung der erhöhten Schmerzsensitivität im STZ-Modell. Nach Abschluss der internen Substanzmessungen der Firma Grünenthal wurden die Ratten vorschriftsmäßig durch langsame CO<sub>2</sub>-Inhalation narkotisiert und getötet. Nach Feststellung des Todes wurden aus jedem Tier 12 - 14 Spinalganglien isoliert (siehe 2.2.5). Aus diesen wurden die Neurone (ca. 20.000 / Tier) durch mehrere Behandlungsschritte weitestgehend vom übrigem Zellmaterial separiert und anschließend in 96-Well-

Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht, konnten pro Platte / bzw. Tier bis zu 64 Konditionen (ca. 300 - 400 Neurone / Kondition) untersucht werden. Dabei wurden factorspezifische Färbungen teilweise parallel mit Stimulationen durch verschiedene Substanzen, sowie mit verschiedenen Dosierungen und unterschiedlicher Behandlungsdauer durchgeführt (siehe 2.2.6). Nach standardmäßigen immunzytochemischen Färbeverfahren durch Antikörper wurden die Platten durch ein High Content Screening Mikroskop, den Cellomics Array Scan VTI vollautomatisch analysiert. Durch diese Methode konnte die mikroskopische Analyse von ca. 20.000 Neuronen im Durchschnitt in 4 - 5 Stunden erfolgen, was folglich eine quantitative Analyse ermöglichte. Außerdem wurde dadurch der subjektive Aspekt durch den Untersucher eliminiert. Diese Einzelzelldaten wurden anschließend größtenteils durch die Verwendung von im Labor entwickelten Skripten unter Verwendung der Programmiersprache R (Version 3.2.3) zum einen deskriptiv dargestellt, sowie in weiteren Schritten normalisiert, statistisch analysiert und wiederum graphisch dargestellt. Vereinzelt erfolgte die weitere Analyse auch mit PRISM (Version 5 und 7)



**Abbildung 6: Studiendesign im zeitlichen Ablauf.** 8 Wochen alten Ratten wurde einmalig STZ intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere enthielten nur den Trägerstoff Zitrat. 12 Tage später erfolgte die Blutzuckermessung und STZ-Tiere, die den festgesetzten Schwellenwert von 28 mmol/l nicht erreichten wurden von der Studie ausgeschlossen. Kontrolltiere (CTL) wiesen im Durchschnitt Glukosewerte von 8,52 mmol/l auf. 3 Tage später, an Tag 15 wurde der Pfootendrucktest nach Randall und Selitto an jedem Tier durchgeführt und der Mittelwert aus zwei Messungen verwendet um die Entwicklung der Hyperalgesie zu demonstrieren. Dabei zeigten die STZ-Tiere deutlich niedrigere Schmerzschwellen. 1 - 3 Tage später wurden die Spinalganglien entnommen und direkt im Anschluss im Rahmen der zellulären Analyse weiterverarbeitet.

### **2.2.2 Tiere & Haltung**

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden durch die Firma Grünenthal von Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich bezogen und frühestens 5 Tage nach Ankunft verwendet. Tiere, die äußerliche Anzeichen von Krankheiten zeigten, wurden ausgeschlossen. Bis zum Beginn der Versuche wurden sie unter standardisierten Bedingungen (Licht: 06:00 h – 18:00 h, Dunkelheit: 18:00 h – 06:00 h; 20 °C – 24 °C Raumtemperatur; relative Luftfeuchtigkeit: 35 % – 70 %; Luftaustausch 15 x pro Stunde, Luftbewegung < 0,2 m/s) in Makrolon-Typ-4 Käfigen mit Standard Weichholz Einstreu (J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland) in Gruppen gehalten. Standard Futter für Labortiere (ssniff R/M-Haltung, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) stand pelletiert ad libitum bereit. Als Trinkwasser wurde Aachener Leitungswasser verwendet und durch Wasserflaschen oder automatische Wasserspender ebenfalls *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Alle durchgeführten Versuche wurden unter AZ 84-02.05.20.12.006 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt und unter Beachtung der tierschutzrechtlichen Vorgaben durchgeführt.

### **2.2.3 Diabetes mellitus Induktion durch Streptozotocin**

Die Induktion des Diabetes wurde von Mitarbeitern der Firma Grünenthal durchgeführt. Sie erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (75 mg/kg). Nach zwei Wochen wurde die Blutglukose mit Hilfe des Haemoglukotests (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) und des Reflexions Colorimeters (Hestia Pharma GmbH, Mannheim) an der Schwanzvene bestimmt. Nur die Tiere, die über dem festgesetzten Glukosewert lagen (> 28 mmol/l), wurden als diabetisch eingestuft und in die Untersuchung mit einbezogen. Kontrolltiere wurden auf die gleiche Weise mit der entsprechenden Menge Zitrat behandelt und ebenfalls einer Glukosemessung unterzogen.

In einigen experimentellen Reihen wurden auch die Tiere untersucht, denen STZ injiziert worden war, die aber einen Blutglukosewert unter 28 mmol/l aufwiesen. Diese wurden dann als separate Gruppe (Non) betrachtet und ausgewertet.

### **2.2.4 Schmerzverhaltenstests**

Zwei Wochen nach der Diabetesinduktion und nach Bestätigung der Hyperglykämie wurden die Ratten durch Mitarbeiter der Firma Grünenthal nach der Methode von Randall und Selitto (1957) auf Hyperalgesie untersucht. Um den mechanischen schmerzhaften Schwellenwert zu ermitteln wurde ein Algesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italien) verwendet. Dieses übt

durch eine konische, abgerundete und nicht schmerzhaft Spitze (2 mm<sup>2</sup>) einen stetig ansteigenden Druck auf die Dorsalfläche der Pfote aus. Als schmerzinduzierte Reaktion der Ratten wurden Wegziehen der Pfote, Lautäußerungen oder starke Unruhe gewertet. Um Gewebeschädigung vorzubeugen wurde die Obergrenze auf 500 g festgesetzt.

### **2.2.5 Isolation sensorischer Neurone**

Der von mir eigenständig durchgeführte Teil dieser Arbeit beginnt mit der Isolation der sensorischen Neurone.

Nach Abschluss der oben genannten Tests, sowie der internen Substanztestungen der Firma Grünenthal wurden die Tiere durch Mitarbeiter der Firma Grünenthal vorschriftsmäßig durch langsame Kohlenstoffdioxid-Inhalation narkotisiert und getötet. Nach Feststellung des Todes folgte die Enthauptung der Tiere mit Hilfe einer Guillotine und anschließend eine Ausblutung um die Isolation der Wurzelganglien zu erleichtern.

Einer Desinfektion mit Ethanol (70 %) folgte die Inzision der Haut und Unterhaut in der Mittellinie vom Hals bis zum Becken. Die Haut wurde weitgehend abpräpariert. Die dann freiliegende lange Rückenmuskulatur wurde bilateral entlang der Wirbelsäule inzidiert und ebenfalls abpräpariert. Anschließend konnte der Wirbelkanal mit Hilfe eines Rongeurs und eines medizinischen Seitenschneiders der Länge nach geöffnet werden. Die nun zugänglichen lumbalen Spinalganglien (L 1 – 6 / 7) wurden einzeln entnommen und in MEM-Medium gesammelt.

Nach Entfernung von überschüssigem Gewebe wurden die Ganglien in NB-Medium überführt und mit Kollagenase für 1 h bei 37 °C enzymatisch angedaut, um eine Vereinzelung der Neurone zu ermöglichen.

Die Vereinzelung der Zellen erfolgte durch Trituration. Dafür wurden die vorverdauten Ganglien einer Ratte mit Hilfe einer silikonbeschichteten Pasteurpipette in 5 ml NB-Medium mehrmals auf und ab pipettiert. Die so dissoziierten Zellen wurden auf 1,5 ml 15 % BSA in DPBS geschichtet und anschließend zentrifugiert (8 min, 180 G, Temperatur = 20 °C, Beschleunigung = 8, Bremsung = 4). Das gesamte Medium, sowie überschüssiges organischen Gewebe wurden entfernt und das verbleibende Zellpellet wurde in 7 ml NB-Medium erneut resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 8-Kanal Pipette gleichmäßig in eine mit Ornithin (100 µg/ml) und Laminin (5 µg/ml) beschichtete und auf 37 °C erwärmte 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät (100 µl/Well). Anschließend inkubierten die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Luftkonzentration über Nacht im Zellinkubator.



### 2.2.6 Stimulation und Fixation

Zur Stimulation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen wurden die Mikrotiterplatten auf 37 °C warmen Heizblöcken fixiert um ein Abkühlen der Zellen während der Behandlung zu vermindern. Der jeweilige Stimulus (PGI<sub>2</sub>, NGF, OSM, Forskolin) wurde in einer separaten Mikrotiterplatte vorgelegt und angewärmt. Mit einer 8-Kanal-Pipette wurden je 50 µl des Mediums aus der Mikrotiterplatte entnommen, in der Mikrotiterplatte mit dem Stimulus gemischt und dem Zeitplan entsprechend (nach 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min) auf die Zellen gegeben. Zwischen den einzelnen Behandlungsschritten wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Stimulation folgte unmittelbar die Fixierung aller Zellen durch Zugabe von 100 µl 8 % Paraformaldehyd pro Well. Dieses wurde zu den 100 µl im Well vorliegenden Medium gegeben, gemischt (Endkonzentration 4 %), nach 10 min entfernt und durch 100 µl DPBS ersetzt. Um etwaige Reste von PFA zu beseitigen wurde das gesamte DPBS noch zweimal gewechselt. Anschließend konnten die Platten bei 4 °C gelagert oder direkt weiter behandelt werden.

Bei Färbungen ohne Stimulation wurden die Platten lediglich den Fixierungsschritten durch PFA und den anschließenden Waschschrritten mit DPBS unterzogen.

### 2.2.7 Immunzytochemie

Zunächst wurden die Zellen mit einer Block- und Permeabilisationslösung (*Normal goat serum blocking* oder *Normal donkey serum blocking*) behandelt, die Serum und Triton-X als Detergenz enthielt, um die unspezifische Antikörperbindungsstellen abzudecken und die Zellmembran zu permeabilisieren. Dafür wurde das DPBS aus den Wells entfernt und durch 50 µl Blocklösung pro Well ersetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Block- und Permeabilisationslösung mit einer 8-Kanal-Pipette entfernt und durch DPBS ersetzt. Dieser Waschvorgang durch DPBS wurde anschließend zweimal wiederholt um die vollständige Entfernung zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Primär-Antikörpern, gelöst in BSA (1 % w/v) in DPBS (30 µl pro Well) bei 4 °C über Nacht behandelt.

Es folgten drei weitere Waschvorgänge mit DPBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die entsprechenden in DPBS gelösten fluoreszierenden Sekundärantikörper, sowie DAPI auf die Zellen gegeben (1:1000, 50 µl pro Well) und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach drei erneuten Waschvorgängen wurden die Wells auf je 200 µl DPBS aufgefüllt und mit Aluminium-Klebefolie verschlossen. Diese Maßnahme schützt die Neurone vor Licht und Austrocknung und die Platten erhielten somit eine längere Lagerfähigkeit.

### 2.2.8 High Content Screening Mikroskopie

Die gefärbten Platten wurden mit dem Cellomics Array Scan VTI unter Verwendung eines Standard Neuronen Protokolls gescannt. Dabei wurden Bilder mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln unter Verwendung eines 10x Objektiv erzeugt. Die Bildanalyse erfolgte durch das Cellomics Software Paket. Nach Hintergrundkorrektur in der UCHL1-Färbung durch einen Tiefpassfilter, wurden die Bilder anhand eines festgesetzten Schwellenwertes in Binärbilder konvertiert und mit Hilfe einer Methode, die auf der Geometrie der Objekte basiert, segmentiert. Die Neurone wurden durch die festgelegten Objektselektionsparameter identifiziert (Größe: 165 – 7500 µm<sup>2</sup>; Zirkularität (Umfang<sup>2</sup> / 4 π x Fläche): 1 – 3; Längen-/Breitenverhältnis: 1 – 2; Durchschnittsintensität: 1000 – 12000; Gesamtintensität: 24 × 10<sup>4</sup> – 4 × 10<sup>7</sup>). Auf der Grundlage dieser Selektionsparameter wurden die Signale in den weiteren Kanälen quantifiziert. Um später die spektrale Überlappung (Spill-over-Effekt) zwischen den Fluoreszenzkanälen berechnen zu können wurden bei dem standardmäßig verwendeten 3-Kanal-Protokoll drei Kontroll-Wells gescannt: (1) nur UCHL1, (2) UCHL1 + Antikörper 2, (3) UCHL + Antikörper 3. Um etwaigen Fluoreszenzunterschieden durch die jeweilige Lokalisation auf der Platte vorzubeugen, wurde die Anordnung der untersuchten Zellen bzw. Substanzen randomisiert. Außerdem wurden in einer Platte stets beide Phänotypen untersucht.

### 2.2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von R Version 3.2.3 oder alternativ PRISM 5, bzw. 7. Zunächst wurde eine rein deskriptive Analyse durchgeführt und graphisch dargestellt. Hier konnten besonders Artefakte durch Behandlungsfehler oder andere Störfaktoren frühzeitig erkannt werden. Anschließend wurde die Steigung der Regressionsgerade in den Kontrollen berechnet und die Daten entsprechend kompensiert um somit den spektralen Überlappungseffekt (*Spill-over-Effekt*) zwischen den Fluoreszenz-Kanälen bestmöglich zu eliminieren (Roederer, 2002).

Die kompensierten Daten der nicht-stimulierten Zellen wurden außerdem auf einen Mittelwert von 1 (oder 1000) normalisiert, um eventuelle Variabilität zwischen verschiedenen Platten und experimentellen Tagen auszugleichen.

Als Statistische Tests wurden je nach Fragestellung T-Test, einfaktorielle oder mehrfaktorielle ANOVA durchgeführt, als Post-hoc Analyse wurden entsprechend Bonferroni- oder Tukey-Test verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet. Einzelne Messungen führten aufgrund der Stichprobengröße zu Ergebnissen von  $p < 0,001$ .

Sämtliche Abbildungen wurden ebenfalls durch mit der Programmiersprache R entwickelten Skripte oder Prism erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Systemische Applikation von STZ induziert Hyperglykämie

Zur Kontrolle des STZ-Modells und der entsprechend auftretenden Hyperglykämie wurde bei allen Tieren 12 Tage nach der intraperitonealen STZ- bzw. Lösungsmittel-Injektion eine Blutglukosemessung durchgeführt. Diese Messungen wurden von Mitarbeitern der Firma Grünenthal in Aachen durchgeführt.

An allen experimentellen Tagen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Blutglukosewerten der Kontrolltiere (n = 25) sowie der STZ-Tiere (n = 27) (Tabelle 7). Während der Blutglukosewert bei den Kontrolltieren im Mittel bei  $8,5 \pm 0,2$  mmol/l lag, war dieser im STZ-Modell mit  $30,8 \pm 0,4$  mmol/l 3,6-fach erhöht. Tiere, die STZ erhalten hatten, dessen Glukosewerte aber nicht den Grenzwert von 28 mmol/l überschritten, wurden von der Studie ausgeschlossen oder aber als separate Gruppe (Non) untersucht. Die Blutzuckerwerte dieser Tiere waren mit  $12,6 \pm 2,1$  mmol/l im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls erhöht.

Glukose (mmol/l) Grenzwert für Hyperglykämie: 28 mmol/l	CTL	STZ	Non	p-Wert STZ vs. CTL
Datum	n = 25 Mittelwert $\pm$ SEM	n = 27 Mittelwert $\pm$ SEM	n = 8 Mittelwert $\pm$ SEM	
05.03.2015	9,0 $\pm$ 0,5	30,2 $\pm$ 0,9		< 0,0001
19.03.2015	8,8 $\pm$ 0,3	31,2 $\pm$ 1,2		< 0,0001
17.04.2015	8,7 $\pm$ 0,2	31,5 $\pm$ 1,2	9,7 $\pm$ 0,2	< 0,0001
29.04.2015	8,5 $\pm$ 0,2	28,8 $\pm$ 0,5	15,4 $\pm$ 3,8	< 0,0001
01.09.2015	7,9 $\pm$ 0,3	31,5 $\pm$ 0,6		< 0,0001
<b>Mittelwert (mmol/L)</b>	<b>8,5 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>30,8 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>12,6 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>&lt; 0,0001</b>

**Tabelle 8: Systemische Applikation von STZ induziert Hyperglykämie.** Zwölf Tage nach STZ-Injektion wurde bei allen Tieren die Blutglukose bestimmt. Tiere, die mit STZ behandelt wurden und eine Hyperglykämie von über 28 mmol/l entwickelten, wurden als diabetischer Phänotyp in die Studie miteinbezogen (STZ, n = 27; Blutglukose:  $30,8 \pm 0,4$  mmol/l; ( $F_{2,59} = 400,7$ ;  $p < 0,05$ )). Kontrolltieren (n = 25) wurde lediglich das Lösungsmittel injiziert. Sie entwickelten keine Hyperglykämie (Blutglukose:  $8,5 \pm 0,1$  mmol/l). Tiere, die STZ erhalten hatten, dessen Blutglukose den festgesetzten Schwellenwert von 28 mmol/l jedoch nicht erreichte, wurden ausgeschlossen oder als separate Gruppe (Non, n = 8) untersucht

(Blutglukose:  $12,6 \pm 2,1$  mmol/l); Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Daten basierend auf den von Mitarbeitern der Firma Grünenthal durchgeführten Messungen.

### 3.2 Systemische Applikation von STZ induziert mechanische Hyperalgesie

Der STZ induzierte diabetische Phänotyp wurde auch mit Verhaltensexperimenten untersucht. Diese Experimente wurden ausschließlich von Mitarbeitern der Firma Grünenthal durchgeführt. Die Tiere wurden drei Tage nach Feststellung der Hyperglykämie (Tag 15) dem modifizierten Pfotendrucktest nach Randall & Selitto („paw pressure test“, PPT) unterzogen. Um einzelne, aufgrund der biologischen Variabilität auftretende abweichende Reaktionen nicht falsch zu deuten, wurde zur Demonstration der Hyperalgesie für jedes Tier der Mittelwert aus zwei Messungen verwendet.

Während die Kontrolltiere im Mittel bei einem Gewicht von  $106,2 \pm 1,1$  g mit Wegziehen der Pfote, Lautäußerung oder allgemeiner Unruhe reagierten, waren die STZ-Tiere wesentlich empfindlicher (Tabelle 8). Sie zeigten eine deutliche mechanische Hyperalgesie und reagierten im Mittel schon bei  $59,6 \pm 1,8$  g. Die Tiere aus der Non-Gruppe hingegen zeigten zwar einen abweichenden Blutzuckerspiegel zu den Kontrolltieren, die Unterschiede im Verhaltenstest waren jedoch sehr gering und stellten sich bei der Analyse als nicht signifikant abweichend von den Kontrolltieren dar ( $106,2 \pm 1,1$  g vs.  $107,3 \pm 2,0$  g)

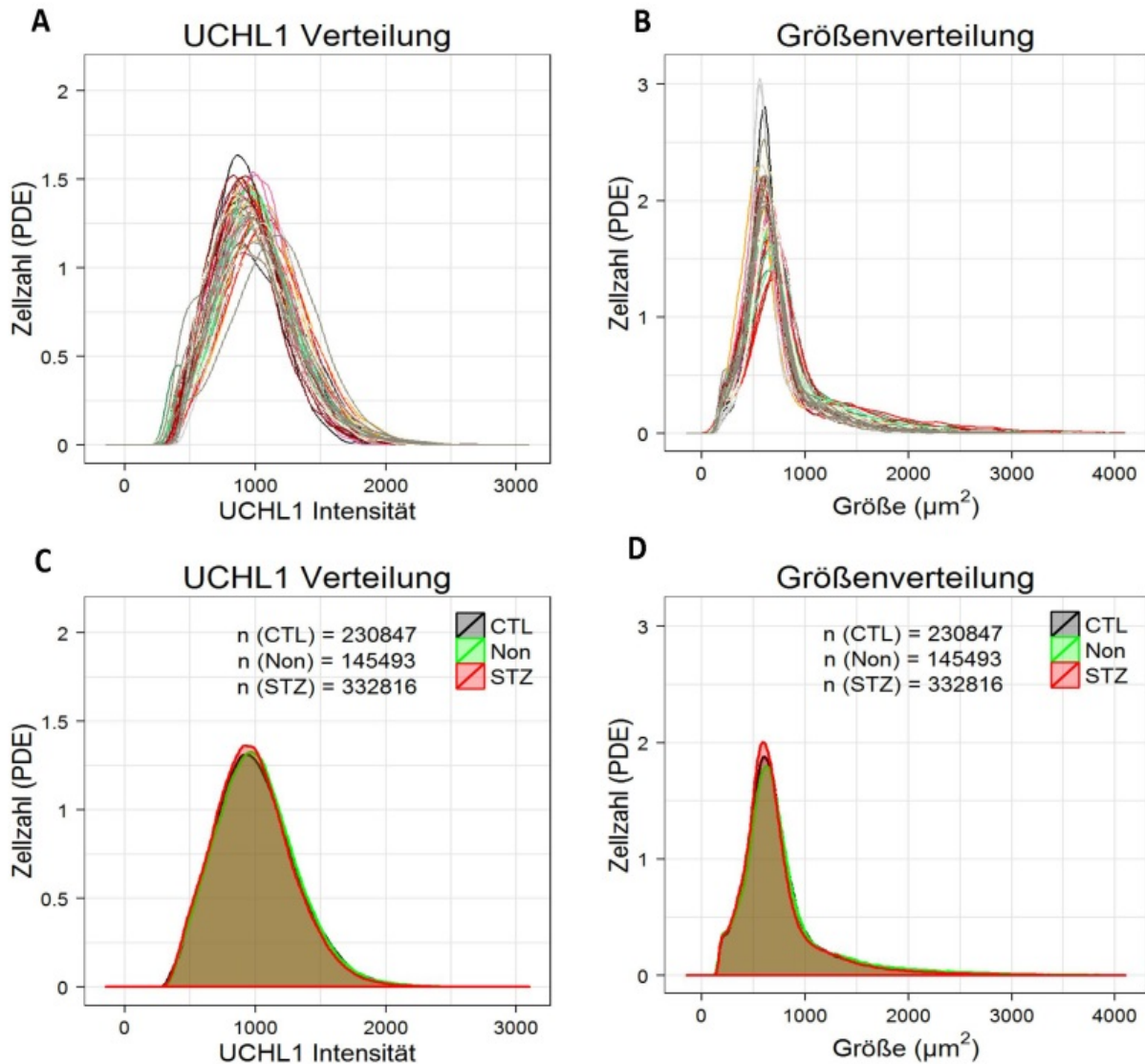
Pfotendrucktest; Druck (g)	CTL	STZ	Non	p-Wert STZ vs. CTL
Datum	n = 25 Mittelwert $\pm$ SEM	n = 27 Mittelwert $\pm$ SEM	n = 8 Mittelwert $\pm$ SEM	
05.03.2015	$106,5 \pm 2,5$	$54,5 \pm 3,7$		< 0,0001
19.03.2015	$106,0 \pm 1,9$	$55,0 \pm 1,8$		< 0,0001
17.04.2015	$105,0 \pm 2,3$	$60,0 \pm 5,3$	$108,5 \pm 3,2$	0,0002
29.04.2015	$104,4 \pm 1,2$	$56,3 \pm 4,3$	$106,0 \pm 2,6$	< 0,0001
01.09.2015	$107,9 \pm 2,9$	$66,4 \pm 2,9$		< 0,0001
<b>Mittelwert (g)</b>	<b><math>106,2 \pm 1,1</math></b>	<b><math>59,6 \pm 1,8</math></b>	<b><math>107,3 \pm 2,0</math></b>	<b>&lt; 0,0001</b>

**Tabelle 9: Systemische Applikation von STZ induziert mechanische Hyperalgesie** Der Schwellenwert für die mechanische Druckbelastung wurde nach Feststellung der Blutglukosekonzentration zweimalig durch den modifizierten Randall-Selitto Test bestimmt. Dabei zeigten die hyperglykämischen STZ-Tiere an allen experimentellen Tagen eine

signifikante Hyperalgesie ( $F_{2,59} = 307,2$ ;  $p < 0,05$ ) und reagierten schon bei geringem Gewicht ( $59,6 \pm 1,8$  g). Kontrolltiere mit Normoglykämie hielten deutlich stärkerem Druck stand ( $106,2 \pm 1,1$  g). Die teilweise mituntersuchten Non-Tiere zeigten Werte, die nicht signifikant von denen der Kontrolltiere abwichen ( $107,3 \pm 2,0$  g;  $F_{2,59} = 307,2$ ;  $p < 0,05$ ). ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Daten basierend auf den von Mitarbeitern der Firma Grünenthal durchgeführten Messungen.

### **3.3 Die Größenverteilung und die Expression des neuronalen Markers UCHL1 sind im STZ-Modell unverändert**

Sensorische Neurone der Spinalganglien sind sehr heterogen, d. h. die isolierte Zellpopulation besteht aus verschiedenen Untergruppen. Allen sensorischen Neuronen gemein ist jedoch die Expression des neuronalen Markers UCHL1, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen (Day and Thompson, 2010, Thompson et al., 1983). Die quantitative Analyse der UCHL1-Expression in allen Einzelzellen einer Präparation ergab eine unimodale Verteilung, die einer Normalverteilung ähnelt (Abb. 7A). Auch die Größe der einzelnen Zellen unterschied sich, stellte aber in der Gesamtheit stets eine charakteristische unimodale Verteilung mit Flanke dar (Abb. 7B). Um sicherzustellen, dass die Gesamtpopulation der isolierten Zellen zwischen dem STZ-Modell und den Kontrolltieren vergleichbar ist und um experimentelle Ausreißer zu identifizieren, wurden diese beiden Faktoren in allen Tieren untersucht. Trotz biologischer Variabilität zwischen den Einzeltieren, waren die Verteilungen über alle Experimente hinweg sehr ähnlich (Abb. 7C-D). Es zeigte sich eine Normalverteilung der UCHL1 und eine typische Größenverteilung der einzelnen Neurone. In keinem Experiment kam es zu einer deutlichen Verschiebung oder Verformung der Kurve, welches als Verlust einer bestimmten Zellgruppe hätte gewertet werden müssen (Abb. 7A-B). Außerdem zeigte sich, dass sowohl die UCHL1- als auch die Größenverteilung der Neurone im STZ-Modell nicht verändert sind (Abb. 7 C-D).



**Abbildung 7: Sensorische Neurone aus dem STZ Model haben eine unveränderte Größenverteilung und Intensitätsverteilung des neuronalen Markers UCHL1.** (A) Normalisierte Verteilungen der UCHL1-Expression in DRGs aller analysierten Tiere dieser Studie ( $n = 52$ ). Die Expression variierte leicht von Tier zu Tier, nahm aber insgesamt eine sehr ähnliche Verteilung an. (B) Einzelne, normalisierte Größenverteilungen der Neurone in den DRGs aller analysierten Tiere dieser Studie. (C) Normalisierte UCHL1-Verteilung der verschiedenen Gruppen. Die UCHL1 Verteilung war in Neuronen von STZ- (rot), CTL- (schwarz) und Non-Tieren (grün) weitestgehend identisch. (D) Normalisierte Größenverteilung der Neurone in den jeweiligen Gruppen. Es zeigten sich keine Veränderungen der Größenverteilung in DRGs aus STZ- ( $n = 23$ ), CTL- ( $n = 21$ ), oder Non-Tieren ( $n = 8$ ). Gesamtneuronenzahl: CTL = 230847; STZ = 332816; Non = 145493

### 3.4 Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten

Die Population isolierter Neurone aus Spinalganglien von gesunden Ratten setzt sich aus verschiedenen Subgruppen zusammen. Diese Subgruppen können anhand der Expression charakteristischer Markerproteine unterschieden werden. Die im Rahmen dieser Studie isolierten Neurone wurden anhand von Markerproteine auf Subgruppen untersucht, denen

Funktionen in der Schmerztransduktion und in Sensitivierungsvorgängen zugeschrieben werden. Dazu zählen TRPV1, CGRP, IB4, CaMKII $\alpha$ , RII $\beta$  und Nav1.8 (siehe 1.1.1). Außerdem gilt NF-200 als Marker für die stärker myelinisierten Neurone wie A $\alpha$ - und A $\beta$ -Fasern, denen bisher kein bekannter Zusammenhang mit schmerzrelevanter Signaltransduktion zugeschrieben wird (Cheng and Ji, 2008, Mense, 2004). Während die biologische Variabilität zwischen den einzelnen Tieren deutlich erkennbar war (Abb.8A), zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen STZ-Modell und Kontrolltieren (bzw. der Non-Gruppe) im Mittel gering ausfielen (Abb.8 B).

Die Intensitätsverteilung des hitzesensitiven Ionenkanals TRPV1 war im STZ-Modell nicht verändert. In einem Großteil der Zellpopulation wurden nur geringe Mengen an TRPV1 detektiert, während eine zweite Gruppe deutlich höhere Konzentrationen von TRPV1 aufwies. Der Übergang zwischen diesen beiden Gruppen stellte sich allerdings eher fließend dar. CGRP wurde in DRGs von Kontrolltieren in einer ähnlichen Verteilung wie TRPV1 detektiert, wobei deutlich weniger Zellen über größere Mengen an CGRP verfügten. Diese Verteilung von CGRP veränderte sich auch nicht im STZ-Modell.

Die IB4 bindenden Zellen konnten sowohl in Kontrolltieren als auch im STZ-Modell in zwei Gruppen unterteilt werden, dessen Übergang sich in beiden Phänotypen fließend darstellte. Ein größerer Teil der Zellen konnte IB4 nur schwach binden, während eine zweite, relativ große Zellgruppe eine größere Affinität zu IB4 zeigte.

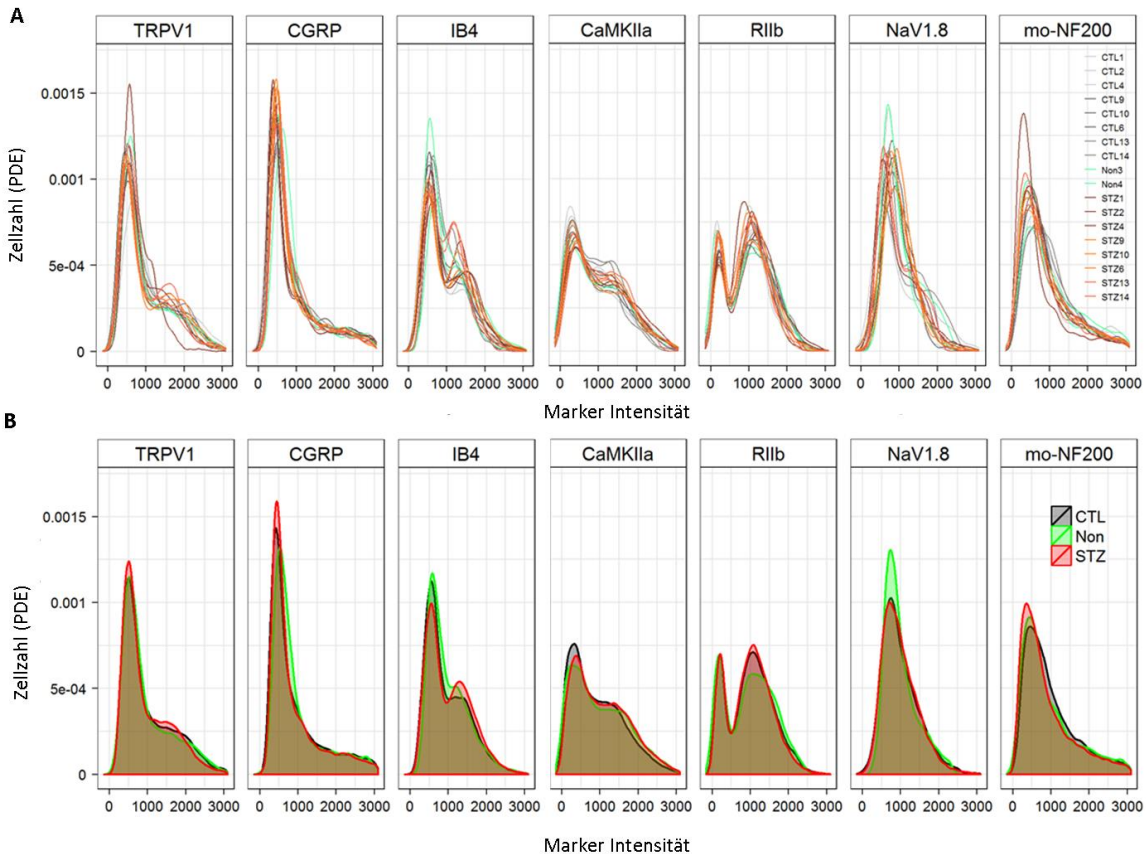
Während CaMKII $\alpha$  insgesamt in weniger Zellen exprimiert wurde als TRPV1 und CGRP und sich nur eine leichte Tendenz zur Identifizierung von zwei Gruppen zeigte, welche auch im STZ-Modell zu finden war, ließen sich die Neurone anhand von RII $\beta$  deutlich in zwei Gruppen einteilen. An der bimodalen Verteilung ließ sich erkennen, dass Zellen mit kaum bis niedriger RII $\beta$ -Expression (RII $\beta$ -) vorhanden waren, nur wenige Neurone mit einer mittleren Expression, aber eine weitere große Gruppe mit starker RII $\beta$ -Expression (RII $\beta$ +). Diese Zellen werden (in der Literatur) vorrangig als Nozizeptoren identifiziert (Isensee et al., 2014). Eine Unterscheidung dieser beiden Gruppen war auch im STZ-Modell erkennbar.

Der spannungsabhängige Ionenkanal Nav1.8 wird in Neuronen gesunder Ratten breit verteilt exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit kam es auch im hyperalgetischen STZ-Modell nicht zu einer Überexpression des Ionenkanals.

Antikörper gegen NF-200 werden vor allem von myelinisierten, nicht nozizeptiven Neuronen gebunden (Ruscheweyh et al., 2007). Auch dieser Subgruppenanteil war im STZ-Modell nicht verändert. Die Zusammensetzung der untersuchten neuronalen Subgruppen wurde folglich nicht durch eine Behandlung mit STZ beeinflusst. Mit STZ behandelte Tiere, die unter



dem festgelegten Wert der Hyperglykämie blieben, schienen Abweichungen in der Expression von Nav1.8. zu zeigen, jedoch handelt es sich hier lediglich um Daten von zwei Tieren.



**Abbildung 8: Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten. (A)** Normalisierte Intensitätsverteilungen der jeweiligen Subgruppenmarker TRPV1, CGRP, IB4, CaMKII $\alpha$ , RII $\beta$ , Nav1.8 und NF200 in Abhängigkeit der Zellzahl in den einzelnen Tieren (n = 18). Einzelne Tiere zeigten Abweichungen, insgesamt stellten sich die Verteilungen aber sehr ähnlich dar. **(B)** Subgruppenverteilung in DRGs von STZ- (rot), CTL- (schwarz) und Non-Tieren (grün). Es sind nur minimale Unterschiede zwischen CTL- und STZ-Tieren zu erkennen. Aus Non-Tieren gewonnene Neurone wiesen eine größere Abweichung auf, es handelte sich hier aber um wesentlich weniger Tiere (Non: n = 2 Tiere, CTL: n = 9 Tiere, STZ: n = 9 Tiere). Gesamtneuronenzahl: CTL = 62245; STZ = 69419; Non = 14979

### 3.5 Stimulation mit prototypischen inflammatorischen Mediatoren induziert im STZ-Modell eine höhere Variabilität in der schmerzrelevanten Signaltransduktion

Zur Untersuchung der schmerzrelevanten Signaltransduktion, wurden in einem ersten Screen (N = 4 Tiere pro Gruppe) verschiedene prototypische Mediatoren genutzt, um

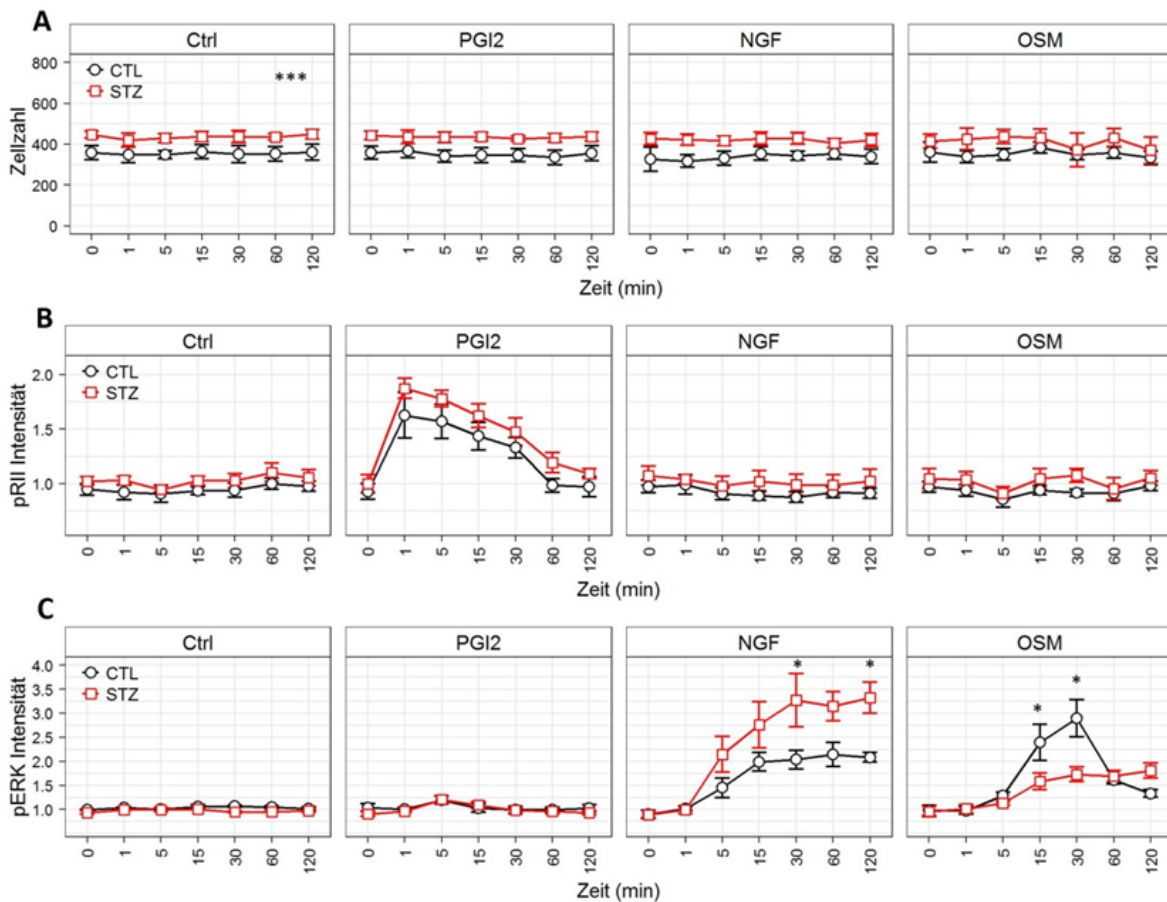
Veränderungen der sehr zahlreichen intrazellulären Signalwege zu erfassen. Diese Mediatoren werden seit Jahren in der Schmerzforschung genutzt und ein Teil ihrer Wirkungsmechanismen ist bereits bekannt. Die von uns genutzten Proteine PGI<sub>2</sub>, NGF und OSM induzieren über verschiedene Signalwege die intrazelluläre Phosphorylierung von PKA bzw. ERK1/2 (Gold et al., 1998, Sachs et al., 2009, Cavanaugh et al., 2001, Tamura et al., 2005, Ko et al., 2016). PGI<sub>2</sub> führt über die Bindung an G-protein-gekoppelte IP-Rezeptoren zur Aktivierung von PKA, während NGF die Tyrosinkinase TrkA aktiviert und OSM an gp130/OSMR-Cytokinrezeptoren bindet (Hucho and Levine, 2007, Khan and Smith, 2015, Langeslag et al., 2011). NGF und OSM werden in der Literatur und vorigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich mit der Phosphorylierung von ERK1/2 in Zusammenhang gebracht. Um durch die natürliche biologische Variabilität nicht zu falschen Ergebnissen zu gelangen, wurden alle Substanzen in mehreren Tieren untersucht und es konnten auch stets mehrere Substanzen an Zellen desselben Tieres untersucht werden (n > 300 Zellen pro Kondition und Zeitpunkt). Die Zellen wurden 1, 5, 15, 30, 60 oder 120 Minuten lang mit dem entsprechenden Stimulanz inkubiert, anschließend fixiert und dann immunzytochemisch angefärbt (Abb. 9).

Die Anzahl der isolierten und stimulierten Zellen blieb für alle Zeitpunkte und unter allen stimulierenden Einflüssen weitgehend konstant (Abb. 9A).

Nach Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Einzelmessungen der jeweiligen Stimulationszeitpunkte, ergab sich ein zeitlicher Ablauf der Phospho-Intensität von PKA-RII (pRII) (Abb. 9B) und ERK1/2 (pERK) (Abb. 9C). Zellen aus dem gleichen Tier wurden stets für alle Zeitpunkte genutzt und aus den Replikaten (Anzahl der Tiere) der Mittelwert gebildet. Zu allen Zeitpunkten wurde ebenfalls eine Lösungsmittelkontrolle (Ctrl) durchgeführt. In den Kontrollen wurde keine Induktion der Phospho-Intensität und somit Aktivierung von PKA oder ERK beobachtet.

Die PGI<sub>2</sub> induzierte Phospho-Intensität von pRII war in Zellen der Kontrolltiere sowie im STZ-Modell schon nach 1 min auf das 1,5-fache bzw. 2-fache erhöht. Bis Minute 120 sank die Phosphorylierungsintensität nur langsam ab und erreichte erst danach annähernd wieder die Grundlinie (Abb. 9B). PGI<sub>2</sub> induzierte dagegen über 120 min keine ERK1/2-Phosphorylierung. Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung war in Zellen des STZ-Modells höher als in Neuronen von CTL-Tieren ( $F_{1,42} = 22,4$ ;  $p < 0,05$ ). Insbesondere nach 30 min und 120 min zeigten sich große Differenzen. Die OSM induzierte ERK1/2-Phosphorylierung führte im STZ-Modell zu einer insgesamt veränderten Kinetik ( $F_{1,42} = 5,7$ ;  $p < 0,05$ ). Während hier die früheren Zeitpunkte (5 – 30 min) eine geringere Phosphorylierung zeigten, als im Kontrolltier, war die Reaktion 120 min nach Stimulation erhöht (Abb. 9C).

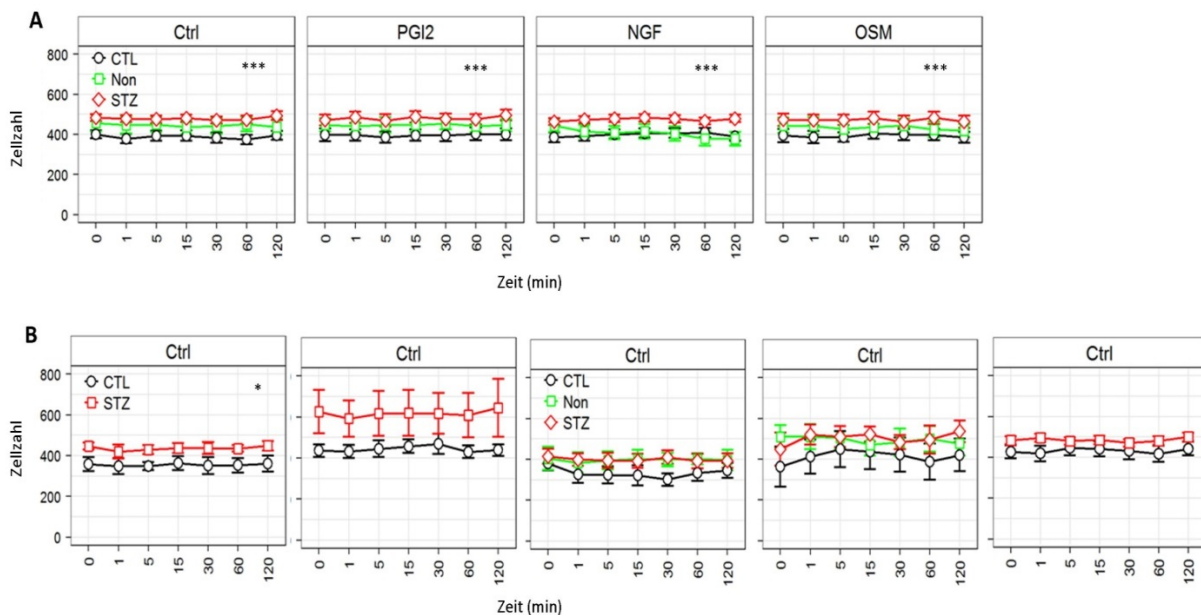
Dieses Experiment suggerierte, dass im hyperalgetischen STZ-Modell die intrazelluläre, schmerzrelevante Signaltransduktion nach Stimulation mit prototypischen, inflammatorischen Mediatoren verändert und insbesondere die durch NGF-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 erhöht ist.



**Abbildung 9: Stimulation mit prototypischen inflammatorischen Mediatoren induziert im STZ-Modell eine höhere Variabilität in der schmerzrelevanten Signaltransduktion.** (A) Durchschnittliche Anzahl mittels HCS-Mikroskopie analysierter Neurone der Kontrollgruppe (schwarz,  $n = 39068$ ) und Neurone aus dem STZ-Modell (rot,  $n = 47683$ ) pro Kondition und Zeitpunkt. Die Stimulation mit  $\text{PGI}_2$ , NGF und OSM hatte keine Auswirkungen auf die vom HCS-Mikroskop detektierte Anzahl von Neuronen. (B) Normalisierte phospho-RII-Intensität (pRII) unter Kontrollbedingungen (Ctrl) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten (0 – 120 min) nach Stimulation mit  $\text{PGI}_2$  ( $2 \mu\text{M}$ ), NGF ( $2,5 \text{ nM}$ ) und OSM ( $100 \text{ ng/ml}$ ).  $\text{PGI}_2$  führte zu einer schnellen, transienten Phosphorylierung. NGF und OSM induzierten keine PKA-RII-Phosphorylierung. (C) Parallel gemessene, normalisierte ERK1/2-Phosphorylierung (pERK) unter den gleichen Bedingungen wie (B). Während  $\text{PGI}_2$  kaum Auswirkungen hatte, führte die Stimulation mit NGF zu einem deutlichen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung, insbesondere in Neuronen der STZ-Tiere. OSM führte zu einer späteren, transienten ERK1/2-Phosphorylierung. STZ-Neurone und CTL-Neurone verhielten sich hier unterschiedlich. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt,  $n = 4$  Tiere pro Gruppe, Neuronenanzahl pro Kondition  $> 300$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.6 STZ-Behandlung resultiert in erhöhter Neuronenzahl *in vitro*

Bei der Isolation und Kultivierung von DRG-Neuronen und ihrer Untersuchung mittels HCS-Mikroskopie konnte neben der Analyse relevanter Faktoren für die Signaltransduktion parallel auch die Anzahl der Neurone gemessen werden, die pro Kondition untersucht wurden. Um etwaige Variabilität durch Plattenlagerung, -temperatur oder andere Faktoren zu eliminieren wurden stets Zellen beider Gruppen in jeder Platte untersucht. Auch die Positionen innerhalb einer Platte waren randomisiert. Das Volumen der ausgesäten Zellsuspension wurde für beide Gruppen gleichgehalten. Dennoch zeigte sich, dass die Anzahl der *in vitro* mittels HCS-Mikroskopie untersuchten Zellen der beiden Gruppen voneinander abwichen (Abb. 10). Im STZ-Modell lag die Neuronenzahl pro Well bzw. Kondition im Mittel höher als die der Kontrolltiere. Dabei wurde die Anzahl der detektierten Zellen nicht durch eine Stimulation mit PGI<sub>2</sub>, NGF oder OSM beeinflusst (Abb. 10A). Auch die Zeitpunkte der Stimulationen zeigten keine Auswirkungen (Abb. 10A) und die Fixation erfolgte bei allen Zellen einer Platte, unabhängig von ihrer Stimulation, nach der gleichen Zeit. Die Gesamtzahl der Neurone variierte zwischen einzelnen experimentellen Tagen, die detektierte Anzahl von Neuronen aus STZ-Tieren war jedoch stets höher als die Anzahl der Neurone aus Kontrolltieren (Abb. 10B, nur unter Kontrollbedingung gezeigt). Somit resultiert die systemische STZ-Behandlung der Ratten in erhöhter Neuronenzahl *in vitro*.

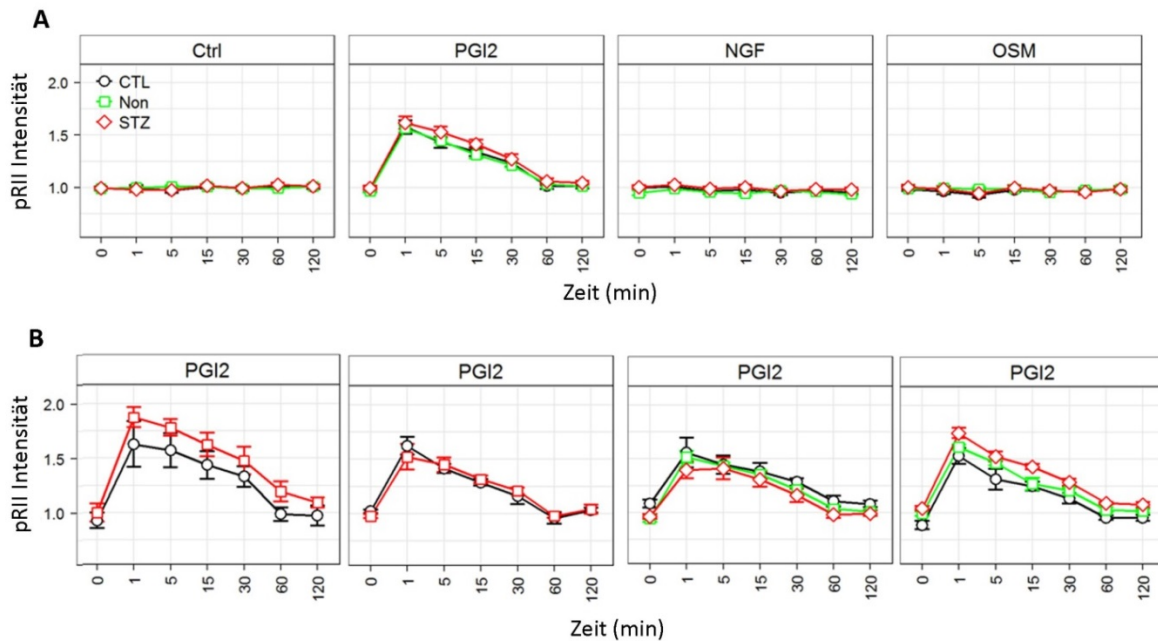


**Abbildung 10: Systemische STZ-Behandlung resultiert in höherer Neuronenzahl *in vitro*.** Anzahl der mittels HCS-Mikroskopie detektierten Zellen aus CTL-Tieren (schwarz), STZ-Tieren (rot), sowie der Non-Gruppe (grün). **(A)** Anzahl der gesamten, aus STZ- (n = 23), CTL- (n = 21), und Non-Tieren (n = 8) gewonnenen Neurone unter Kontrollkonditionen, sowie nach Stimulation mit PGI<sub>2</sub>, NGF und OSM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 – 120 min). Unter allen Konditionen und Zeitpunkten wurden mehr Zellen aus STZ-Tieren

detektiert ( $F_{2,1599} = 84,2$ ;  $p < 0,001$ ). **(B)** Zellzahlen der drei Tiergruppen unter Kontrollkondition an jeweils einem einzigen experimentellen Tag (v. l. n. r. 05.03. n = 4 Tiere pro Gruppe (p.G.); 19.03. n = 3 Tiere p.G.; 17.04. n = 4 Tiere p.G.; 29.04. n = 4 Tiere p.G.; 01.09. n = 7 Tiere p.G.). Die teilweise vorhandene Variabilität der Zellzahlen zwischen den 5 einzelnen experimentellen Tagen wird hier deutlich. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; Gesamtneuronenzahl: CTL = 230847, STZ = 332816, Non = 145493, Neuronanzahl pro Kondition  $> 300$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### **3.7 Stimulation mit PGI<sub>2</sub> führt zu transienter Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp**

Werden isolierte Neurone *in vitro* mit PGI<sub>2</sub> stimuliert, kommt es zur Aktivierung und somit Dissoziation der PKA-II, was zu einer erhöhten Zugänglichkeit der phosphorylierten inhibitorischen Domänen der regulatorischen RII Untereinheiten führt (pRII) (Isensee et al., 2014). Diese messbare pRII erreicht ihren Höhepunkt bei 1,5-facher Steigerung sehr früh (nach ca. 1 min) und fällt dann langsam wieder ab. Nach 60 min sinkt die Phosphorylierungsintensität wieder auf die Höhe der Grundlinie ab und steigt bis zur 120. min auch nicht wieder an (Isensee et al., 2014). Diese transiente Phosphorylierungsdynamik konnte sowohl in Neuronen, die aus Kontrolltieren isoliert wurden, als auch in den aus dem STZ-Modell gewonnen Neuronen reproduziert werden. Das Maß der Phosphorylierung stellte sich dabei an den verschiedenen experimentellen Tagen weitgehend identisch dar. NGF und OSM induzierten dagegen in keinem der beiden Phänotypen eine messbare Phosphorylierung von PKA-RII. Neurone, die aus Tieren der Non-Gruppe isoliert wurden zeigten ebenfalls keine Abweichungen (Abb. 11).



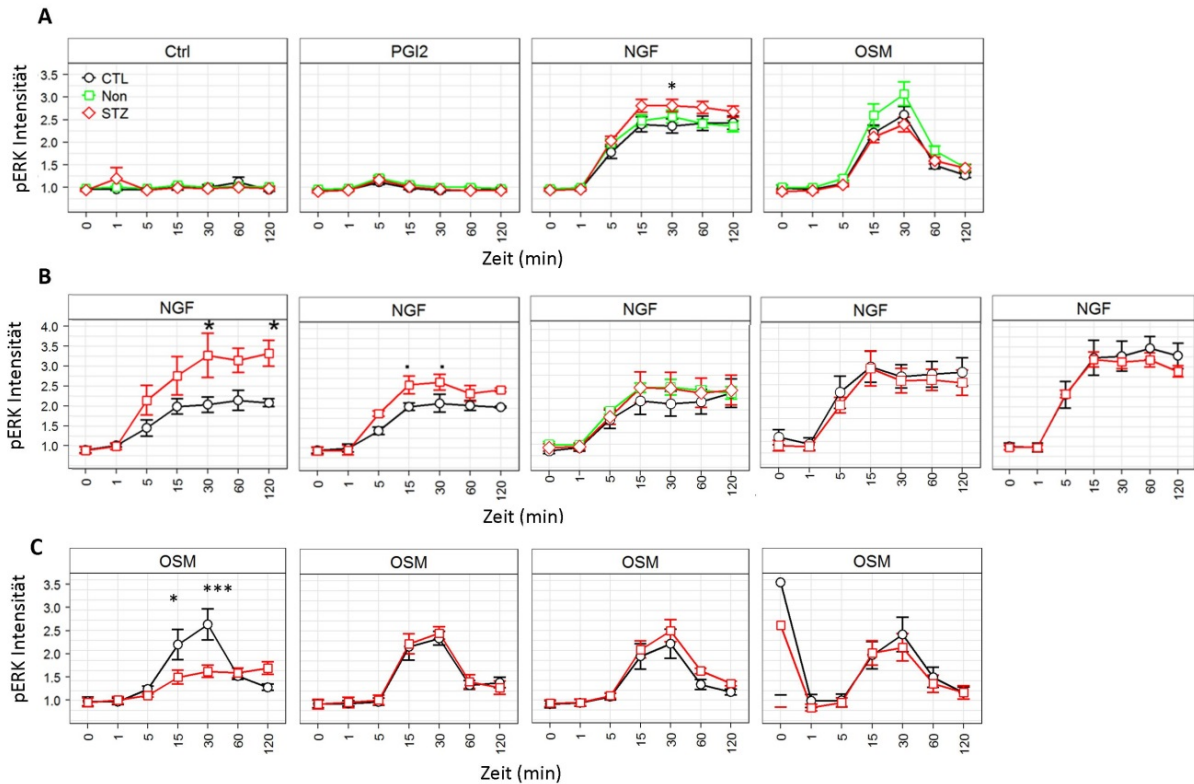
**Abbildung 11: Stimulation mit PGI<sub>2</sub> führt zu transientser Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp.** Dargestellt werden die durch HCS-Mikroskopie ermittelten pRII-Intensitäten in Neuronen von CTL- (schwarz, n = 21), STZ- (rot, n = 23) und Non-Tieren (grün, n = 8) nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen an den unterschiedlichen Zeitpunkten (0 – 120 min). **(A)** Nur PGI<sub>2</sub> führte zu einer Phosphorylierung von PKA-RII. Diese stellte sich transient dar und lag nach 120 min wieder auf dem basalen Level. **(B)** An allen 4 experimentellen Tagen (v. l. n. r. 05.03. / 19.03. / 17.04. / 29.04.) stellte sich der Verlauf der Phosphorylierung durch PGI<sub>2</sub> in Neuronen aus CTL- und STZ-Tieren weitgehend gleich dar. Die Non-Tiere wurden nur an 2 Tagen (17.04. / 29.04.) untersucht, wichen aber in der pRII-Intensität nicht von den anderen beiden Phänotypen ab. Mittelwert ± SEM, Neuronenanzahl pro Kondition > 300, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

### 3.8 Die NGF- und OSM-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 variiert im STZ-Modell

Im Gegensatz zur relativ konstant auftretenden, zuvor beschriebenen, transienten PKA-RII-Phosphorylierung, variierte die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Stimulation mit NGF und OSM insbesondere im STZ-Modell sehr stark. NGF induzierte im Kontrolltier eine Phosphorylierung, die zwischen 30 und 120 min mit ca. 3-facher Erhöhung ihr höchstes Ausmaß erreicht hatte. Die erste geringe Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung trat nach 1 min ein und stieg dann stetig an, bis ca. 30 min nach Stimulation. Danach stieg die ERK1/2-Phosphorylierung nur noch wenig an und blieb für die nächste Stunde weitgehend konstant. Diese Phosphorylierung fiel im STZ-Modell nur geringgradig höher aus als in Neuronen von Kontrolltieren (Abb. 12A, NGF). In der Darstellung der einzelnen Replikate spiegelte sich die hohe Variabilität der Phosphorylierung im STZ-Modell wieder. Im ersten Experiment kam es in Neuronen des STZ-Modells zu höherer ERK1/2-Phosphorylierung als

in Kontrolltierneuronen ( $F_{1,42} = 22,4$ ;  $p < 0,05$ ). Im zweiten Experiment fielen diese Unterschiede bereits wesentlich geringer aus ( $F_{1,28} = 18,5$ ;  $p < 0,1$ ) und in den folgenden Experimenten nahm der Unterschied der ERK1/2-Phosphorylierung immer weiter ab (Abb. 12B). Die stärkere ERK1/2-Phosphorylierung im STZ-Modell nach 30 Minuten Stimulation mit NGF blieb über alle Experimente hinweg signifikant ( $F_{2,455} = 8,7$ ;  $p < 0,05$ ).

OSM führt in Neuronen gesunder Ratten zu einer langsam ansteigenden und nur recht kurz andauernden Phosphorylierung von ERK1/2, die nach ca. 30 min ihren Höhepunkt erreicht. Anschließend nimmt die ERK1/2-Phosphorylierung wieder ab (Ko et al., 2016); AG Hucho/Garza, unpublizierte Resultate). In den durchgeführten Experimenten zeigte sich nach 30 min eine Erhöhung der Phosphorylierung auf das 2,5-fache. Nach 120 min sank die ERK1/2-Phosphorylierung wieder bis zur Grundlinie (Abb. 12A, OSM). Im ersten Experiment ergab sich in Neuronen von STZ-Tieren außerdem eine abweichende Phosphorylierungskurve ( $F_{1,42} = 5,6$ ;  $p < 0,05$ ). OSM führte hier zu einem langsameren Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung, welcher erst nach ca. 120 min die maximale (1,5-fache) Intensität erreichte. Dieser Effekt ließ sich in den folgenden Experimenten jedoch nicht reproduzieren. An den anderen experimentellen Tagen reagierten Neurone aus STZ-Tieren nahezu exakt wie die aus Kontrolltieren isolierten Neurone (Abb. 12C).



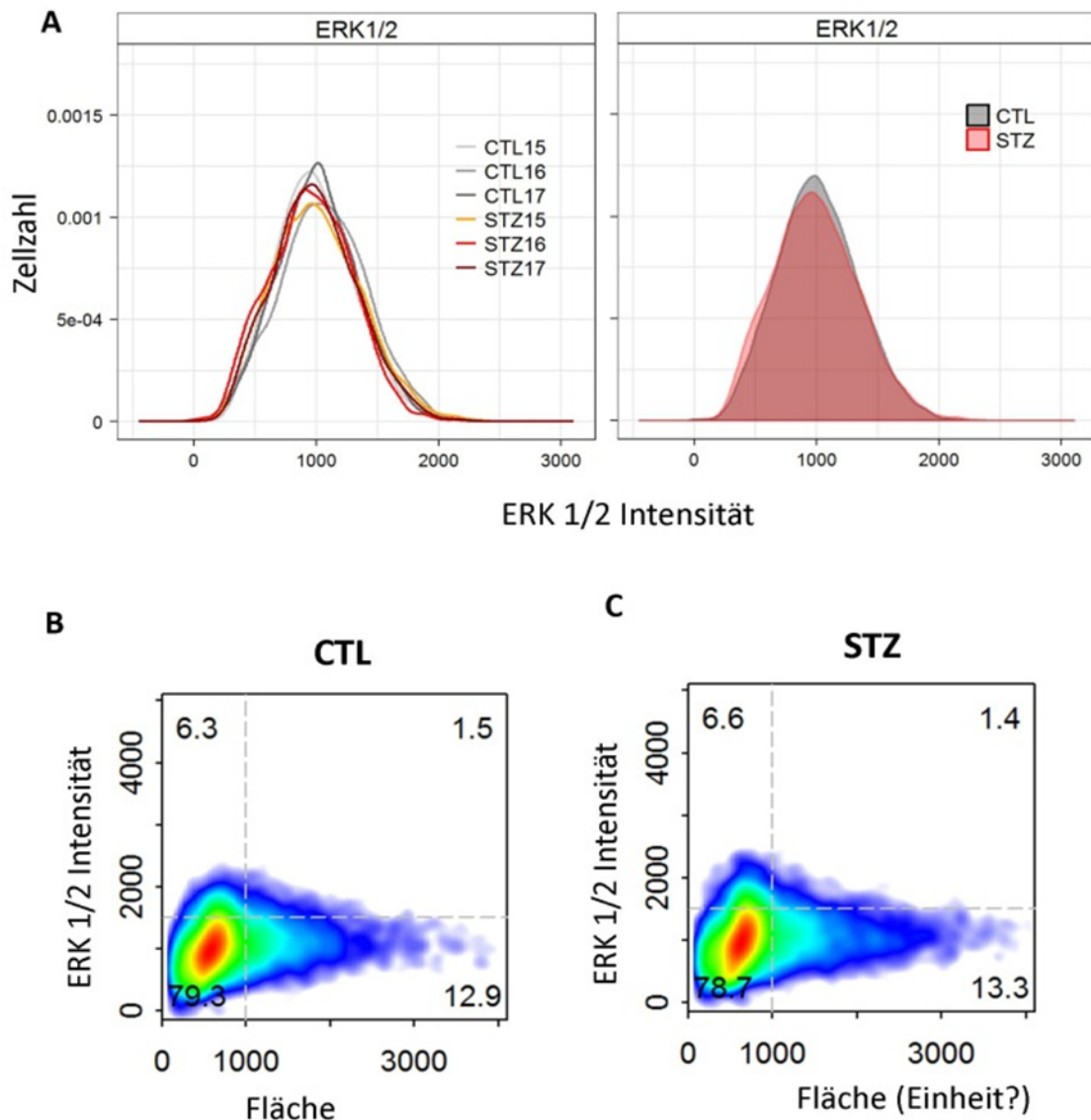
**Abbildung 12: Die NGF- und OSM-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 variiert im STZ-Modell.** Gemessene ERK1/2-Phosphorylierung (pERK) der unterschiedlichen Phänotypen CTL (n = 21), STZ (n = 23) und Non (n = 8) nach Stimulation mit PGI<sub>2</sub>, NGF, OSM und unter Kontrollbedingungen (Ctrl). **(A)** Unter Kontrollbedingungen sowie nach Stimulation mit PGI<sub>2</sub> kam es nicht zu einem nennenswerten Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. Stimulation mit NGF führte in allen Phänotypen nach 15 min zur Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung auf das 2,5- bis 3-fache. Auch die Stimulation mit OSM führte zu höherer ERK1/2-Phosphorylierung. Diese stellte sich allerdings transient dar und lag nach 60 min bereits wieder deutlich näher an der Grundlinie. **(B)** Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung variierte stark zwischen den experimentellen Tagen. Während sich an den ersten zwei experimentellen Tagen noch Abweichungen von STZ-Neuronen zu Neuronen aus Kontrolltieren zeigten, stellte sich die ERK1/2-Phosphorylierung in den folgenden Experimenten nahezu identisch dar (v. l. n. r. 05.03. / 19.03. / 17.04. / 29.04. / 01.09.) **(C)** Stimulation der Zellen mit OSM führte anfangs zu einer abweichenden Phosphorylierung der Neurone aus STZ-Tieren (n = 4 Tiere p. G.;  $F_{1,42} = 5,6$ ;  $p < 0,05$ ). Dieser Effekt ließ sich später nicht mehr reproduzieren. (v. l. n. r. 05.03. / 19.03. / 17.04. / 29.04), Neuronenzahl pro Kondition > 300, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.9 Die basale ERK1/2-Expression ist im STZ-Modell unverändert

Um die Variabilität der ERK1/2-Phosphorylierung genauer einordnen zu können, wurden Zellen derselben Tiere wie in den zuvor verwendeten Experimenten parallel auf die basale, also nicht-phosphorylierte Verteilung von ERK1/2 untersucht. Um eine höhere



Phosphorylierung durch vermehrte Expression im STZ-Modell ausschließen zu können, wurden sowohl Zellen aus Kontrolltieren, sowie Zellen aus dem STZ-Modell parallel analysiert. In den untersuchten Neuronen (CTL: 17458 / STZ: 18887) konnte dabei kein Unterschied in der Expression der basalen ERK1/2 festgestellt werden (Abb.13A). In beiden Phänotypen zeigte sich eine typische unimodale Verteilung, die einer Normalverteilung stark ähnelt. Einige Neurone exprimierten nur extrem wenig ERK1/2, einige extrem viel und der Großteil lag dazwischen mit einer mittleren ERK1/2-Expression. Um eventuelle Abweichungen in der Lokalisation der ERK1/2 Verteilung auszuschließen wurde außerdem parallel die Größe der Zellen analysiert (Abb. 13B). Sowohl in den Kontrolltieren als auch im STZ-Modell zeigten vornehmlich kleine Neurone starke ERK1/2-Expression. Mit zunehmender Größe der Neurone nahm die Menge der ERK1/2-Expression ab.



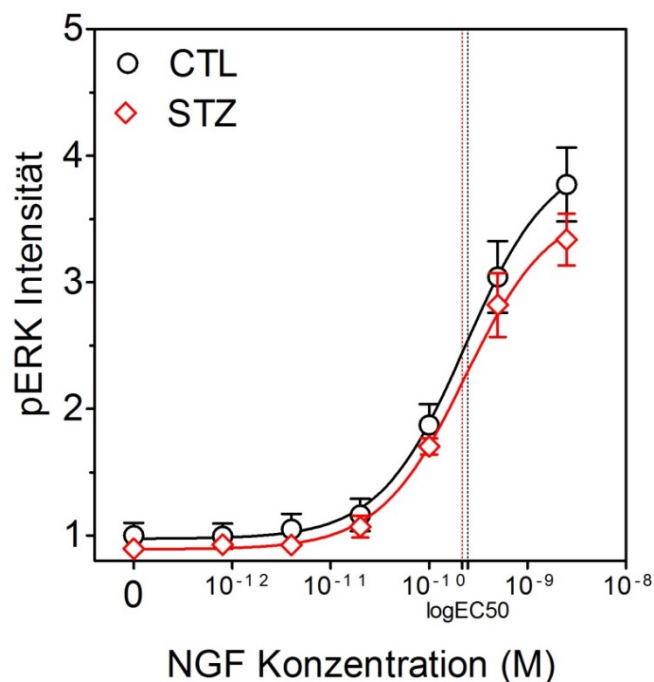
**Abbildung 13: Die basale ERK1/2-Expression ist im STZ-Modell unverändert. (A)** Expression von ERK1/2 ohne Stimulation in den Neuronen der einzelnen Tiere ( $n = 3$  Tiere) sowie in den jeweiligen Gruppen (STZ, CTL). Obwohl die Verteilung der basalen ERK1/2-Expression zwischen einzelnen Individuen geringfügig variiert, ist sie im Mittel zwischen beiden Gruppen unverändert. **(B-C)** Einzelzelldaten zur Expressionsstärke von ERK1/2 in Bezug zur Zellgröße in CTL-Tieren **(B)** und im STZ-Modell **(C)**. Die Verteilung der Expression von ERK1/2 in unterschiedlich großen Neuronen ist unverändert.

### 3.10 Die NGF Dosis-Wirkungs-Kurve ist im STZ-Modell unverändert

Nachdem sich die Expressionsdichte von ERK1/2 als identisch darstellte, sollten im nächsten Schritt weitere, im STZ-Modell möglicherweise veränderte Faktoren im Signalweg von NGF zu ERK1/2 untersucht werden. Dafür wurden Dosis-Wirkungs-Kurven herangezogen. Aus Kontrolltieren isolierte Neurone sowie Neurone aus dem STZ-Modell wurden für 30 min mit

0; 0,0008; 0,004; 0,02; 0,1; 0,5 und 2,5 nM NGF stimuliert (Abb. 14). Auch in diesem Experiment konnten die UCHL1-Verteilung und die Größenverteilung der Neurone als Kontrollen parallel analysiert werden. Die typischen Verteilungen blieben erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Zellen konnten außerdem nicht nur auf ihre ERK1/2-Phosphorylierung hin untersucht werden, gleichzeitig erfolgte eine Färbung mit Antikörpern gegen unphosphoryliertes ERK1/2 (Abb. 15). Hierdurch sollte deutlich werden ob und inwiefern besonders Zellen mit hoher oder niedriger ERK1/2 Expression auf die Stimulation mit NGF reagieren.

Nach Auswertung des Dosis Effektes auf die Gesamtpopulation der isolierten Neurone (Abb. 14), ließ sich bei 0,02 nM NGF (Abb. 14:  $2 \times 10^{-11}$ ) ein erster Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung erkennen. Eine Konzentration von 0,1 nM NGF führte bereits zur Verdopplung der ERK1/2-Phosphorylierung. Sowohl in Neuronen der STZ-Tiere, als auch in den aus Kontrolltieren gewonnenen Neuronen lag der EC50 bei ca. 0,23 nM NGF (CTL: 0,25 nM vs. STZ: 0,22 nM;  $F_{1,64} = 0,1$ ;  $p = 0,7$ ) Bis zu einer Konzentration von 0,5 nM NGF stieg die ERK1/2-Phosphorylierung weiter steil an. Anschließend folgte mit ca. 3,5-fach erhöhter ERK1/2-Phosphorylierung jedoch eine Annäherung an ein Plateau (Abb. 14).



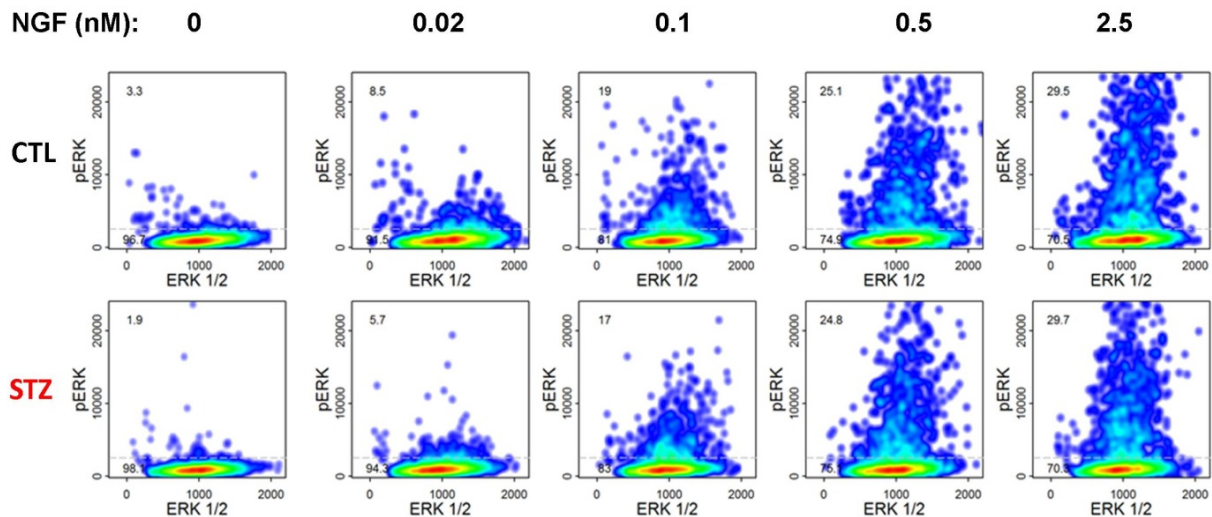
**Abbildung 14: Die NGF Dosis-Wirkungskurve ist im STZ-Modell unverändert.** Normalisierte pERK-Intensitäten in Abhängigkeit zu den verwendeten, hier logarithmisch dargestellten NGF Konzentrationen in Kontrolltieren (n = 6 Tiere) und im STZ-Modell (n = 6 Tiere). Mit zunehmender NGF-Dosis stieg die Phosphorylierung von ERK1/2 an. Beide Phänotypen zeigten eine fast identische Reaktion auf die Stimulation mit NGF, Neuronenanzahl pro Kondition > 200.

Aus der Analyse der Einzelzellendaten (Abb. 15) ließen sich weitere Erkenntnisse gewinnen. Die bereits beschriebenen höheren ERK1/2-Phosphorylierungen entstanden nicht durch einen gleichmäßigen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung in allen Neuronen. Vielmehr handelte es sich hier um einen geringen Anteil der Zellen, die teilweise sehr hohe ERK1/2-Phosphorylierung aufwiesen.

Bei Konzentrationen von weniger als 0,02 nM NGF wurde keine Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung festgestellt (Daten nicht gezeigt). In einigen Zellen konnte lediglich eine spontane Phosphorylierung beobachtet werden. Nach Stimulation mit 0,1 nM NGF zeigten einige Zellen eine gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung (ca. 7 %, pERK-Intensität 10 – 20-fach erhöht, Abb. 15). Mit zunehmender Dosis zeigten entsprechend mehr Zellen erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung, jedoch beschränkte sich die Reaktion stets auf eine responsive Subgruppe (7 % bei 0,02 nM NGF, 17 % bei 0,1 nM NGF, 25 % bei 0,5 nM NGF, Abb. 15). Selbst bei der höchsten Dosis von 2,5 nM NGF zeigten lediglich 30 % der Zellen erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung. In einzelnen Neuronen dieser Gruppe wurde ein über 25-facher Anstieg von pERK gemessen (Abb. 15).

Eine Korrelation zwischen stark ERK1/2 positiven Zellen und deren Reaktion auf Stimulation mit NGF war nicht erkennbar. Ähnlich wie die ERK1/2-Verteilung selbst, zeigte auch die Population der Neurone, die auf NGF mit ERK1/2-Phosphorylierung reagierten eher eine Normalverteilung. Ein Großteil der Neurone (ca. 70 %), die deutliche ERK1/2-Expression zeigten, wies auch nach Stimulation mit hoher NGF Dosis keine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung auf (Abb.15).

Im Vergleich der ERK1/2-Phosphorylierung in Neuronen von Kontrolltieren mit den aus dem STZ-Modell gewonnenen Neuronen zeigten sich kaum Unterschiede. Die Dosis-Wirkungs-Kurve verlief nahezu identisch, der EC50 war ebenfalls gleich (Abb. 14). Auch die Population der auf NGF ansprechenden Zellen war nahezu identisch (Abb. 15).



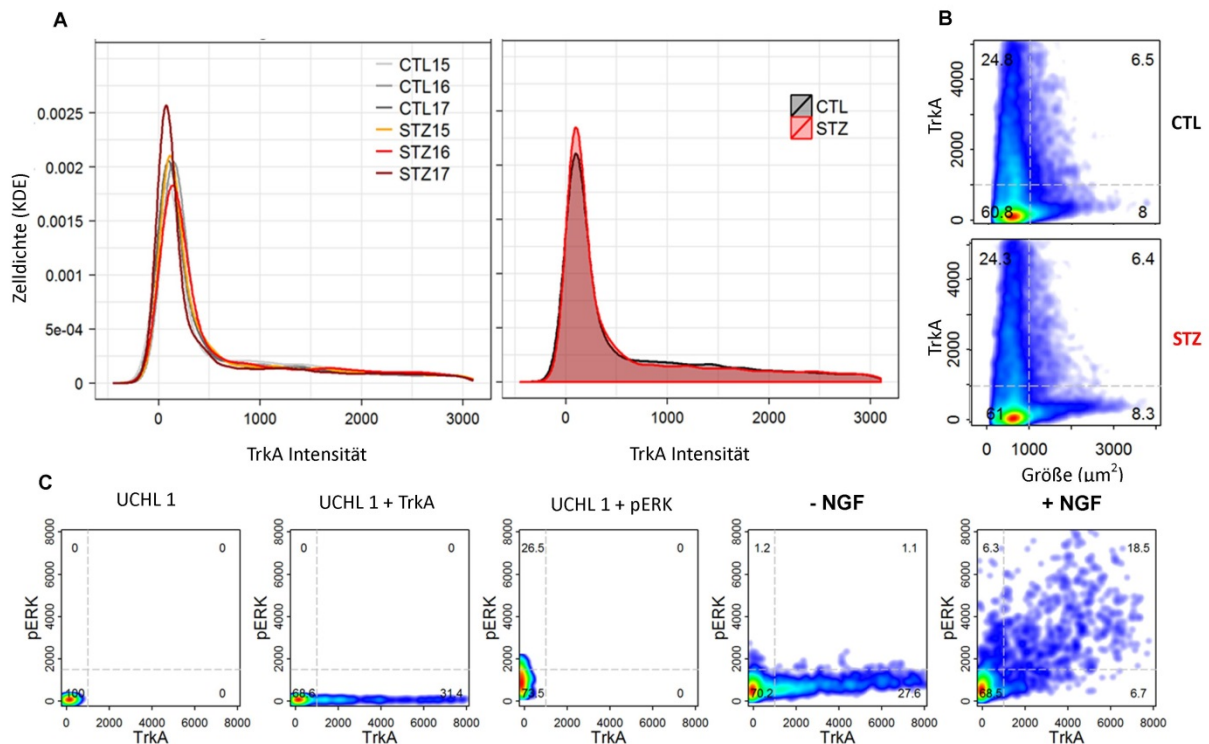
**Abbildung 15: Der dosisabhängige Anteil der NGF responsiven Zellen ist im STZ-Modell unverändert.** ERK1/2-Phosphorylierung der einzelnen untersuchten Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von ERK1/2. Sowohl die Expression von ERK1/2 als auch der Anteil Zellen, der mit höherer ERK1/2-Phosphorylierung reagierte, zeigten annähernd eine Normalverteilung. Mit zunehmender Konzentration von NGF steigerten zunehmend mehr Zellen ihre ERK1/2-Phosphorylierung und einzelne Neurone erreichten eine deutlich höhere ERK1/2-Phosphorylierung (> 25-fach), Neuronenzahl pro Kondition > 200.

### 3.11 Der NGF-Rezeptor TrkA wird vornehmlich in kleinen Nozizeptoren exprimiert und nicht durch STZ hochreguliert

Die TrkA ist eine Tyrosinkinase und wird nicht von allen Neuronen der Spinalganglien gleichermaßen exprimiert. Sie fungiert als Rezeptor für NGF und führt so über weitere, hintereinander gekoppelte Proteine zur Phosphorylierung von ERK1/2 (Barbacid, 1994, Hong et al., 2012, Skaper, 2008). Es wurden quantitative Analysen zur TrkA-Expression in beiden Phänotypen durchgeführt und diese im Verhältnis zur Gesamtpopulation der aus Spinalganglien isolierten Neurone dargestellt (Abb. 16). TrkA zeigte in Spinalganglien der gesunden Ratten eine unimodale Verteilung mit langer Flanke. Eine große Anzahl Neurone exprimiert nur sehr geringe Mengen an TrkA. Es gab jedoch auch Neurone, die höhere bis sehr hohe Intensitäten an TrkA aufwiesen. Auch im STZ-Modell ließ sich diese Verteilung deutlich erkennen (Abb. 16A). Durch gleichzeitige Analyse der Größe der isolierten Neurone konnte zudem eine Abhängigkeit der Expression von TrkA zur Größe der einzelnen Neurone gezeigt werden. TrkA wurde sowohl im STZ-Modell als auch im Kontrolltier in kleinen Neuronen stärker exprimiert (24,8 %) als in größeren Neuronen (6,5 %) (Abb. 16B).

Bei Betrachtung der TrkA-Verteilung in Zusammenhang mit der NGF induzierten Signaltransduktion zeigte sich, dass bei vermehrter Expression von TrkA auch die ERK1/2-Phosphorylierung steigt. In Kontrollen, in denen jeweils nur Primär-Antikörper gegen UCHL1, UCHL1 + TrkA, bzw. UCHL1 + pERK verwendet wurden, lassen sich eventuell auftretende spektrale Überlappungen zwischen den Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe der verwendeten Antikörper ausschließen (Abb. 16C). Nach mathematischer Korrektur spektraler Überlappungen wiesen die Kontrollen keine Korrelation zwischen den Intensitäten auf. Es ist deutlich erkennbar, dass nach Färbung mit UCHL1 keine höheren Intensitäten von TrkA oder pERK nachweisbar waren. Die Färbung mit UCHL1 und TrkA zeigte die deutliche Variabilität in der TrkA-Expression der Zellen, aber keine Hinweise auf Überlappungseffekte auf ein als pERK detektiertes Signal. Auch die Färbung gegen pERK zeigt, dass es dabei nicht zu höheren TrkA-Intensitäten kam (Abb. 16C).

Nach Stimulation der Neurone mit NGF wurde der Fokus auf die Expression von TrkA in Zusammenhang mit der ERK1/2-Phosphorylierung gelegt. Sowohl im STZ-Modell als auch in den Kontrolltieren zeigten Zellen mit hoher TrkA Expression ohne die Einwirkung von NGF kaum ERK1/2-Phosphorylierung (27,6 % vs. 1,1 %). (Abb. 16C – NGF). Nach der Stimulation mit NGF hingegen zeigte sich in beiden Phänotypen, dass nahezu alle Zellen, in denen TrkA vermehrt exprimiert wurde mit starker ERK1/2-Phosphorylierung reagierten (18,6 % Abb.16C). Zudem zeigten stark TrkA positive Zellen eine deutlich höhere ERK1/2-Phosphorylierung als Neurone mit weniger TrkA-Expression (Abb. 16C + NGF).

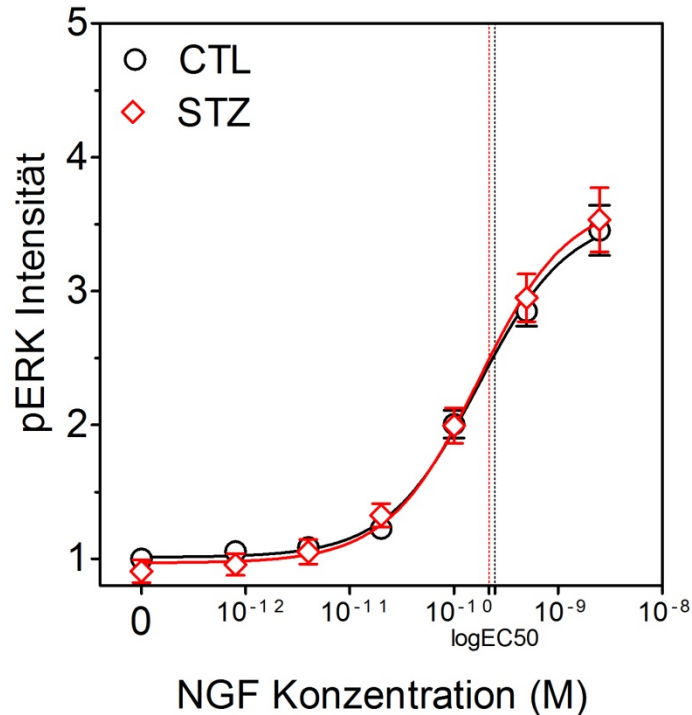


**Abbildung 16: Der NGF-Rezeptor TrkA wird vornehmlich in kleinen Nozizeptoren exprimiert und nicht durch STZ hochreguliert. (A)** Die Verteilung der TrkA-Intensität zeigte in den untersuchten Neuronen eine lange Flanke, weshalb von sehr variabler TrkA-Expression auszugehen ist. Vergleicht man die beiden Phänotypen Kontrolltier und STZ-Modell miteinander, ist erkennbar, dass es zu keiner relevanten Differenz in der TrkA-Verteilung kam. ( $n = 3$ , Gesamtneuronenanzahl  $> 17000$  Neurone p. G.) **(B)** TrkA-Expression im Verhältnis zur Größe der einzelnen Neurone. Im gesunden, sowie im diabetischen Phänotyp konzentriert sich die TrkA-Expression insbesondere auf kleine Neurone. **(C)** Kontrollen (1-3), in denen nur UCHL 1, UCHL 1 + TrkA, bzw. UCHL 1 + pERK gefärbt wurde, um etwaige spektrale Überlappungen auszuschließen. Unstimulierte (- NGF) und mit NGF stimulierte Neurone (+ NGF) nach ca. 30 min. Es lässt sich eine deutliche Korrelation zwischen den TrkA positiven Neuronen und der Intensität der ERK1/2-Phosphorylierung erkennen.

### 3.12 Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig und korreliert mit der TrkA-Expression

Nach Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von NGF auf ERK1/2 wurden weitere Experimente durchgeführt um auch die Dosis-Wirkung in Zusammenhang mit TrkA genauer analysieren zu können. Sowohl im STZ-Modell als auch in Kontrolltieren wurden isolierte Neurone für 30 min mit den bereits zuvor verwendeten Dosierungen stimuliert. Dabei zeigte sich eine identische Entwicklung der Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 17) in beiden Phänotypen. Ab einer Konzentration von 0,02 nM zeigte sich ein Anstieg der ERK1/2-

Phosphorylierung. Neurone aus dem STZ-Modell verhielten sich identisch zu Neuronen aus Kontrolltieren. Auch hier fielen die beiden EC50 Werte zusammen (CTL: 0,18 nM vs. STZ: 0,16 nM). Auch bei höherer NGF-Dosis zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Phänotypen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven verliefen in diesem zweiten Experiment nahezu identisch.



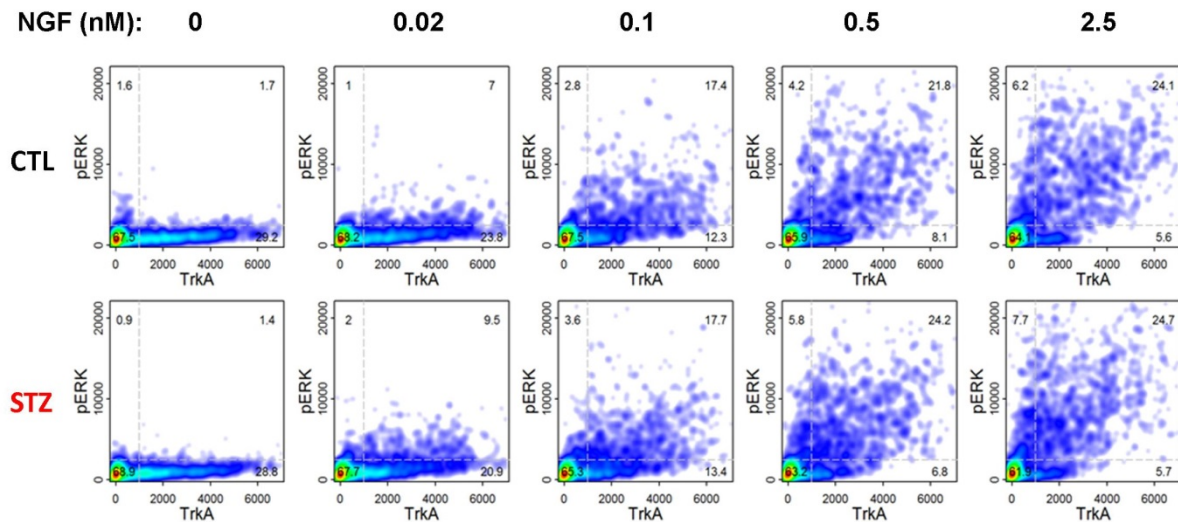
**Abbildung 17: Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig.** Normalisierte ERK1/2-Phosphorylierung in Abhängigkeit zur logarithmisch dargestellten NGF-Konzentration (n = 6, Neuronenanzahl pro Kondition > 200). Die Dosis-Wirkungs-Kurve verlief identisch in beiden Phänotypen und erreichte bei einer ca. 3,8-fachen Erhöhung ihr Maximum.

Durch Einzelzelldaten ließ sich auch hier erkennen, dass es sich nur um eine Untergruppe (ca. 24 %) von Neuronen handelte, die nach NGF-Stimulation sehr hohe ERK1/2-Phosphorylierung entwickelte (Abb. 18). Selbst nach Stimulation mit 2,5 nM NGF zeigten über 60 % der Zellen keine Veränderung ihrer ERK1/2-Phosphorylierung. Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Normalverteilung der reagierenden Zellen (siehe 3.10) ließ sich hier eine deutliche Korrelation der ERK1/2-Phosphorylierung zur Expression von TrkA erkennen. Bei niedriger NGF-Dosierung (0,02 nM) zeigten 7 % der Neurone ansteigende ERK1/2-Phosphorylierungen (bis 10-fach). Diese 7 % stammten nahezu ausschließlich aus der Population der TrkA positiven Zellen. Mit ansteigender NGF-Dosierung stieg auch die Anzahl der reagierenden Zellen sowie das Maß der Phosphorylierung. So zeigten bei 0,5 nM NGF bereits über 20 % der Neurone erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung, die größtenteils bei 10 -



20-fachen Intensitäten lagen. Nach einer Stimulation mit 2,5 nM NGF waren es ca. 24 % der Neurone. Unter dieser Dosis stellte sich auch der Anteil der TrkA positiven Zellen mit niedriger ERK1/2-Phosphorylierung deutlich geringer dar, als ohne Stimulation (28 % zu 5 %). Dies lässt erkennen, dass es bei nahezu allen, stark TrkA positiven Zellen nach Stimulation durch NGF zu einer ERK1/2-Phosphorylierung kommt.

Die zuvor beschriebenen Beobachtungen zeigten auch im STZ induzierten, diabetischen Phänotyp keine Abweichungen (Abb. 18).



**Abbildung 18: Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig und korreliert mit der TrkA-Expression.** Einzelzelldaten zur Phosphorylierungsintensität von ERK1/2 in Abhängigkeit der zellbasierten Expression von TrkA nach Stimulation mit unterschiedlichen Dosierungen NGF (0; 0,02; 0,1; 0,5; 2,5 nM). Insbesondere stark TrkA positive Neurone reagierten vermehrt mit ERK1/2-Phosphorylierung auf NGF, (n = 6, Neuronenzahl pro Kondition > 200)

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen der intrazellulären, schmerzsensibilisierenden Signalwege bei der diabetischen Neuropathie zu identifizieren. Dazu wurde das STZ-induzierte Diabetes-Modell in der Ratte verwendet und vornehmlich die Signalwege der zwei intrazellulären Kinasen PKA-II und ERK1/2, sowie deren Aktivatoren  $\text{PGI}_2$ , NGF, und OSM untersucht. Die Studie wurde mit einer neuen Methode, der HCS-Mikroskopie, zur zellulären Analyse kultivierter peripherer nozizeptiver Neurone durchgeführt. Des Weiteren sollte durch quantitative, morphologische Untersuchungen die Stabilität des Modells und die Anwendbarkeit der HCS-Mikroskopie auf ein komplexes Krankheitsmodell wie das der diabetischen Neuropathie geprüft werden.

Es konnte gezeigt werden, dass

- a) die HCS-Mikroskopie auf das STZ-Modell angewendet werden kann und sich das STZ-Modell als solches eignet um neben Verhaltenstests auch zelluläre Veränderungen zu untersuchen. Die Blutzuckermessungen und der Pfotendrucktest nach Randall und Selitto zeigten sich stabil und eignen sich so zur Validierung des Diabetes und der mechanischen Hyperalgesie. Als weitere Kontrolle können Ergebnisse der HCS-Mikroskopie verwendet werden.
- b) die Morphologie und Subgruppenverteilung der heterogenen Neuronengruppe auch unter dem Einfluss von STZ gleich bleibt.
- c) die gemessenen Phospho-Intensitäten von PKA-II nach Stimulation mit  $\text{PGI}_2$  im STZ-Modell nicht von denen im „gesunden“ Phänotyp abweichen
- d) es bei der Stimulation der Neurone mit NGF, welche über den TrkA-Rezeptor zur Aktivierung von ERK1/2 führt, im STZ-Modell zu wesentlich mehr Variabilität kommt als in den Kontrolltieren. Teilweise wurde eine höhere ERK1/2-Phosphorylierung gemessen. Die basale Expression von ERK1/2 blieb dabei unverändert und es kam nicht zu einer erhöhten TrkA-Expression in Neuronen des STZ-Modells. Auch bei der weiteren Analyse durch Dosis-Wirkungs-Kurven konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Phänotypen erkannt werden. Die in gesunden Phänotypen bekannte Korrelation der TrkA positiven Zellen mit der Intensitätssteigerung der ERK1/2-Phosphorylierung nach NGF Stimulation konnte auch im STZ-Modell beobachtet werden.

- e) die STZ-Behandlung der Tiere *in vitro* zu höheren isolierten und analysierten Neuronenzahlen führte.

#### 4.1 Das Streptozotocin-Modell

Das STZ-Modell ist ein klassisches Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der diabetischen Neuropathie (Akbarzadeh et al., 2007, Ikebukuro et al., 2002, Fox et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Mitarbeiter der Firma Grünenthal bei allen Tieren Blutglukosemessungen durchgeführt um die eingetretene Hyperglykämie zu validieren. Die Messungen erfolgten 12 Tage nach der ebenfalls dort erfolgten STZ-Injektion, was im Vergleich der Literatur einen recht späten Zeitpunkt darstellt. In den meisten Untersuchungen konnte die Hyperglykämie bereits nach drei bis fünf Tagen festgestellt werden (Yamamoto et al., 2009, Malcangio and Tomlinson, 1998, Bishnoi et al., 2011). Tiere, deren Glukosewerte den Grenzwert von 28 mmol/l nicht überschritten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Weshalb diese Tiere trotz gleicher Behandlung keine ausreichende Hyperglykämie erreichten, ist unklar. Der Anteil lag zwischen 40 und 58 %.

In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Angaben zu den Grenzwerten der Hyperglykämie, nach denen die Tiere als diabetisch eingeordnet werden. Mehrere Studien setzten den Wert bereits bei 14 – 22,2 mmol/l fest, während andere Studien erst Werte über 28 mmol/l als diabetische Hyperglykämie werteten. Dadurch verschiebt sich die Population der untersuchten Tiere und eventuelle Veränderungen, die bei Beginn des Diabetes oder bei milderer Formen auftreten, werden nicht berücksichtigt. Auch die STZ-Dosierung und Applikationsart sind nicht einheitlich. Die Dosierung variierte zwischen 45 und 75 mg/kg und die Injektion wurde entweder intravenös oder intraperitoneal durchgeführt (Bishnoi et al., 2011, Courteix et al., 1993, Fox et al., 1999, Malcangio and Tomlinson, 1998, Mitani et al., 2008, Yamamoto et al., 2009). Mit einer intraperitonealen Injektion von 75 mg/dl und einem Grenzwert von 28 mmol/l bewegt sich das hier verwendete STZ-Modell im oberen Bereich der Anwendungsspanne. Auf den prozentualen Anteil der Tiere, die trotz STZ nicht diabetisch werden, gingen kaum Autoren ein. Während Ferhatovic et al. zeigten, dass nur 71 % der Tiere diabetisch wurden, führten Bishnoi et al. auch weitere Analysen in den nicht diabetischen gewordenen Tieren durch. Sie zeigten, dass es auch fünf Wochen nach der STZ-Injektion nicht zu einer Erhöhung der Glukose kam, die Tiere aber etwas intoleranter auf exogene Glukosezufuhr reagierten. Die induzierte Hyperglykämie war stärker ausgeprägt als

in Kontrolltieren und hielt auch länger an. Ein Unterschied im Insulinspiegel hingegen wurde nicht festgestellt (Ferhatovic et al., 2013, Bishnoi et al., 2011).

Durch Messungen mit dem PPT nach Randall und Selitto konnte die jeweils eingetretene mechanische Hyperalgesie bestätigt werden. Diese tritt im Vergleich zur Hyperglykämie erst später ein. Nach dem Erfahrungswert aus jahrelanger Arbeit mit dem STZ-Modell erfolgten die Messungen in der Firma Grünenthal am Tag 15 nach der Diabetesinduktion, d. h. drei Tage nach Feststellung der Hyperglykämie.

In der Literatur sind ähnliche Angaben zu finden. So beobachteten verschiedene Studien das Auftreten der Hyperalgesie 14 Tage nach STZ-Injektion (Malcangio and Tomlinson, 1998, Mitani et al., 2008, Courteix et al., 1993, Ferhatovic et al., 2013). In einer weiteren Studie wurde die Hyperalgesie erst nach drei Wochen dokumentiert, jedoch wurden die Tiere in dieser Studie nach zwei Wochen keiner Messung unterzogen, weshalb diese Abweichung nicht mit den übrigen in Konflikt steht (Yamamoto et al., 2009). Insgesamt stellte sich das STZ-Modell, sofern es nach STZ-Applikation auch zu einer Hyperglykämie kam, als ein sehr stabiles Modell zur Untersuchung der phänotypischen Ausprägung der diabetischen Neuropathie dar.

Hinweise auf eine direkte Wirkung der STZ-Applikation auf die Sensitivität der Neurone konnten in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. In einigen Studien wird davon ausgegangen, dass die im STZ-Modell entstandene Hyperalgesie nicht mit der Ausprägung einer Hyperglykämie, also dem entstanden Diabetes zusammenhängt, sondern durch STZ induzierte Modifikation von Ionenkanälen in den Neuronen selbst entsteht (Pabbidi et al., 2008, Bishnoi et al., 2011, Andersson et al., 2015). Bei der Erzeugung eines STZ-Mausmodells führte die STZ-Injektion bei einigen Mäusen nicht zu einer Hyperglykämie, sehr wohl aber zu nozizeptiven Veränderungen. Nach systemischer STZ-Applikation wurden die Tiere hyposensitiv gegenüber Kälte und mechanischen Einflüssen. Die lokale, intraplantare Injektion hingegen führte zu akuter, polymodaler Hypersensitivität in den Tieren (Andersson et al., 2015). In einer Gruppe von Ratten, die nach Injektion von STZ keine Hyperglykämie entwickelten, kam es ebenfalls zu einer deutlichen mechanischen und thermischen Hyperalgesie (Bishnoi et al., 2011). Entsprechende Veränderungen des nozizeptiven Schwellenwertes konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Tiere, die nach zwei Wochen keine Hyperglykämie entwickelt hatten, zeigten auch keine Hyperalgesie. Diese Abweichungen könnten mit den unterschiedlich gewählten Zeitpunkten zusammenhängen. Während in dieser Arbeit die Glukosemessungen und Pfortendrucktests zwei Wochen nach STZ-Applikation durchgeführt wurden, wählten die Autoren der anderen Publikationen wesentlich frühere Zeitpunkte. Zudem wurden die nozizeptiven Veränderungen auch als

transient beschrieben (Andersson et al., 2015). Die Hyperalgesie nach intraplantarer Injektion war bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar und spricht damit eher für einen akuten z. B. entzündungsbedingten Mechanismus. Dementsprechend stehen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mit den Angaben in der Literatur im Konflikt. Weitere, zeitabhängige Studien sind allerdings nötig um diesen Aspekt genauer zu analysieren.

Nach der Entnahme, Isolation und weiteren Aufbereitung wurden die Neurone von jedem Tier auf Ihre Größenzusammensetzung sowie die Verteilung des neuronalen Markers UCHL1 untersucht. Die in Spinalganglien gesunder Ratten vorliegenden Neurone zeigen eine sehr heterogene, aber konstante Zusammensetzung. Auch im diabetischen Phänotyp kam es – wie oben gezeigt - nicht zu einer Abweichung dieses Musters. Sowohl die Größenverteilung als auch die Intensität der UCHL1 blieb erhalten. Zu diesem Schluss kamen auch Marangoni et al., die ihre Untersuchungen allerdings an Lysaten aus Herzgewebe neuropathischer Ratten durchführten (Marangoni et al., 2014). Aber auch DRG-Neurone zeigten in einem Langzeitmodell der diabetischen Neuropathie keine Hinweise auf Apoptose (Cheng and Zochodne, 2003). Diese Ergebnisse unterstützen, dass weder STZ an sich, noch der eingetretene Diabetes zu einem spezifischen oder ubiquitären Verlust von Neuronen führt.

## **4.2 Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten**

Quantitative Analysen zu Morphologie und Rezeptorexpression der gesamten heterogenen Population sensorischer Neurone der Spinalganglien wurden bisher kaum publiziert. Veränderungen ihrer Verteilung in Modellen der diabetischen Neuropathie sind meist qualitativer Natur. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die isolierten DRG-Neurone aus dem STZ-Modell hinsichtlich ausgewählter Markerproteine, die bestimmte Subgruppen identifizieren, parallel untersucht und mit den Kontrolltieren verglichen. Auch wenn viele sensorische Neurone polymodal sind, können sie anhand bestimmter Markerproteine gruppiert werden. TRPV1 und Nav1.8 sind Ionenkanäle, dessen Modulation bereits mit Sensibilisierung und Schmerzentstehung in Verbindung gebracht wurden (siehe 1.1.1). Es liegen qualitative Untersuchungen vor, in denen vor allem die Aktivität bzw. Phosphorylierung analysiert wurde. So konnte schon mehrfach eine Veränderung der TTX-R Kanäle, zu denen auch Nav1.8 gehört, in Modellen der diabetischen Neuropathie bestätigt werden (Bich-Hoai et al., 2010, He et al., 2016). Dabei ging man aber vor allem von Veränderungen ihrer Aktivität, also Phosphorylierung aus. Veränderungen in der Expressionsquantität von Nav1.8 nach Induktion der Hyperglykämie konnten nicht

festgestellt werden (Bich-Hoai et al., 2010). Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, in der keine Abweichungen in der Verteilung und Expression von Nav1.8 gemessen wurden. In einer anderen Studie konnte eine Zunahme der Nav1.8 Kanäle gemessen werden, jedoch wurde hier der neuropathische Schmerz durch selektive Durchtrennung der ventralen Nervenwurzel induziert, was einen Vergleich zum diabetischen Tiermodell erschwerte (Chen et al., 2011). Über die Verteilung der Nav1.8 Kanäle auf die einzelnen Subtypen der Neurone liegen bisher keine Studien vor.

Auch der hitzesensitive Ionenkanal TRPV1 wird seit seiner Isolation in Bezug zu schmerzsensitivierenden Signalwegen intensiv analysiert und diskutiert. Sowohl die Menge exprimierter TRPV1-Moleküle, als auch Konformationsänderungen spielen eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit konnten keine Veränderungen der Expression von TRPV1 im diabetischen, neuropathischen Tiermodell im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden, was auch in anderen Untersuchungen im STZ-Modell bestätigt wird (Mitani et al., 2008). Bei der Untersuchung sensorischer Neurone mittels Western Blot Analyse 4 - 8 Wochen nach STZ-Injektion wurde ein Anstieg der Expression von TRPV1 beobachtet (Hong and Wiley, 2005). Andere Studien hingegen analysierten ebenfalls die Expression von TRPV1 im diabetischen Tiermodell und stellten kontrovers dazu eine Reduktion der Expression fest (Wei et al., 2009). Diese Messungen bezogen sich allerdings nicht auf sensorische Neurone sondern auf Gewebelysate aus Mäuseherzen, weshalb diese Beobachtung nicht im Widerspruch mit den zuvor erwähnten Ergebnissen steht. 2014 wurde in einer zeitabhängigen Studie eine erhöhte TRPV1-Expression in DRG Neuronen gezeigt. Dieser Anstieg nach 14 Tagen nach STZ-Applikation konnte aber am Tag 21 nicht mehr nachgewiesen werden, weshalb der Anstieg von TRPV1 als transient eingestuft wurde (Cui et al., 2014). Diese Tatsache könnte die variablen Angaben in der Literatur erklären.

CGRP wird von der peptidergen Population von C-Faser Nozizeptoren gebildet und sezerniert und wurde in der Literatur schon viel im Zusammenhang mit neuropathischen Vorgängen diskutiert. Es liegen zahlreiche Untersuchungen vor, deren Ergebnisse auf ein Absinken der CGRP-Expression in diabetischen Tiermodellen hinweisen. So wurde gezeigt, dass es nach STZ-Behandlung schon nach 6 Wochen zur Reduktion des mRNA-Gehalts für CGRP kommt und auch in einem Langzeitmodell konnte nach 12 Monaten eine signifikante Reduktion der mRNA festgestellt werden (Zochodne et al., 2001, Rittenhouse et al., 1996). Brewster et al. differenzierten zwischen der Reduktion von CGRP und dem in ihrem Fall nicht veränderten mRNA-Gehalt, was auf eine posttranslationale Modifikation hinweist, und die divergierenden Aussagen erklären könnte (Brewster et al., 1994). Relativ neue Untersuchungen unterstützen eher die Ansicht, dass es zu einer Zunahme von CGRP kommt. In Kardiomyozyten neuropathischer Ratten wurde nach 8 Wochen andauerndem

Diabetes eine erhöhte CGRP-Expression gezeigt, während der neuronale Marker PGP 9.5 sich nicht veränderte (Marangoni et al., 2014).

In DRG Neuronen konnte 14 - 28 Tage nach STZ-Injektion ebenfalls ein Anstieg von CGRP nachgewiesen werden (Kou et al., 2014). In den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Zellen 16 - 18 Tage nach Diabetesinduktion untersucht wurden, zeigte sich hingegen keine Veränderung der CGRP-Expression im STZ-Modell im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Ansicht ist ebenfalls in der Literatur vertreten und wurde schon in verschiedenen Tiermodellen der diabetischen Neuropathie belegt. In diabetischen BB-Wistar-Ratten wurde keine erhöhte CGRP-Expression festgestellt und auch die basale CGRP-Ausschüttung war in lumbalen Spinalganglien nach der Behandlung mit STZ unverändert (Bishnoi et al., 2011, Terenghi et al., 1994). In diabetischen p75+/+ und p75-/- Mäusen wurden ebenfalls keine Abweichungen bezüglich der absoluten oder relativen Anzahl der CGRP positiven Neurone beobachtet (Jiang et al., 2004).

Die CamKII $\alpha$  wird durch den Calcium-Calmodulin-Komplex reguliert und spielt im peripheren und zentralen Nervensystem in vielen Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Es existieren vier Isoformen: CamKII $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  und - $\delta$ . Dabei nimmt die CamKII $\alpha$ -Isoform eine wichtige Position bei Sensitivierungsvorgängen in kleinen sensorischen Neuronen ein (Carlton, 2002).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Expression der CamKII $\alpha$  geringer ausfällt, als andere Markerproteine. Es kommt aber nicht zu einer Veränderung im STZ-Modell. In der Literatur finden sich Studien, in denen gezeigt wurde, dass es nach Ligatur des N. ischiadicus in den zugehörigen lumbalen Spinalganglien zu einer Erhöhung der Expression von CamKII $\alpha$  kommt und auch nach Applikation von Freund's Adjuvant, welches eine akute Entzündung und somit einen schmerzhaften Reiz auslöst, wurde ein Anstieg der CamKII $\alpha$  gemessen (Carlton, 2002). Diese Mechanismen basieren allerdings auf einem akuten, entzündlichen Stimulus und unterscheiden sich somit von der durch Diabetes induzierten, sich langsam entwickelnden Neuropathie. Im diabetischen STZ-Modell finden sich nur wenige Studien zur Veränderung der Expression von CamKII $\alpha$ . Der Fokus in der Literatur liegt eher auf der Aktivitätsänderung, was auch darauf hinweisen könnte, dass bisher kein Anstieg der Expression gemessen wurde. Eine Studie zeigte, dass es zwei Wochen nach der Diabetesinduktion zu einem Anstieg der gesamten CamKII kommt, unabhängig ihrer Isoformen und es konnte auch ein Anstieg der pCamKII $\alpha$ , also der aktivierten  $\alpha$ -Isoform gemessen werden (Ferhatovic et al., 2013). Allerdings wurden keine Aussagen zur Expressionsquantität der nicht-phosphorylierten CamKII $\alpha$  getroffen, wodurch ein Vergleich der Ergebnisse erschwert wird. Andere Studien machten ähnliche Beobachtungen im Trigemininalganglion. Zwei Monate nach STZ-Applikation kam es zu einer Erhöhung von

pCamKII $\alpha$ , ein Vergleich der CamKII $\alpha$ -Expression wurde nicht durchgeführt (Jerić et al., 2015).

Die Expression der regulatorischen PKA Untereinheit RII $\beta$ , einem neuen Marker für kleine sensorische Nozizeptoren (Isensee et al., 2014), wurde bisher in Schmerzmodellen noch nicht analysiert. Hier zeigte sich, dass die Expression von RII $\beta$  im Rattenmodell der diabetischen Neuropathie unverändert bleibt.

IB4 fungiert als Marker für „nicht-peptiderge“ Neurone mit unmyelinisierten Nervenfasern (Bae et al., 2015). Im STZ-Modell konnte gezeigt werden, dass es 14 und 28 Tage nach der Diabetesinduktion zu einem Verlust von IB4/+ Neuronen in Spinalganglien kommt (Kou et al., 2014). Dabei wurden gefrorene Ganglionschnitte gefärbt und durch ein konfokales Lasermikroskop analysiert. In dieser Arbeit hingegen zeigte sich deutlich, dass es im STZ-Modell weder zu einem Verlust, noch zu einer Verteilungsänderung der IB4/+ Neurone kommt. Es zeigte sich allerdings eine recht starke biologische Variabilität in den Einzeltieren, die bei zu geringer Stichprobengröße, zu der Annahme führen könnte, dass es doch zu einer Veränderung in der Expression kommt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte quantitative Analyse mit mehr als 60.000 Neurone pro Gruppe, konnte das Risiko minimiert werden. In einer anderen Studie zur IB4-Expression in einem neuropathischen Rattenmodell konnte nach zwei Wochen keine Veränderungen der IB4-Expression in den entnommenen Spinalganglien nachgewiesen werden. Erst nach vier Wochen zeigte sich eine Zunahme der IB4-Expression (Chao et al., 2008).

Als Marker für die myelinisierten, nicht-nozizeptiven Neurone wird NF-200 genutzt (Basbaum et al., 2009). Die in dieser Studie aus dem STZ-Modell gewonnenen Neurone zeigten eine identische Verteilung und Expression wie die der Kontrolltiere. Diese Beobachtung wird durch Publikationen in der Literatur unterstützt. Bei Untersuchung in einem neuropathischen Mausmodell, welches durch Ligatur des N. ischiadicus erzeugt wurde, kam es nicht zu einer Abweichung der NF-200-Expression in den Spinalganglien (Ruscheweyh et al., 2007). Auch nach Diabetesinduktion durch STZ zeigte sich keine Veränderung der NF-200-Expression (Mitani et al., 2008).

### **4.3 STZ Behandlung resultiert in erhöhter Neuronenzahl *in vitro***

Alle isolierten Neurone wurden von der Präparation bis zur Auswertung nach demselben Protokoll analysiert. Zellen aus Kontrolltieren wurden parallel und im Wechsel mit Zellen aus dem STZ-Modell isoliert, behandelt und gefärbt. Auch die Reihenfolge sowie der Präparator wurden randomisiert, wie auch die Anordnung auf den Platten. Dennoch wurden insgesamt



bei der Auswertung signifikant mehr Neurone aus STZ-Tieren detektiert. Durch die zuvor genannte Randomisierung können wechselnde äußere Bedingungen nahezu ausgeschlossen werden. Offen bleibt die Frage, ob evtl. das Nährmedium zum Transport, in der Zellkultur oder während der Digestion durch die Kollagenase unterschiedlich gut von den beiden Zellgruppen toleriert wird. Im verwendeten Medium zur Trituration und Aufarbeitung ist unter anderem auch Insulin enthalten, welches zur Aufnahme von Glukose in die Zellen führt. Die aus dem STZ-Modell isolierten Neurone befanden sich vorher in einer dauerhaft hyperglykämischen Umgebung. Möglicherweise sind die Neurone dadurch sensitiver für die geringe Insulinkonzentration und somit lebensfähiger. Die erhöhte Neuronenzahl des STZ-Modells könnte folglich durch ein Absterben der „normalen“ Nervenzellen zustande kommen, welches sonst nicht detektiert wird, da der Prozentsatz recht stabil ist. Theoretisch könnte natürlich auch die STZ-Behandlung oder die dadurch entstehende Hyperglykämie zur Proliferation der Neurone führen. Diese These ist aber eher unwahrscheinlich, da es sich bei den in Spinalganglien vorliegenden Neuronen um bereits vollständig ausdifferenzierte Zellen handelt, in denen keine Mitose zu erwarten ist. Zudem fehlen entsprechende Hinweise in der Literatur. Lediglich in intestinalen Epithelzellen wurden vereinzelt Hinweise auf vermehrte Zellproliferation nach STZ induziertem Diabetes bzw. in hyperglykämischer Umgebung gefunden (Dorfman et al., 2015, Li et al., 2016, Geoffroy et al., 2005). Zur Analyse und Bestätigung dieser These sind weitere Untersuchungen unter sehr stabilen Bedingungen und mit unterschiedlichen Nährmedien nötig.

#### **4.4 Stimulation mit PGI<sub>2</sub> führt zu transienter Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp**

Durch die Stimulation peripherer Nervenzellen mit PGI<sub>2</sub> kommt es über GPCRs zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Diese generiert cAMP, welches wiederum die in Neuronen vorliegende PKA-II aktiviert (Taiwo et al., 1989, Taiwo and Levine, 1991, Pierre et al., 2009, Hucho and Levine, 2007). Gemessen werden kann diese Aktivierung anhand der Phospho-Intensität der regulatorischen Untereinheit RII (siehe 1.1.4) (Isensee et al., 2014). In dieser Arbeit wurden die Neurone unterschiedlich lange stimuliert. Bereits nach 1 min kam es zu einem deutlichen Anstieg der Phospho-Intensität, die anschließend kontinuierlich wieder sank und nach zwei Stunden wieder dem basalen Level entsprach. Unterschiede im STZ-Modell traten nicht auf. In der Literatur wird bereits beschrieben, dass die durch PGI<sub>2</sub> induzierte Hyperalgesie nach 5 min nur noch von der Proteinkinase A abhängt und eine Hemmung der Adenylatzyklase oder cAMP keine Reduktion der Hyperalgesie hervorruft (Aley and Levine, 1999). Auch andere Publikationen beschrieben 30 min nach Stimulation

mit Prostaglandin E2 deutlich erhöhte PKA-Phosphorylierung, die nach 180 min nicht mehr nachweisbar war (Sachs et al., 2009). Teilweise wurde bereits zwischen den Isoformen PKA-I, und der vor allem in Nozizeptoren exprimierten PKA-II differenziert. Durch Stimulation der Neurone mit PGI<sub>2</sub> kam es zu einer selektiven Aktivierung von PKA-II (Isensee et al., 2014). Zum Vergleich der phänotypischen Ausprägung der PGI<sub>2</sub> induzierten Hyperalgesie im STZ-Modell zu Kontrolltieren wurde parallel der nozizeptive Schwellenwert im Tiermodell analysiert. Es wurde kein Unterschied zwischen den beiden Phänotypen festgestellt. PGI<sub>2</sub> führte in beiden Phänotypen gleichermaßen zu einem dosisabhängigen Absinken des Schwellenwertes (Ahlgren and Levine, 1993). Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass die Signaltransduktion, die zur Aktivierung der PKA führt, im STZ-Modell nicht verändert ist.

#### **4.5 Die Variabilität der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation mit NGF und OSM**

Bei der Stimulation von Neuronen mit Neurotrophinen, wie NGF oder Zytokinen, wie OSM kommt es zu einer intrazellulären Aktivierung von ERK1/2, die anhand der zunehmenden ERK1/2-Phosphorylierung gemessen werden kann (Sammons et al., 2000, Delcroix et al., 2003, Ko et al., 2016). Dieser Anstieg ist zeit- und dosisabhängig und eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung konnte bereits in verschiedenen hyperalgetischen Zuständen nachgewiesen werden. Erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung wurde in Spinalganglien z. B. nach noxischer thermischer Stimulation und in neuropathischen Modellen durch partielle Ligatur des N. ischiadicus, sowie in Rückenmarksneuronen nach Ligatur eines Spinalnervs beobachtet (Dai et al., 2002, Kiguchi et al., 2009, Zhuang et al., 2005). Dieser Anstieg zeigte sich transient und hielt nicht dauerhaft an. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch Adrenalin induzierte Hyperalgesie ERK1/2 abhängig ist (Aley et al., 2001). Eine Blockade an unterschiedlichen Stufen der Signalkaskade zu ERK1/2 führte zur Reduktion der Hyperalgesie, während eine Inhibition der anderen Signalwege, wie z.B. PKA und PKC keinen Einfluss zeigte (Aley et al., 2001). In einem chronischen Schmerzmodell wie das der diabetischen Neuropathie stellt sich die Frage ob ERK1/2 bereits in einer Art vorbereiteten, also sensibilisierten Stadium („primed state“) vorliegt und sich die intrazelluläre Signaltransduktion nach Stimulation mit NGF verändert (Hucho and Levine, 2007). In PC12 Zellen wurde bereits ein entsprechendes Phänomen beobachtet. Eine einzelne Stimulation mit NGF hatte keine Auswirkung, eine zweite Stimulation führte dann aber zu Neuritenwachstum (Chung et al., 2010).

In dieser Arbeit kam es bei der Stimulation der Neurone mit NGF zu sehr variablen Ergebnissen. Anfangs zeigte sich eine deutlich erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung im STZ-Modell im Vergleich zum gesunden Phänotyp, insbesondere nach 15 und 30 Minuten Stimulation (siehe 3.5). Diese Ergebnisse entstanden aus Messungen von ca. 80.000 Neuronen, isoliert aus je 4 Tieren eines Phänotyps. Auch die Stimulation mit OSM zeigte erst eine signifikant veränderte Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung. Während diese OSM induzierte Abweichung in weiteren Untersuchungen nicht mehr reproduzierbar war (siehe 3.8) zeigte die NGF induzierte Veränderung der ERK1/2-Phosphorylierung sich häufiger im STZ-Modell, wenn auch im Laufe aller Experimente mit zunehmend geringerer Effektgröße. Dabei kam es gleichzeitig im STZ-Modell, sowie auch in den Kontrolltieren zu einem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. Während in den ersten Ergebnissen nach NGF Stimulation eine 2 – 2,5-fache Steigerung auftrat, konnte in Wiederholungsexperimenten bis zu 3,5-fach erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung gemessen werden. Dieser Effekt stellte sich jedoch in beiden Phänotypen gleichermaßen dar. Aufgrund der hohen Stabilität der parallelen Untersuchungen zur PGI<sub>2</sub> vermittelten PKA-II-Phosphorylierung und der OSM induzierten ERK1/2-Phosphorylierung, sollte dieser Variabilität durchaus Beachtung geschenkt werden, zumal bei der Herstellung des STZ-Modell ebenfalls eine hohe Variabilität im Ausmaß der eintretenden Hyperglykämie entsteht.

Die oben genannten Ergebnisse lassen sich unter verschiedenen Aspekten mit Hinweisen aus der Literatur vereinbaren. In Studien zu viszeralem Colon-innervierenden Neuronen wurde im neuropathischen STZ-Modell 8 Wochen nach Diabetesinduktion eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung nachgewiesen und als mögliche Ursache der viszeralem diabetischen Hypersensibilität diskutiert (Grabauskas et al., 2011). Weitere Studien zeigten auch zeitabhängige Unterschiede in der ERK1/2-Phosphorylierung. Nach noxischer Simulation von Neuronen kam es zu einer erhöhten ERK1/2-Phosphorylierung, die lediglich 2 - 5 min andauerte (Dai et al., 2002). In anderen Studien zeigte sich ebenfalls ein schnell eintretender Anstieg, dieser hielt mindestens 30 min, oder aber auch mehrere Tage an (Donnerer and Liebmann, 2010, Obata et al., 2004). Andere schlussfolgerten, dass es nach Nervenschädigung zuerst zu einem zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden anhaltenden Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung in den Neuronen selbst kommt und anschließend auch zu einer Erhöhung in umgebenden Gliazellen und Astrozyten (Ma and Quirion, 2005). Diese Ergebnisse lassen eine enorme Variabilität und Sensitivität in der ERK1/2-Phosphorylierung erkennen. Es liegen kaum vergleichbare Ergebnisse vor, da entweder der Zeitpunkt aber auch das Modell sowie die Nachweismethode völlig unterschiedlich gewählt wurden. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich bei STZ-Tieren im Gegensatz zu den Angaben von Grabauskas et al. ohne Stimulation durch nozizeptive

Mediatoren kein Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung, obwohl es sich um das gleiche neuropathische Modell handelt. Die schmerzhaften Veränderungen überwiegen im Menschen aber in den ersten Wochen und Monaten der diabetischen Neuropathie, während später eher Sensibilitätsverluste und Taubheitsgefühl beschrieben werden (Peltier et al., 2014). Diese Arbeit fokussierte sich deshalb auf einen recht frühen Zeitpunkt, 2 Wochen nach Diabetesinduktion, also das Anfangsstadium der nachweisbaren Hyperalgesie im STZ Modell, während Grabauskas et al. die Tiere erst 8 Wochen nach Diabetesinduktion untersuchten (Grabauskas et al., 2011).

Aufgrund der enormen Variabilität und den kaum vergleichbaren Ergebnissen in der Literatur sollte der Signalweg von NGF zu ERK1/2 im STZ-Modell genauer analysiert werden. NGF bindet an die Tyrosinkinase TrkA und führt dann über nachgeschaltete Proteine (Ras, Raf und MEK) zur ERK1/2-Phosphorylierung. Eine Erklärung für die enorme Variabilität könnte z. B. durch die gewählte Dosis begründet sein oder auch eine gegebenenfalls veränderte Rezeptor-Liganden-Affinität im STZ-Modell. Aber auch veränderte ERK1/2-Expression hätte zu einer Verschiebung der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation führen können. Dafür wurden Dosis-Wirkungskurven von NGF zu pERK erstellt und genauere Analysen zur Quantität der basalen ERK1/2-Expression durchgeführt. Die TrkA-Expression und Verteilung wurde ebenfalls analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in sensorischen Neuronen dosisabhängig ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Angaben in der Literatur, die in sympathischen Neuronen und Epithelzellen der Cornea ebenfalls eine dosisabhängige ERK1/2-Phosphorylierung zeigten (Hong et al., 2012, Vaillant et al., 1999), während derzeit keine Untersuchungen diesbezüglich in Spinalganglien vorliegen. Unterschiede der Dosis-Wirkungskurve im STZ-Modell traten hingegen nicht auf.

Auch die Expression von TrkA stellte sich im neuropathischen STZ-Modell identisch dar, bestätigend zu bereits veröffentlichten Angaben (Unger et al., 1998, Schmidt et al., 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass TrkA in beiden Phänotypen vor allem in kleinen Neuronen exprimiert wird, und insbesondere TrkA-positive Zellen nach der Stimulation mit NGF eine starke ERK1/2-Phosphorylierung zeigen. Diese Beobachtung unterstützen vorherige Studien zur Verteilung und Korrelation von TrkA im gesunden Phänotyp (Galoyan et al., 2003, Averill et al., 1995).

Die Variabilität der ERK1/2-Phosphorylierung sollte nicht unterschätzt werden. In diabetischen und neuropathischen Modellen wurden Defizite im NGF-Transport, sowie im NGF-Gehalt in Serum und Gewebe beobachtet (Hellweg and Hartung, 1990, Hellweg et al., 1994, Faradji and Sotelo, 1990). Folglich könnten diese Veränderungen den Effekt der

variierenden ERK1/2-Phosphorylierung nach Zugabe von exogenem NGF erklären. Gegebenenfalls sind diese Neurone wesentlich sensibler gegenüber NGF, wenn sie längere Zeit unter NGF-Restriktion standen. Weshalb die Effekte jedoch konstant abnehmen bleibt vorerst unklar.

## **4.6 Einschränkungen der Arbeit und Ausblick**

Diese Arbeit fand im Rahmen eines Kollaborationstests der Experimentellen Anästhesie und Schmerzforschung der Uniklinik Köln mit der Firma Grünenthal in Aachen statt. Durch den räumlichen Abstand der beiden Institutionen und die neuen räumlichen Umstände mussten einige Schwierigkeiten bewältigt werden. Die entnommenen Spinalganglien wurden von Aachen nach Köln transportiert. Durch variables Verkehrsaufkommen und auch unterschiedliche Außentemperaturen konnten die Bedingungen vermutlich nicht vollständig stabil gehalten werden. Folglich stellt sich die Frage, ob die unterschiedlichen Transportzeiten einen Einfluss auf die in Köln analysierten Neurone hatten.

Das STZ-Modell an sich weist außerdem einige Schwankungen auf, wie z.B. die variierende Anzahl der diabetischen Tiere nach STZ-Injektion. Ob die variablen Messungen mit der Variabilität des Modells korrelieren ist nicht eindeutig geklärt. Auch wurde ein recht früher Zeitpunkt nach der Diabetesinduktion gewählt. Dies könnte zu einem Verlust bestimmter, erst später auftretender Effekte geführt haben. Zudem wurden die Untersuchungen zu Veränderungen bezüglich der diabetischen Neuropathie in einem einzigen Modell durchgeführt. Um allgemeingültige Erkenntnisse zu generieren, sollten dieselben Experimente auch in weiteren Modellen der diabetischen Neuropathie durchgeführt werden. Außerdem wären auch vergleichende Analysen nach unterschiedlich lang bestehender Neuropathie sinnvoll um den Verlust transienter Ereignisse zu umgehen.

Eine weitere Einschränkung betrifft die gemessene erhöhte Neuronenzahl im STZ-Modell. Die Neuronenzählung erfolgte erst nach der Stimulation und Fixation. Es kann nicht eingeordnet werden, ob bereits mehr Neurone aus den einzelnen Tieren isoliert wurden, oder ob die Neurone des STZ-Modells evtl. nur besser an die Transport- und Kulturbedingungen angepasst sind, wodurch zum Zeitpunkt der Fixation mehr vitale Neurone verbleiben. Zur weiterführenden Differenzierung dieser Problematik wäre z. B. eine Versuchsreihe mit Variabilität des Mediums, unter Berücksichtigung der Zugabe bzw. des Entzugs von Insulin und Glukose sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Zur Identifizierung von Veränderungen in der intrazellulären schmerzsensibilisierenden Signaltransduktion im Tiermodell der diabetischen Neuropathie wurden im Rahmen dieser Arbeit qualitative und quantitative Untersuchungen durchgeführt. Als Modell wurde das bereits etablierte, substanzinduzierte, diabetische und neuropathische Streptozotocin-Modell der Ratte verwendet. Die durch Streptozotocin (STZ) entstandenen Veränderungen wurden zunächst *in vivo* anhand von Blutglukosemessungen und Schmerzverhaltensexperimenten analysiert, auch mit Hinblick auf die Stabilität des Modells. Anschließend wurden quantitative Analysen auf zellulärer Ebene durchgeführt. Neurone der Spinalganglien aus STZ-Tieren wurden auf schmerzrelevante Eigenschaften untersucht und mit den aus Kontrolltieren gewonnenen Neuronen verglichen. Hierfür wurde die neuartige, in der Schmerzforschung noch nicht verbreitete *High Content Screening* Mikroskopie verwendet. Die *in vivo* Experimente zeigten, dass alle Tiere, die durch STZ eine Hyperglykämie entwickelten, auch eine Neuropathie entwickelten. Diese zeigte sich durch einen herabgesetzten Schwellenwert der Schmerzinduktion. Es zeigte sich aber auch, dass nicht alle Tiere, die STZ erhalten hatten, überhaupt Diabetes entwickelten. Ca. 50 % der Tiere, die STZ erhalten hatten, zeigten nach zwei Wochen keine Hyperglykämie und wurden von der Studie ausgeschlossen. Vereinzelt wurden diese Tiere zusätzlich als separate Gruppe untersucht, zeigten aber keine Abweichungen zu Kontrolltieren. Die zelluläre Analyse zeigte zunächst, dass es im STZ-Modell weder zu einem ubiquitären Zellverlust, noch zu einem Verlust einer spezifischen Subgruppe in den Spinalganglien kommt. Die Subgruppenverteilung, gemessen an den Markerproteinen TRPV1, Nav1.8, CGRP, CamKII $\alpha$ , IB4, RII $\beta$  und NF-200 stellte sich in beiden Phänotypen identisch dar. Zur Feststellung etwaiger Veränderungen in der intrazellulären Signaltransduktion wurden bekannte schmerzsensibilisierende Mediatoren verwendet und ihre Zielproteine PKA-II und ERK1/2 untersucht. Die PGI<sub>2</sub> induzierte Aktivierung von PKA-II wurde anhand der phosphorylierten Untereinheit pRII gemessen und zeigte in beiden Phänotypen einen identischen, zeitabhängigen Verlauf, der zuerst einem starken Anstieg unterlag und dann innerhalb von 2 h wieder auf die Ausgangsintensität sank. OSM zeigte im STZ-Modell keine Abweichung in der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zum gesunden Phänotyp. Nach Stimulation mit NGF hingegen kam es zu sehr variablen Ergebnissen. NGF induzierte im STZ-Modell teilweise wesentlich stärkere ERK1/2-Phosphorylierung, weshalb dieser Signalweg anschließend noch differenzierter untersucht wurde. NGF bindet an den Rezeptor TrkA und aktiviert so eine Signalkaskade über Proteine und Kinasen wie z. B. Ras, Raf und MEK, die wiederum ERK1/2 aktivieren. Die Rezeptorexpression von TrkA zeigte eine deutlich höhere Ausprägung in kleinen Neuronen

und zudem eine Korrelation der Neurone, die auf eine Stimulation mit NGF mit starker ERK1/2-Phosphorylierung reagierten. Diese Verteilung war auch im STZ-Modell erkennbar. Die basale ERK1/2 Expression zeigte keine Abweichung. Es wurden außerdem Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, in denen erkennbar wurde, dass sich die NGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung dosisabhängig darstellt, es aber nicht zu Abweichungen im STZ-Modell kommt. Eine weitere, etwas unerwartete Beobachtung betraf die Anzahl der isolierten Neurone. Insgesamt wurden mehr Zellen aus dem STZ-Modell isoliert.

## 6 Summary

### **Changes in intracellular pain sensitizing signaling pathways in sensory neurons in a rat model of diabetic neuropathy**

To identify changes in intracellular pain sensitizing pathways in a rat model of diabetic neuropathy this study performed qualitative and quantitative analysis. Streptozotocin (STZ) injection was used as an established substance-induced model of diabetic neuropathy. STZ-induced changes were analyzed *in vivo* using blood glucose measurements and mechanical pain threshold measuring via paw pressure test, reflecting the reproducibility of the model. Quantitative studies were performed on dorsal root ganglions *in vitro*. The fairly new technology of High Content Screening Microscopy was used to analyze pain sensitizing signaling pathways. *In vivo* studies showed that all animals that developed hyperglycemia also developed a neuropathy, as demonstrated by a decreased pain threshold. Furthermore, it was also demonstrated, that up to 50 % of the animals that received STZ did not become hyperglycemic within 2 weeks. They were either excluded from the study, or investigated as a separate group, but this did not result in significant findings. Cellular analysis showed that there is neither ubiquitous lack of neurons in the STZ model, nor loss of a specific subgroup. The distribution of neuron subtypes, as determined using the subtype markers TRPV1, Nav1.8, CGRP, CamKII $\alpha$ , IB4, RII $\beta$  and NF-200, was identical in both phenotypes. To identify changes in the sensitizing signaling pathways themselves, stimulating agents were used and the downstream mediators Proteinkinase II (PKA-II) and Extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) were measured as markers of activation. Prostaglandin 2 (PGI<sub>2</sub>) induced activation of PKA-II was identical in both phenotypes, increasing rapidly after stimulation and then decreasing slowly to baseline within 2 hours. Oncostatin M showed an identical activation of ERK1/2 in both phenotypes as well. Stimulation with nerve growth factor (NGF) resulted in a high variability in ERK1/2 activation. Response to NGF was markedly increased in the STZ group compared to control animals, prompting further analysis of the NGF-ERK1/2 pathway. NGF binds to Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) inducing the activation of the signaling cascade. This results in phosphorylation of proteins and kinases like Ras, Raf and MEK, leading to activation of ERK1/2. Expression of TrkA was elevated in small neurons and correlated with the NGF responsive neurons showing a high amount of phosphorylated ERK1/2 upon stimulation. This distribution of TrkA could also be observed in the STZ model. No change could be observed in basal ERK1/2 expression between STZ-treated and control animals. Dose-response analysis showed a strong NGF dose-dependent phosphorylation of ERK1/2, but no difference between the groups.



Unexpectedly the total number of neurons isolated from STZ-treated animals was always higher, compared to those from control animals.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, C. A., Malik, R. A., van Ross, E. R., Kulkarni, J. and Boulton, A. J. (2011) 'Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K', *Diabetes Care*, 34(10), pp. 2220-4.
- Ahlgren, S. C. and Levine, J. D. (1993) 'Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats', *Neuroscience*, 52(4), pp. 1049-55.
- Ahmed, A., Bril, V., Orszag, A., Paulson, J., Yeung, E., Ngo, M., Orlov, S. and Perkins, B. A. (2012) 'Detection of diabetic sensorimotor polyneuropathy by corneal confocal microscopy in type 1 diabetes: a concurrent validity study', *Diabetes Care*, 35(4), pp. 821-8.
- Akbarzadeh, A., Norouziyan, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A. A., Mofidian, S. M. and Rad, B. L. (2007) 'Induction of diabetes by Streptozotocin in rats', *Indian J Clin Biochem*, 22(2), pp. 60-4.
- Aley, K. O. and Levine, J. D. (1999) 'Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain', *J Neurosci*, 19(6), pp. 2181-6.
- Aley, K. O., Martin, A., McMahon, T., Mok, J., Levine, J. D. and Messing, R. O. (2001) 'Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases', *J Neurosci*, 21(17), pp. 6933-9.
- Aloe, L., Manni, L., Properzi, F., De Santis, S. and Fiore, M. (2000) 'Evidence that nerve growth factor promotes the recovery of peripheral neuropathy induced in mice by cisplatin: behavioral, structural and biochemical analysis', *Auton Neurosci*, 86(1-2), pp. 84-93.
- Anand, P. (1996) 'Neurotrophins and peripheral neuropathy', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1338), pp. 449-54.
- Anand, P., Terenghi, G., Warner, G., Kopelman, P., Williams-Chestnut, R. E. and Sinicropi, D. V. (1996) 'The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy', *Nat Med*, 2(6), pp. 703-7.
- Andersson, D. A., Filipović, M. R., Gentry, C., Eberhardt, M., Vastani, N., Leffler, A., Reeh, P. and Bevan, S. (2015) 'Streptozotocin Stimulates the Ion Channel TRPA1 Directly: Involvement of Peroxynitrite', *J Biol Chem*, 290(24), pp. 15185-96.
- Andres, C., Meyer, S., Dina, O. A., Levine, J. D. and Hucho, T. (2010) 'Quantitative automated microscopy (QuAM) elucidates growth factor specific signalling in pain sensitization', *Mol Pain*, 6, pp. 98.
- Apfel, S. C. and Kessler, J. A. (1996) 'Neurotrophic factors in the treatment of peripheral neuropathy', *Ciba Found Symp*, 196, pp. 98-108; discussion 108-12.
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D. and Zubieta, J. K. (2005) 'Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease', *Eur J Pain*, 9(4), pp. 463-84.
- Association, A. D. (2010) 'Diagnosis and classification of diabetes mellitus', *Diabetes Care*, 33 Suppl 1, pp. S62-9.
- Atkinson, M. A. and Maclaren, N. K. (1994) 'The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus', *N Engl J Med*, 331(21), pp. 1428-36.
- Averill, S., Delcroix, J. D., Michael, G. J., Tomlinson, D. R., Fernyhough, P. and Priestley, J. V. (2001) 'Nerve growth factor modulates the activation status and fast axonal transport of ERK 1/2 in adult nociceptive neurones', *Mol Cell Neurosci*, 18(2), pp. 183-96.
- Averill, S., McMahon, S. B., Clary, D. O., Reichardt, L. F. and Priestley, J. V. (1995) 'Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons', *Eur J Neurosci*, 7(7), pp. 1484-94.
- Backonja, M. M. and Stacey, B. (2004) 'Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating', *J Pain*, 5(9), pp. 491-7.

- Bae, J. Y., Kim, J. H., Cho, Y. S., Mah, W. and Bae, Y. C. (2015) 'Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion', *J Comp Neurol*, 523(1), pp. 126-38.
- Barbacid, M. (1994) 'The Trk family of neurotrophin receptors', *J Neurobiol*, 25(11), pp. 1386-403.
- Barbacid, M. (1995) 'Neurotrophic factors and their receptors', *Curr Opin Cell Biol*, 7(2), pp. 148-55.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. and Julius, D. (2009) 'Cellular and molecular mechanisms of pain', *Cell*, 139(2), pp. 267-84.
- Beagley, J., Guariguata, L., Weil, C. and Motala, A. A. (2014) 'Global estimates of undiagnosed diabetes in adults', *Diabetes Res Clin Pract*, 103(2), pp. 150-60.
- Belmonte, C. and Viana, F. (2008) 'Molecular and cellular limits to somatosensory specificity', *Mol Pain*, 4, pp. 14.
- Benedetti, M., Levi, A. and Chao, M. V. (1993) 'Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), pp. 7859-63.
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S. and Gereau, R. W. (2002) 'cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation', *Neuron*, 35(4), pp. 721-31.
- Bich-Hoai, T. T., Marin, A., Dinu, C., Banciu, D., Maria-Luiza, F. and Ristoiu, V. (2010) 'Hypoxia and high glucose activate tetrodotoxin-resistant Na(+) currents through PKA and PKC', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 70(4), pp. 351-61.
- Bishnoi, M., Bosgraaf, C. A., Abooj, M., Zhong, L. and Premkumar, L. S. (2011) 'Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators', *Mol Pain*, 7, pp. 52.
- Bogen, O., Dreger, M., Gillen, C., Schröder, W. and Hucho, F. (2005) 'Identification of versican as an isolectin B4-binding glycoprotein from mammalian spinal cord tissue', *FEBS J*, 272(5), pp. 1090-102.
- Brewster, W. J., Diemel, L. T., Leach, R. M. and Tomlinson, D. R. (1994) 'Reduced sciatic nerve substance P and calcitonin gene-related peptide in rats with short-term diabetes or central hypoxaemia co-exist with normal messenger RNA levels in the lumbar dorsal root ganglia', *Neuroscience*, 58(2), pp. 323-30.
- Bril, V. and Buchanan, R. A. (2006) 'Long-term effects of ranirestat (AS-3201) on peripheral nerve function in patients with diabetic sensorimotor polyneuropathy', *Diabetes Care*, 29(1), pp. 68-72.
- Bron, R., Klesse, L. J., Shah, K., Parada, L. F. and Winter, J. (2003) 'Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors', *Mol Cell Neurosci*, 22(1), pp. 118-32.
- Callaghan, B. C., Cheng, H. T., Stables, C. L., Smith, A. L. and Feldman, E. L. (2012) 'Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments', *Lancet Neurol*, 11(6), pp. 521-34.
- Carlton, S. M. (2002) 'Localization of CaMKIIalpha in rat primary sensory neurons: increase in inflammation', *Brain Res*, 947(2), pp. 252-9.
- Cavanaugh, J. E., Ham, J., Hetman, M., Poser, S., Yan, C. and Xia, Z. (2001) 'Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons', *J Neurosci*, 21(2), pp. 434-43.
- Chao, T., Pham, K., Steward, O. and Gupta, R. (2008) 'Chronic nerve compression injury induces a phenotypic switch of neurons within the dorsal root ganglia', *J Comp Neurol*, 506(2), pp. 180-93.
- Chen, X., Pang, R. P., Shen, K. F., Zimmermann, M., Xin, W. J., Li, Y. Y. and Liu, X. G. (2011) 'TNF- $\alpha$  enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury', *Exp Neurol*, 227(2), pp. 279-86.

- Cheng, C. and Zochodne, D. W. (2003) 'Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes', *Diabetes*, 52(9), pp. 2363-71.
- Cheng, H. T., Dauch, J. R., Hayes, J. M., Hong, Y. and Feldman, E. L. (2009) 'Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes', *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(11), pp. 1229-43.
- Cheng, J. K. and Ji, R. R. (2008) 'Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain', *Neurochem Res*, 33(10), pp. 1970-8.
- Chung, J., Kubota, H., Ozaki, Y., Uda, S. and Kuroda, S. (2010) 'Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation', *PLoS One*, 5(2), pp. e9011.
- Ciruela, A., Dixon, A. K., Bramwell, S., Gonzalez, M. I., Pinnock, R. D. and Lee, K. (2003) 'Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain', *Br J Pharmacol*, 138(5), pp. 751-6.
- Clark, J. B., Palmer, C. J. and Shaw, W. N. (1983) 'The diabetic Zucker fatty rat', *Proc Soc Exp Biol Med*, 173(1), pp. 68-75.
- Clark, K. J. and Murray, A. W. (1995) 'Evidence that the bradykinin-induced activation of phospholipase D and of the mitogen-activated protein kinase cascade involve different protein kinase C isoforms', *J Biol Chem*, 270(13), pp. 7097-103.
- Clary, D. O. and Reichardt, L. F. (1994) 'An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23), pp. 11133-7.
- Cobb, M. H. (1999) 'MAP kinase pathways', *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4), pp. 479-500.
- Courteix, C., Eschalier, A. and Lavarenne, J. (1993) 'Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain', *Pain*, 53(1), pp. 81-8.
- Cui, Y. Y., Xu, H., Wu, H. H., Qi, J., Shi, J. and Li, Y. Q. (2014) 'Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats', *PLoS One*, 9(7), pp. e102052.
- da Rocha Fernandes, J., Ogurtsova, K., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Seuring, T., Zhang, P., Cavan, D. and Makaroff, L. E. (2016) 'IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes', *Diabetes Res Clin Pract*, 117, pp. 48-54.
- Dai, Y., Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tokunaga, A., Yamanaka, H., Tachibana, T., Liu, Y. and Noguchi, K. (2002) 'Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization', *J Neurosci*, 22(17), pp. 7737-45.
- Dawes, J. M., Andersson, D. A., Bennett, D. L. H., Bevan, S. and McMahon, S. B. (2013) 'Inflammatory Mediators and Modulators of Pain', in McMahon, S.L., Koltzenburg, M., Tracey, I. & Turk, D.C. (eds.) *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 48-67.
- Day, I. N. and Thompson, R. J. (2010) 'UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein', *Prog Neurobiol*, 90(3), pp. 327-62.
- Delcroix, J. D., Valletta, J. S., Wu, C., Hunt, S. J., Kowal, A. S. and Mobley, W. C. (2003) 'NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals', *Neuron*, 39(1), pp. 69-84.
- Diemel, L. T., Brewster, W. J., Fernyhough, P. and Tomlinson, D. R. (1994) 'Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor', *Brain Res Mol Brain Res*, 21(1-2), pp. 171-5.
- Donnerer, J. and Liebmann, I. (2010) 'Dorsal root ganglion neurons respond with prolonged extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation following noxious heat and cold stimulation', *Neurosci Lett*, 472(2), pp. 109-13.
- Dorfman, T., Pollak, Y., Sohotnik, R., Coran, A. G., Bejar, J. and Sukhotnik, I. (2015) 'Enhanced intestinal epithelial cell proliferation in diabetic rats correlates with  $\beta$ -catenin accumulation', *J Endocrinol*, 226(3), pp. 135-43.
- Dunn, J. S. and McLetchie, N. G. B. (1943) 'Experimental Alloxan Diabetes in the rat', *The Lancet*, Volume 242(Issue 6265), pp. 384-387.
- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Backonja, M., Farrar, J. T., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., Kalso, E. A., Loeser, J. D., Miaskowski, C., Nurmikko, T. J., Portenoy, R. K., Rice, A.

- S., Stacey, B. R., Treede, R. D., Turk, D. C. and Wallace, M. S. (2007) 'Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations', *Pain*, 132(3), pp. 237-51.
- Dyck, P. J., Peroutka, S., Rask, C., Burton, E., Baker, M. K., Lehman, K. A., Gillen, D. A., Hokanson, J. L. and O'Brien, P. C. (1997) 'Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans', *Neurology*, 48(2), pp. 501-5.
- Edelmayer, R. M., Brederson, J. D., Jarvis, M. F. and Bitner, R. S. (2014) 'Biochemical and pharmacological assessment of MAP-kinase signaling along pain pathways in experimental rodent models: a potential tool for the discovery of novel antinociceptive therapeutics', *Biochem Pharmacol*, 87(3), pp. 390-8.
- Fang, X., Djouhri, L., McMullan, S., Berry, C., Waxman, S. G., Okuse, K. and Lawson, S. N. (2006) 'Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression', *J Neurosci*, 26(27), pp. 7281-92.
- Faradji, V. and Sotelo, J. (1990) 'Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy', *Acta Neurol Scand*, 81(5), pp. 402-6.
- Ferhatovic, L., Banozic, A., Kostic, S., Kurir, T. T., Novak, A., Vrdoljak, L., Heffer, M., Sapunar, D. and Puljak, L. (2013) 'Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes', *Anesth Analg*, 116(3), pp. 712-21.
- Forbes, J. M. and Cooper, M. E. (2013) 'Mechanisms of diabetic complications', *Physiol Rev*, 93(1), pp. 137-88.
- Fowler, M. J. (2008) 'Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes', *Clinical Diabetes*, 26(2), pp. 77-82.
- Fox, A., Eastwood, C., Gentry, C., Manning, D. and Urban, L. (1999) 'Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat', *Pain*, 81(3), pp. 307-16.
- Galan, A. (2003) 'Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain', *Brain Res Mol Brain Res*, 116(1-2), pp. 126-34.
- Galoyan, S. M., Petruska, J. C. and Mendell, L. M. (2003) 'Mechanisms of sensitization of the response of single dorsal root ganglion cells from adult rat to noxious heat', *Eur J Neurosci*, 18(3), pp. 535-41.
- Gao, F. and Zheng, Z. M. (2014) 'Animal models of diabetic neuropathic pain', *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122(2), pp. 100-6.
- Gascon, E. and Moqrich, A. (2010) 'Heterogeneity in primary nociceptive neurons: from molecules to pathology', *Arch Pharm Res*, 33(10), pp. 1489-507.
- Gavazzi, I., Kumar, R. D. C., McMahon, S. B. and Cohen, J. (1999) 'Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro', *European Journal of Neuroscience*, 11(10), pp. 3405-3414.
- Geoffroy, K., Troncy, L., Wiernsperger, N., Lagarde, M. and El Bawab, S. (2005) 'Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels', *FEBS Lett*, 579(5), pp. 1249-54.
- Gold, M. S. (2013) 'Molecular Biology of Sensory Transduction', in McMahon, S.L., Koltzenburg, M., Tracey, I. & Turk, D.C. (eds.) *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 31-47.
- Gold, M. S. and Gebhart, G. F. (2010) 'Nociceptor sensitization in pain pathogenesis', *Nature Medicine*, 16(11), pp. 1248-1257.
- Gold, M. S., Levine, J. D. and Correa, A. M. (1998) 'Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro', *J Neurosci*, 18(24), pp. 10345-55.
- Goldberg, D. S. and McGee, S. J. (2011) 'Pain as a global public health priority', *BMC Public Health*, 11, pp. 770.

- Goto, Y., Kakizaki, M. and Masaki, N. (1976) 'Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding', *Tohoku J Exp Med*, 119(1), pp. 85-90.
- Grabauskas, G., Heldsinger, A., Wu, X., Xu, D., Zhou, S. and Owyang, C. (2011) 'Diabetic visceral hypersensitivity is associated with activation of mitogen-activated kinase in rat dorsal root ganglia', *Diabetes*, 60(6), pp. 1743-51.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U. and Shaw, J. E. (2014) 'Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035', *Diabetes Res Clin Pract*, 103(2), pp. 137-49.
- Hackel, D. B., Frohman, L., Mikat, E., Lebovitz, H. E., Schmidt-Nielsen, K. and Kinney, T. D. (1966) 'Effect of diet on the glucose tolerance and plasma insulin levels of the sand rat (*Psammomys obesus*)', *Diabetes*, 15(2), pp. 105-14.
- Hanani, M., Blum, E., Liu, S., Peng, L. and Liang, S. (2014) 'Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents', *J Cell Mol Med*, 18(12), pp. 2367-71.
- Hasan, W., Pedchenko, T., Krizsan-Agbas, D., Baum, L. and Smith, P. G. (2003) 'Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein', *J Neurobiol*, 57(1), pp. 38-53.
- He, W. Y., Zhang, B., Xiong, Q. M., Yang, C. X., Zhao, W. C., He, J., Zhou, J. and Wang, H. B. (2016) 'Intrathecal administration of rapamycin inhibits the phosphorylation of DRG Nav1.8 and attenuates STZ-induced painful diabetic neuropathy in rats', *Neurosci Lett*, 619, pp. 21-8.
- Heller, T., Blum, M., Spraul, M., Wolf, G. and Müller, U. A. (2014) '[Diabetic co-morbidities: prevalences in Germany]', *Dtsch Med Wochenschr*, 139(15), pp. 786-91.
- Hellweg, R. and Hartung, H. D. (1990) 'Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy', *J Neurosci Res*, 26(2), pp. 258-67.
- Hellweg, R., Raivich, G., Hartung, H. D., Hock, C. and Kreutzberg, G. W. (1994) 'Axonal transport of endogenous nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy', *Exp Neurol*, 130(1), pp. 24-30.
- Hellweg, R., Wöhrle, M., Hartung, H. D., Stracke, H., Hock, C. and Federlin, K. (1991) 'Diabetes mellitus-associated decrease in nerve growth factor levels is reversed by allogeneic pancreatic islet transplantation', *Neurosci Lett*, 125(1), pp. 1-4.
- Hong, J., Qian, T., Le, Q., Sun, X., Wu, J., Chen, J., Yu, X. and Xu, J. (2012) 'NGF promotes cell cycle progression by regulating D-type cyclins via PI3K/Akt and MAPK/Erk activation in human corneal epithelial cells', *Mol Vis*, 18, pp. 758-64.
- Hong, S. and Wiley, J. W. (2005) 'Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1', *J Biol Chem*, 280(1), pp. 618-27.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) 'Neurotrophins: roles in neuronal development and function', *Annu Rev Neurosci*, 24, pp. 677-736.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2003) 'Trk receptors: roles in neuronal signal transduction', *Annu Rev Biochem*, 72, pp. 609-42.
- Huang, W. J., Wang, B. R., Yao, L. B., Huang, C. S., Wang, X., Zhang, P., Jiao, X. Y., Duan, X. L., Chen, B. F. and Ju, G. (2000) 'Activity of p44/42 MAP kinase in the caudal subnucleus of trigeminal spinal nucleus is increased following perioral noxious stimulation in the mouse', *Brain Res*, 861(1), pp. 181-5.
- Hucho, T. and Levine, J. D. (2007) 'Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology', *Neuron*, 55(3), pp. 365-76.
- Hulse, R. P., Beazley-Long, N., Ved, N., Bestall, S. M., Riaz, H., Singhal, P., Ballmer Hofer, K., Harper, S. J., Bates, D. O. and Donaldson, L. F. (2015) 'Vascular endothelial growth factor-A165b prevents diabetic neuropathic pain and sensory neuronal degeneration', *Clin Sci (Lond)*, 129(8), pp. 741-56.
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J. and Messing, R. O. (1995) 'Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth', *J Biol Chem*, 270(50), pp. 30134-40.

- Ibáñez, C. F., Ilag, L. L., Murray-Rust, J. and Persson, H. (1993) 'An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin', *EMBO J*, 12(6), pp. 2281-93.
- Ikebukuro, K., Adachi, Y., Yamada, Y., Fujimoto, S., Seino, Y., Oyaizu, H., Hioki, K. and Ikehara, S. (2002) 'Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats', *Transplantation*, 73(4), pp. 512-518.
- Impey, S., Obrietan, K. and Storm, D. R. (1999) 'Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity', *Neuron*, 23(1), pp. 11-4.
- Isensee, J., Diskar, M., Waldherr, S., Buschow, R., Hasenauer, J., Prinz, A., Allgöwer, F., Herberg, F. W. and Hucho, T. (2014) 'Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons', *J Cell Sci*, 127(Pt 1), pp. 216-29.
- Isensee, J. and Hucho, T. (2017) 'HCS-Mikroskopie – ein Schlüssel zu intrazellulären Schmerzmechanismen', *Biospektrum*, 23(3), pp. 277-280.
- Isensee, J., Krahé, L., Moeller, K., Pereira, V., Sexton, J. E., Sun, X., Emery, E., Wood, J. N. and Hucho, T. (2017) 'Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Nav1.7 knockout mice', *Sci Signal*, 10(461).
- Ismail-Beigi, F., Craven, T., Banerji, M. A., Basile, J., Calles, J., Cohen, R. M., Cuddihy, R., Cushman, W. C., Genuth, S., Grimm, R. H., Hamilton, B. P., Hoogwerf, B., Karl, D., Katz, L., Krikorian, A., O'Connor, P., Pop-Busui, R., Schubart, U., Simmons, D., Taylor, H., Thomas, A., Weiss, D., Hramiak, I. and group, A. t. (2010) 'Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial', *Lancet*, 376(9739), pp. 419-30.
- Jerić, M., Vuica, A., Borić, M., Puljak, L., Jeličić Kadić, A., Grković, I. and Filipović, N. (2015) 'Diabetes mellitus affects activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal ganglia', *J Chem Neuroanat*, 64-65C, pp. 12-19.
- Ji, R. R. (2004) 'Peripheral and central mechanisms of inflammatory pain, with emphasis on MAP kinases', *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3(3), pp. 299-303.
- Ji, R. R., Gereau, R. W., Malcangio, M. and Strichartz, G. R. (2009) 'MAP kinase and pain', *Brain Res Rev*, 60(1), pp. 135-48.
- Ji, R. R., Samad, T. A., Jin, S. X., Schmoll, R. and Woolf, C. J. (2002) 'p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia', *Neuron*, 36(1), pp. 57-68.
- Jiang, Y., Nyengaard, J. R., Zhang, J. S. and Jakobsen, J. (2004) 'Selective loss of calcitonin gene-related Peptide-expressing primary sensory neurons of the a-cell phenotype in early experimental diabetes', *Diabetes*, 53(10), pp. 2669-75.
- Kahn, S. E. (2000) 'The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus', *Am J Med*, 108 Suppl 6a, pp. 2S-8S.
- Kamei, J., Ohhashi, Y., Aoki, T. and Kasuya, Y. (1991) 'Streptozotocin-induced diabetes in mice reduces the nociceptive threshold, as recognized after application of noxious mechanical stimuli but not of thermal stimuli', *Pharmacol Biochem Behav*, 39(2), pp. 541-4.
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. (1992) 'Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain', *Diabetes*, 41(11), pp. 1422-8.
- Khan, N. and Smith, M. T. (2015) 'Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology', *Molecules*, 20(6), pp. 10657-88.
- Khasar, S. G., Lin, Y. H., Martin, A., Dadgar, J., McMahan, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D. and Messing, R. O. (1999) 'A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice', *Neuron*, 24(1), pp. 253-60.
- Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y. and Kishioka, S. (2009) 'Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in Sciatic Nerve Contributes to Neuropathic

- Pain After Partial Sciatic Nerve Ligation in Mice', *Anesthesia and Analgesia*, 109(4), pp. 1305-1311.
- Ko, H. S., Park, B. J., Choi, S. K., Kang, H. K., Kim, A., Kim, H. S., Park, I. Y. and Shin, J. C. (2016) 'STAT3 and ERK Signaling Pathways Are Implicated in the Invasion Activity by Oncostatin M through Induction of Matrix Metalloproteinases 2 and 9', *Yonsei Med J*, 57(3), pp. 761-8.
- Kou, Z. Z., Li, C. Y., Hu, J. C., Yin, J. B., Zhang, D. L., Liao, Y. H., Wu, Z. Y., Ding, T., Qu, J., Li, H. and Li, Y. Q. (2014) 'Alterations in the neural circuits from peripheral afferents to the spinal cord: possible implications for diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats', *Front Neural Circuits*, 8, pp. 6.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M. L. and Kolb-Bachofen, V. (1995) 'Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage', *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376(3), pp. 179-85.
- Langeslag, M., Constantin, C. E., Andratsch, M., Quarta, S., Mair, N. and Kress, M. (2011) 'Oncostatin M induces heat hypersensitivity by gp130-dependent sensitization of TRPV1 in sensory neurons', *Mol Pain*, 7, pp. 102.
- Lawson, S. N. and Waddell, P. J. (1991) 'Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons', *J Physiol*, 435, pp. 41-63.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. and Hempstead, B. L. (2001) 'Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins', *Science*, 294(5548), pp. 1945-8.
- Leininger, G. M., Vincent, A. M. and Feldman, E. L. (2004) 'The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy', *J Peripher Nerv Syst*, 9(1), pp. 26-53.
- Lenzen, S. (2008) 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51(2), pp. 216-26.
- Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. (1963) 'Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro', *Dev Biol*, 6, pp. 653-9.
- Lewin, G. R. (1993) 'Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat', *J Neurosci*, 13(5), pp. 2136-48.
- Lewin, G. R. (2014) 'Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy', *Handb Exp Pharmacol*, 220, pp. 251-82.
- Lewin, G. R. and Barde, Y. A. (1996) 'Physiology of the neurotrophins', *Annu Rev Neurosci*, 19, pp. 289-317.
- Lewin, G. R. and Mendell, L. M. (1993) 'Nerve growth factor and nociception', *Trends Neurosci*, 16(9), pp. 353-9.
- Lewin, G. R., Rueff, A. and Mendell, L. M. (1994) 'Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia', *Eur J Neurosci*, 6(12), pp. 1903-12.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. (1998) 'Signal transduction through MAP kinase cascades', *Adv Cancer Res*, 74, pp. 49-139.
- Li, X. X., Liu, Y. M., Li, Y. J., Xie, N., Yan, Y. F., Chi, Y. L., Zhou, L., Xie, S. Y. and Wang, P. Y. (2016) 'High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98', *J Cell Mol Med*, 20(6), pp. 1159-69.
- Ma, W. and Quirion, R. (2005) 'The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain', *Expert Opin Ther Targets*, 9(4), pp. 699-713.
- Malcangio, M. and Tomlinson, D. R. (1998) 'A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats', *Pain*, 76(1-2), pp. 151-7.
- Malik-Hall, M., Dina, O. A. and Levine, J. D. (2005) 'Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia', *Eur J Neurosci*, 21(12), pp. 3387-94.
- Marangoni, M. N., Brady, S. T., Chowdhury, S. A. and Piano, M. R. (2014) 'The co-occurrence of myocardial dysfunction and peripheral insensate neuropathy in a streptozotocin-induced rat model of diabetes', *Cardiovasc Diabetol*, 13, pp. 11.



- Marlin, M. C. and Li, G. (2015) 'Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome', *Int Rev Cell Mol Biol*, 314, pp. 239-57.
- Mense, S. S. (2004) '[Functional neuroanatomy for pain stimuli. Reception, transmission, and processing]', *Schmerz*, 18(3), pp. 225-37.
- Mitani, O., Masui, K., Tsujimoto, H., Jinbo, K., Watanabe, Y., Ohkura, T., Taya, K. and Ikeda, H. (2008) 'Histopathological Changes of Streptozotocin-induced Painful Diabetes and Antihyperalgesic Effect of Capsaicin Cream in Rats', *Journal of Toxicologic Pathology*, 21(2), pp. 97-104.
- Nakhooda, A. F., Like, A. A., Chappel, C. I., Murray, F. T. and Marliss, E. B. (1977) 'The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies', *Diabetes*, 26(2), pp. 100-12.
- NRW, L. (2015) *Leitmarktwettbewerb Life Sciences.NRW*. Available at: <https://www.land.nrw/de/pressemitteilung/leitmarktwettbewerb-lifesciencesnrw-land-foerdert-zehn-forschungsprojekte-mit-rund> (Accessed: 23.05. 2017).
- Obata, K. and Noguchi, K. (2004) 'MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity', *Life Sci*, 74(21), pp. 2643-53.
- Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A. and Noguchi, K. (2004) 'Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body', *Neuroscience*, 126(4), pp. 1011-21.
- Pabbidi, R. M., Cao, D. S., Parihar, A., Pauza, M. E. and Premkumar, L. S. (2008) 'Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons', *Mol Pharmacol*, 73(3), pp. 995-1004.
- Papanas, N. and Ziegler, D. (2016) 'Emerging drugs for diabetic peripheral neuropathy and neuropathic pain', *Expert Opin Emerg Drugs*.
- Peltier, A., Goutman, S. A. and Callaghan, B. C. (2014) 'Painful diabetic neuropathy', *BMJ*, 348, pp. g1799.
- Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G. and Scholich, K. (2009) 'Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets', *Nat Rev Drug Discov*, 8(4), pp. 321-35.
- Purves, T., Middlemas, A., Agthong, S., Jude, E. B., Boulton, A. J. M., Fernyhough, P. and Tomlinson, D. R. (2001) 'A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy', *Faseb Journal*, 15(13), pp. 2508-2514.
- Qiao, L. Y. (2014) 'Neurotrophin signaling and visceral hypersensitivity', *Front Biol (Beijing)*, 9(3), pp. 216-224.
- Rakieten, N. (1963) 'Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)', *Cancer Chemother Rep*, 29, pp. 91-8.
- Reichard, P., Pihl, M., Rosenqvist, U. and Sule, J. (1996) 'Complications in IDDM are caused by elevated blood glucose level: the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) at 10-year follow up', *Diabetologia*, 39(12), pp. 1483-8.
- Ringkamp, M., Raja, S. N., Campbell, J. N. and Meyer, R. A. (2013) 'Peripheral Mechanisms of Cutaneous Nociception', in McMahon, S.L., Koltzenburg, M., Tracey, I. & Turk, D.C. (eds.) *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 1-30.
- Rittenhouse, P. A., Marchand, J. E., Chen, J., Cream, R. M. and Leeman, S. E. (1996) 'Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons', *Peptides*, 17(6), pp. 1017-22.
- Rivara, M. and Zuliani, V. (2016) 'Novel sodium channel antagonists in the treatment of neuropathic pain', *Expert Opin Investig Drugs*, 25(2), pp. 215-26.
- Roederer, M. (2002) 'Compensation in flow cytometry', *Curr Protoc Cytom*, Chapter 1, pp. Unit 1.14.
- Rukwied, R., Mayer, A., Kluschina, O., Obreja, O., Schley, M. and Schmelz, M. (2010) 'NGF induces non-inflammatory localized and lasting mechanical and thermal hypersensitivity in human skin', *Pain*, 148(3), pp. 407-13.

- Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Schoffnegger, D. and Sandkühler, J. (2007) 'Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice', *J Comp Neurol*, 502(2), pp. 325-36.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. London.
- Russo, A. F. (2015) 'Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55, pp. 533-52.
- Sachs, D., Villarreal, C., Cunha, F., Parada, C. and Ferreira, S. (2009) 'The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception', *Br J Pharmacol*, 156(5), pp. 826-34.
- Safieh-Garabedian, B., Kanaan, S. A., Jalakhian, R. H., Jabbur, S. J. and Saadé, N. E. (1997) 'Involvement of interleukin-1 beta, nerve growth factor, and prostaglandin-E2 in the hyperalgesia induced by intraplantar injections of low doses of thymulin', *Brain Behav Immun*, 11(3), pp. 185-200.
- Sammons, M. J., Raval, P., Davey, P. T., Rogers, D., Parsons, A. A. and Bingham, S. (2000) 'Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway', *Brain Res*, 876(1-2), pp. 48-54.
- Sango, K., Verdes, J. M., Hikawa, N., Horie, H., Tanaka, S., Inoue, S., Sotelo, J. R. and Takenaka, T. (1994) 'Nerve growth factor (NGF) restores depletions of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro', *J Neurol Sci*, 126(1), pp. 1-5.
- Schmidt, R. E., Dorsey, D. A., Roth, K. A., Parvin, C. A., Hounsom, L. and Tomlinson, D. R. (2000) 'Effect of streptozotocin-induced diabetes on NGF, P75(NTR) and TrkA content of prevertebral and paravertebral rat sympathetic ganglia', *Brain Res*, 867(1-2), pp. 149-56.
- Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H. and Newgard, C. B. (1994) 'STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells', *Diabetes*, 43(11), pp. 1326-33.
- Sehgal, N., Colson, J. and Smith, H. S. (2013) 'Chronic pain treatment with opioid analgesics: benefits versus harms of long-term therapy', *Expert Rev Neurother*, 13(11), pp. 1201-20.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M. and Murphy, R. A. (1996) 'Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases', *Biochem J*, 314 (Pt 3), pp. 951-60.
- Sima, A. A. and Sugimoto, K. (1999) 'Experimental diabetic neuropathy: an update', *Diabetologia*, 42(7), pp. 773-88.
- Skaper, S. D. (2008) 'The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7(1), pp. 46-62.
- Skaper, S. D. (2012) 'The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview', *Methods Mol Biol*, 846, pp. 1-12.
- Stavniichuk, R., Obrosova, A. A., Drel, V. R., Nadler, J. L., Obrosova, I. G. and Yorek, M. A. (2013) '12/15-Lipoxygenase inhibition counteracts MAPK phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy', *J Diabetes Mellitus*, 3(3).
- Stavniichuk, R., Shevalye, H., Hirooka, H., Nadler, J. L. and Obrosova, I. G. (2012) 'Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy', *Biochem Pharmacol*, 83(7), pp. 932-40.
- Svensson, P., Cairns, B. E., Wang, K. and Arendt-Nielsen, L. (2003) 'Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia', *Pain*, 104(1-2), pp. 241-7.

- Taiwo, Y. O., Bjerknes, L. K., Goetzl, E. J. and Levine, J. D. (1989) 'Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system', *Neuroscience*, 32(3), pp. 577-80.
- Taiwo, Y. O. and Levine, J. D. (1991) 'Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia', *Neuroscience*, 44(1), pp. 131-5.
- Tamura, S., Morikawa, Y. and Senba, E. (2005) 'Up-regulated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 and cyclic AMP-responsive element binding protein by peripheral inflammation in primary afferent neurons possibly through oncostatin M receptor', *Neuroscience*, 133(3), pp. 797-806.
- Terenghi, G., Chen, S., Carrington, A. L., Polak, J. M. and Tomlinson, D. R. (1994) 'Changes in sensory neuropeptides in dorsal root ganglion and spinal cord of spontaneously diabetic BB rats. A quantitative immunohistochemical study', *Acta Diabetol*, 31(4), pp. 198-204.
- Thompson, R. J., Doran, J. F., Jackson, P., Dhillon, A. P. and Rode, J. (1983) 'PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells', *Brain Res*, 278(1-2), pp. 224-8.
- Thomson, D. M., Herway, S. T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J. D., Barrow, J. R. and Winder, W. W. (2008) 'AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family', *J Appl Physiol* (1985), 104(2), pp. 429-38.
- Tiaka, E. K., Papanas, N., Manolakis, A. C. and Maltezos, E. (2011) 'The role of nerve growth factor in the prophylaxis and treatment of diabetic foot ulcers', *Int J Burns Trauma*, 1(1), pp. 68-76.
- Tjälve, H. and Wilander, E. (1976) 'The uptake in the pancreatic islets of nicotinamide, nicotinic acid and tryptophan and their ability to prevent streptozotocin diabetes in mice', *Acta Endocrinol (Copenh)*, 83(2), pp. 357-64.
- Turk, J., Corbett, J. A., Ramanadham, S., Bohrer, A. and McDaniel, M. L. (1993) 'Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets', *Biochem Biophys Res Commun*, 197(3), pp. 1458-64.
- Unger, J. W., Klitzsch, T., Pera, S. and Reiter, R. (1998) 'Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: Morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord', *Experimental Neurology*, 153(1), pp. 23-34.
- Vaillant, A. R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (1999) 'Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival', *J Cell Biol*, 146(5), pp. 955-66.
- Wei, Z., Wang, L., Han, J., Song, J., Yao, L., Shao, L., Sun, Z. and Zheng, L. (2009) 'Decreased expression of transient receptor potential vanilloid 1 impairs the postischemic recovery of diabetic mouse hearts', *Circ J*, 73(6), pp. 1127-32.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999) 'Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human', *Physiol Rev*, 79(1), pp. 143-80.
- Wise, P. H., Weir, B. J., Hime, J. M. and Forrest, E. (1972) 'The diabetic syndrome in the tuco-tuco (*Ctenomys talarum*)', *Diabetologia*, 8(3), pp. 165-72.
- Woolf, C. J. and Salter, M. W. (2000) 'Neuronal plasticity: increasing the gain in pain', *Science*, 288(5472), pp. 1765-9.
- Yamamoto, H., Shimoshige, Y., Yamaji, T., Murai, N., Aoki, T. and Matsuoka, N. (2009) 'Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats', *Neuropharmacology*, 57(4), pp. 403-8.
- Zhang, P., Smith-Nguyen, E. V., Keshwani, M. M., Deal, M. S., Kornev, A. P. and Taylor, S. S. (2012) 'Structure and allostery of the PKA RII $\beta$  tetrameric holoenzyme', *Science*, 335(6069), pp. 712-6.
- Zhuang, Z. Y., Gerner, P., Woolf, C. J. and Ji, R. R. (2005) 'ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model', *Pain*, 114(1-2), pp. 149-59.

- Zhuang, Z. Y., Xu, H., Clapham, D. E. and Ji, R. R. (2004) 'Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization', *J Neurosci*, 24(38), pp. 8300-9.
- Ziegler, D., Papanas, N., Vinik, A. I. and Shaw, J. E. (2014) 'Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes', *Handb Clin Neurol*, 126, pp. 3-22.
- Zochodne, D. W. (2015) 'Diabetes and the plasticity of sensory neurons', *Neurosci Lett*, 596, pp. 60-5.
- Zochodne, D. W., Verge, V. M., Cheng, C., Sun, H. and Johnston, J. (2001) 'Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes', *Brain*, 124(Pt 11), pp. 2319-34.

# 8 Anhang

## 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CamKII<math>\alpha</math></b>	<i>Calcium/Calmodulin-dependent kinase II <math>\alpha</math></i>
<b>cAMP</b>	cyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CCM</b>	<i>Corneal Confocal Microscopy</i>
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin-Gene-Related Peptide</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i>
<b>CTL</b>	Kontrolltiere
<b>Ctrl</b>	Kontrolle
<b>C<math>\alpha</math></b>	katalytische Untereinheit C $\alpha$
<b>C<math>\beta</math></b>	katalytische Untereinheit C $\beta$
<b>C<math>\gamma</math></b>	katalytische Untereinheit C $\gamma$
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus Typ 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus Typ 2
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>DRG</b>	<i>dorsal root ganglion</i> ; Spinalganglion
<b>DSP</b>	distale sensomotorische Polyneuropathie
<b>EC50</b>	mittlere effektive Konzentration
<b>ERK1/2</b>	<i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
<b>et al.</b>	und andere
<b>Fsk</b>	Forskolin
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
<b>Gs-GPCR</b>	stimulierende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
<b>h</b>	Stunden

---

<b>HCS</b>	<i>High Content Screening</i>
<b>IASP</b>	<i>International Association for the Study of Pain</i>
<b>IB4</b>	<i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia isolectin B4</i>
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LANUV</b>	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
<b>MAP-Kinase</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MEK</b>	MAPK/ERK-Kinase
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>min</b>	Minuten
<b>Mio.</b>	Millionen
<b>mRNA</b>	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
<b>Nav1.7</b>	<i>Voltage-gated sodium channel Na(v)1.7</i>
<b>Nav1.8</b>	<i>Voltage-gated sodium channel Na(v)1.8</i>
<b>NB</b>	Neurobasal-A Medium
<b>NDSB</b>	<i>Normal donkey serum block</i>
<b>NF-200</b>	Neurofilament 200
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i>
<b>NGSB</b>	<i>Normal goat serum block</i>
<b>Non</b>	Tiergruppe, die nach STZ Injektion nicht diabetisch wurden
<b>NT-3</b>	Neurotrophin-3
<b>NT-4</b>	Neurotrophin-4
<b>NT-5</b>	Neurotrophin-5
<b>OSM</b>	Oncostatin M
<b>p.G.</b>	per Gruppe
<b>p75NT</b>	p75 Neurotrophin Rezeptor
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymerase
<b>PC12</b>	Zelllinie, die aus einem (Phäochromocytom) der Ratte stammt.
<b>PDE</b>	<i>Propability Density Estimation</i> : Verteilungswahrscheinlichkeit
<b>pERK</b>	phosphorylierte <i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostazyklin
<b>PGP</b>	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A

---

<b>PKA-II</b>	Proteinkinase A-II
<b>PKA-RII</b>	Regulatorische Untereinheit RII der Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PPT</b>	<i>paw pressure test</i> ; Pfortendrucktest
<b>pRII</b>	phosphorylierte regulatorische Untereinheit RII
<b>PrKX</b>	Proteinkinase X
<b>RII<math>\alpha</math></b>	Regulatorische Untereinheit RII $\alpha$
<b>RII<math>\beta</math></b>	Regulatorische Untereinheit RII $\beta$
<b>RII<math>\beta</math>/+</b>	RII $\beta$ -positiv
<b>RI<math>\alpha</math></b>	Regulatorische Untereinheit RI $\alpha$
<b>RI<math>\beta</math></b>	Regulatorische Untereinheit RI $\beta$
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i>
<b>STZ</b>	Streptozotocin
<b>TrkA</b>	Tropomyosinrezeptorkinase A
<b>TrkB</b>	Tropomyosinrezeptorkinase B
<b>TrkC</b>	Tropomyosinrezeptorkinase C
<b>TRPV1</b>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
<b>TTX-R</b>	Tetrodotoxin-resistent
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>UCHL1</b>	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
<b>v. l. n. r.</b>	von links nach rechts
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>vs.</b>	versus
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Tiermodelle der diabetischen Neuropathie .....	18
Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterial .....	23
Tabelle 3: Puffer und Biochemikalien .....	24
Tabelle 4: Stammlösungen.....	24
Tabelle 5: Stammlösungen der Stimulantien .....	25
Tabelle 6: Primär-Antikörper.....	26
Tabelle 7: Sekundär-Antikörper.....	27
Tabelle 8: Systemische Applikation von STZ induziert Hyperglykämie .....	34
Tabelle 9: Systemische Applikation von STZ induziert mechanische Hyperalgesie .....	35



### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuroanatomie der Nozizeption..	4
Abbildung 2: Modulation von Schmerzsensitivität.....	6
Abbildung 3: Die PKA-II Aktivierungskaskade.....	10
Abbildung 4: Die NGF – ERK1/2 Signalkaskade .....	12
Abbildung 5: Experimenteller Aufbau zur <i>High Content Screening</i> basierten Analyse sensorischer Neurone.....	20
Abbildung 6: Studiendesign im zeitlichen Ablauf .....	28
Abbildung 7: Sensorischen Neurone aus dem STZ-Modell haben eine unveränderte Größenverteilung und Intensitätsverteilung des neuronalen Markers UCLH1 .....	37
Abbildung 8: Die Zusammensetzung neuronaler Subgruppen bleibt im STZ-Modell erhalten .....	39
Abbildung 9: Stimulation mit prototypischen inflammatorischen Mediatoren induziert im STZ-Modell eine höhere Variabilität in der schmerzrelevanten Signaltransduktion.....	41
Abbildung 10: Systemische STZ-Behandlung resultiert in höherer Neuronenzahl <i>in vitro</i> .....	42
Abbildung 11: Stimulation mit PGI <sub>2</sub> führt zu transienter Phosphorylierung von PKA-RII, unabhängig vom diabetischen Phänotyp .....	44
Abbildung 12: Die NGF- und OSM-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 variiert im STZ Modell.....	46
Abbildung 13: Die basale ERK1/2-Expression ist im STZ-Modell unverändert .....	48
Abbildung 14: Die NGF Dosis-Wirkungskurve ist im STZ-Modell unverändert.....	49
Abbildung 15: Der dosisabhängige Anteil der NGF responsiven Zellen ist im STZ-Modell unverändert .....	51
Abbildung 16: Der NGF-Rezeptor TrkA wird vornehmlich in kleinen Nozizeptoren exprimiert und nicht durch STZ hochreguliert. ....	53
Abbildung 17: Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig.....	54
Abbildung 18: Die NGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist dosisabhängig und korreliert mit der TrkA-Expression.....	55

## 8.4 Publikationen

1. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Kollaborationstests der Experimentellen Anästhesiologie und Schmerzforschung der Uniklinik Köln und der Grünenthal GmbH angefertigt. Sie schaffte die Grundlage für die Kollaboration der beiden Institutionen für das Projekt „NeuRoWeg - Innovative Testsysteme zur Identifizierung kurativer Analgetika mit verlässlicher Prognose für die Wirkung im Patienten“. Das Projekt gewann den Leitmarktwettbewerb Life Sciences.NRW 2015 und wird über 3 Jahre mit 1,5 Mio. Euro gefördert (NRW, 2015).
2. Isensee, J., Kaufholz, M., Knappe M.J., Hasenauer, J., Hammerich, H., Gonczarowska-Jorge, H., Zahedi, R. P., Schwede, F., Herberg, F.W., Hucho, T.: Phosphorylation of PKA-RII subunits precedes cAMP-induced activation and regulates activity termination – J Cell Biol, Apr 2018, jcb.201708053

## 8.5 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Tim Hucho bedanken, der mir den Sprung in eine externe Doktorarbeit in Köln ermöglicht hat und stets mit einem guten Rat zur Seite stand, insbesondere wenn mal wieder die Frustration durchzudringen drohte.

Ein ebenso großer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh, der mir ermöglichte die Arbeit am Fachbereich in Berlin einzureichen und auch nach langen Phasen der „Stille“ meinerseits immer sehr zeitnah auf meine Anliegen reagierte und mit guten Ratschlägen als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei Jörg für die gute Betreuung bedanken. Er widmete sich den unendlich scheinenden Problemen mit „R“, verhinderte so den einen oder anderen Nervenzusammenbruch, quälte sich durch unformatierte, erste Versuche einer Monographie-Verfassung und stand stets als Ansprechpartner zur Verfügung.

Bei der Firma Grünenthal möchte ich mich vor allem für die zur Verfügung gestellten Tiere, aber auch für die gute Kooperation bedanken. Planung, Durchführung und jegliche Datenkommunikation verliefen stets zügig und unkompliziert.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Hucho, also Alina, Katharina, Leo, Anibal, Stephanie, Maike, Jenny, Petra, Jeremy und Marianne die mir stets mit guten Worten, guten Ideen und Taten zur Umsetzungen von Experimenten, sowie guter Laune und nicht zuletzt auch gutem Kulinarischen zur Seite standen. Ich werde die Zeit im Labor immer in bester Erinnerung behalten.

Außerdem möchte ich auch meiner Schwester Linda danken, die als Relativistin und „erfahrener PostDoc“ doch das ein oder andere Mal zur Beruhigung oder zum Beantworten von nicht immer sehr intellektuellen Fragen, sei es formeller oder inhaltlicher Natur, zur Seite stand.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie mich in dieser Zeit finanziell, aber vor allem mental unterstützt haben und sich geduldig und nachsichtig mit meinen Launen in dieser Zeit zeigten. Ohne ihre Unterstützung, wäre diese Arbeit wohl nicht fertig geworden.

## **8.6 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich alle Versuche, sofern nicht anders angegeben, selbstständig durchgeführt habe und die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 07.06.2018

Hanna Hammerich









9 783863 879082  
**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-908-2