

Translationale Schmerzforschung
Leitung Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho
Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der Universität zu Köln
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. Andrea U. Steinbicker

**Die Aktivierung von PKA-II durch
TRP-Kanal-Agonisten ist unabhängig vom
cyclischen Adenosinmonophosphat in
nozizeptiven Neuronen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Patricia Stefanie Alm
aus Dormagen

promoviert am 08.06.2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. T. Hucho
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Matthes

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho
Herr Privatdozent Dr. Jörg Isensee

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Herrn Privatdozent Dr. Jörg Isensee von mir selbst und zum Teil mit Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentin Frau Siobal durchgeführt worden.

Das Studiendesign orientierte sich an der in der Arbeitsgruppe Hucho etablierten Methodik. Die Methodik wurde von Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Herrn Privatdozent Dr. Jörg Isensee entwickelt. Die einzelnen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Privatdozent Dr. Jörg Isensee ausgearbeitet. Zwischenergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe präsentiert und besprochen. Die selbstständige Auswertung der Daten, das selbstständige Erstellen der Abbildungen und die selbstständige statistische Auswertung der Daten erfolgte unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Jörg Isensee.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.11.2025

Unterschrift:

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Universitätsprofessor Tim Hucho danken, der mich wie selbstverständlich in seinem Labor willkommen geheißen hat und mir diese spannende Dissertation erst ermöglicht hat. Vielen Dank Tim, für die Ermutigung und das Vertrauen und dass du uns gezeigt hast, wie faszinierend und spannend die Schmerzforschung ist.

Besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. Bernd. W. Böttiger, der mir durch die Freistellung diese experimentelle Forschungsarbeit ermöglicht hat.

Meinem direkten Betreuer Herrn Dr. Jörg Isensee danke ich für die Unterstützung und die Betreuung bei der Arbeit. Danke für deine Hilfe in allen Aspekten, sei es bei der Planung der Experimente bis hin zur Statistik. Danke, dass ich immer mit Fragen kommen durfte.

Dem gesamten Team der AG Hucho möchte ich für die herzliche Aufnahme ins Team und für die schöne Zeit im Labor danken.

Frau Maïke Siobal, die uns mit viel Geduld in die Ins und Outs gezeigt hat und uns bei jedem Praxisschritt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. Rebecca Dinnendahl und Ehsan Alirahimi, danke für die aufbauenden Worte und den Austausch und dass Ihr auch immer ein offenes Ohr hattet.

Danke Petra, für deine Hilfe bei allem Organisatorischen und deine herzliche Aufnahme.

Raphael, dir möchte ich für die kurzweiligen Stunden im Labor danken. Zusammen gingen das Präppen und auch die Statistik deutlich leichter.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen bedanken, die mich unterstützt haben. Ihr habt mich das ein oder andere Mal aus der Verzweiflung geholt und mich motiviert. Besonderer Dank gilt dabei Markus, Caro und insbesondere Larissa fürs Korrekturlesen und Motivieren. Dem Team vom Powerhouse und insbesondere Coach Denis für Motivation, Ansporn und den Ausgleich. Mein Kumpel Mohammad, der mehr Autorität hat, als jeder Oberarzt.

Mama, Papa und Benny, danke Euch, dass ihr immer an mich glaubt und hinter mir steht.

Und zu guter Letzt Danke an die Menschen, deren Musik mich öfters vorm Verzweifeln bewahrt hat: Got7, The Rose, Junny, The Luka State, Shinee, und BtoB.

„But that's why it's called
Beautiful pain“

- BtoB: Beautiful pain, 2018

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1. ZUSAMMENFASSUNG	13
2. EINLEITUNG	15
2.1. Definition und Relevanz von Schmerzen im Gesundheitssystem	15
2.2. Mechanistische Deskriptoren für Schmerzen: neuropathischer, nozizeptiver und noziplastischer Schmerz	16
2.3. Schmerzweiterleitung	17
2.4. Verschiedene Untergruppen nozizeptiver Neurone	18
2.5. Sensitivierung und Schmerzen	20
2.5.1. Periphere Sensitivierung	21
2.5.2. Zentrale Sensitivierung	21
2.6. Intrazelluläre Signaltransduktion in Nozizeptoren	22
2.6.1. Der <i>Second Messengers</i> cAMP induziert Hyperalgesie	23
2.6.2. PKA Isoformen	23
2.6.3. Einfluss der PKA auf Ionenkanäle, Transmitterfreisetzung und Genexpression	24
2.6.4. MAP Kinasen und PKC	25
2.6.5. TRPV1 und TRPA1 aktivieren sensorische Neurone und verursachen Schmerzen	26
2.6.6. TRPV1 wird durch Hitze und Capsaicin aktiviert	26
2.6.7. TRPA1 wird durch AITC aktiviert	27
2.6.8. Spannungsabhängige Calciumkanäle	28
2.6.9. Depolarisation aktiviert die PKA-II unabhängig von cAMP und induziert mechanische Hyperalgesie	29
2.7. Fragestellung und Ziel der Arbeit	30
3. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1. Material	32
3.1.1. Verwendete Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien	32
3.1.2. Nährmedien, Reagenzien, Zusätze	35
3.1.3. Prästimulantien	38

3.1.4.	Rezeptoragonisten	39
3.1.5.	Primäre Antikörper	39
3.1.6.	Sekundäre Antikörper	40
3.1.7.	Software	40
3.1.8.	Websites	41
3.2.	Methoden	41
3.2.1.	Versuchstiere	41
3.2.2.	Isolation der dorsalen Spinalganglien	41
3.2.3.	Zellkultur nozizeptiver Neurone aus dorsalen Spinalganglien	42
3.2.4.	Stimulation der Zellkulturen	44
3.2.5.	Prästimulation der primär sensorischen Neurone mit cAMP-Modulatoren und Fentanyl	44
3.2.6.	Stimulation der primär Sensorischen Neurone mit TRPA1- und TRPV1-Agonisten	45
3.2.7.	Fixierung der nozizeptiven Neuronen	45
3.2.8.	Immunzytochemie	46
3.2.8.1	Verwendete Primäre Antikörper	46
3.2.8.2	Verwendete Sekundäre Antikörper	47
3.2.9.	<i>High Content Screening</i> Mikroskopie und Datenanalyse	47
3.2.10.	Qualitätssicherung und Quantifizierung der PKA-II Aktivität bei <i>High Content Imaging</i> -Experimenten mit primär sensorischen Neuronen	48
3.2.11.	Statistische Auswertung	50
3.2.12.	Calcium-Bildgebung	50
3.2.12.1.	Herstellung der Zellkulturen	50
3.2.12.2.	Färbung der Zellen mit Calbryte 630 AM	51
3.2.12.3.	Stimulation der Zellen und Bildgenerierung	52
3.2.12.4.	Analyse der Bilder	52
4.	ERGEBNISSE	54
4.1.	Fentanyl inhibiert PKA-II nach Stimulation mit Serotonin	54
4.2.	Fentanyl hat den gleichen Einfluss auf die TRPV1- und TRPA1-vermittelten PKA-II Aktivierung, wie auf die KCl-induzierte PKA-II Aktivierung	55
4.3.	Fentanyl hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2	56
4.4.	Langzeitbehandlung mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPS-pAB aktiviert PKA-II	58
4.5.	Rp-cAMPS-pAB inhibiert PKA-II nach Stimulation mit Serotonin	59

4.6.	Rp-cAMPS-pAB hat keinen Effekt auf PKA-II nach Stimulation mit Capsaicin oder AITC	61
4.7.	Langzeitbehandlung mit Rp-cAMPS-pAB aktiviert ERK1/2	62
4.8.	Rp-cAMPS-pAB erhöht Aktivität von ERK1/2 nach Stimulation mit AICT, nicht aber nach Stimulation mit Capsaicin oder Serotonin	63
4.9.	Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX erhöht die basale PKA-II Aktivität	65
4.10.	Prästimulation mit IBMX verlängert die Aktivierung von PKA-II nach Stimulation mit Serotonin, nicht aber nach Stimulation mit AITC oder Capsaicin	66
4.11.	Prästimulation mit IBMX hat keinen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität	69
4.12.	Der TRPA1-Agonist PF4840154 hat in hohen Dosen einen Effekt auf PKA-II, jedoch nicht auf ERK1/2	71
4.13.	Hohe Dosen von PF4840154 induzieren Calciuminflux	74
5.	DISKUSSION	80
5.1.	Die Aktivierung der PKA-II durch TRP Agonisten scheint unabhängig von cAMP und Opioid-unresponsiv zu sein.	80
5.2.	Aktivierung der PKA kann unabhängig von cAMP erfolgen	82
5.3.	TRPV1 und TRPA1 aktivieren PKA unabhängig von cAMP	83
5.4.	Beeinflussung von TRPV1 und TRPA1 als Alternative zu Opioiden in der Schmerzbehandlung	85
5.5.	Stärken und Limitationen	86
5.6.	Ausblick auf die Zukunft	88
6.	LITERATURVERZEICHNIS	89
7.	ANHANG	97
7.1.	Abbildungsverzeichnis	97
7.2.	Tabellenverzeichnis	98

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
a.u.	Beliebige Einheit - <i>Arbitrary unit</i>
Abb.	Abbildung
AITC	Allylisoithiocyanat
AKAP79/150	Protein kinase A anchoring protein 79/150
AMAP-Rezeptor	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca ²⁺	Calciumion
CACNA1C	Untereinheit alpha-1C des L-Typ Calciumkanals Cav1.2
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CaN	Calcineurin
Cap	Capsaicin
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CIPS	<i>Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1/2
f.c.	Final concentration - Endkonzentration
FK oder FK506	Tacrolimus
FKBPs	FK506-bindende Proteine
G	Gramm
GCPR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GDP	Guanosin-Di Phosphat
GFL	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTP	Guannosin Triphosphat
HCS-Mikroskopie	High Content Screening-Mikroskopie
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen, <i>human embriotic kidney cell</i>
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IB4	Isolektin B4
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>

Iono	Ionomycin
KCl	Kaliumchlorid
Konz.	Konzentration
LTP	Lang-Zeit Potenzierung
m/s	Meter pro Sekunde
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	MAP/ERK-Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
Mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOP	μ Opioid Rezeptor
NGF	Nervenwachstumsfaktor, <i>nerve growth factor</i>
NGS	Normales Ziegenserum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKA-I	Typ I PKA
PKA-II	Typ II PKA
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pRII	Phosphorylierte regulatorische Untereinheit der PKA-II
Prkar2b	PKA-II regulatorische Untereinheit beta
ROI	<i>Region of interest</i>
S	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
SNL	Spinalnervenligatur, <i>Spinal Nerve Ligation</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TrkA	Tropomyosinrezeptorkinase A
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin</i>
TRPA1	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin 1</i>
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
TRPM	<i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPML	<i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
TRPP	<i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
U	Einheiten - <i>Units</i>
UCHL1	Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1
WHO	Weltgesundheitsorganisation

YLDs	Lebensjahre mit Einschränkungen - <i>Years lived with disability</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Die Öffnung des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.2$ nach Depolarisation mit Kaliumchlorid (KCl) aktiviert Typ-II Protein Kinase A (PKA-II) in nozizeptiven Neuronen *in vitro* und bewirkt langanhaltende mechanische Hyperalgesie *in vivo*.¹ Im Gegensatz zur Aktivierung von PKA-II durch G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), ist die Aktivierung von PKA-II nach Depolarisation unabhängig von cAMP und kann daher nicht durch Opioide inhibiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob dieser pronozizeptive Mechanismus auch durch Aktivierung ligandengesteuerter Kationenkanäle der *Transient Receptor Potential* (TRP)-Familie wie TRPA1 und TRPV1 aktiviert wird.

Übernachtskulturen dissoziierter sensorischer Neurone der Ratte (Tierversuchsgenehmigungsnummer 84-02.05.20.13.045) wurden in einer 2 Stunden-Kinetik mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin (1 μ M), dem TRPA1-Agonisten AITC (10 μ M) oder dem 5HT₄-Agonisten Serotonin (1 μ M) stimuliert, fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Als Korrelat für die Aktivität der PKA-II wurde die Fluoreszenzintensität eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die regulatorischen Untereinheiten von PKA-II mittels High-Content-Imaging (HCI) quantifiziert. Zur mechanistischen Analyse der cAMP-Abhängigkeit wurden die Zellen mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 100 μ M), dem inaktiven cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder dem Adenylylcyclasehemmenden Opioid Fentanyl (10 μ M) vorbehandelt. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von R-Skripten statistisch ausgewertet und visualisiert. In vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte eine Aktivierung der PKA-II durch Stimulation der ligandengesteuerten Kationenkanäle TRPV1 mittels Capsaicin und TRPA1 mittels AITC bereits nachgewiesen werden.

Um die cAMP-Abhängigkeit der PKA-II zu testen, wurden verschiedene mechanistische Ansätze getestet. Serotonin fungierte dabei als Positivkontrolle, da der durch Serotonin-induzierte Aktivierungsprozess der PKA-II cAMP abhängig ist.¹

Die Prästimulation mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX, welcher eine langanhaltende Erhöhung des zellulären cAMPs bewirkt, führte ubiquitär zu einem Anstieg der basalen PKA-II Aktivität. In dem durch Serotonin aktivierten, GPCR- α -s gekoppelten, cAMP-abhängigen Signalweg verlängerte die Prästimulation mit IBMX zusätzlich die PKA-II Aktivität. Im Gegensatz dazu war eine Verlängerung der PKA-II Aktivierung bei Stimulation des TRPA1-Kanals mit AITC und des TRPV1-Kanals mit Capsaicin nicht zu beobachten. Die Prästimulationen mit dem inaktiven cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB inhibierte die PKA-II nach Stimulation mit Serotonin, nicht aber nach Stimulation mit Capsaicin oder AITC. Durch Bindung an den μ -Opioidrezeptor können Opioide die Adenylylcyclase hemmen, wodurch weniger cAMP gebildet wird. Prästimulation mit dem Opioid Fentanyl

reduzierte die Serotonin-induzierten PKA-II Aktivität. Im Gegensatz dazu hatte die Prästimulation mit Fentanyl keinen inhibitorische Effekt auf die PKA-II Aktivität nach Stimulation mit Capsaicin oder AITC.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl AITC als auch Capsaicin zu einer cAMP-unabhängigen PKA-II Aktivierung führen. In zukünftigen Studien muss nun untersucht werden, ob dieser Mechanismus bei Opioid-resistenten Schmerzen relevant ist.

2. Einleitung

2.1. Definition und Relevanz von Schmerzen im Gesundheitssystem

Chronische Schmerzen sind ein weltweites Gesundheitsproblem, insbesondere im Hinblick auf Behinderung, Krankheitslast, Lebensqualität und Verlust der Gesundheit.^{2,3} In der „*Global Burden of Disease Study*“ von 2016 wurden Schmerzen und mit Schmerzen assoziierte Krankheiten als eine der Hauptursachen für Behinderungen und Krankheitslast weltweit identifiziert.⁴ Dabei wird zwischen akuten und chronischen Schmerzen unterschieden. Akute Schmerzen sind vorübergehend und gehen meist mit unmittelbarer Gewebeschädigung oder Entzündung einher.⁵ Bestehen Schmerzen über einen Zeitraum länger als 3 Monate, so werden sie als chronische Schmerzen bezeichnet und als eigenständige Pathologie angesehen.^{5,6} Schmerzen im unteren Rücken („*lower back pain*“) und Migräne sind die häufigsten Ursachen für Jahre, die mit Behinderung gelebt wurden (*Years lived with disability*, YLD). Der untere Rückenschmerz machte dabei 57,6 Millionen YLD und Migräne 45,1 YLD aus.⁴ Durch Arbeitsunfälle und Inanspruchnahme von medizinischen Leistungen werden direkte und indirekte Kosten im Gesundheitssystem verursacht.^{3,7} Die Angaben zu den Kosten, die durch chronische Schmerzen verursacht werden, variieren.³ *Wenig et al.* schätzten die indirekten Kosten in Deutschland 2009 auf etwa 49 Milliarden Euro.⁸ Die höchsten Gesamtkosten unter den chronischen Schmerzen werden dabei durch Rückenschmerzen verursacht.⁷

Schmerz wurde bereits 1979 von der *International Association for the Study of Pain* (IASP) als „eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung verbunden ist oder in Bezug auf eine solche Schädigung beschrieben wird“⁹ definiert. Diese Definition wurde international von Schmerz-Forschenden, der Weltgesundheitsorganisation und vielen im Gesundheitswesen Arbeitenden übernommen.¹⁰

2020 wurde diese erstmals überarbeitet und um sechs Unterpunkte für zusätzlichen Kontext erweitert. Die neue Definition benennt Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht oder einer solchen ähnelt.“ Das Empfinden von Schmerzen wird dabei als persönliche Erfahrung definiert, die durch biologische, psychologische und soziale Faktoren beeinflusst wird. In den Unterpunkten wird weiter postuliert, dass das Konzept von Schmerzen durch Erfahrungen erlernt wird und individuelle Schmerzerfahrungen immer respektiert werden sollten, da sie interindividuell sehr unterschiedlich sind. Schmerz diene gewöhnlich einer Adaptation, könne jedoch auch unerwünschte Effekte auf (körperliche) Funktionen sowie soziales und psychologisches Wohlbefinden haben.

Die physischen, emotionalen und sozialen Auswirkungen von Schmerzen auf Individuen sind zum Teil so stark, dass es zu deutlichen Einschränkungen des Alltags führt.⁵

Um die Relevanz von chronischen Schmerzen in der Gesellschaft zu verdeutlichen, klar definierte Behandlungswege und Forschungsprogramme zu verbessern und den Zugang zu multimodaler Schmerztherapie zu vereinfachen, wurden chronische Schmerzen 2018 unter Federführung der IASP in die ICD-11 (*International Classification of Diseases 11th Version*) unter Berücksichtigung von psychologischen und sozialen Faktoren aufgenommen.⁶

2.2. Mechanistische Deskriptoren für Schmerzen: neuropathischer, nozizeptiver und noziplastischer Schmerz

Die Kategorisierung von Schmerzpatienten und Schmerzpatientinnen ist wichtig um die Wirksamkeit von Behandlungskonzepten beurteilen zu können. Daher werden drei mechanistische Ursachen des Schmerzes unterschieden: nozizeptive, neuropathische und noziplastische Schmerzen.¹¹

Nozizeptiver Schmerz wird von der IASP als „Schmerz, der durch eine tatsächliche oder drohende Schädigung von nichtneuronaem Gewebe entsteht und auf die Aktivierung von Nozizeptoren zurückzuführen ist“ definiert.^{11,12} Bei nozizeptiven Schmerzen ist im Gegensatz zu neuropathischen Schmerzen das somatosensorische Nervensystem intakt.^{12,13}

Die Definition des neuropathischen Schmerzes wurde 2011 erneuert und als „Schmerzen, die durch eine Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems hervorgerufen werden“ beschrieben.¹²⁻¹⁴ Befindet sich die Läsion nicht in einem dem somatosensorischen Nervensystem zugehörigen Abschnitt, wie beispielsweise dem Cerebellum, oder präsentieren sich Symptome ohne Korrelat einer Läsion oder Erkrankung, so wird aktuell der daraus resultierende Schmerz nicht dem neuropathischen Schmerzen zugeordnet.^{12,14}

Diese zwei mechanistischen Definitionen beziehen viele Schmerzpatienten ohne Aktivierung von Nozizeptoren oder ohne Erkrankung, beziehungsweise Läsion des somatosensorischen Nervensystems, nicht mit ein.^{13,15} Dazu zählen der unspezifische Rückenschmerz, unspezifische periphere Gelenkschmerzen, Fibromyalgie und das Komplexe Regionale Schmerz Syndrom (CRPS) Typ 1.^{11,13} 2016 wurde mit den noziplastischen Schmerzen eine dritte mechanistische Schmerzdefinition etabliert. Noziplastische Schmerzen unterscheiden sich von den neuropathischen und nozizeptiven Schmerzen, da sie nicht durch eine periphere Pathologie erklärt werden können. Es kommt nicht wie bei den nozizeptiven Schmerzen beispielsweise zu einer Gewebeschädigung oder Inflammation, oder zu einer Nervenschädigung, wie bei den neuropathischen Schmerzen. Noziplastische Schmerzen sind in ihrer Entität noch nicht gänzlich verstanden, jedoch liegen ihnen die zentrale Sensitivierung

mit Veränderung der zentralen Schmerzverarbeitung, wie beispielsweise verstärkter zentrale Schmerzwahrnehmung und veränderter sensorische Verarbeitung zu Grunde.^{11,15-17}

Nach der durch die IASP veröffentlichte Terminologie bedeutet Sensibilisierung eine erhöhte Empfindlichkeit der nozizeptiven Neurone auf ihre normalen Reize (Input) beziehungsweise eine Reizantwort auf Reize, die normalerweise unterhalb der Reizschwelle liegen. Dabei kann es auch zu einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes kommen.¹² Bei der zentralen Sensitivierung zeigt sich die erhöhte Reizantwort in den nozizeptiven Neuronen des zentralen Nervensystems. Eine normale Funktion der peripheren Neurone bleibt dabei bestehen.¹² Periphere Sensibilisierung bedeutet eine erhöhte Reizantwort und reduzierte Reizschwelle der peripheren nozizeptiven Neurone auf einen Stimulus in ihrem Leitungsfeld.¹²

Noziplastische Schmerzen sind mit starken psychischen Belastungen und einer Sensibilisierung auf Reizmodalitäten, wie Kälte, chemische Substanzen und Licht verbunden. Eine Schmerzausbreitung und Überempfindlichkeit außerhalb des ursprünglich gereiztem Dermatoms zeigen sich im muskuloskelettalem System.^{11,18} Die erhöhte Schmerzausweitung, die psychische Komponente und Sensibilisierung auf andere Reizmodalitäten, weisen beim noziplastischen Schmerz neben der zentralen Sensibilisierung auch auf eine supraspinale Sensibilisierung mit Prozessen im Mittelhirn und Hirnstamm hin.^{11,17}

Die zentrale Sensibilisierung auf spinaler Ebene steht bei neuropathischen und nozizeptiven Schmerzen stärker im Fokus.^{11,17}

2.3. Schmerzweiterleitung

Reizentstehung, Weiterleitung und Verarbeitung erfolgt über periphere und zentrale nozizeptive Neurone des somatosensorische Nervensystems.^{2,12} Das erste nozizeptive Neuron, auch Nozizeptor genannt, umfasst eine Untergruppe peripherer Nerven, die thermische, mechanische und chemische Stimuli detektieren und weiterleiten.¹⁹ Sie weisen eine erhöhte Reizschwelle auf und werden erst erregt, wenn der Stimulus einen noxischen Schwellenwert überschreitet.^{12,20} Ihre Zellkörper befinden sich in den dorsalen Spinalganglien, bzw. Trigeminalganglien und weisen sowohl einen peripheren axonalen Ast, mit dem viszerale und somatische Regionen innerviert werden, als auch einen zentralen axonalen Ast auf.^{2,20} Die rezeptiven Felder der peripheren Nervenenden sind verzweigt und können abhängig von Lokalisation und Nervenfasertyp Quadratmillimeter bis mehrere Quadratzentimeter umfassen.²¹ Über den zentralen Ast werden die nachgeschalteten nozizeptiven Neurone im Rückenmark innerviert, deren Zellkörper im Dorsalhorn des Rückenmarks und Hirnstamm liegen und deren afferente Fasern auf die Gegenseite kreuzen.^{2,20} Dieser aufsteigende Weg über den *Tractus spinothalamicus lateralis* führt zur Reizweiterleitung in supraspinale Hirnregionen.²² Vom Thalamus werden die Signale zur Weiterverarbeitung zur Amygdala und zu corticalen Regionen weitergeleitet.²¹ Dazu zählen unter anderem parietale und frontale

Cortexregionen, der *Lobus insularis* und der *Gyrus cinguli*.^{21,22} Die Schmerzübertragung kann über absteigende Signalwege beeinflusst werden, indem die Übertragung zwischen dem ersten und zweiten Neuron in dem Dorsalhorn im Rückenmark beeinflusst wird. Nozizeptive Signale können dadurch potenziert oder inhibiert werden.²³

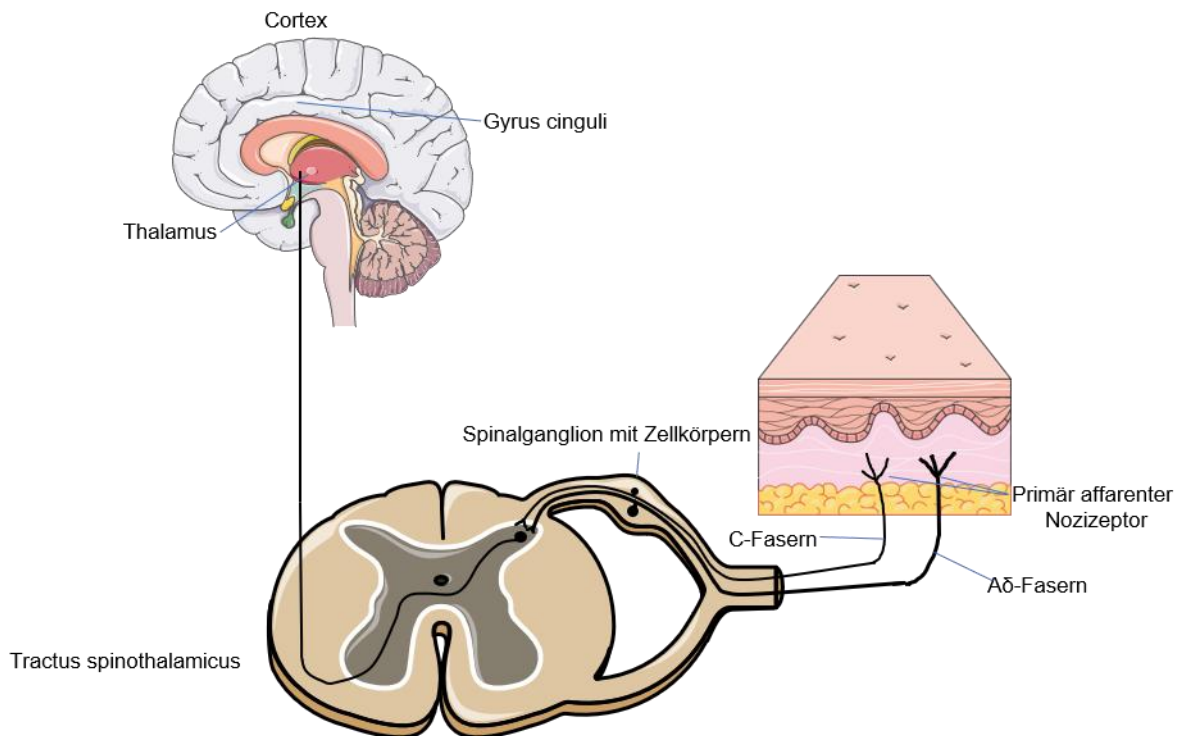


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des generellen Signalweges der Nozizeption

Freie Nervenenden nehmen Schmerz und Temperaturreize auf. Im Spinalganglion befinden sich die Zellkörper der Nozizeptoren. Die Umschaltung auf das nachgeschaltete Neuron erfolgt im Hinterhorn des Rückenmarks, es kommt zur Kreuzung auf Segmentebene auf die Gegenseite. Aufsteigen der Bahnen im Vorderseitenstrang zum Thalamus. Dort erfolgt die Umschaltung auf das dritte Neuron und Weiterleitung an weitere Hirnregionen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Abbildung C „Tractus spinothalamicus und seine zentrale Verbindung“ des Kapitels 9.5 Aufsteigende Bahnen: Tractus spinothalamici und Abbildung B „Periphere somatische Schmerzleitung (nach Lorke)“ des Kapitels 12.4 Sensorisches System: Schmerz aus Prometheus LernAtlas der Anatomie erstellt²⁴

2.4. Verschiedene Untergruppen nozizeptiver Neurone

Die für die Schmerzweiterleitung notwendigen Nozizeptoren können anhand ihrer unterschiedlichen Physiologie, Anatomie und Biochemie unterschieden werden. Es kann zwischen thermalen, mechanischen und chemischen Nozizeptoren unterschieden werden. Eine weitere Unterscheidung der Nozizeptoren erfolgt anhand der Geschwindigkeit der Schmerzweiterleitung, welche durch den Myelinisierungsgrad und den Faserdurchmesser bestimmt wird. Aδ-Fasern übertragen Schmerzen schnell mit einer Geschwindigkeit von 5-25 m/s. Sie sind myelinisiert und weisen einen mittleren Durchmesser (1-5 µm)²⁵ auf. Schmerzen, die durch Aδ-Fasern übertragen werden sind gut lokalisierbar und bewirken häufig ein Zurückziehen der betroffenen Körperregion. Sie sind somit Bestandteil der Reaktion auf

akute, „erste“ Schmerzen.^{20,21,26} Die A δ -Fasern können weiterhin in schnell und langsam übertragende A δ -Fasern unterschieden werden. Schnell übertragende A δ -Fasern von Typ I leiten scharfe, gut lokalisierbare Schmerzsignale an das zentrale Nervensystem weiter. Langsam übertragende A δ -Fasern von Typ II übertragen moderate Schmerzempfindungen, welche nicht so scharf oder direkt sind, wie die der schnell übertragenden A δ -Fasern. A δ -Fasern haben eine hohe Reizschwelle für mechanosensitive Reize.²¹ Typ I und Typ II A δ -Fasern reagieren auf Hitze unterschiedlich. Typ I reagiert auf Temperaturen ab 53 °C und Typ II auf Temperaturen ab 43 °C.^{27,28}

„Zweiter“ beziehungsweise langsamer Schmerz wird durch unmyelinisierte C-Fasern mit einer Geschwindigkeit von > 2 m/s übertragen. Ihre Zellkörper und Fasern sind kleiner im Durchmesser. Bei dem übertragenen Schmerz handelt es sich um schwer zu lokalisierende, diffusen Schmerz. C-Fasern sind in die Entstehung von Hyperalgesie und Allodynie involviert und spielen eine Rolle bei persistierenden und chronischen Schmerzzuständen.^{20,21,26} C-Fasern sind meist polymodal und reagieren sowohl auf noxische thermale, mechanische sowie chemische Stimuli. Einige C-Fasern sind mechanisch insensitiv, reagieren aber auf noxische Hitze.²⁸ „Leise“ Nozizeptoren stellen eine Untergruppe der C-Fasern dar. Sie liegen in der Haut, weisen einen kleinen Durchmesser auf und müssen zur Signalweiterleitung erst sensitiviert werden, beispielsweise wenn es zu einer Entzündung oder Verletzung des Gewebes kommt. Die Identifikation des Stimulus ist erschwert festzustellen.

Ein Marker für nozizeptive Neurone, der in vielen nozizeptiven Subgruppen vorkommt und der sowohl in C-, als auch in A δ -Fasern exprimiert wird, ist die β -Isoform der Proteinkinase A-II.²⁹ Größere Neurone mit Markern für Propriozeption wie Neurofilament 200 (NF200) exprimierten RII β nicht.²⁹ Biochemisch unterscheiden sich Nozizeptoren durch ihre Neurotransmitter, Rezeptoren, Ionenkanäle und Genexpression anhand derer Schmerzsignale an das zentrale Nervensystem weitergeleitet werden. Zu den Neurotransmittern zählen beispielsweise Substanz P, Glutamat und das *Calcitonin Gene-related Peptide* (CGRP). Zu den Ionen-Kanälen zählen unter anderem die Transienten-Rezeptor Potential Kanäle (TRP) und spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle. Verschiedene Subtypen der Nozizeptoren unterscheiden sich in der Ausprägung und Aktivität ihrer Ionenkanäle und der Ausprägung und dem Freisetzungsmuster ihrer Neurotransmitter, wodurch die unterschiedliche Schmerzwahrnehmung und Sensitivität beeinflusst werden.²⁶ Eine eindeutige Einteilung in verschiedene Klassen von Nozizeptoren ist schwierig, da es häufig zu einer Überlappung und Co-Expression von Ionenkanälen kommt und die jeweilige Reaktion auf inflammatorische Mediatoren, mit entweder direkter Aktivierung oder Sensitivierung variiert.²¹

Nozizeptoren werden in peptiderge und non-peptiderge Nozizeptoren unterteilt. Peptiderge Nozizeptoren setzen zusätzlich zu dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, der in

allen Nozizeptoren vorkommt, Neuropeptide wie Substanz P und *Calcitonin Gene-related Peptide* (CGRP) als Antwort auf noxische Stimuli frei. Die Freisetzung der Neuropeptide spielt eine Rolle in neurogener Entzündung und der Sensitivierung von Nozizeptoren. Eine dauerhafte Freisetzung der Neuropeptide trägt über persistierende Sensitivierung und neuroplastische Veränderungen zum Erhalt chronischer Schmerzzustände bei.^{28,30} Peptiderge Fasern exprimieren Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), einen Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (NGF).²¹ Non-peptiderge Nozizeptoren verwenden zur Transmission von Signalen die „klassischen“ Neurotransmitter Glutamat, Achetylcholin, Gamma Amino Butter Säure und Monoamine. Sie sind sowohl in der schnellen Signalantwort auf Gewebeschädigung, als auch in der Modulation der Schmerzwahrnehmung involviert.^{28,31} Sie weisen die Rezeptor Tyrosinkinase RET auf, die von Gliazellen stammende Neurotrophischen Faktor-Liganden (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands*) binden und exprimieren das α -D-galactosyl-bindende Lektin IB4. Non-peptiderge Nozizeptoren co-exprimieren den purinergen ligandengesteuerten Ionenkanal P2X3-Rezeptor.^{21,27,32} Verschiedene Nozizeptoren enden an unterschiedlichen Laminae des Hinterhorns des Rückenmarks. A δ -Nozizeptoren verschalten primär an Lamina I und geben einige Verschaltungen an Lamina V und X ab. Die peptidergen primären Afferenzen, die sowohl aus C- als auch aus A δ -Fasern bestehen, verschalten auf ein zweites Neuron in Lamina I und II. Nonpeptiderge C-Nozizeptoren enden in Lamina II.^{21,33} Studien an menschlichen Spinalganglien zeigten die Umschaltung von Nozizeptoren in Laminae I und II. Dabei zeigten sich in 33 % der Neurone eine Co-Expression des peptidergen Markers CGRP und des non-peptidergen Markers P2XR.^{21,34}

2.5. Sensitivierung und Schmerzen

Hyperalgesie ist der Ausdruck einer erhöhten Sensitivität auf Schmerzen. Dies kommt typischerweise in verletztem und entzündetem Gewebe vor. Es kann zwischen primärer Hyperalgesie bzw. peripherer Sensitivierung und sekundärer Hyperalgesie bzw. zentraler Sensitivierung unterschieden werden. Primäre Hyperalgesie tritt dabei an der Stelle der Verletzung auf und ist durch direkte Sensitivierung der Nozizeptoren bedingt. Sekundäre Hyperalgesie ist hingegen ein Prozess innerhalb des ZNS, bei dem Schmerzsignale durch Langzeitpotenzierung an der zentralen Synapse der Nozizeptoren und nachgeschalteten Neuronen im Dorsalhorn amplifiziert werden.²¹ Sowohl periphere als auch zentrale Sensitivierung spielen eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung.

2.5.1. Periphere Sensitivierung

Periphere Sensitivierung und somit primäre Hyperalgesie resultieren aus Vorgängen im verletzten oder entzündeten Gewebe, die zu einer erhöhten Reizempfindlichkeit und verminderten Reizschwelle der Nozizeptoren führen.^{21,35} Über die Freisetzung von Substanz P und CGRP als Reaktion auf Gewebsschädigung können Entzündung und Schmerz in der Peripherie verstärkt werden. Die Freisetzung von Substanz P, CGRP und Glutamat führt zu verstärkter Schmerzweiterleitung. Substanz P und CGRP führen weiterhin zu Vasodilatation und Plasmaextravasation im Bereich von Kapillaren und Arteriolen, sowie zu Freisetzung von inflammatorischen und nozizeptiven Mediatoren, wie Prostaglandinen, Bradykinin und Histamin durch benachbarte Zellen, welche die peripheren Nerven durch Aktivierung von Schmerz-modulierenden Rezeptoren sensitivieren. Die Freisetzung von Substanz P und CGRP wird durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom N- und L-Typ vermittelt. Durch erhöhte Sensitivität von Ionenkanälen, vor allem Natrium-Kanälen, kommt es zu erhöhter Erregbarkeit der peripheren Nervenzelle.^{21,36} Periphere Sensitivierung beeinflusst sowohl die Schmerzwahrnehmung von akuten, als auch von chronischen Schmerzen.^{21,35}

2.5.2. Zentrale Sensitivierung

Bei der zentralen Sensitivierung kommt es im Gegensatz zur peripheren Sensitivierung zu Veränderungen auf Rückenmarks- und Gehirnebene. Schmerzsignale aus der Peripherie werden aufgrund von erhöhter neuronaler Aktivität verstärkt und es können Hyperalgesie und Allodynie auftreten.²¹ Die verstärkte neuronale Funktion im ZNS entsteht dabei durch Änderungen in der Membranerregbarkeit, reduzierter Inhibition und veränderter Wirksamkeit bzw. veränderter Transmission an der Synapse.³⁷ Synaptischer Input, der vormals unterhalb der Reizschwelle lag, verursacht einen erhöhten Aktionspotential-Output. Schmerz kann dadurch unabhängig von noxischen Stimuli wahrgenommen werden und eigentlich harmlose Reize können Schmerzen hervorrufen.³⁷ Mechanistisch kommt es bei der zentralen Sensitivierung unter anderem zu vermehrter Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern an der Synapse, wie Glutamat.³⁸

Glutamat, ein an ionotropen Rezeptoren schnell wirkender Neurotransmitter der primären afferenten Neurone, bindet an Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks. Dabei bilden die primären afferenten Neurone Synapsen mit Interneuronen und Projektionsneuronen. Die Bindung von Glutamat an diese Rezeptoren führt zu Aktivität dieser Rezeptoren. Zu den Glutamat-bindenden Rezeptoren gehören NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure), Kainate-Rezeptorkanäle und metabotrope Glutamat-Rezeptor Subtypen.³⁷ Die Bindung an metabotropen Glutamat-Rezeptoren führt zur langsamen synaptischen Transmission, da noch weitere Schritte, wie

Second Messenger und Proteinkinasen und Proteinphosphatasen involviert sind. Neuropeptide, wie Substanz P, oder biogene Amine führen ebenfalls zur langsamen synaptischen Transmission³⁹ Die Phosphorylierung der NMDA- und AMPA-Rezeptoren führt zur erhöhter Aktivitätsdichte der Rezeptoren, postsynaptischer Übererregbarkeit und Verstärkung der nozizeptiven Übertragung. Periphere Entzündungsreaktionen und noxische Stimuli können die NMDA-Rezeptorfunktionalität durch Phosphorylierung verändern.³⁷ Andere Neurotransmitter, die zur zentralen Sensitivierung beitragen, sind Stickstoffmonoxid (NO), Bradykinin und BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Substanz P und CGRP tragen über temporäre Summation von langsamen synaptischen Potentialen zur kumulativen Membrandepolarisation bei.³⁷ Erhöhte synaptische Transmission und neuronale Erregbarkeit entstehen weiterhin durch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Calciumionen. Aktivierung metabotroper Glutamaterezeptoren und Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch Glutamat bewirkt einen Calciumeinstrom.^{37,38} Vermehrter Calcium-Influx veranlasst die Aktivierung verschiedener Signalwege, unter anderem die Phosphorylierung der Glutamaterezeptoren, was zur Potenzierung der synaptischen Übertragung führt.^{33,37} Der Calciumeinfluss durch NMDA-Rezeptoren trägt auch zur neuronalen Plastizität bei. Diese Vorgänge ähneln den neuronalen Vorgängen des Lernens und Gedächtnisses und können so zur Entstehung von chronischen Schmerzen beitragen.³³

Dysregulation von Ionenkanälen, wie beispielsweise Kaliumionenkanälen, führt zur Imbalance im Ionenfluss entlang der Nervenzellmembran. Es kommt zum vermehrten neuronalen „Firing“ und zentraler Sensitivierung. Auch die Hochfrequenz-Stimulation von C-Fasern in gesunden Menschen führte zu neuronalem „Firing“ und somit zur zentralen Sensitivierung^{33,37,38}

Diese nimmt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Hyperalgesie, Allodynie und in der Chronifizierung von Schmerzen ein, sie kann nach Abheilung der ursprünglichen Verletzung oder Entzündung bestehen bleiben.^{21,37,38}

2.6. Intrazelluläre Signaltransduktion in Nozizeptoren

Nozizeptoren reagieren auf eine Vielzahl verschiedener Stimuli, welche über Rezeptorsysteme zur Auslösung von Aktionspotentialen führen oder intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und somit die Erregbarkeit der Nozizeptoren modulieren. Diese Stimuli können entweder endogen vorkommen, wie beispielsweise die inflammatorischen Mediatoren Bradykinin und Prostaglandin E2, oder exogener Natur sein, wie mechanische Reize oder chemische Stimuli.^{21,40,41} Auch die somit ausgelöste neuronale Aktivität selbst aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, die nozizeptiven Neurone weiter sensitivieren.¹

2.6.1. Der *Second Messengers* cAMP induziert Hyperalgesie

Verschiedene Transmembranmoleküle sind an der Sensitivierung von Nozizeptoren und an der Aktivierung ihrer intrazellulären Signalkaskaden beteiligt. Zu diesen Transmembranmolekülen zählen Ionen-Kanäle, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Rezeptoren für Zytokine und Neurotrophine.⁴² Die Entstehung von Hyperalgesie kann durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst werden. Viele dieser endogenen Liganden, wie zum Beispiel Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostaglandin I₂ (PGI₂) binden an stimulatorische GPCRs und führen über Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels.^{43 42,44} GPCRs weisen sieben Transmembrandomänen auf, welche auf ihrer intrazellulären Seite ein G-Protein binden.⁴⁵ Die G-Proteine sind Heterotrimere aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Bei stimulatorischen G α_s -gekoppelten GPCRs führt die Rezeptoraktivierung zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Der aktivierte GPCR interagiert mit dem G-Protein. Es kommt zu einer Öffnung einer Bindungsstelle der G α_s -Untereinheit, welche im inaktiven Zustand GDP (Guanosindiphosphat) gebunden hat. Diese Interaktion führt zum Austausch von GDP zu GTP (Guanosintriphosphat). Die GTP-gebundene, aktivierte G α_s -Untereinheit dissoziiert von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten können mit weiteren *Downstream*-Effektoren interagieren.⁴⁶⁻⁴⁸ Die aktivierte G α_s -Untereinheit stimuliert die transmembranständige Adenylylcyclase, die cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) bildet.^{45,49,50} Der *Second Messenger* cAMP ist in der Entstehung von Hyperalgesie und Schmerzen involviert. *Taiwo et al.* zeigten, dass erhöhte intrazelluläre Level von cAMP die nozizeptive Reizschwelle für mechanische Hyperalgesie herabsetzt und dass inflammatorische Liganden, wie die Prostaglandine E₂ und I₂, über Aktivierung des cAMP-Messenger Systems Hyperalgesie verursachen.⁵¹ *Taiwo und Levine* konnten in weiteren Experimenten zeigen, dass erhöhte cAMP-Level durch Hemmung der cAMP-abbauenden Phosphodiesterase ^{49,51} zu mechanischer Hyperalgesie führt.^{44,45,52} Der Phosphodiesterase Inhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), der zur Akkumulation von cAMP führt wurde unter anderem dafür verwendet.⁵¹⁻⁵³ *Taiwo und Levine* konnten ebenfalls zeigen, dass das Rp-Isomer der cyclischen Adenosin-3'5'-Monophosphothioate (Rp-cAMPS), ein cAMP-Analogon, die durch cAMP hervorgerufene Hyperalgesie inhibieren konnte.⁵²

2.6.2. PKA Isoformen

Der wichtigste intrazelluläre Effektor von cAMP ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). PKA ist an der Prozessierung von nozizeptiven Reizen, persistierenden Schmerzen und der Schmerzsensitivierung beteiligt.⁵⁴⁻⁵⁶ Die Inhibierung der PKA führte in Tierexperimenten zu einem reduzierten Schmerzverhalten.⁵⁴ Bei der Proteinkinase handelt es sich um ein tetrameres Molekül, das aus zwei regulatorischen (R) und 2 katalytischen (C)

Untereinheiten besteht. Es gibt vier verschiedene regulatorische Untereinheiten (RI α , RI α , RI β , RI β) und vier verschiedene katalytische Untereinheiten (C α , C β , C γ , PrKX). Anhand der regulatorischen Untereinheiten werden die Isoformen der PKA in PKA-I und PKA-II unterteilt.⁵⁵ Die Bindung der katalytischen Untereinheit an die inhibitorischen Bindungsstellen der regulatorischen Untereinheit inaktiviert die PKA. Durch allosterische Bindung von cAMP an zwei „*cyclic-nucleotide binding domains*“ (CNBD) pro regulatorischer Untereinheit kommt es zur Aktivierung der PKA durch Freisetzung der katalytischen Untereinheiten.⁵⁷⁻⁵⁹

Ein entscheidender Unterschied zwischen PKA-I und PKA-II Isoformen besteht in der inhibitorischen Domäne der regulatorischen Untereinheiten. Während die RI-Untereinheiten die C-Untereinheiten durch ein nicht-phosphorylierbares Pseudosubstrat blockieren, haben die RII-Untereinheiten ein phosphorylierbares Serin in dieser Domäne, was sie zu Substraten der C-Untereinheiten macht. Obwohl die inhibitorische Domäne der RII-Untereinheiten schon in der inaktiven PKA-II phosphoryliert vorliegt, erhöht sich die Zugänglichkeit des Epitops nach cAMP-abhängiger Dissoziation des PKA-II Holoenzym.⁶⁰ Daher kann mittels Phosphospezifischer Antikörper gegen die inhibitorischen Domänen der RII-Untereinheiten die Aktivität (Dissoziation) der PKA-II analysiert werden.^{1,60,61}

2.6.3. Einfluss der PKA auf Ionenkanäle, Transmitterfreisetzung und Genexpression

PKA kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor und ist an der Regulation vieler biologischer Vorgänge beteiligt. Dazu zählen unter anderem Gedächtnis, Zelldifferenzierung, Proliferation und Metabolismus.⁵⁹ PKA ist auch auf vielfältige Weise in die Nozizeption involviert. Insbesondere die PKA-II kann durch inflammatorische Mediatoren cAMP-abhängig aktiviert werden.^{51,52,55} Sie ist sowohl an der Regulation der Sensitivität der Nozizeptoren als auch an der Freisetzung von Neurotransmittern, an intrazellulären Signalkaskaden und der Entstehung von Schmerzen beteiligt.^{1,54,62} Die aktivierte PKA-II phosphoryliert Ionenkanäle in nozizeptiven Neuronen, wodurch sich deren Öffnungswahrscheinlichkeit verändert. Zu diesen zählen unter anderem TRPV1, Na_v1.8, P2X3, spannungsabhängige Calciumkanäle und Kaliumkanäle. Die PKA-II ist auch essentiell an der verstärkten synaptischen Übertragung, der Lang-Zeit Potenzierung (LTP) und somit der zentralen Sensitivierung beteiligt. Die Aktivierung der PKA führt auch zu einer Aktivierung von nachgeschalteten Effektoren, wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP response-element-binding protein* (CREB). CREB wird phosphoryliert, was zu Expression von Genen führt, welche für die Langzeit-Sensitivierung benötigt werden.^{55,63,64}

2.6.4. MAP Kinasen und PKC

Neben der PKA und dem *Second Messenger* cAMP gibt es noch weitere Mediatoren, die an der Sensitivierung von Neuronen und an der Entstehung von Hyperalgesie beteiligt sind, dazu zählt unter anderem die Proteinkinase C (PKC). Diese ist in die periphere Sensitivierung von nozizeptiven Neuronen involviert.⁵² Die Aktivierung von PKC scheint vor allem thermische Hyperalgesie und mechanische Allodynie hervorzurufen. Dabei ist vor allem die Isoform ϵ der PKC an verschiedenen Schlüsselmechanismen beteiligt, die zur Sensitivierung von Neuronen führen.⁴⁰ Unter anderem beeinflusst die Aktivierung der PKC ϵ TRPV1-exprimierende peptiderge Nozizeptoren. Die PKC ϵ kann dabei durch Phorbol ester aktiviert werden.⁶⁵ Eine Behandlung dieser Neurone mit Phorbol ester senkt die Wärme-Schwelle der TRPV1 Kanäle und kann diese für die Stimulation mit Capsaicin sensitivieren.^{40,66-68} Die aktivierte PKC ϵ ist auch am Einbau von TRPV1 Kanälen in die Zellmembran von nozizeptiven Neuronen beteiligt.⁶⁹

Sowohl PKA, als auch PKC ϵ können einen weiteren Mediator, die *Extracellular signal-regulated Proteinkinase 1/2* (ERK1/2) aktivieren, der an der Entstehung von Hypersensitivität beteiligt ist. Die Aktivierung von ERK1/2 kann auch gänzlich ohne Einfluss von PKA und PKC ϵ erfolgen.^{64,70,71}

Die ERK1/2 zählt zu den Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die an der Sensitivierung nozizeptiver Neurone beteiligt sind. MAPKs sind Serin/Threonin Proteinkinasen. Sie aktivieren regulatorische Proteine und sind an der Transduktion von extrazellulären Signalen in das Zellinnere beteiligt. Die Aktivierung von ERK ist an der Entstehung von Hypersensitivität auf vor allem thermische und mechanische Stimuli beteiligt. Die ERK1/2 Kaskade kann durch noxische Stimuli, wie Bindung von inflammatorischen Mediatoren, oder NGF an Rezeptor Tyrosin Kinasen oder an GPCRs ausgelöst werden.⁷¹⁻⁷³ Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des G-Proteins Ras. Ras-GTP aktiviert wiederum die MAPK Kinase Kinase Raf. Diese phosphoryliert die MAPK/ERK Kinase (MEK) und aktiviert diese. MEK ist eine *Upstream*-Kinase von ERK1/2 und kann auch über Calciumeinstrom und Depolarisation aktiviert werden. MEK phosphoryliert ERK1/2, was die ERK1/2-Kaskade auslöst. Die aktivierte pERK1/2 wandert in den Zellkern und aktiviert über Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor CREB.⁷² Über das Auslösen und die Modulation von Genexpression trägt ERK zu langanhaltenden physiologischen Veränderungen, wie peripherer Sensibilisierung bei, was zu persistierender Hypersensitivität führt.^{71,74}

2.6.5. TRPV1 und TRPA1 aktivieren sensorische Neurone und verursachen Schmerzen

An der Entstehung von Schmerzen sind unterschiedliche Rezeptoren beteiligt. Die Transient Receptor Potential (TRP) Ionenkanäle sind zelluläre Detektoren für noxische Stimuli. TRP Ionenkanäle bilden eine Rezeptorenfamilie, die aus den sechs Unterfamilien *canonical/classical Transient Receptor Potential* (TRPC), *Transient Receptor Potential Vanilloid* (TRPV), *Transient Receptor Potential Melastin* (TRPM), *Transient Receptor Potential Ankyrin* (TRPA), *Transient Receptor Potential Polycystin* (TRPP) und *Transient Receptor Potential Mucolipin* (TRPML) besteht.^{75,76} TRP-Kanäle sind nicht selektive Kationenkanäle, die für Natrium- und Calcium-Ionen durchlässig sind.

Sie bestehen aus 6 Transmembrandomänen, die sich zu einem Tetramer anordnen. Zwischen den Transmembrandomänen befindet sich die Pore für Kationen.^{76,77} Sie sind polymodal und können über verschiedene Mechanismen aktiviert oder moduliert werden. Die direkte Aktivierung erfolgt über exogene und endogene Liganden sowie physikalische Stimuli wie Temperaturveränderungen oder mechanische Reize.⁷⁶ Zudem kann die Öffnungswahrscheinlichkeit beispielsweise durch posttranslationale Modifikation und Bindung verschiedener Lipide moduliert werden. Dabei spielt auch die Regulation durch GPCR-aktivierte Signaltransduktion eine wichtige Rolle. TRP-Kanäle sind unter anderem zelluläre Sensoren und sind an neuronalem Wachstum und Chemotaxis beteiligt.⁷⁶ Die TRP-Kanäle TRPV1 und TRPA1 werden in überlappenden Subgruppen von nozizeptiven Neuronen exprimiert und sind an der Transmission von Schmerzen in sensorischen Neuronen beteiligt.⁷⁸

2.6.6. TRPV1 wird durch Hitze und Capsaicin aktiviert

TRPV1 kommt insbesondere in einer Subgruppe von nozizeptiven Neuronen vor, die als peptiderge Neurone bezeichnet werden, da sie die Neuropeptide Substanz P und *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) exprimieren. Wie die meisten unmyelinisierten Nozizeptoren, haben sie eher kleinere Zellkörper im Spinalganglion.⁷⁹ TRPV1 wird durch Wärme über 43 °C aktiviert, wenn er nicht zuvor sensitiviert wurde. TRPV1 ist auch ein spezifischer Rezeptor für den exogenen Liganden Capsaicin, der vor allem in verschiedenen Arten der Gattung *Capsicum* (Paprika) vorkommt. Die Aktivierung von TRPV1 kann auch durch endogene Signalmoleküle, wie beispielsweise Anandamide und Eicosanoide erfolgen. TRPV1 trägt zu thermaler Hyperalgesie bei. Die Hitze-Reizschwelle wird durch inflammatorische Mediatoren, wie Bradykinin oder durch Phosphorylierung durch NGF herabgesetzt. In TRPV1 *Knock-out* Mäusen konnte die Wärme-Hyperalgesie herabgesetzt werden, was auf eine Beteiligung von TRPV1 bei thermaler Hyperalgesie nach Gewebsverletzung hinweist. Es kommt bei Entzündungsprozessen zu einer Hochregulation und vermehrten Aktivität des Rezeptors.

TRPV1 kann auch durch Protonen aktiviert werden. TRPV1 ist der einzige Hitze-Nozizeptor, nach dessen Aktivierung es zu Freisetzung von CGRP und Substanz P kommen kann. TRPV1 ist an der Entstehung von neuropathischen und Knochenkrebschmerzen beteiligt.⁸⁰

PKA und PKC können den Rezeptor-Kanal sensitivieren. Phosphorylierung an Serin116 des TRPV1 durch die PKA zeigte in Experimenten von *Bhave et al.* eine Verhinderung der Desensitivierung des TRPV1-Kanals. TRPV1 fungiert somit auch als Substrat der PKA. Das Zusammenspiel von PKA und TRPV1 kann somit einen Weg der Sensitivierung der Neurone und einen Entstehungsmechanismus für chronische Schmerzzustände erklären.⁸⁰ Experimente an Dorsalganglien von Ratten zeigten eine Phosphorylierung von Serin502 und Serin800 des TRPV1 durch die PKC. Als Folge dieser Phosphorylierung zeigte sich eine erhöhte Sensitivität auf Capsaicin, Anandamide und Hitze. Calcineurin führt zu Dephosphorylierung am TRPV1-Kanal und führt somit zur Desensitivierung des Kanals.⁸¹

Zur Inhibition von TRPV1 kommt es durch direkte Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an das C-Terminal des Kanals. Durch Aktivierung der Phospholipase C kommt es zur Hydrolyse von PIP₂ und zur Aufhebung der TRPV1-Inhibition. Dies kann ein Grund dafür sein, dass Rezeptor-aktivierte Phospholipase C-Aktivität den TRPV1-Kanal zu sensitivieren scheint.⁷⁶

Die Bindung von Capsaicin an TRPV1 führt nicht nur zu dessen Aktivierung, sondern kann den Kanal auch desensitivieren, wahrscheinlich durch eine Dephosphorylierung.^{80,82}

TRPV1 ist nicht der einzige *Transiente Receptor Potential* Kanal, der Wärmestimuli detektiert. TRPV2, TRPV3 und TRPV4 sind ebenfalls daran beteiligt.⁸³

Weiterhin kommt TRPV1 nicht nur in peripheren nozizeptiven Neuronen vor. Der non-selektive Ionenkanal ist auch Sensor für die Körpertemperatur und ist an hippocampaler Plastizität beteiligt.^{78,84}

2.6.7. TRPA1 wird durch AITC aktiviert

Ein weiterer für Schmerz relevanter TRP-Kanal ist TRPA1. Dieser unterscheidet sich von anderen TRP-Kanälen durch 14 Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus.⁷⁶ TRPA1 ist an der Detektion von Kälte und Hitze beteiligt.^{83,85,86} TRPA1 ist moderat spezifisch reagibel auf Allylisothiocyanat (AITC), welches im Senföl enthalten ist. Obwohl TRPM8 ist der hauptsächliche Sensor für Kälte-detektion ist, scheint TRPA1 in Mäusen zur Kälte-Hypersensitivität bei 10 °C beizutragen.^{83,85,86} In Mausexperimenten war TRPA1 an der Aceton-induzierten Hyperalgesie und dem Zurückziehen der Pfote von einer 0°C kalten Platte beteiligt.^{83,85} Beim Menschen ist TRPA1 jedoch nicht an der Kältesensibilisierung beteiligt.⁸⁷ TRPA1 ist auch an der Detektion von noxischer, akuter Hitze beteiligt. So zeigten dreifach *Knock-out* Mäuse für TRPA1, TRPV1 und TRM3 eine deutlich herabgesetzte Sensitivität auf

Hitzereize im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, oder *Knock-out* Mäusen bei denen nur zwei der TRP-Kanäle ausgeschaltet wurden.⁸⁶ TRPA1-*Knock-out* Mäuse zeigten eine erhöhte Reizschwelle für punktuelle mechanische Stimuli und reduzierte inflammatorische Hyperalgesie. TRPA1 ist ein Sensor für elektrophile noxische irritierende Stimuli. TRPA1 wird durch inflammatorische Mediatoren sensitiviert. AITC kann eine Untergruppe von TRPV1 Neuronen aktivieren. Eine Co-Expression TRPV1 mit TRPA1 in diesen Neuronen konnte gezeigt werden. TRPA1 kann durch intrazelluläre Calciumfreisetzung aktiviert werden.^{83,85} Die intrazelluläre Calciumfreisetzung ist Folge der Aktivierung von muscarinergen Rezeptoren, die über Phospholipase C-Aktivierung die intrazellulären Calciumspeicher freisetzt. Muscarinerge Rezeptoren können somit TRPA1 ebenfalls aktivieren.⁸⁸ Dabei bindet das intrazelluläre Calcium an den TRPA1-Kanal und sensitiviert ihn für Aktivierung. Nach initialer Sensitivierung des Rezeptors führt Calcium auch zu einer Desensitivierung des TRPA1.⁸²

TRPA1 wird durch reversible kovalente Veränderung der reaktiven Cysteine in der N-Terminal Region des Kanals aktiviert.^{89,90} Die kovalente Bindung der Elektrophilen an Cystein C621 ist dabei essentiell für die Konformationsänderung von TRPA1 und dessen Aktivierung. Eine darauffolgende Modifikation von C665 durch elektrophile Bindung scheint ebenfalls an der TRPA1 Aktivierung beteiligt zu sein. Die zuvor entstandene Konformationsänderung wird stabilisiert und die Calciumpermeabilität wird erhöht.⁸⁸ Die kovalenten Modifikationen an den Cysteinen konnten in Experimenten durch Zugabe von Menthol revertiert werden.⁸⁹ TRPA1 ist ähnlich wie TRPV1 an der inflammatorischen und wahrscheinlich auch neuropathischen Schmerzentstehung beteiligt.⁷⁸

2.6.8. Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle spielen eine wichtige Rolle in der Transduktion von Aktionspotentialen in intrazelluläre Calciumsignale, die weitere physiologische Prozesse, wie beispielsweise Genexpression oder Neurotransmitterfreisetzung, initiieren können. Sie bestehen aus α_1 -, α_2 -, β -, γ - und δ -Untereinheiten. Sie werden anhand der α_1 -Untereinheiten, die aus 4 Transmembrandomänen besteht zwischen denen sich die Pore für den Calciumeintritt befindet, unterschieden.

Calmodulin (CaM) kann an das intrazelluläre C-Ende der α_1 -Untereinheit binden und Calciumabhängig den Kanal inaktivieren. Der L-Typ-Kanal $\text{Ca}_v1.2$ kommt in neuronalen Zellkörpern und Dendriten vor und kann Proteinkinasen im *Downstream* aktivieren. Über Gentranskription kann somit die synaptische Plastizität im Hippocampus und Cortex verändert werden.⁹¹ Vor allem der $\text{Ca}_v1.2$ Kanal kann über Phosphorylierung an Serin 1928 am C-Terminus der α -Untereinheit oder auch an der β -Hilfsuntereinheit reguliert werden. Diese Phosphorylierung erfolgt durch die PKA. Zuerst wurde dies in Cardiomyozyten nachgewiesen.⁹²⁻⁹⁴ Dort führte die

Phosphorylierung durch die PKA zur Öffnung der Kanäle auch bei kleineren Depolarisationsströmen.⁹⁵ Der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal ist wesentlicher Bestandteil an der durch Depolarisation hervorgerufenen Sensibilisierung von nozizeptiven Neuronen.¹ Calcium Influx durch $\text{Ca}_v1.2$ führt zur Aktivierung der PKA-II. Die PKA-II phosphoryliert den $\text{Ca}_v1.2$ an Serin1928 und führt zur vermehrten Öffnung des spannungsabhängigen Calciumkanals. In *in vivo* Experimenten zeigten die $\text{Ca}_v1.2$ involvierenden Signalwege eine Beteiligung an mechanischer Hyperalgesie.¹

N- und L-Typ Calciumkanäle beeinflussen die Freisetzung von Neuropeptiden. Durch Inhibition dieser Kanäle kann es zu verminderter Schmerzwahrnehmung kommen.²¹

2.6.9. Depolarisation aktiviert die PKA-II unabhängig von cAMP und induziert mechanische Hyperalgesie

Nicht nur Liganden-abhängige Vorgänge haben einen Einfluss auf Neurone und die Entstehung von Hyperalgesie. Der Arbeitsgruppe Hucho konnten zeigen, dass auch elektrische Aktivität in nozizeptiven Neuronen die PKA-II aktivieren kann.¹ Depolarisation mit KCl führt in Neuronen mit kleinerem Durchmesser zu einer Aktivierung der PKA-II. Durch Blockade verschiedener Ionen-Kanäle in nozizeptiven Neuronen, bzw. durch Experimente mit Nozizeptoren von *Knock-Out* Mäusen, konnte die Beteiligung von $\text{Ca}_v1.2$ nachgewiesen werden. Dabei wird für die Depolarisation-induzierte PKA-II Aktivierung Calciumeinstrom durch Ca_v1 Nanodomänen benötigt. Intrazelluläres Calcium und Calciumeinstrom durch Ionomycin-induzierte Poren an entfernten Stellen führen jedoch nicht zur Aktivierung von PKA-II. Die Aktivierung der PKA-II ist dabei unabhängig von cAMP. Blockade von Calcium-abhängigen Adenylylcyclasen mit Inhibitoren oder die Blockade der Adenylylcyclase über Aktivierung der Opiatrezeptoren führte zu keiner Änderung der PKA-II Aktivität. Auch zeigten erhöhte intrazelluläre cAMP-Level durch Hemmung der cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) oder das kompetitive, inaktive cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB keine signifikante Änderung der Depolarisation-induzierten PKA-II Aktivität. In In-vivo-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Depolarisation zu mechanischer Hyperalgesie führt.¹ Die Depolarisation-induzierte PKA-II Aktivierung ist ein möglicher Mechanismus um opiatresistente Schmerzzustände zu erklären. Es eröffnet die Frage, ob auch andere Wege der PKA-II Aktivierung unabhängig von cAMP und somit unresponsiv auf Opioide und Opiate sind.

2.7. Fragestellung und Ziel der Arbeit

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Depolarisation peripherer Nozizeptoren mittels KCl oder Toxinen, die spannungsabhängige Natriumkanäle in offenem Zustand arretieren, zu langanhaltender mechanischer Hyperalgesie führt. In Abhängigkeit vom spannungsabhängigen Calciumkanal $\text{Ca}_v1.2$, führt diese Art der Depolarisation zu Calciumeinstrom und zur Aktivierung der PKA-II, die durch Phosphorylierung von $\text{Ca}_v1.2$ den Calciumeinstrom weiter steigert. Im Gegensatz zum klassischen cAMP-abhängigen Aktivierungsmechanismus, ist die Aktivierung von PKA-II nach Depolarisation jedoch cAMP-unabhängig und kann somit nicht durch Opioide inhibiert werden.¹ Dies könnte einen möglichen Mechanismus für das Auftreten von Opioid-resistenten Schmerzen darstellen.

Auch durch Aktivierung von TRP-Kanälen wie TRPA1 und TRPV1 strömt Calcium in nozizeptive Neurone ein, was das Empfinden von Schmerzen *in vivo* auslöst.^{96-100,101} In bisher nicht veröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe konnte eine partielle Aktivierung der PKA-II durch Agonisten von TRPA1 und TRPV1 gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob die durch TRPA1 und TRPV1 verursachte Aktivierung der PKA-II ebenfalls cAMP-unabhängig ist und daher nicht durch Opioide inhibiert werden kann. Zur Untersuchung des zellulären Mechanismus der cAMP-Abhängigkeit wurden Übernachtskulturen der dissoziierten primär sensorischen Neurone der Ratte mit dem Phosphodiesterasehemmer 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dem inaktiven cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB, oder dem Opioid Fentanyl für 30 Minuten inkubiert und anschließend in einer 2-Stunden-Kinetik mit den TRPA1-Agonisten Allylthiocyanat (AITC), dem TRPV1-Agonisten Capsaicin, der Positivkontrolle KCl und dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle stimuliert. Bei cAMP-Abhängigkeit der PKA-II Aktivierung würde bei Vorinkubation mit IBMX, welches über die Hemmung der Phosphodiesterase die cAMP-Konzentration in den Zellen erhöht, eine vermehrte und verlängerte PKA-II Aktivität erwartet werden. Bei Vorinkubation mit dem inaktiven cAMP-Analogon würde eine verminderte PKA-II Aktivität erwartet werden, da Rp-Isomere von cAMP den inaktiven Zustand von PKA stabilisieren.¹⁰²⁻¹⁰⁶ Eine verminderte PKA-II Aktivität würde ebenfalls bei der Vorinkubation mit Fentanyl erwartet werden, da Fentanyl inhibitorische Opioidrezeptoren aktiviert, welche die Adenylylcyclase hemmen und somit zu verminderter Synthese von cAMP führen.

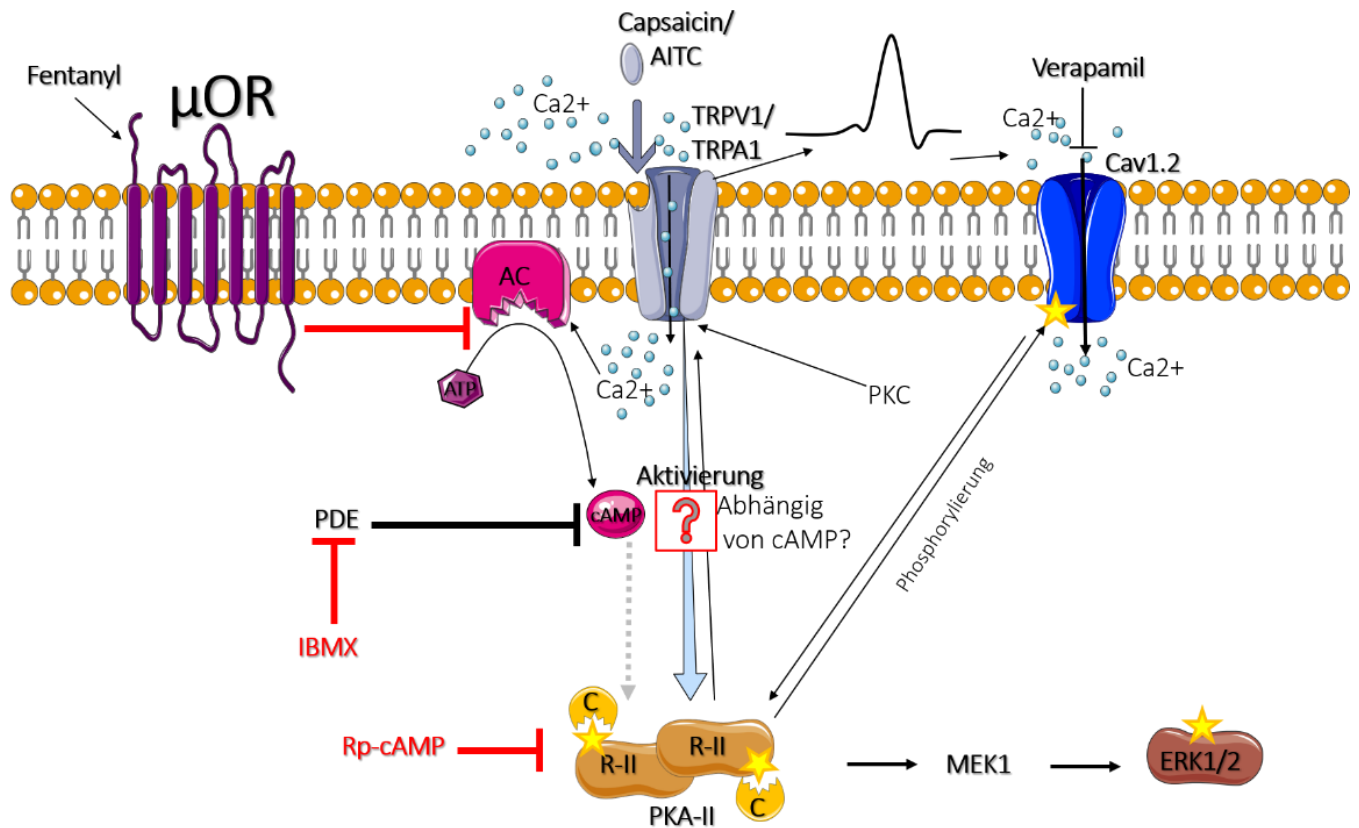


Abbildung 2: Arbeitshypothese

Es soll getestet werden, ob die TRPV1- bzw. TRPA1-induzierte PKA-II Aktivierung abhängig von cAMP und responsiv auf Opioiden ist. In rot dargestellt sind die geplanten Beeinflussungen der cAMP-Abhängigkeit, bzw. der Opioidresponsivität. AC: Adenylcyclase, μ OR: μ Opioid-Rezeptor, PDE: Phosphodiesterase, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches Adenosin Monophosphat, IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthine, ERK1/2: Extracellular-signal regulated kinases 1/2, Ca^{2+} : Calciumionen, PKA-II: Proteinkinase II, RII: Regulatorische Untereinheit II der PKA, C: Katalytische Untereinheit der PKA, PKC: Proteinkinase C, AITC: Allylthiocyanat, MEK1: MAP/ERK-Kinase, TRPA1: Transient Receptor Potential Ankyrin 1, TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloid 1

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: verwendete chirurgische Instrumente

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Friedman Rongeur	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	16000-14
Dumont #7 Inox Pinzette, gebogen	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	11272-40
Dumont #5 Pinzette, gerade	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	11251-10
Gewebepinzette-2x3 Zähne	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	11022-14
Littauer Knochen Schere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	16152-11
Vannas Federschere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	91500-09
Fine Schere große Öffnung	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	14040-10
Skalpelhalter #3G S/S	Swann-Morton Ltd., Sheffield, United Kingdom	0933
Skalpellklingen #10	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	10010-00
Studenten chirurgische Schere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	91401-14
Kleintierguillotine	Ugo Basile srl, Gemonio, Italien	7950

Tabelle 2: verwendete (elektronische) Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller	Katalognummer
Zentrifuge, Tischmodelle belüftet/gekühlt	Mega Star 1.6 R	Avantor™ delivered by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	#521-2660P
4-Fach Ausschwingrotor	TX-500	Thermo Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA	-
Sicherheitswerkbank Klasse II	Safe 2020 1.8 Microbiological Safety Cabinet Class II	Thermo Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA	51026934
CO ₂ Brutschrank	Thermo Scientific Heracell 150i	Thermo Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA	35776
Wirbelmischer	Vortex Genie™ 2	Scientific Industries SI™	SI-0256

Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	Avantor™ delivers by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	05533
Einkanalpipette, mechanisch, variables Volumen	Ergonomic High Performance 0.2 -2 µl	Avantor™ delivered by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	613-5258
Einkanalpipette, mechanisch, variables Volumen	Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High- Performance, 100- 1000 µl	Avantor™ delivered by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5265
Einkanalpipette, mechanisch, variables Volumen	Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High- Performance, 20-200 µl	Avantor™ delivered by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5263
Einkanalpipette, mechanisch, variables Volumen	Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High- Performance, 2-20 µl	Avantor™ delivered by VWR™ Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5260
pH-Meter	pHenomenal™ pH 1000 L	VWR International bvba Researchpark Haasrode 2020 Geldenaaksebaan 464 B-3001 Leuven	662-1422
pH-Elektrode mit Temperatursensor	Phenomenal ® 221, mit Temperatursensor	avantor™ delivers by vwr™ Radnor, Pennsylvania, USA	662-1161
LED Illuminator for Fura-2 ratiometric calcium imaging	CoolLED pE-340 fura 340 nm and 380 nm	CoolLED Headquarters CoolLED Ltd. 26 Focus Way Andover SP10 5NY Hampshire United Kingdom	pE-340-FR-D- YYY-ZZ s/n AZ1293
Mikroskopständer	LEICA CTR6000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Ernst-Leitz-Strasse 17-37 Wetzlar, 35578 Deutschland	11888821
Bunsenbrenner	Sicherheitsbunsen- brenner, Fireboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz	144 000
Euthanasie-Kammer	CO ₂ Euthanasie System für Ratten und Mäuse, CO ₂ - Euthanasie-Deckel für Käfigtypen II, II long und III	BioMedical Instruments, Zöllnitz, Deutschland	CO2B-2

Voll automatisiertes, inverses Forschungsmikroskop für die Biomedizin	Leica DMI6000 B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Ernst-Leitz-Strasse 17-37 Wetzlar, 35578 Deutschland	11888941
Objektiv	Plan NeoFluar™ System Standard Olympus™ Objektiv (10x, 0,30 NA)	Olympus Corporation, Tokio, Japan	420340-9901-000
Objektiv	HC PL FLUOTAR L 20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Ernst-Leitz-Strasse 17-37 Wetzlar, 35578 Deutschland	11506243
Kamera	Photometrics X1 CCD, 14-Bit Kamera	Teledyne Photometrics, Tucson, Arizona, USA	
Hoch-Durchlauf-Mikroskop (High Content Screening-Mikroskop)	CellInsight CX7 LZR Plattform (High Content Screening-Mikroskop)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#CX7A1110LZR
Mikroskop	Stereomikroskop SMZ-171	Motic, Kowloon Bay, Hongkong	46455
Pipettierhelfer	Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland	#26300
Wasserbad	Wasserbad 12l 230V EU+UK plug	VWR Grant Instruments Ltd. Cambridge UK	462-0557
8-Kanal Pipette, 5-100 µl	Eppendorf Eppendorf Xplorer®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	#4861000120
Mikrotiterplattenumsetzer	Orbitor RS2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#ORB2002
Pipettierhelfer	Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland	#26300

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Kat.-Nr.
70 %-iges Ethanol	Fischar, Saarbrücken, Deutschland	#225183
96-Kammer Platte	Greiner, Kremsmünster, Österreich	#655896
Aluminiumfolie	Corning, Corning, USA	#6569

Falcon® Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Corning, Corning, USA	#352096
Falcon® Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Corning, Corning, USA	#352070
Kleinumige feuer-polierte, silikonbeschichtete Pasteurpipette	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	#747720
Normallumige feuer- polierte, silikonbeschichtete Pasteurpipette	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	#747720
Petrischale, 4 cm Durchmesser	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#TPPA93040
V-förmige Mikrotestplatten	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland	#10-111-000

3.1.2. Nährmedien, Reagenzien, Zusätze

Tabelle 4: Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Hersteller	Kat.-Nr.
Neurobasal-A Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#12349-015
Minimal Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#42360-024

Tabelle 5: in den Nährmedien verwendete Zusätze

Zusatz	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
B-27 Supplement	1:50 (400 µL/20 ml NB)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	

L-Glutamin	1:400 (50 µl/20 ml NB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	#G6392
L-Glutamat	1:270.3 (74 µl/20 ml NB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	#G8415
Penicillin/Streptomycin	1:100 (200 µl/ 20ml NB)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	# 15140122

Tabelle 6: Reagenzien zur Zellkultur und Immunocytochemie

Bezeichnung	Herstellung/Endkonzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
Bovines Serumalbumin (BSA) , 30 %	12 g BSA in 40 ml Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#A9418
Bovines Serumalbumin (BSA), 1 %	10 g BSA in 1000 ml DPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#A9418
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#D8537-500 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth GmbH. & Co KG, Karlsruhe, Deutschland	4720.4
Kollagenase P, 250 U/ml	10 U/ml	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz	#11213873001
Laminin	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#23017-015
Normales Ziegen Serum (NGS)	-	Dianova, Hamburg, Deutschland	#005-000-121

Normales Ziegenserum Blockierungslösung (NGBS)	2 % normales Ziegenserum (NGS), 1 % BSA, 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween 20 in DPBS)		
Paraformaldehyd (PFA), 8 %-ig	80 g PFA wurden in 1 L DPBS aufgelöst und bis 80 °C erhitzt	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	#104005
Poly-L-Ornithin	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#P2533
Triton X-100	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#T9284-100ml
Tween 20	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#P9416
Zellkulturwasser	-	Lonza, Basel, Schweiz	#BE17-724F

Tabelle 7: Für Calcium Imaging verwendete Salzlösung

Bezeichnung	Menge	Finale Konzentration	Hersteller	Cat.-Nummer
HEPES	2.38 g	10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	H0887-100ML
Natriumchlorid (NaCl)	8.18 g	140 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Kaliumchlorid (KCl)	372.75 mg	5 mM	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1.04936.1000
Calciumchlorid (CaCl ₂)	221.98 mg	2 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	CN93.1
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	95.22 mg	1 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	kk36.2
D-Glucose	1.8 g	10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	G6152
Zellkulturwasser (ddH ₂ O)	Bis zu 1000 ml		Lonza, Basel, Schweiz	#BE17-724F

Tabelle 8: verwendete Zusätze/Reagenzien für das Calcium Imaging

Zusatz	Stammlösung	Konzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
Fetales Bovines Serum	2 %		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	S0615
Cytosin β -D-Arabinofuranoside hydrochloride (AraC)	20 mM (9.5 mg in 1780 μ l dH ₂ O)	2 μ M (1:10000 in Medium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	C6645-100MG
Nerven-Wachstums-Faktor (NGF), Maus	1.92 μ M (50 μ g/ml in 0.1%BSA/H ₂ O)	1 nM	Alomone Labs, Jerusalem BioPark, Israel	#N-240

Tabelle 9: verwendeter Farbstoff für das Calcium Imaging

Name	Stammlösung	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
Calbryte 630 AM	2.5 mM (in DMSO gelöst)	5 μ M (1:500 Endkonzentration in Medium oder Puffer)	Biomol GmbH - Life Science Shop, Hamburg, Deutschland	#20720

3.1.3. Prästimulantien

Tabelle 10: Zur mechanistischen Analyse verwendete Prästimulation

Substanz	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	100 mM (10 mg in 449.9 μ l DMSO)	100 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	I7018
Fentanyl Citrat	10 mM (1.4 mg in 265 μ l dH ₂ O)	10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	F3886
Rp-cAMPS-pAB (adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxybenzyl ester)	10 mM (1 μ mol in 100 μ l DMSO)	10 μ M	Biolog Life Science Institute GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland	A218-01

3.1.4. Rezeptoragonisten

Tabelle 11: Verwendete Rezeptorstimulantien

Stimulanz	Stimulierter Rezeptor/Kanal	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Hersteller	Kat.Nr.
Capsaicin	TRPV-1	10 mM (1 mg in 327.5 µl DMSO)	1 µM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	#M2028
Serotonin	5HT4-GPCR	100 mM (10 mg in 254.1 µl DMSO)	1 µM	Calbiochem, San Diego, Californien, Vereinigte Staaten	#508120
Allylisothiocyanat (AITC)	TRPA-1	10 M stock	5 mM, 10 mM, 125 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	377430-5G
PF4840154	TRPA-1	10 mM	0,008 µM, 0,04 µM, 0,2 µM, 1 µM, 5 µM, 25 µM, 125 µM	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, Vereinigte Staaten	28915
Kaliumchlorid (KCl)	-	3 M	40 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#104936

3.1.5. Primäre Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Epitop	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
ch-PGP	Huhn	UCHL1/ anti-PGP 9.5	Polyklonal	1:2000	Novus, Cambridge, UK	#NB110-58872
mo-PERK	Maus	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), Thr202/Tyr204 (E10)	Monoklonal	1:250	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	#9106L

ra-pRII	Kaninchen	Pospho RIIa (S99), clone 151	Monoklonal	1:1000	Abcam, Cambridge, UK	#ab32390
---------	-----------	------------------------------------	------------	--------	-------------------------	----------

3.1.6. Sekundäre Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Epitop	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
gt-A467-ms Alexa Fluor Plus 647	Ziege	Maus IgG (H+L)	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32728
gt-A488-ch Alexa Plus 488	Ziege	Huhn IgY	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32931
gt-A555-rb Alexa plus 555	Ziege	Kaninchen IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32732
Hoechst 34580	-	-	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#63493

3.1.7. Software

Tabelle 14: Verwendete Software

Programm	Version	Hersteller
R	4.2.0/ 4.1.1	The R Foundation (Team, 2018) ©
Cellomics, HCS Studio Cell Analysis Software	6.6.1 (Build 8468)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Graphpad Prism 6	6	GraphPad Software, San Diego, California, USA
Inkscape	1.0.2	Inkscape-Projekt
Image J	1.53o	Wayne Rasband, National Institute of Health, Maryland, USA
Leica Application Suite X.Ink Life Science	MC-0000071_2019.01.30 Installiert 01.09.2021	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica LAS X Hardware Configurator. Ink	Installiert 01.09.2021	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland

3.1.8. Websites

Zur Erstellung der Abbildung 1, 2, 3 wurden kostenlos Bilder von Les Laboratoires Servier auf www.smart.servier.com zur Verfügung gestellt. Der Zugriff erfolgte am 21. September 2021, 28.08.2024 und 10.09.2024.

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Männliche und weibliche Sprague-Dawley Ratten (Envigo, USA) im Alter zwischen 8 und 12 Wochen wurden für die Versuche verwendet. Die Tiere wurden in einer temperatur- und luftfeuchtigkeitskontrollierten Tierhaltungseinrichtung der Uniklinik Köln bei einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Nahrung und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Haltung, Verwendung und Tötung der Tiere erfolgte nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) insb §4 TierSchG und der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV). Die „Organentnahme nach Tötung“ wurden beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) angezeigt und dort unter der Genehmigungsnummer 84-02.05.20.13.045 geführt. Die Tiere wurden zwischen 9 und 12 Uhr morgens getötet. Die Experimente wurden unter Beachtung der 3R Richtlinie („Refine“, „Reduce“, „Replace“) durchgeführt. Es bestand zu jeder Zeit das Bestreben, die Anzahl der Tiere zu minimieren.

3.2.2. Isolation der dorsalen Spinalganglien

Zur Isolation der Spinalganglien wurden sowohl männliche als auch weibliche Sprague-Dawley Ratten in einer CO₂-Kammer durch langsame Kohlenstoffdioxid-Inhalation narkotisiert und getötet. Nach Überprüfung des Todes wurde die Ratte enthauptet und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Damit bei der anschließenden Präparation eine bessere Übersicht gewährleistet werden konnte, wurde die Ratte kopfüber gehalten und durch wiederholte Druckausübung auf den Thorax zum Ausbluten gebracht. Die Haut wurde durch einen Längsschnitt am Rücken eröffnet und von dem darunterliegenden Gewebe abpräpariert. Es erfolgte die Entfernung der Faszien über der Wirbelsäule. Dazu wurde ein Friedman-Rongeur verwendet. Danach erfolgte beidseits je ein paravertebraler Einschnitt in die Muskulatur. Anschließend wurde der Spinalkanal mit Hilfe einer Knochenschere durch V-förmiges Durchtrennen der Arcus Vertebrae eröffnet und das Rückenmark mit einer gebogenen Pinzette und einer Federschere entfernt. Unter dem Mikroskop wurden die Spinalganglien identifiziert und bilateral mittels einer gebogener Pinzette und einer Federschere herauspräpariert.

Die dorsalen Spinalganglien aus den cervicalen, thorakalen und lumbalen Wirbelsäulenabschnitten jeweils einer Seite wurden in einer 2,5 ml Petrischale mit *Minimal Essential Medium* (MEM) gesammelt und unter dem Mikroskop wurde das umhüllende Bindegewebe soweit möglich abpräpariert (*desheathing*). Die präparierten dorsalen Spinalganglien (DRGs) wurden dann in zwei Petrischalen mit je 2,5 ml Neurobasal-Medium (NB-Medium) überführt. Neurobasalmedium wird aus Neurobasal-A-Medium (30 ml, pur), B-27 Supplement (600 µl, 1:50), L-Glutamin (75 µl, 1:400 gelöst in Zellkulturwasser, Endkonzentration: 200 mM), L-Glutamat (111 µl, 1:270,3 gelöst in Zellkulturwasser, Endkonzentration: 1 mg/ml) und Penicillin/Streptomycin (300 µl, 1:100) hergestellt.

3.2.3. Zellkultur nozizeptiver Neurone aus dorsalen Spinalganglien

Pro Petrischale wurden 100 µl Kollagenase P (f.c. = 10 U/ml) hinzugefügt und die Petrischalen wurden für eine Stunde bei 37 °C in einer humidifizierten Atmosphäre bei 5 % CO₂ inkubiert. Um die Dissoziation der Spinalganglien zu erreichen, wurden sie mit feuerpolierten und silikonbeschichteten Pasteur-Pipetten tritiert. Dazu wurden die Spinalganglien aus je einer der Petrischalen zusammen mit den 2,5 ml Neurobasal-Medium mit einer feuerpolierten, silikonbeschichteten Pasteurpipette mit weiter Öffnung in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben, welches bereits 2,5 ml Neurobasal-Medium beinhaltete. Wenn die Spinalganglien zu Boden gesunken waren, wurden sie mit der Hälfte des NB-Mediums (2,5 ml) in ein zweites 15 ml Falcon Röhrchen gegeben und zehnmal auf- und abpipettiert.

Der Überstand wurde nach Absinken der nicht dissoziierten Spinalganglien in ein drittes 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Aus dem ersten Falcon Röhrchen wurde das übrige Medium mit einer kleinlumigen, silikonbeschichteten, feuerpolierten Pipette zu den nicht-dissoziierten Spinalganglien in das zweite Falcon Röhrchen überführt und mit der gleichen Pipette 10-mal auf- und abpipettiert. Nach erneutem Absetzen wurde der Inhalt des zweiten Röhrchens mit der kleinlumigen Pipette in das dritte Falcon Röhrchen überführt und zum zweiten Mal mit der kleinlumigen Pasteur-Pipette 10-mal auf- und abpipettiert, um eine vollständige Dissoziation der Spinalganglien zu erreichen. Die Überstände (*Supernatants*), welche die dissoziierten Spinalganglien enthielten, wurden alle im dritten Falcon Röhrchen zusammengeführt.

Eine 14 % Bovine Serumalbumin (BSA) Gradient Zentrifugation für 8 Minuten bei 120 g und 23 °C wurde durchgeführt, um Axonstumpfe und sonstige Zelltrümmer zu entfernen. Dafür wurde ein 4-Fach Ausschwingrotor des Modells TX-500 (Thermo Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Zum Erreichen des 14 %igen BSA-Gradienten wurden 750 µl eines 30% Bovinen Serum Albumins (Sigma) mit 850 µl des zuvor angesetzten Neurobasal-Mediums vorsichtig in einem 15 ml Falcon Röhrchens vermischt. Auf diesen Gradienten wurden je die Zellsuspension vorsichtig aufgetragen. Dadurch befanden sich in

jedem Falcon Röhrchen zwei Schichten mit unterschiedlichen Dichten. Pro Petrischale entstanden je zwei 14 %ige BSA-Gradienten.

Nach Zentrifugation wurden die Zelltrümmer, die sich zwischen den Schichten befanden, und das überschüssiges BSA der oberen Schicht mit der großlumigen Pasteurpipette entfernt. Die Neurone, welche sich in 50-100 µl des Mediums als Pellet am Grund des Röhrchens abgesetzt hatten, wurden mit zunächst in 1 ml angereichertem Neurobasal-Medium resuspendiert und schließlich mit 6 ml angereichertem Medium aufgefüllt, um 64 Wells von einer 96 Mikrotiter-Platte zu befüllen.

100 µl der Zellsuspension wurden pro Well in eine zuvor mit Poly-L-Ornithin (4 ml à 0,1 mg/ml) und Laminin (11,8 µl à 1,6 mg/ml) beschichteten und für eine Stunde in humifizierter Atmosphäre inkubierten 96 Mikrotiter-Platte gegeben. Diese wurde über Nacht bei 37°C in einer humifizierten Atmosphäre bei 5% CO₂ inkubiert.

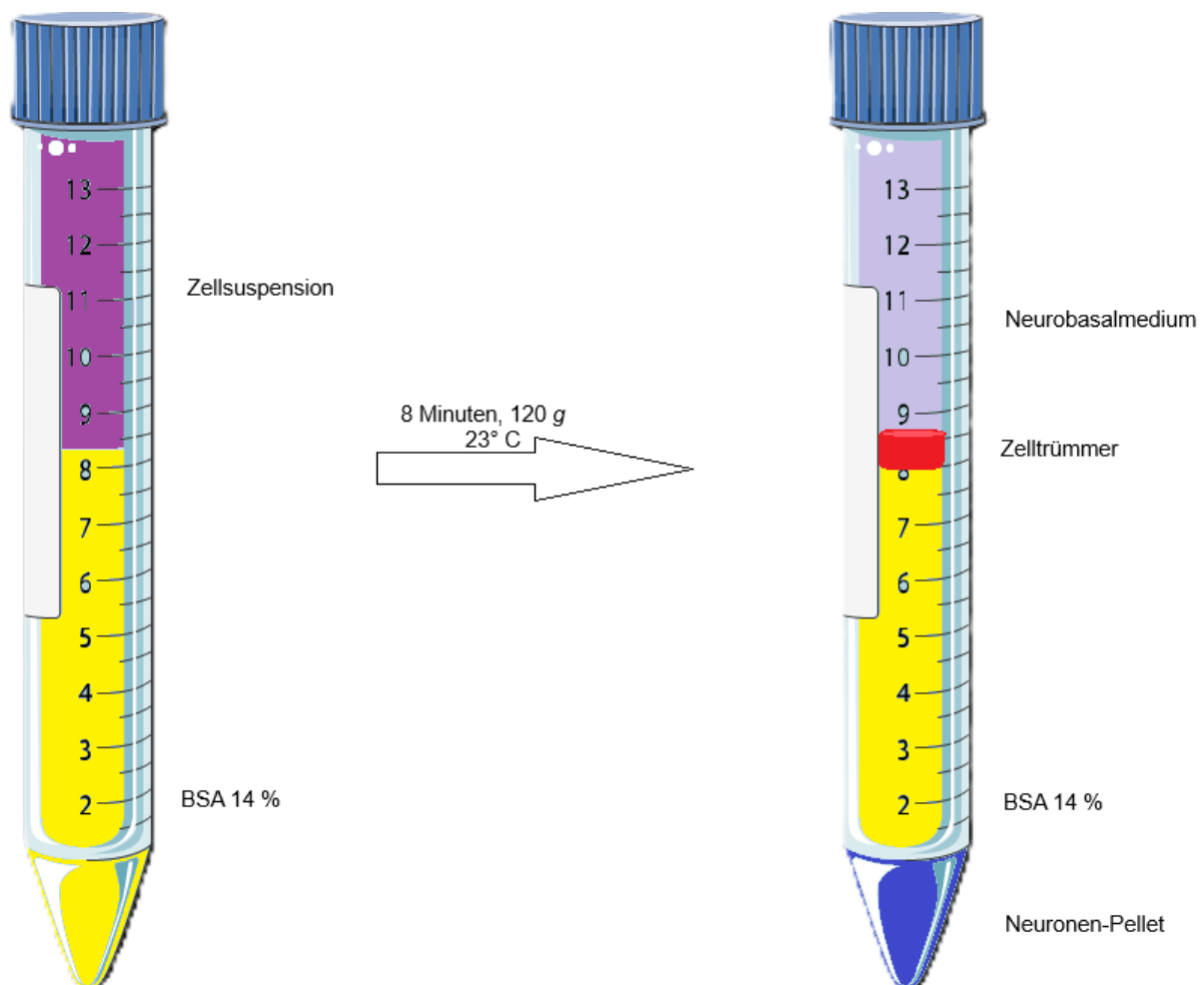


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines 14 % BSA-Gradienten zur Gewinnung von Neuronen aus einer Zellsuspension

3.2.4. Stimulation der Zellkulturen

Die Prästimulation und Stimulation der Spinalganglien fand am Tag nach der Isolation statt. Sowohl Prästimulation als auch Stimulation der Zellen erfolgte auf vorgewärmten Wärmeblöcken. Für Prästimulation-, als auch Stimulationssubstanzen wurden, bis auf die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (2,1 µl) 12,5 µl der jeweiligen Substanz in 10-fach erhöhter Konzentration in konischen V-förmigen-Boden-Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 50 µl des Zellkultur-Mediums aus der 96-Kammer Mikrotiterplatte gemischt. Das Mischen erfolgte durch 3-maliges Auf und Abpipettieren. Das gemischte Medium wurde danach aus der V-förmigen-Boden-Mikrotiterplatte erneut in die 96-Kammer Mikrotiterplatte zurückgegeben. Zwischen den einzelnen Prästimulations- und Stimulationsschritten wurden die 96-Kammer Mikrotiterplatten in humifizierter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.5. Prästimulation der primär sensorischen Neurone mit cAMP-Modulatoren und Fentanyl

Zur mechanistischen Analyse einer möglichen cAMP-abhängigen PKA-II Aktivierung nach TRPA1- und TRPV1-Stimulation wurden die primär sensorischen Neurone mit chemischen Verbindungen für 30 Minuten prästimuliert, welche die Konzentration von cAMP in der Zelle verändern (Fentanyl, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)) bzw. die als kompetitive Antagonisten von cAMP fungieren (Rp-cAMPS-pAB). Dazu wurden je 12,5 µl von Fentanyl und IBMX in V-förmigen Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 50 µl des Mediums aus den Wells durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Das gemischte Medium wurde danach in das jeweilige Well zurück überführt. Fentanyl wurde mit einer Konzentration von 100 µM vorgelegt, sodass die Endkonzentration 10 µM betrug, IBMX wurde in einer Konzentration von 1000 µM vorgelegt, mit einer Endkonzentration von 100 µM. Für die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB wurden 2,1 µl in einer Konzentration von 500 µM in die V-förmigen Mikrotiterplatten vorgelegt, die finale Konzentration betrug 10 µM. Die verwendeten Konzentrationen beruhen auf vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe Hucho.¹

Zur Negativ-Kontrolle wurden die jeweiligen Lösungsmittel und Puffer in gleicher Konzentration und mit gleichem pH-Wert verwendet, ohne Zusatz der Prästimulantien. Bei der IBMX-Prästimulation diente 1 %iges Dimethylsulfoxid (DMSO) in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) als Kontrolle (Endkonzentration 0,1 %), bei der Prästimulation von Fentanyl diente dH₂O in PBS (Endkonzentration 0,01 %) als Negativkontrolle. Zum Vergleich der mechanistischen Analyse der Rp-cAMPS-pAB wurde 30 %iges DMSO in dH₂O mit einem pH-Wert von 5.5 (Endkonzentration 3%) als Negativkontrolle verwendet. Die Prästimulationen erfolgten jeweils über einen Zeitraum von 30 Minuten.

3.2.6. Stimulation der primär Sensorischen Neurone mit TRPA1- und TRPV1-Agonisten

Zur Aktivierung der Transient Rezeptor Potential Kanäle Ankyrin 1 (TRPA1) und Transient Rezeptor Potential Kanäle Vanilloid 1 (TRPV1) und des 5HT4-GPC-Rezeptors wurden die nozizeptiven Neurone nach der 30-minütigen Prästimulation in einer 2-Stunden-Kinetik mit den Agonisten von TRPA1 (Allylisothiocyanat: AITC), TRPV1 (Capsaicin), sowie mit dem 5HT4-GPCR-Agonist 5-HT (Serotonin) stimuliert. Die Stimulationen erfolgten dabei über 0 bis 120 Minuten.

Die verwendeten Endkonzentrationen von Capsaicin und Serotonin beruhen auf Ergebnissen aus Vorexperimenten der Arbeitsgruppe Hucho¹ und die verwendete Konzentration des AITCs beruht auf bisher noch nicht veröffentlichten Ergebnissen. Die Endkonzentrationen für Capsaicin und Serotonin betragen dabei jeweils 1 μ M, die für AITC 10 mM.

Serotonin diente in den Experimenten als Positivkontrolle für eine cAMP-abhängigen PKA-II Aktivierungsprozess.

Aufgrund der hohen Volatilität des Allylisothiocyanats (AITC) wurden Kammern, in denen die Zellkulturen mit AITC stimuliert wurden, direkt nach Zugabe von AITC mit selbstklebender, undurchlässiger Aluminiumfolie abgedichtet, damit AITC keine unbehandelten Zellkulturen oder bereits durch anderweitig stimulierte Zellkulturen beeinflussen konnte.

Als Positivkontrolle diente Kaliumchlorid (KCl), welches in einer Endkonzentration von 40 mM in einer 30-minütigen Stimulation verwendet wurde.

Als Negativkontrolle wurde 1 %iges Dimethylsulfoxid (DMSO) in PBS gelöst, sodass DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % verwendet wurde.

Zur Testung, ob anstelle des volatilen AITC auch ein anderer TRPA1-Agonist verwendet werden kann, wurden PF4840154, AITC und KCl in einem Dosis-Antwort-Experiment in Verschiedenen Dosierungen gegeneinander getestet. KCl 40 mM diente als Basiskontrolle. Als Negativkontrolle fungierte erneut das Lösungsmittel (12,5 %iges DMSO in PBS gelöst, Endkonzentration 1,25 %).

3.2.7. Fixierung der nozizeptiven Neuronen

Durch Zugabe von 100 μ l 8 %igem Paraformaldehyd (PFA) pro Kammer wurde die Stimulation beendet und die Fixierung der Zellen wurde begonnen. In den Zellkammern befanden sich nun insgesamt 200 μ l und die Endkonzentration des Paraformaldehyds betrug 4 %. Damit es durch Zugabe des PFA zur Vernetzung der Proteine kommen konnte, wurde das 4 %ige PFA-Medium-Gemisch 5 Minuten ruhen gelassen. Danach erfolgte die Durchmischung durch 3-maliges Auf- und Abpipettieren von ca. 50 μ l. Nachdem der Mischvorgang beendet war,

wurden 100 µl aus jeder Kammer verworfen. Durch das Ersetzen des PFA/Medium-Gemischs durch 100 µl *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) wurde die Fixierung der Zellen nach weiteren 5 Minuten beendet. Eine erneute Waschung mit DPBS fand nach weiteren 10 Minuten statt. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.8. Immunzytochemie

Die fixierten Zellen wurden mit 50 µl normaler Ziegen Serum-Blockierungslösung (NGSB) (2 % normales Ziegen Serum (NGS), 1 % BSA (10 g BSA in 1000 ml DPBS), 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween 20 in DPBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Dadurch kam es zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und die Zellen wurden für die Immunzytochemie permeable gemacht. Danach wurden die Ziegen Serum-Blockierungslösung durch 30 µl von primären Antikörpern (in 1% BSA gelöst) ersetzt und die Zellen wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Ziele der primären Antikörper waren das Ubiquitin carboxy-terminale Hydrolase Isozym L1 (UCHL1), die phosphorylierten regulatorischen Untereinheiten RIIα und RIIβ (pRII) der Protein Kinase A II (PKA-II) und die phosphorylierte *Extracellular-signal regulated kinases 1/2* (pERK1/2). UCHL1 ist ein spezifischer Neuronen Marker¹⁰⁷, pRII dient dabei als PKA-II Aktivierungs-Korrelat¹⁰⁸ und pERK1/2 dient als Aktivierungs-Korrelat der ERK1/2, welche Bestandteil eines nachgeschalteten Signalwegs der aktivierten PKA-II ist.¹⁰⁹ Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 Minuten mit DPBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden sie mit 50 µl von sekundären Antikörpern (gelöst 1:1000 in DPBS) für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur behandelt. Zusätzlich zu den sekundären Antikörpern wurde der Nucleus-Farbstoff¹¹⁰ HOECHST 34580 (Sigma Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 zur Stammlösung hinzugegeben. Es erfolgen erneut drei Waschungen (Raumtemperatur, im Dunkeln) mit 100 µl DPBS für jeweils 10 Minuten. Zum Schluss wurden zusätzliche 100 µl DPBS hinzugefügt, sodass insgesamt 200 µl in den Wells vorhanden waren. Die 96-Well Platte wurde vor dem Scannen mit selbstklebender Aluminiumfolie lichtdicht abgeklebt und bei 4°C bis zum Scannen aufbewahrt. Das Scannen erfolgte innerhalb der 2 darauffolgenden Tage.

3.2.8.1 Verwendete Primäre Antikörper

Die verwendeten primären Antikörper waren: Huhn polyklonal anti-UCHL1 anti-PGP (1:2000 Novus, Cambridge, UK, #NB110-58872), Maus monoklonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), (Thr202/Tyr204) (1:250, New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, #9106L) und Kaninchen monoklonal anti-Phospho-RIIα (S99), (1:1000 Abcam, Cambridge, UK #ab32390).

3.2.8.2. Verwendete Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper wurden die folgenden verwendet: Alexa Fluor Plus 647 Ziege anti-Maus IgG (H+L) (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA #A32728), Alexa Plus 488 Ziege anti-Huhn IgY (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #A32931), Alexa plus 555 Ziege anti-Kaninchen IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #A32732) und Hoechst 34580 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA #63493).

3.2.9. High Content Screening Mikroskopie und Datenanalyse

Für die Hoch-Durchsatz Mikroskopie (High Content Screening Mikroskopie/ HCS-Mikroskopie) wurde ein *Cellinsight CX7 LZR* Plattform Mikroskop mit laserbasierter Hochleistungsbeleuchtung und mit multiplexfähiger Fluoreszenz-Zellmarkierung verwendet. Für das automatische Scannen multipler 96-Kammer-Platten wurde der Mikrotiterplatten Umsetzer Orbitor RS2 verwendet. Die dem Mikroskop zugehörige HCS-Software HCS Studio 6.6.2 Cell Analysis Software von Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA) wurde zur Quantifizierung der Antikörpersignale verwendet. Für die Aufnahmen wurde die Photometrics X1 CCD 14-Bit Kamera (Teledyne Photometrics, Tucson, Arizona, USA) und als Lichtquelle der integrierte Laser (Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm, 647 nm) verwendet. Das für den Scanvorgang verwendete Objektiv war das Plan NeoFluar™ System Standard Olympus™ (10x, 0,30 NA, Olympus Corporation, Tokio, Japan). Die Aufnahmen erfolgten in 10-facher Vergrößerung. Dabei wurde jede mit Zellkultur ausgesäte Kammer der 96-Mikrotiterplatte in 49 Blickfelder unterteilt, die einzeln gescannt wurden. Die Auflösung der Aufnahmen betrug 1104 x 1104 Pixel (2x2 *Binning*). Wie in vorangegangenen Experimenten durch die Arbeitsgruppe beschrieben,¹ wurden mit einem Protokoll des *Cellomics Software* Paketes Objekt-Selektions-Parameter festgelegt, welche geeignete primär sensorische Neuronen identifizieren. Es erfolgte dafür die Hintergrundkorrektur der UCHL1-Färbungen (*low pass filtration*), welche dann in eine binäre Bildmaske konvertiert und segmentiert wurden. Die Neurone wurden aufgrund der Objekt-Selektions-Parameter ausgewählt: die Größe betrug dabei 164-7500 μm^2 , die Zirkularität 1-3 ($\text{Perimeter}^2/4\pi$ Fläche), das Längen-Breiten-Verhältnis von 1-2, die durchschnittliche Intensität von 800-1200 und die Gesamtintensität von 2×10^5 - 5×10^7 . Die so entstandenen Bildmasken wurden dann zur Quantifizierung des Fluoreszenz-Signals in den anderen Kanälen genutzt. Es wurden drei respektive Kontrollen für jede Dreifachfärbung durchgeführt, um einen Übertragungseffekt zwischen den verschiedenen Fluoreszenzkanälen eliminieren zu können: 1. UCHL1 alleinig, 2. UCHL1 und der Antikörper 1 und als 3. UCHL1 und Antikörper 2.¹ Die Rohdaten der Kontrollen wurden dazu benutzt, um die Steigung der bestpassendsten

Regressionsgerade zu berechnen. Diese wurde dann dazu benutzt, um den Übertragungseffekt zwischen den Fluoreszenzkanälen zu kompensieren.¹¹¹

Die kompensierten Daten wurden auf einen Mittelwert von 1 (oder 1000) für die nicht stimulierten Zellen normalisiert, um so die Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten zu berücksichtigen.

3.2.10. Qualitätssicherung und Quantifizierung der PKA-II Aktivität bei *High Content Imaging*-Experimenten mit primär sensorischen Neuronen

Die Testung der oben genannten Arbeitshypothese wurde an primären Nozizeptoren der Ratte durchgeführt. Nach Präparation der Spinalganglien und Anfertigung von Übernachtzellkulturen erfolgte die Stimulation der dissoziierten sensorischen Neurone. Nach Fixierung wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt, um eine Analyse der intrazellulären Signalwege zu ermöglichen. Zur Quantifizierung der Zellen und der markierten Proteine wurde die *High Content Screening* Mikroskopie verwendet. Durch automatisierte Digitalisierung der vollständigen Zellkulturen, sowie durch die automatisierte Signalquantifizierung auf Einzelzellebene wurde eine größere Objektivität der Versuchsergebnisse gewährleistet, als durch die mikroskopische Untersuchung der Zellen und markierten Proteine durch Forschende möglich wäre. Durch die HCS-Mikroskopie konnte zudem eine adäquate Zellzahl in kurzer erreicht werden.¹¹² Die Arbeitsgruppe von Professor Hucho ist das erste Labor, welches die HCS-Mikroskopie im Gebiet der Schmerzforschung etablierte.^{1,29,55,60,61,113} Die Arbeitsgruppe hat zur Qualitätssicherung und Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Experimente einen Goldstandard entwickelt.

Für jedes Experiment wurden mindestens 4 Replikate angefertigt und die Gesamtzahl pro Zellkammer betrug mindestens 500 Zellen. Lag die Zellzahl in der Zellkammer unter 500, so wurde diese Zellkammer exkludiert.

Jedes Replikat eines Experimentes wies eine unterschiedliche Anordnung der Konditionen auf der Mikrotiterplatte auf, um anordnungsabhängige Effekte zu eliminieren.

Durch die *High Content Screening* Mikroskopie wurden in den folgenden Experimenten vier Fluoreszenzkanäle gemessen. Der erste Fluoreszenzkanal diente der Identifizierung der primär sensorischen Neurone und maß die Fluoreszenz der Antikörper für den neuronalen Marker UCHL1.^{114,115} Nur Zellen, die positiv für UCHL1 waren wurden für die Auswertung der Experimente verwendet. Zudem wurde die Gesamtzahl der Zellen mittels Markierung der Zellkerne durch Hoechst-Färbung für die Qualitätssicherung hinzugezogen. Nur wenn ein vorher festgesetztes Verhältnis der nozizeptiven Neuronen, also UCHL1-positiven Zellen, zur Gesamtzellzahl erreicht wurde, wurde das Replikat inkludiert. Ebenso musste die Verteilung der Zellgrößen mit positiven UCHL1-Signal innerhalb eines festgesetzten Standards liegen.

Die Bilder mit UCHL1-Färbung wurden hintergrundkorrigiert und in eine binäre Bildmaske konvertiert. Anhand von festgelegten Objekt-Selektions-Parametern wurden geeignete Zellen identifiziert. Zu den Objekt-Selektions-Parametern zählten die Zellgröße ($164\text{-}7500\ \mu\text{m}^2$), die Rundheit ($1\text{-}3\ \text{Perimeter}^2/4\pi \times \text{Fläche}$), das Längen-Breiten-Verhältnis ($1\text{-}2$) und die Intensität der Färbung UCHL1 (durchschnittliche Intensität: $800\text{-}12000$, gesamte Intensität $2 \times 10^5 - 5 \times 10^7$).

Diese Selektionsparameter bildeten die Grundlage für die Quantifizierung der weiteren Fluoreszenzkanäle. Um falsch positive Werte, die durch Überlappung der Emissionsspektren der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe entstehen können,¹¹⁶ korrigieren zu können, wurden Kontrollzellkammern mit Einzelzellfärbungen auf jeder Mikrotiterplatte angefertigt. Dabei zeigten jeweils zwei Zellkammern die alleinige UCHL1-Färbung, zwei die UCHL1- und pRII-Färbung, zwei weitere die UCHL1- und pERK1/2-Färbung und zwei Zellkammern zeigten die UCHL1-, pRII- und pERK1/2-Färbung.

Die Quantifizierung der PKA-II Aktivität mit Hilfe der *High Content Screening* Mikroskopie ist möglich da die Aktivierung der PKA-II zu einer Konformationsänderung führt. Dadurch wird an der Regulatorischen Untereinheit RII eine Bindungsstelle für einen spezifischen Antikörper zugänglich. Dieser primäre Antikörper wird spezifisch von einem sekundären, fluoreszierenden Antikörper gebunden. Die Intensität dieses sekundären Antikörpers kann als Maß der PKA-II Aktivität verwendet und über *High Content Screening* Mikroskopie quantifiziert werden.^{55,60}

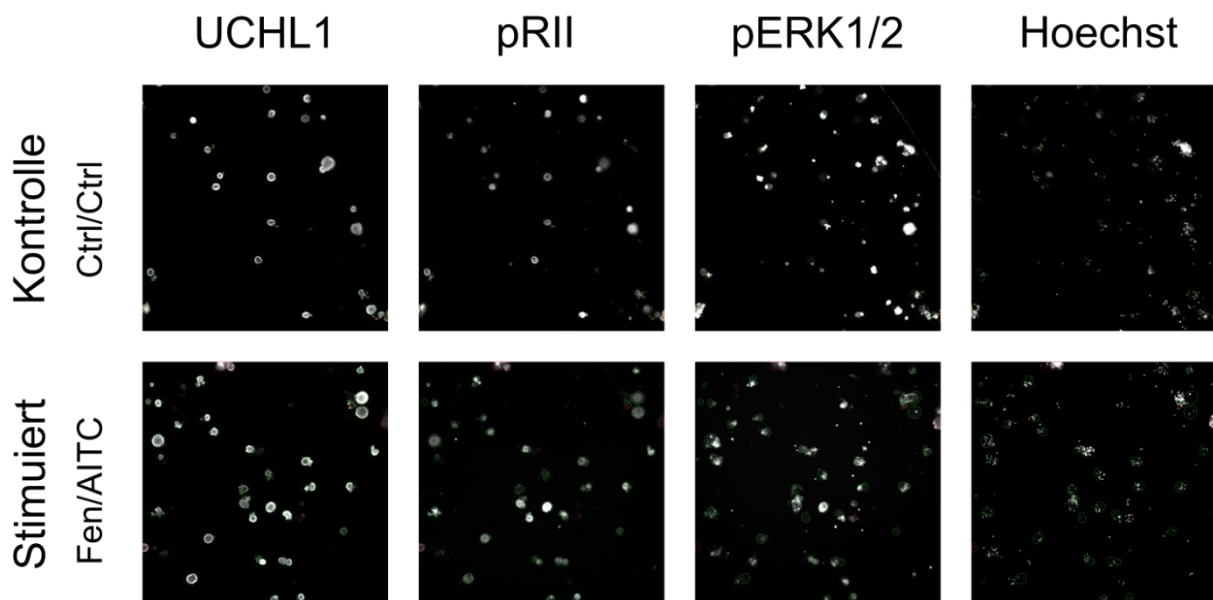


Abbildung 4: Darstellung der automatisierten Bildanalyse mittels HCS- Mikroskopie

Aufnahme der Bilder der Neuronen mittels HCS-Mikroskop. Identifikation der nozizeptiven Neurone anhand der UCHL1- Expression und der eingestellten Objektselektionsparameter. Identifizierte Neurone werden grün umrandet dargestellt. Die Aktivität der PKA-II und der ERK1/2 kann in den respektiven Fluoreszenzkanälen automatisch quantifiziert werden.

3.2.11. Statistische Auswertung

Die mit dem HCS-Mikroskop verknüpfte Software „*Cellomics, HCS Studio Cell Analysis Software*“ wurde verwendet, um die Einzelbilder zu analysieren und die daraus entstandenen Daten zu exportieren. Die Software R (Version 4.2.0 und 4.1.1) wurde zur weiteren Datenauswertung der Experimenten verwendet.¹¹⁷

Pro Experiment wurden 4 Replikate angefertigt, dabei stammten die primär sensorischen Neurone bei je zwei Replikaten von männlichen und bei zwei von weiblichen Tieren. Kammern der Mikrotiterplatte, in denen die Zellzahl unter 500 lag, wurden von der Analyse ausgeschlossen, ein in der Arbeitsgruppe Hucho bereits etabliertes Verfahren.

Zur statistischen Analyse wurden einfaktorielle ANOVA und zweifaktorielle ANOVA verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde mit $p < 0.05$ als statistisch signifikant definiert. Die kinetischen Experimente wurden mit Hilfe von R analysiert. Die zweifaktorielle ANOVA wurde verwendet, um die Signifikanz unterschiedlicher Werte zu berechnen. Als Post-hoc Analyse wurde der Bonferroni-Test gewählt, um den P-Wert verschiedener Paare (beispielsweise Kontrolle gegen Behandlung zu jedem Zeitpunkt) zu bestimmen. Dazu wurden die Paare in einer Matrix mit Hilfe von R (Bibliothek multcomp) gegenübergestellt. Die Grafiken zeigen den Mittelwert $\pm$ den Standardfehler (SEM). GraphPad Prism 6, Inkscape 1.0.2 und Fiji- Image J wurden zur Erstellung der Graphen verwendet. Die Dosis-Antwort-Kurven wurden durch nichtlineare Regression mit Kurvenanpassung (drei Parameter, Standard Hill Slope) in der Prism-Software (Version 6, GraphPad) erstellt. In den Grafiken wurden statistisch signifikante Unterschiede mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,00$ angegeben. Verglichen wurden die Signalantworten der jeweiligen stimulierten Neurone abhängig davon, ob die Prästimulation mit einer aktiven Verbindung oder der Negativkontrolle stattfand. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimulierten Neuronen und der Negativkontrolle wurden mit \$ für $p < 0,05$, \$\$ für $p < 0,01$ und \$\$\$ für $p < 0,001$ angegeben.

3.2.12. Calcium-Bildgebung

Herstellung der Zellkulturen

Die Calcium-Bildgebung wurde durchgeführt, um die Calciumdynamik in primär sensorischen Neuronen nach Behandlung von PF4840154 und AITC zu vergleichen. Die Isolation der primär sensorischen Neurone für die Calcium-Bildgebung erfolgte dabei auf die gleiche Art und Weise, wie für die Hoch-Durchsatz-Mikroskopie. Auch die Herstellung der Zellkulturen erfolgte wie in Kapitel 3.2.3. beschrieben. Das Neurobasal-Medium, das für die Calcium-Bildgebung verwendet wurde, enthielt neben den Zusätzen (B-27, L-Glutamin, L-Glutamat und Penicillin/Streptomycin) zusätzlich 10-20 ng/ml NB-Medium Nerven-Wachstums-Faktor von der Maus (mNGF), Cytosin- β -D-Arabinofuranoside-hydrochloride (AraC) in einer

Endkonzentration von 2 μM (Verdünnung 1:10000) und 2% Fötales Bovines Serum (FBS). Die Dissoziation der Spinalganglien (Trituation) erfolgte nach der oben beschriebenen etablierten Methode der Arbeitsgruppe Hucho (Kapitel 3.2.3.).¹

Für die Calcium-Bildgebung wurde eine höhere Zelldichte als für die HCS-Mikroskopie benötigt. Daher wurde nach der Zentrifugation der Zellsuspension und des 14 %igen BSA-Gradienten und nach Resuspension des Pellets in NB-Medium, die neuentstandene Zellsuspension mit nur einem weiteren Milliliter angereichertem Medium aufgefüllt. 100 μl der Zellsuspension wurden in je eine Kammer der beschichteten 96-Kammer-Mikrotiterplatte gegeben. Die Hälfte der Spinalganglien eines Tieres wurden somit auf 16 Kammern einer Mikrotiterplatte ausgesät. Diese Zellkulturen wurden über Nacht in humifizierter Atmosphäre bei 37° C und einer Atmosphärenkonzentration von 5 % CO_2 inkubiert

3.2.12.1. Färbung der Zellen mit Calbryte 630 AM

Der rotfluoreszierende, in DMSO gelöste Indikator für intrazelluläres Calcium Calbryte 630 AM (Stammkonzentration 2.5 mM, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde mit dem vollständig angereicherten Medium auf eine Endkonzentration von 5 μM verdünnt. Das DMSO wies eine Endkonzentration von 0,2% auf.

Das Zellkulturmedium wurde abpipettiert und durch 100 μl des verdünnten, 5 μM Calbryte 360 AM ersetzt, damit die Zellen den Farbstoff aufnehmen konnten. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 60 Minuten bei 37 °C, humifizierter Atmosphäre und 5 % CO_2 unter Lichtausschluss inkubiert. Dazu wurde ein mit Aluminiumfolie lichtundurchlässiger Mikrotiterplatten-Deckel zur Abdeckung benutzt, um eine vorzeitige Anregung des Farbstoffes zu vermeiden.

Nach Inkubation wurden die 100 μl des Mediums komplett abpipettiert, um im Medium treibende Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden danach vorsichtig zwei Mal mit im Wasserbad auf 37° C erwärmter Salzlösung (HEPES 10 mM, Sigma-Aldrich; Natriumchlorid 140 mM Carl Roth GmbH + Co. KG; Kaliumchlorid 5 mM Merck Millipore; Calciumchlorid 2 mM Carl Roth GmbH + Co. KG; Magnesiumchlorid 1 mM, Carl Roth GmbH + Co. KG; D-Glucose 10 mM Sigma-Aldrich; Zellkulturwasser (ddH₂O) Lonza) gewaschen. Es wurden je 100 μl pro Zellkammer pro Waschung verwendet. Nach der zweiten Waschung verblieben 100 μl der Salzlösung in den Kammern der Mikrotiterplatten. Zwischen den Waschungen wurden die Zellkammern mit Hilfe des Aluminiumbeschichteten Deckels abgedunkelt.

3.2.12.2. Stimulation der Zellen und Bildgenerierung

Für die Bildgenerierung wurde die Mikrotiterplatte auf den Objektisch aufgelegt. Für das entsprechende Well wurde ein geeigneter Bildausschnitt, der nicht am Rand der Kammer lag, gesucht in dem möglichst viele einzelne Zellen zu sehen waren. Die richtige Fokusebene wurde manuell eingestellt. Zur Bildaufnahme wurde die Leica Application Suite X.Ink Life Science Software verwendet. Für die Aufnahmen wurden das HC PL FLUOTAR L 20x/0,40 CORR PH1-Objektiv (LEICA, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Als Lichtquelle diente der LED-Illuminator für Fura-2 ratiometrische Calciumbildgebung CoolLED.(CoolLED Headquarters). Wellenlängen von 340 nm und 380 nm wurden zur Beleuchtung der Zellen und zum Anregen des Calciumindikators Calbryte verwendet.

Als Stimulantien wurden PF4840154 in Endkonzentrationen von 125 μ M, 25 μ M und 5 μ M sowie AITC in Endkonzentrationen von 50 μ M, 250 μ M und 125 μ M verwendet. KCl in einer Endkonzentration von 40 mM diente als Positivkontrolle für einen Calciumeinstrom. Als Negativkontrolle diente DMSO in einer Endkonzentration von 1,28 %. Es wurden je 20 μ l der jeweiligen Stimulation in die entsprechende Kammer gegeben. Die Stimulantien wurden mit der oben genannten Salzlösung auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

Um einen Ausgangswert für die Fluoreszenz zu erhalten, wurde ein Baseline Scan für 20 Sekunden mit einer Aufnahme-Geschwindigkeit von einem Bild pro Sekunde (1 Hz) durchgeführt. Danach wurden 20 μ l der jeweiligen Simulations-Substanz hinzu-pipettiert mit Hilfe einer langen Pipettenspitze, sodass die primär sensorischen Neurone durch die Hinzugabe der Substanzen nicht aus dem Bildbereich gespült wurden. Die Pipettenspitze durfte dabei weder den Rand der Zellkammer noch das Objektiv berühren, um Verwackelungen bei der Bildaufnahme oder ein Verschieben der Mikrotiterplatte auf dem Objektisch des Mikroskops zu vermeiden.

Nach Hinzugabe der Substanzen wurden für 40 Sekunden Bilder mit einer Geschwindigkeit von 1 Hz angefertigt. Der Scan erfolgte insgesamt für 60 Sekunden. Um alle potenziell calciumaufnahme-fähigen Zellen zu identifizieren, wurde nach dem 60 Sekunden dauernden Scan in jedes Well 20 μ l KCl in einer Endkonzentration von 40 mM hinzugegeben und für weitere 20 Sekunden wurden Bilder mit einer Geschwindigkeit von 1 Hz aufgenommen. Nach 80 Sekunden war ein Scan pro Kammer abgeschlossen.

3.2.12.3. Analyse der Bilder

Die generierten Bilder mit Hilfe der *Leica Application Suite X.Ink Life Science* Software wurden im *Leica Image File* (LIF)-Format gespeichert. Mit der Software ImageJ (Version 1.53o, *Wayne Rasband, National Institute of Health*, Maryland, USA) wurden die Bilddateien autoskaliert und in die für die jeweilige Stimulation erstellten Ordner als *Tagged Image File Format* (TIFF)-Datei

exportiert. Danach wurden die Bilddateien mit Hilfe eines zuvor erstellten Software-Zusatzmodul für ImageJ analysiert, welches an Hand einer Bildmaske und voreingestellter Parameter die primär sensorischen Neurone aus den Bildinformationen erkennt. Dabei wurden alle calciumaufnahmefähigen Neurone von den Bildern 63-80 zur Erstellung der Bildmaske verwendet in der die Neurone als *Regions of Interest* (ROI) markiert wurden. Zu den zur Identifikation genutzten Parametern zählten unter anderem die Größe (untere Grenze $250 \mu\text{m}^2$, obere Grenze $2000 \mu\text{m}^2$), die Weichzeichnung, die Zirkularität (0,5-1) und die Intensität der Fluoreszenz (40-400).

Verschiedene R-Skripte (Version 4.2.0) wurden verwendet, um die Zellinformationen aus in *ImageJ* generierten Dateien zu extrahieren, zu analysieren und um Kurven zu erstellen, die die Intensität der Fluoreszenz der Zellen abbilden. Dabei entstanden Grafiken mit der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle für die jeweilige Kondition sowie Graphiken, die den Mittelwert und den Standardfehler der jeweiligen Fluoreszenzintensität der Kondition anzeigten.

4. Ergebnisse

Vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass nach KCl Depolarisierung Calciumeinstrom durch den spannungsabhängigen Kanal Cav1.2 in nozizeptiven Neuronen zu cAMP- unabhängiger, Opioid-unresponsiver Aktivierung von PKA-II und langanhaltender mechanischer Hyperalgesie führt.¹ In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob auch die Aktivierung der calciumpermeablen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle TRPA1 und TRPV1 zu cAMP-unabhängiger Aktivierung von PKA-II führen.

4.1. Fentanyl inhibiert PKA-II nach Stimulation mit Serotonin

In nozizeptiven Neuronen führt Calciumeinstrom durch den spannungsabhängigen Cav1.2 Kanal zu einer cAMP-unabhängigen und Opioid-unresponsiven Aktivierung der PKA-II.¹ Im Gegensatz dazu führt die Stimulation mit Serotonin zu einer cAMP-abhängigen und Opioid-responsiven Aktivierung der PKA-II.¹¹⁸ Um diese Unterscheidbarkeit auch für diese experimentelle Serie zu belegen, wurden Übernachtskulturen dissoziierter sensorischer Neurone der Ratte für 30 Minuten mit Fentanyl (10 μ M) oder einer Negativkontrolle 1 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1%) prästimuliert. Danach erfolgten unterschiedlich lange Stimulationen von 0-120 Minuten (2-Stunden-Kinetik) mit Serotonin Als Negativkontrolle für dieses Experiment diente DMSO in PBS gelöst (Negativkontrolle 2, Endkonzentration 0,1 %) Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden verwendet und die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und anschließend statistisch mittels R ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde eine einfaktorielle und zweifaktorielle ANOVA und als Post-hoc Analyse der Bonferroni-Test verwendet. Die Intensität der pRII Untereinheit korreliert dabei mit der PKA-II Aktivität und die Intensität der pERK1/2 mit der ERK1/2 Aktivität.

Wie erwartet zeigte die Prästimulation mit Fentanyl keinen Einfluss auf die pRII Intensität in der Stimulation mit DMSO in PBS gelöst (Negativkontrolle 2).

Die Prästimulation mit Fentanyl inhibierte hingegen die durch Serotonin-induzierte PKA-II Aktivität über die gesamte Zeitspanne.

Die Inhibition der PKA-II Aktivität in den 1- bis 30-minütigen Stimulationszeiträumen erwies sich nach statistischer Auswertung als signifikant.

Fentanyl verringerte die pRII Intensität in der 5-minütigen Stimulation mit Serotonin am stärksten, sodass sie auf 37,9 % ($p < 0,001$, SEM $\pm 0,035$) der Erhöhung der alleinigen Serotonin-Stimulation sank.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Exposition mit Fentanyl keinen Einfluss auf die basale PKA-II Aktivität hat. Die Serotonin-induzierte, cAMP-abhängige PKA-II Aktivität

hingegen wird, wie bereits zuvor beschrieben, durch Fentanyl inhibiert.¹¹⁹ Die Serotonin-Stimulation eignet sich daher als Positivkontrolle um cAMP-abhängige PKA-II Aktivierung zu untersuchen.

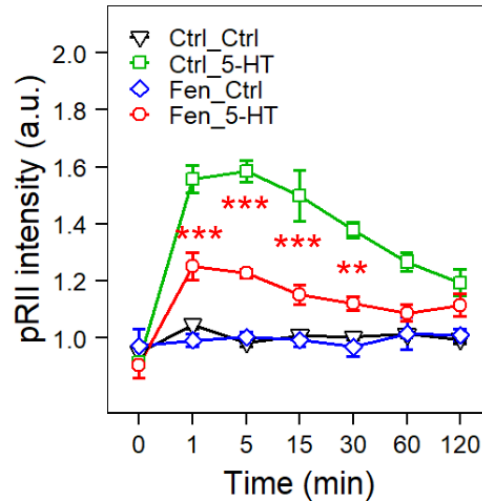


Abbildung 5: Prästimulation mit Fentanyl führt zu einer Minderung des Signals der pRII Untereinheit in der Stimulation mit Serotonin in primär sensorischen Neuronen von Ratten.

Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min., Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau in der Serotoninstimulation in Abhängigkeit von einer Prästimulation mit Fentanyl im Vergleich zur Negativkontrolle. 5-HT: Serotonin, Fen: Fentanyl, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

4.2. Fentanyl hat den gleichen Einfluss auf die TRPV1- und TRPA1-vermittelten PKA-II Aktivierung, wie auf die KCl-induzierte PKA-II Aktivierung

Die durch KCl-Depolarisations-induzierte Aktivierung der PKA-II ist in nozizeptiven Neuronen Opioid-unresponsiv und unabhängig von cAMP.¹ In diesem Experiment sollte getestet werden, ob Fentanyl einen inhibitorischen Effekt auf die TRPA1- und TRPV1-induzierte Aktivität der PKA-II hat.

Für dieses Experiment wurden die Übernachtskulturen der dissoziierten sensorischen Neuronen der Ratte für 30 Minuten mit Fentanyl (10 μ M) oder einer Negativkontrolle 1 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %) prästimuliert. Danach erfolgte in einer 2-Stunden-Kintektik (0-120 Minuten) die Stimulation der TRPA1- und der TRPV1-Rezeptoren mit AITC (10 mM, TRPA1) und Capsaicin (1 μ M, TRPV1). Die gewählten Konzentrationen wurden aufgrund vorangegangener Experimente der Arbeitsgruppe Hucho verwendet. Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden verwendet und die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper wurden mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und anschließend ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA und der Bonferroni-Test verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mittels R.

Die Prästimulation mit Fentanyl zeigte zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten inhibitorischen Effekt auf die AITC-induzierte Aktivität der PKA-II (Abb. 6A). In der 15-minütigen Stimulation mit AITC wurde die pRII Intensität durch Fentanyl am stärksten verringert, sodass sie auf 82 % der Erhöhung der alleinigen Stimulation mit AITC sank. Dies war jedoch nach statistischer Auswertung nicht signifikant ($p > 0,05$).

Auch in den Stimulationen mit Capsaicin inhibierte Fentanyl die PKA-II Aktivität nicht (Abb. 6B). In der 60-minütigen Stimulation mit Capsaicin wurde die pRII Intensität durch Fentanyl am stärksten verringert, sodass sie auf 82 % der alleinigen Stimulation mit Capsaicin sank. Nach statistischer Auswertung zeigte sich die Reduktion als nicht signifikant ($p > 0,05$).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivierung der PKA-II durch TRP Kanal Agonisten nicht auf Opiode anspricht.

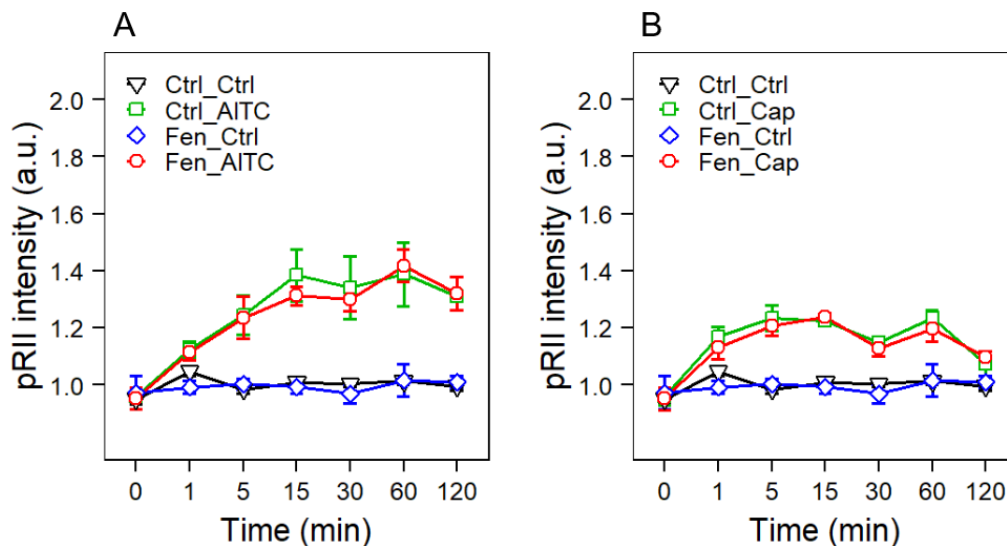


Abbildung 6: Prästimulation mit Fentanyl beeinflusst die durch TRP Kanal Agonisten AITC und Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität in primär sensorischen Neuronen der Ratte nicht.

A: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10 mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In **A-B** sind dieselben Kontrollstimulationen dargestellt wie in Abb. 5. **A-B:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Fentanyl der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). 5-HT: Serotonin, AITC: Allylthiocyanat, Cap: Capsaicin, Fen: Fentanyl, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

4.3. Fentanyl hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2

Um zu testen, ob die Prästimulation mit Fentanyl einen Einfluss auf der PKA-II nachgeschaltete Strukturen beziehungsweise auf weitere Ebenen der Signaltransduktion hat, wurden primär sensorische Neurone der Ratte für 30 Minuten mit Fentanyl (10 μ g) oder mit einer Negativkontrolle (DMSO 0,1 %) prästimuliert, gefolgt von einer 0-120-minütigen Stimulation.

Die Stimulationen erfolgten mit AITC (10 mM, TRPA1-vermittelte Aktivierung), Capsaicin (1 μ M, TRPV1-vermittelte Aktivierung), Negativkontrolle (DMSO 0,1 %) und Serotonin (1 μ M, 5HT4-Rezeptor vermittelte Aktivierung). Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden verwendet. Die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper wurden mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und anschließend ausgewertet. Die statistischen Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA und als Post-hoc Analyse wurde der Bonferroni-Test verwendet.

Die Intensität der pERK1/2 als der PKA-II nachgelagerte Zielstruktur wurde weder durch die alleinige Prästimulation mit Fentanyl noch durch die alleinige Stimulation mit Serotonin, oder durch die kombinierte Stimulation mit Fentanyl und Serotonin signifikant beeinflusst (Abb. 7A). Die Stimulationen mit den TRP Agonisten AITC und Capsaicin erhöhten die ERK1/2 Aktivität in Langzeitstimulationen. AITC erhöhte die Signalantwort der ERK1/2 ab der 15-minütigen Stimulation kontinuierlich, sodass die 30- bis 120-minütigen Stimulationen die ERK1/2 Aktivität signifikant steigerten. Die maximale Steigerung der ERK1/2 Aktivität auf das 3,1-Fache wurde bei der 120-minütigen Stimulation erreicht ($p < 0,001$ SEM $\pm$ 0,412, Abb. 7B). Die der AITC-Stimulation vorausgegangene Prästimulation mit Fentanyl inhibierte die AITC-induzierte ERK1/2 Aktivität jedoch nicht.

Die Stimulationen mit Capsaicin führten im Vergleich zu den Stimulationen mit AITC erst ab der 60-minütigen Stimulation zu einer signifikanten Steigerung der ERK1/2 Aktivität ($p < 0,01$ SEM $\pm$ 0,110). Diese Capsaicin-induzierte Aktivität der ERK1/2 war geringer als die AITC-induzierte ERK1/2 Aktivität. Die durch Capsaicin hervorgerufene maximale Steigerung des ERK1/2 Aktivität betrug das 1,6-Fache und wurde bei der 120-minütigen erreicht ($p < 0,001$ SEM $\pm$ 0,115) (Abb. 7A).

Eine der Capsaicin vorausgegangene Behandlung mit Fentanyl zeigte keinen inhibitorischen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität.

Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Behandlung mit Serotonin nicht zur Aktivierung von ERK1/2 führt und dass die Aktivierung der ERK1/2 durch TRP Kanal Agonisten nicht auf Opioide anspricht.

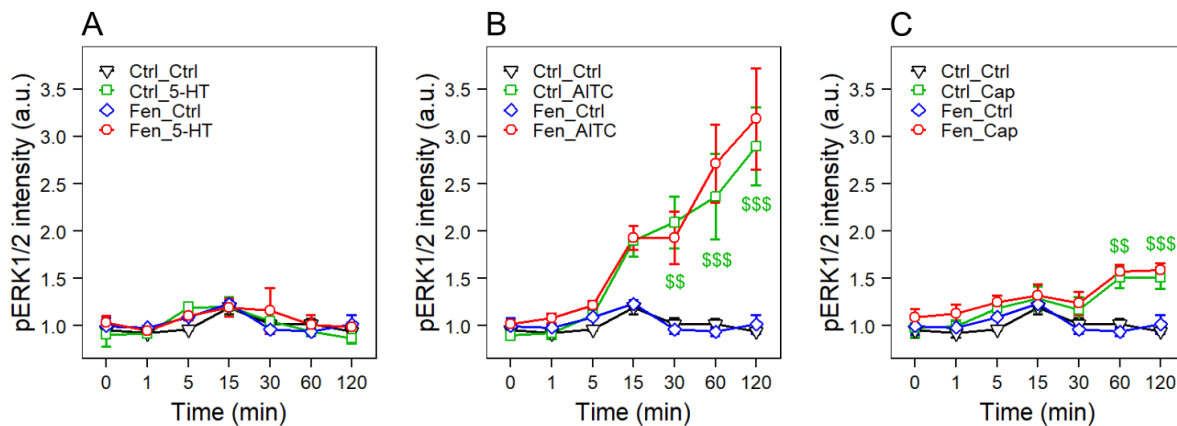


Abbildung 7: Prästimulation mit Fentanyl hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivierung in primär sensorischen Neuronen von Ratten nicht. **A:** Zeitlicher Verlauf pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10 mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **C:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Fentanyl (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In **A-C** ist stets dieselbe Stimulation mit der Negativkontrolle und dieselbe Prästimulation mit Fentanyl oder der Negativkontrolle dargestellt **A-C:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Fentanyl der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Stimulation mit der Negativkontrolle und der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin) Fen: Fentanyl, 5-HT: Serotonin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

4.4. Langzeitbehandlung mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPS-pAB aktiviert PKA-II

Rp-cAMPS-pAB ist ein inaktives Analogon von cAMP, was die inaktive Form der PKA-II stabilisiert. Hierdurch kann dieses als kompetitiver cAMP-Antagonist und somit als PKA-Inhibitor fungieren.¹⁰²⁻¹⁰⁶ Mit diesem Experiment sollte getestet werden, ob der kompetitive cAMP Antagonist die basale PKA-II Aktivität inhibiert.

Für dieses Experiment wurden Übernachtskulturen der dissoziierten sensorischen Neurone der Ratte mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder einer Negativkontrolle (DMSO 3 % in dH₂O, pH 5,5) 30 Minuten lang prästimuliert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit der DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % in PBS gelöst (Negativkontrolle 2) in einer 2-Stunden Kinetik (0-120 Minuten).. Ein Referenzwert für eine Erregung der primär sensorischen Neuronen wurde durch 30-minütige Stimulation mit 40 mM KCl generiert.

Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden angefertigt. Die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper wurden mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und anschließend ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA und als Post-hoc Analyse wurde der Bonferroni-Test verwendet.

In den 0- bis 30-minütigen Stimulationen zeigte die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB keinen signifikanten Einfluss auf die pRII Intensität im Vergleich zur Kontrollstimulation. Ab der

60-minütigen Stimulation steigerte die die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB die PKA-II Aktivität, bis auf das maximal 1,157-Fache in 120-minütigen Stimulation, was statistisch signifikant war ($p < 0,01$, SEM $\pm 0,061$).

Entgegen der Erwartung deuten die Daten darauf hin, dass die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB nicht zu einer Minderung der basalen PKA-II Aktivität führt, sondern dass Rp-cAMPS-pAB die PKA-II in Langzeitbehandlungen aktiviert.

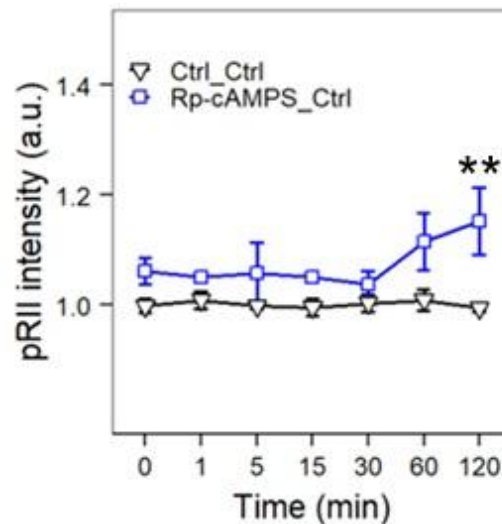


Abbildung 8: Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB führt in Langzeitstimulationen zu einem Anstieg der pRII Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.

zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von Stimulation von 0-120 Minuten mit der Negativkontrolle. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB. Rp-cAMPS: adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxybenzylester, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in dH₂O, pH 5,5, Endkonzentration 3 %; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1 %) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

4.5. Rp-cAMPS-pAB inhibiert PKA-II nach Stimulation mit Serotonin

In diesem Experiment sollte durch Prästimulation mit dem kompetitiven cAMP-Antagonisten und PKA-Inhibitor Rp-cAMPS-pAB¹⁰²⁻¹⁰⁶, gezeigt werden, dass Serotonin als Positivkontrolle für eine cAMP-abhängige Aktivierung der PKA-II verwendet werden kann.

Für dieses Experiment wurden Übernachtskulturen der dissoziierten sensorischen Neurone der Ratte mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder einer Negativkontrolle (DMSO 3 % in dH₂O, pH 5,5) 30 Minuten lang prästimuliert. Anschließend erfolgte eine 2-Stunden-Kinetik (0-120 Minuten) mit Serotonin (1 μ M). Als Negativkontrolle 2 wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % in PBS gelöst verwendet. Ein Referenzwert für eine Erregung der primär sensorischen Neuronen wurde durch 30-minütige Stimulation mit 40 mM KCl generiert. Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden angefertigt. Die

HCS-Mikroskopie wurde verwendet um die Intensität der fluoreszierenden sekundären Antikörper zu quantifizieren und anschließend auszuwerten. Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet und der Bonferroni-Test wurde als Post-hoc Analyse verwendet.

Die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB minderte in diesem Experiment den durch Serotonin-induzierten Anstieg der pRII Intensität in den 5- bis 60-minütigen Stimulationen. Dabei war die Inhibition der PKA-II Aktivität in der 15-minütigen Stimulation statistisch signifikant. Rp-cAMPS-pAB verringerte die pRII Intensität in der 15-minütigen Stimulation mit Serotonin auf 48,23 % der Erhöhung, die durch alleinige Stimulation mit Serotonin hervorgerufenen wurde ($p < 0,05$, SEM $\pm$ 0,034).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Rp-cAMPS-pAB die Serotonin-induzierte, cAMP-abhängige PKA-II Aktivität inhibiert.

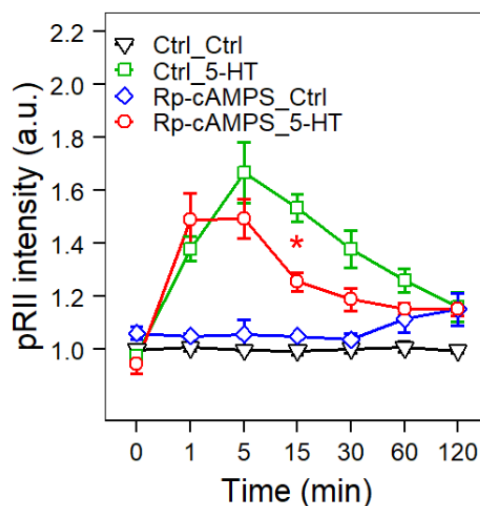


Abbildung 9 Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB inhibiert die PKA-II in Stimulationen mit Serotonin in primär sensorischen Neuronen von Ratten.

Zeitlicher Verlauf der pRII-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. Die Kontrollstimulationen (Ctrl_Ctrl und Rp-cAMPS_Ctrl) sind identisch zu Abb. 8. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB der Stimulation mit 5-HT. 5-HT: Serotonin, Rp-cAMPS: adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxybenzylester, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in dH₂O, pH 5,5, Endkonzentration 3 %; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

4.6. Rp-cAMPS-pAB hat keinen Effekt auf PKA-II nach Stimulation mit Capsaicin oder AITC

In nozizeptiven Neuronen führt Depolarisation durch KCl zu cAMP-unabhängiger, Opioid-unresponsiver PKA-II Aktivierung. Rp-cAMPS-pAB zeigten auf diese PKA-II Aktivierung keinen inhibitorischen Einfluss.¹

Mit diesem Experiment sollte getestet werden, ob das kompetitive cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB einen inhibitorischen Effekt auf die TRPA1- und TRPV1-induzierte PKA-II Aktivität hat.

Dazu wurden Übernachtskulturen der dissoziierten sensorischen Neurone der Ratte mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder einer Negativkontrolle (DMSO 3 % in dH₂O, pH 5,5) 30 Minuten lang prästimuliert. Anschließend erfolgte in einer 2-Stunden-Kinetik (0-120 Minuten) die Aktivierung der TRPA1- und TRPV1-Kanäle mittels AITC (TRPA1, 10 mM) und Capsaicin (TRPV1, 1 μ M). Als Negativkontrolle 2 wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % in PBS gelöst verwendet. 30-minütige Stimulation mit 40 mM KCl diente dazu einen Referenzwert für die Erregung der primär sensorischen Neurone zu generieren. Die Intensitäten der sekundären Antikörper der immunzytochemischen Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und ausgewertet. Die statistischen Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA. Die Post-hoc Analyse erfolgte mittels Bonferroni-Test.

Die Prästimulation mit dem kompetitiven cAMP-Antagonisten Rp-cAMPS-pAB hatte in den Stimulationen mit AITC über den gesamten Stimulationszeitraum keinen Effekt auf die TRPA1-induzierte pRII Intensitätssteigerung (Abb. 10 A). Rp-cAMPS-pAB verringerte in der 15-minütigen Stimulation die pRII Intensität am stärksten, sodass sie auf 85 % der Erhöhung der alleinigen AITC Stimulation sank. Dies erwies sich statistisch als nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Behandlung der nozizeptiven Neurone mit Rp-cAMPS-pAB hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch TRPV1-vermittelte, Capsaicin-induzierte pRII Intensitätssteigerung (Abb. 10 A). Rp-cAMPS-pAB erhöhte in der 5-minütigen Stimulation die pRII Intensität am stärksten, sodass sie auf das 1,1-fache der alleinigen Stimulation mit Capsaicin anstieg. Dies erwies sich als nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die TRP-Kanal-induzierte PKA-II Aktivität wird durch den kompetitiven cAMP Antagonisten Rp-cAMPS-pAB nicht beeinflusst.

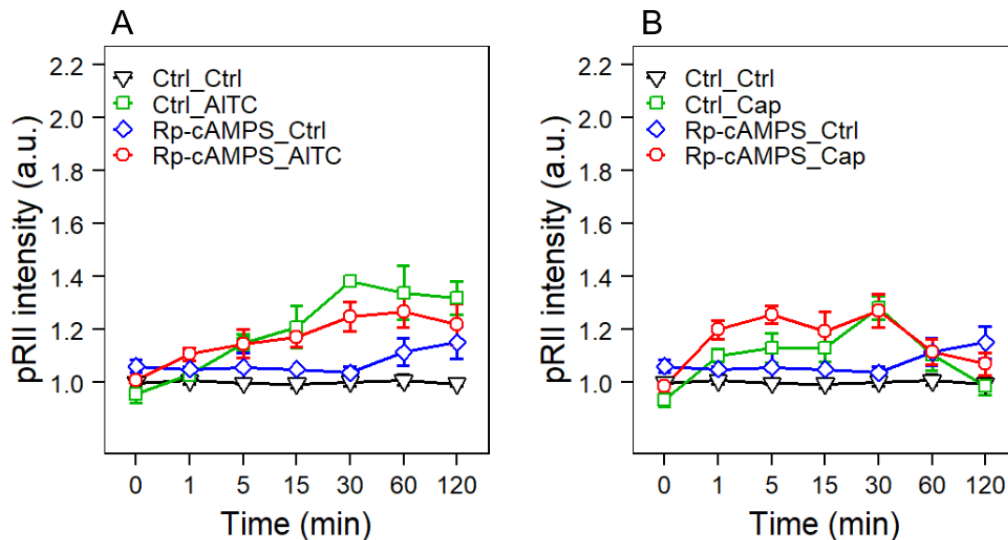


Abbildung 10: Rp-cAMPS-pAB hat keinen Einfluss auf die PKA-II nach Stimulationen mit AITC und Capsaicin in primär sensorischen Neuronen der Ratte:

A: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 µM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 µM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 µM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In **A** und **B** sind dieselben Kontrollstimulationen dargestellt, wie in Abb. 8.A-B: Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB und der Stimulation mit AITC bzw. Capsaicin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, Rp-cAMPS: adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxybenzyl ester, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in dH₂O, pH 5,5, Endkonzentration 3 %; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

4.7. Langzeitbehandlung mit Rp-cAMPS-pAB aktiviert ERK1/2

Die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB führte in Langzeitstimulationen zu einer erhöhten PKA-II Aktivität. Um zu testen, ob die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB einen Einfluss auf der PKA-II nachgeschaltete Strukturen beziehungsweise auf weitere Ebenen der Signaltransduktion hat, wurden primär sensorische Neurone der Ratte für 30 Minuten mit Rp-cAMPS-pAB (10 µg) oder einer Negativkontrolle (DMSO 3 % in dH₂O, pH 5,5) behandelt. Eine 2-Stunden Kinetik (0-120 Minuten) erfolgte im Anschluss mit der Negativkontrolle 2 (DMSO 0,1 % in PBS gelöst). Eine 30-minütige Stimulation mit 40 mM KCl diente als Referenzwert für eine Erregung der primär sensorischen Neuronen.

Die HCS-Mikroskopie wurde verwendet, um die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 zu quantifizieren und auszuwerten. Eine zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Test wurde zur statistischen Auswertung verwendet.

Behandlung mit Rp-cAMPS-pAB steigerte in der 120-minütigen Stimulation die ERK1/2 Aktivität signifikant auf das 1,26-Fache des Referenzwertes und auf das 1,19-Fache der Kontrolle zum Zeitpunkt der 120-minütigen Stimulation ($p < 0,05$, SEM $\pm 0,011$).

Die Stimulation mit Rp-cAMPS-pAB erhöht in Langzeitstimulationen die ERK1/2 Aktivität.

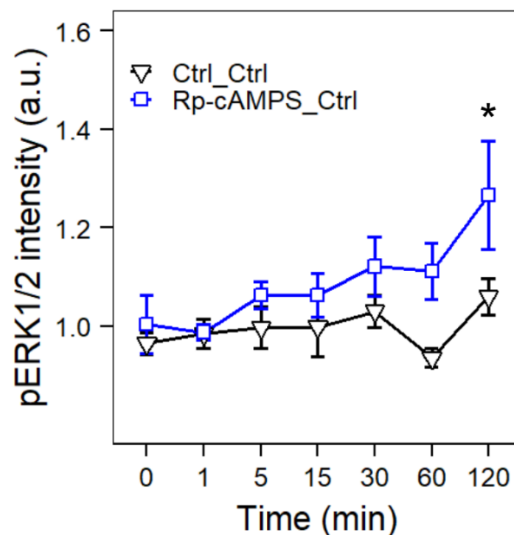


Abbildung 11: Langzeitbehandlung mit Rp-cAMPS-pAB steigert in primärsensorischen Neuronen die ERK1/2 Aktivität:

zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30 minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von Stimulation von 0-120 Minuten mit der Negativkontrolle. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB. Rp-cAMPS: adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxybenzylester, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in dH₂O, pH 5,5, Endkonzentration 3 %; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

4.8. Rp-cAMPS-pAB erhöht Aktivität von ERK1/2 nach Stimulation mit AICT, nicht aber nach Stimulation mit Capsaicin oder Serotonin

Das kompetitive inaktive cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB inhibierte in Stimulationen mit Serotonin die PKA-II Aktivität. In Stimulationen mit AITC oder Capsaicin zeigte es keinen Einfluss auf die PKA-II Aktivität. Behandlung von nozizeptiven primärsensorischen Neuronen mit Rp-cAMPS-pAB aktivierte die PKA-II in Langzeitbehandlungen.

Dieses Experiment diente zur Testung, ob Rp-cAMPS-pAB einen Einfluss auf der PKA-II nachgeschaltete Strukturen, oder weitere Ebenen der Signaltransduktion hat, wenn Stimulationen mit Serotonin oder den TRP-Kanal-Agonisten AITC oder Capsaicin folgen.

In diesem Experiment wurden Übernachtskulturen der dissoziierten sensorischen Neurone der Ratte mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder einer Negativkontrolle (DMSO 3 % in dH₂O, pH 5,5) 30 Minuten lang prästimuliert. Anschließend erfolgte in einer 2-Stunden-Kinetik (0-120 Minuten) die Aktivierung der TRPA1- und TRPV1-Kanäle mittels AITC (TRPA1, 10 mM) und Capsaicin (TRPV1, 1 μ M) und der 5HT₄-Rezeptoren mittels Serotonin (1 μ M). Als Negativkontrolle 2 wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % in PBS gelöst verwendet. Der Referenzwert für eine Erregung der primär sensorischen Neuronen wurde durch 30-minütige Stimulation mit 40 mM KCl generiert.

Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden angefertigt und die Intensität der fluoreszierenden Antikörper wurde mittels HCS-Mikroskopie quantifiziert und ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung wurde eine multifaktorielle ANOVA verwendet, der Bonferroni-Test diente als Post-hoc Analyse.

Weder in Stimulationen mit Serotonin, noch mit Capsaicin zeigte Rp-cAMPS-pAB einen statistisch signifikanten Effekt auf die ERK1/2 Aktivität in nozizeptiven Neuronen (Abb. 12 A und C).

In der 2-Stundenkinetik mit AITC steigerte Rp-cAMPS-pAB die ERK1/2 Aktivität kontinuierlich im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC, sodass in den 30- bis 120-minütigen Stimulationen eine signifikante Erhöhung der ERK1/2 Aktivität erreicht wurde. Die größte Steigerung der ERK1/2 Aktivität wurde in der 120-minütigen Stimulation erreicht und betrug das 1,572-Fache der durch die alleinige Stimulation mit AITC-induzierten ERK1/2 Aktivität ($p < 0,001$, SEM $\pm$ 0,372).

Dieses Ergebnis zeigt, dass das kompetitive cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB die ERK1/2 Aktivität in Stimulationen mit Serotonin und Capsaicin nicht beeinflusst, es aber widererwarten zu einer Steigerung der ERK1/2 Aktivität in Stimulationen mit AITC führt.

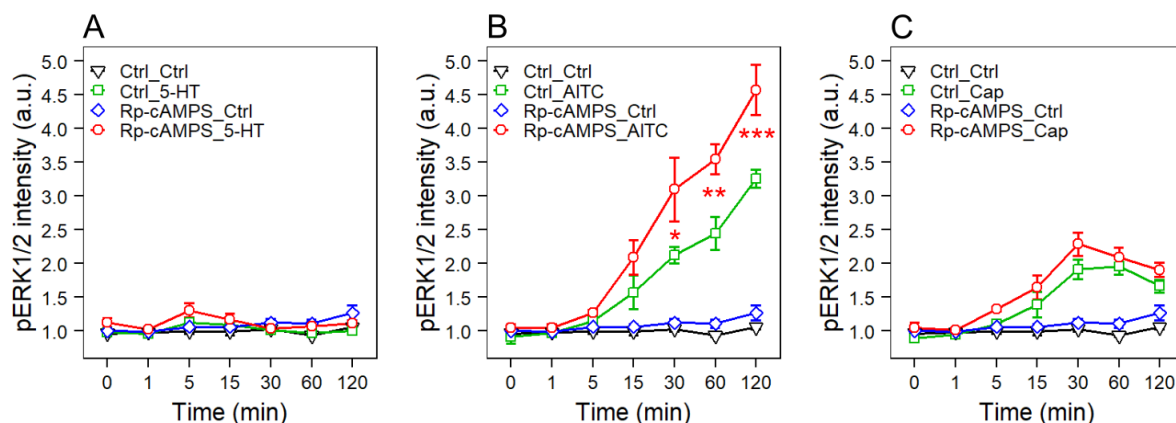


Abbildung 12 Rp-cAMPS-pAB erhöht die Aktivität der ERK1/2 in Stimulationen mit AITC, nicht aber in Stimulationen mit Capsaicin oder Serotonin.

A: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **C:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB (10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **A-C** zeigen dieselben Kontrollstimulationen, wie Abb. 11. **A-C:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). 5-HT: Serotonin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, Rp-cAMPS: adenosine-cAMPS, Rp-isomer, 4-acetoxymethylbenzylester, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in dH₂O, pH 5,5, Endkonzentration 3 %; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

4.9. Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX erhöht die basale PKA-II Aktivität

Da Calciumeinstrom durch den spannungsabhängigen Cav1.2 Kanal in primär nozizeptiven Neuronen zur cAMP-unabhängigen und Opioid-unresponsiven PKA-II Aktivierung führt,¹ sollte durch dieses Experiment der Einfluss des Phosphodiesterasehemmers 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) und somit der Einfluss erhöhter cAMP-Konzentrationen¹²⁰⁻¹²² auf die PKA-II Aktivität getestet werden.

Für dieses Experiment wurden Übernachtskulturen dissoziierter sensorischer Neurone der Ratte für 30 Minuten mit IBMX (100 µM) oder einer Negativkontrolle 1 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %) prästimuliert. Danach erfolgte in einer 2-Stunden-Kinetik (0-120 Minuten) die Stimulation mit der Negativkontrolle 2 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %). Eine 30minütige Stimulation mit 40 mM KCl diente als Referenzwert für eine Erregung der primär sensorischen Neuronen.

Immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 wurden angefertigt und mit Hilfe von HCS-Mikroskopie wurden die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper quantifiziert und anschließend ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet. Als Post-hoc Analyse diente der Bonferroni-Test.

Die Behandlung mit IBMX steigerte über den gesamten Stimulationszeitraum die pRII Intensität signifikant. IBMX steigerte die PKA-II Aktivität dabei um mindestens das 1,24-Fache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13, 60 Minuten: $p < 0,05$ SEM $\pm 0,044$). IBMX steigerte die PKA-II Aktivität auf maximal das 1,356-Fache der Kontrolle in der 15-minütigen Stimulation (Abb. 13, $p < 0,001$, SEM $\pm 0,055$).

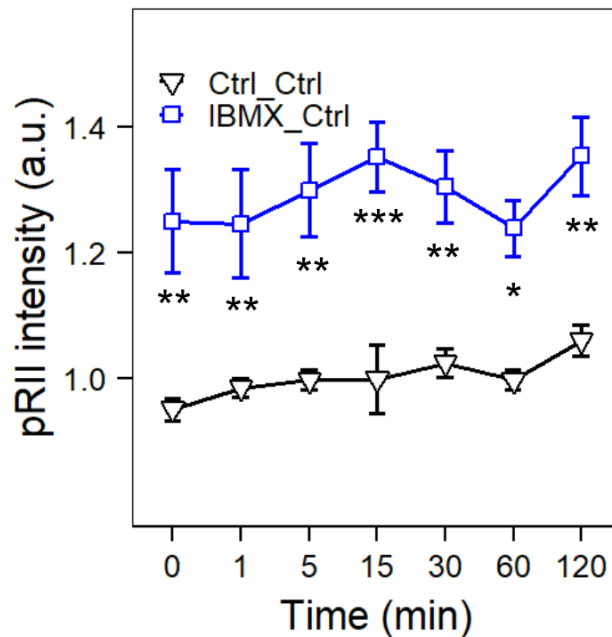


Abbildung 13: Prästimulation mit IBMX erhöht die basale Aktivität der PKA-II in primär sensorischen Neuronen der Ratte

zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30 minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von Stimulation von 0-120 Minuten mit der Negativkontrolle. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit IBMX. IBMX: 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1%; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%) Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 4$.

Dieses Experiment zeigt, dass Prästimulation mit IBMX die basale Aktivität der PKA-II steigert.

4.10. Prästimulation mit IBMX verlängert die Aktivierung von PKA-II nach Stimulation mit Serotonin, nicht aber nach Stimulation mit AITC oder Capsaicin

Die durch Depolarisation hervorgerufene und durch $Ca_v1.2$ medierte Aktivierung der PKA-II ist unabhängig von cAMP und unresponsiv auf Opiode. Prästimulation mit IBMX zeigte außer Erhöhung der basalen PKA-II Aktivität keinen Einfluss auf die durch KCl-induzierte Aktivierung der PKA-II.¹ Durch dieses Experiment sollte getestet werden, ob der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX einen Einfluss auf die TRP-vermittelte Aktivierung der PKA-II hat. Stimulation mit Serotonin diene als Positivkontrolle.

Übernachtskulturen dissoziierter primär sensorischer Neurone der Ratte wurden für dieses Experiment für 30 Minuten mit IBMX (100 μ M) oder einer Negativkontrolle 1 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %) prästimuliert. Danach erfolgte in einer 2-Stunden-Kinetik (0-120 Minuten) die Stimulation der TRPA1-Kanäle mittels AITC (10 mM) und der TRPV1-Kanäle mittels Capsaicin (1 μ M). Die Stimulation der 5HT4-GPC-Rezeptoren erfolgte mittels Serotonin (1 μ M).

Mittels HCS-Mikroskopie wurden die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper der immunzytochemischen Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 quantifiziert und ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet, der Bonferroni-Test diente zur Post-hoc Analyse.

In den Stimulationen mit Serotonin steigerte die Vorbehandlung mit IBMX die Serotonin-induzierte pRII Intensität über den gesamten Stimulationsverlauf. Bis auf die einminütige Stimulation war die durch IBMX gesteigerte pRII Intensität statistisch signifikant. IBMX erhöhte in der 60-minütigen Stimulation die PKA-II Aktivität am stärksten, sodass sie auf das 4,09-Fache der Erhöhung der alleinigen Serotonin-Stimulation stieg und auf das 1,48-Fache in absoluten Werten ($p < 0,001$, SEM $\pm 0,09$). Die alleinige Stimulation mit Serotonin erreichte in der 5-minütigen Stimulation ein Maximum der PKA-II Aktivität. Danach kam es zu einem Abfall der PKA-II Aktivität, je länger die Stimulationen andauerten. Die Prästimulation mit IBMX führte in den Stimulationen mit Serotonin zu einer verlängerten Aktivierung der PKA-II (Abb. 14 A). Auch nach Normalisierung der Daten auf den Zeitpunkt 0 der Negativkontrolle verlängerte IBMX die Aktivierung der PKA-II, diese Verlängerung zeigte sich jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 15 A).

In den Stimulationen mit AITC steigerte die Prästimulation mit IBMX über den gesamten Zeitverlauf die AITC-induzierte pRII Intensität. In den 15- bis 60-minütigen Stimulationen war die pRII Intensitätssteigerung signifikant. Die größte Intensitätssteigerung fand in der 60-minütigen Stimulation statt und stieg auf das 2,25-Fache der Erhöhung der alleinigen AITC-Stimulation an ($p < 0,01$, SEM $\pm 0,084$). IBMX verlängerte die AITC-induzierte PKA-II Aktivierung nicht (Abb. 14 B). Nach Normalisierung der Daten, zeigte IBMX keinen Einfluss auf die AITC-induzierte PKA-II Aktivierung (Abb. 15 B).

Prästimulation mit IBMX steigerte die Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität über den gesamten Stimulationszeitraum. Die Aktivitätssteigerung war in den 0- bis 60-minütigen Stimulationen statistisch signifikant. Die größte PKA-II Aktivierung fand in der 30-minütigen Stimulation statt und betrug eine Steigerung auf das 1,25-Fache in absoluten Werten, bzw. eine Steigerung um das 2,52-Fache der Erhöhung der alleinigen Capsaicin-Stimulation ($p < 0,01$, SEM $\pm 0,091$, vgl. Abb. 15 C). Nach Normalisierung der Daten steigerte die Prästimulation mit IBMX die Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität nicht (Abb. 15 C).

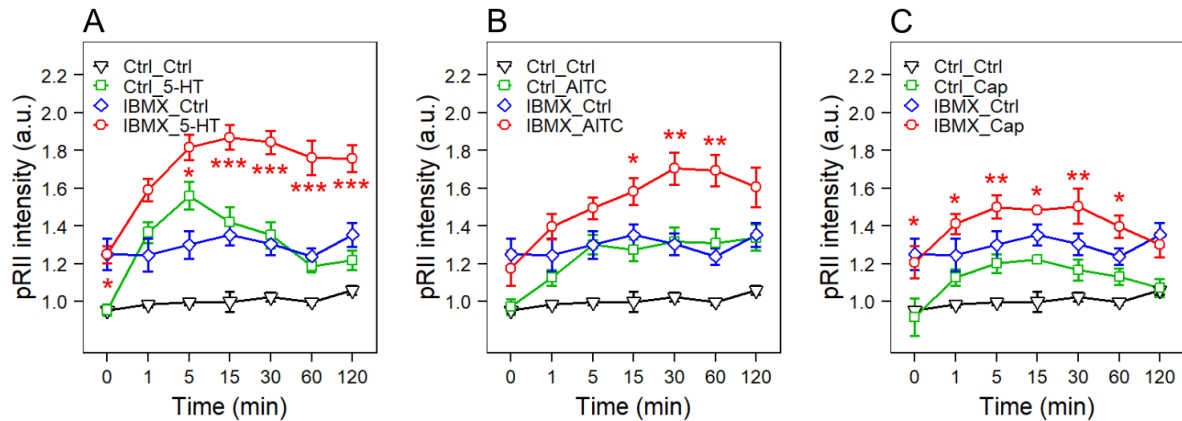


Abbildung 14: Prästimulation mit IBMX verlängert die Serotonin-induzierte PKA-II Aktivität, nicht aber die AITC- oder Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität

A: Zeitlicher Verlauf der pRII-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **C:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **A-C** zeigen dieselben Kontrollstimulationen wie Abbildung 13. **A-C:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit IBMX der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). 5-HT: Serotonin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, IBMX: 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

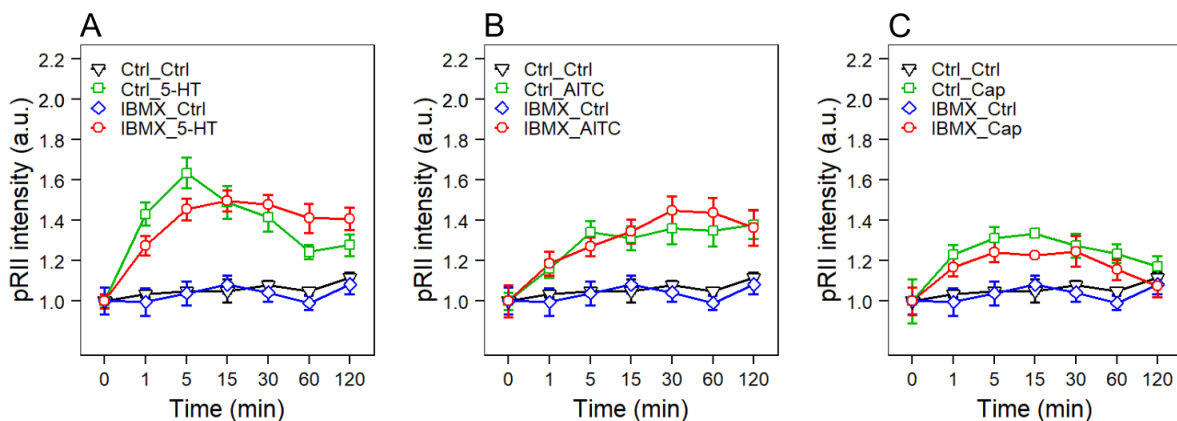


Abbildung 15: Darstellung der Normalisierten Daten der pRII Intensität der Prästimulation mit IBMX.

A: Zeitlicher Verlauf pRII-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pRII-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **C:** Zeitlicher Verlauf der pRII-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In **A-C** sind die gleichen Kontrollstimulationen wie in Abb. 14 als auf den Zeitpunkt 0 normalisierte Daten dargestellt. **A-C:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit IBMX der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). 5-HT: Serotonin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die Prästimulation mit IBMX, wie bereits in der Literatur gezeigt werden konnte, die Aktivierung der PKA-II nach Stimulation mit Serotonin

verlängert.^{1,61} Stimulation mit Serotonin eignet sich daher als Positivkontrolle um eine cAMP-abhängige PKA-II Aktivierung zu untersuchen.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX die TRP-Kanal vermittelte PKA-II Aktivierung nicht verlängert, sondern nur die basale PKA-II Aktivität erhöht.

4.11. Prästimulation mit IBMX hat keinen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität

Das folgende Experiment diente zur Testung, ob die Prästimulation mit IBMX die Aktivität von ERK1/2 beeinflusst. Dazu wurden Übernachtskulturen von primär sensorischen Neuronen der Ratte für 30 Minuten mit IBMX (100 μ M) oder einer Negativkontrolle 1 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %) prästimuliert. Anschließend erfolgte in einer 2-Stunden Kinetik (0-120 Minuten) die Stimulation entweder mit einer Negativkontrolle 2 (DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1 %), dem TRPA1-Agonisten AITC (10 mM), dem TRPV1 Agonisten Capsaicin (1 μ M) oder dem 5HT4-GPC-Rezeptor-Agonist Serotonin (1 μ M).

Mit Hilfe der HCS-Mikroskopie wurden die Intensitäten der fluoreszierenden sekundären Antikörper der immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 quantifiziert und ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet und als Post-hoc Analyse der Bonferroni-Test.

IBMX führte zu einem Anstieg der pERK1/2 Intensität. Nach statistischer Auswertung zeigte sich, dass der Anstieg der basalen pERK1/2 Intensität zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant war.

Die alleinige Prästimulation mit IBMX veränderte die basale pERK1/2 Intensität nicht.

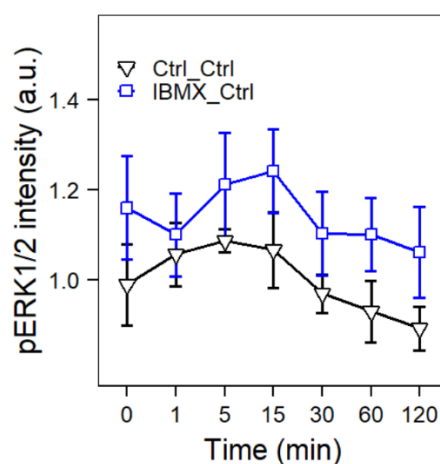


Abbildung 16: Prästimulation mit IBMX hat keinen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität in primär sensorischen Neuronen von Ratten nicht.

zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von Stimulation von 0-120 Minuten mit der Negativkontrolle. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. IBMX: 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: DMSO in PBS, Endkonzentration 0,1%; Stimulation: DMSO in PBS gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1%). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. $n = 4$.

Die Prästimulation mit IBMX führt in den Stimulationen mit Serotonin zu einer Erhöhung der pERK1/2 Intensität. Nach statistischer Auswertung, zeigte sich diese Erhöhung zu keinem Zeitpunkt als statistisch signifikant. IBMX führte in der 15-minütigen Stimulation mit Serotonin zum größten Anstieg der pERK1/2 Intensität, auf das 1,2-fache. Dies war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

IBMX erhöhte in den 0- bis 1-minütigen Stimulationen mit AITC die pERK1/2 Intensität. In den 5- bis 120-minütigen Stimulationen verringerte IBMX jedoch die pERK1/2 Intensität. Die durch IBMX hervorgerufenen Änderungen der pERK1/2 Intensität waren nach statistischer Auswertung nicht signifikant.

IBMX führte in den Stimulationen mit Capsaicin zu einer Erhöhung der pERK1/2 Intensität. In der 30-minütigen Stimulation erhöhte IBMX die pERK1/2 Intensität am stärksten, sodass sie auf das 1,04-fache der alleinigen Stimulation mit Capsaicin anstieg. Diese Intensitätserhöhung war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Prästimulation mit IBMX hatte keinen Einfluss auf die ERK1/2 nach Stimulation mit Serotonin. Des Weiteren beeinflusste die Prästimulation mit IBMX weder die durch AITC-induzierte noch die Capsaicin-induzierte ERK1/2 Aktivierung.

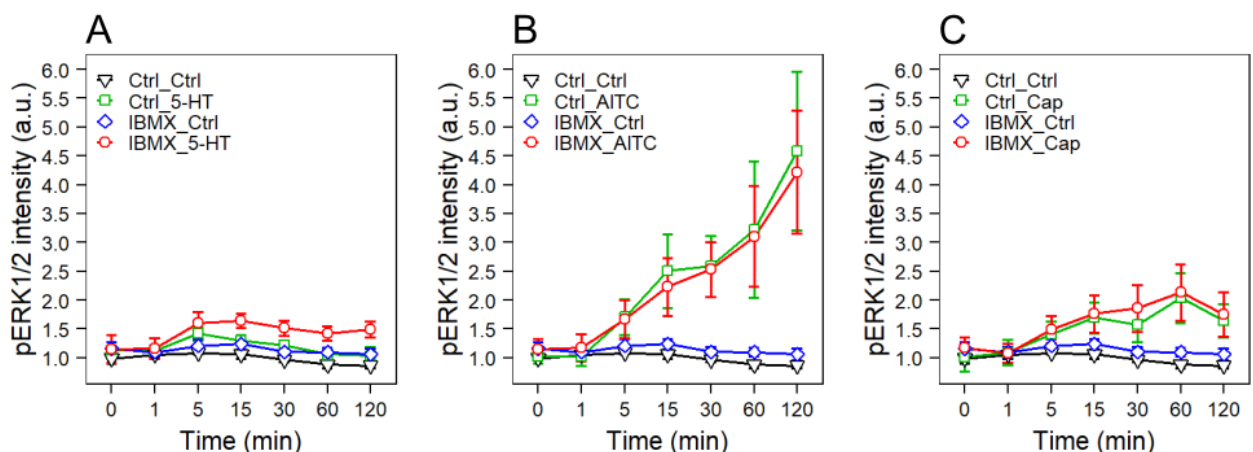


Abbildung 17: IBMX hat keinen Einfluss auf die pERK1/2 Intensität nach Stimulationen mit Serotonin, AITC oder Capsaicin in primär sensorischen Neuronen der Ratte:

A: Zeitlicher Verlauf pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Serotonin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit AITC (10mM) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. **C:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2-Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit IBMX (100 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C sind dieselben Kontrollstimulationen wie in Abbildung 16 dargestellt. **A-C:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Prästimulation mit Negativkontrolle und der Prästimulation mit IBMX der jeweiligen Stimulation (5-HT, AITC, Capsaicin). IBMX: 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 5-HT: Serotonin, AITC: Allylisothiocyanat, Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), $n = 4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass IBMX keinen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität hat.

4.12. Der TRPA1-Agonist PF4840154 hat in hohen Dosen einen Effekt auf PKA-II, jedoch nicht auf ERK1/2

Der nicht-selektive, für Calcium permeable Kationenkanal TRPA1 kann durch verschiedene elektrophile sowie nicht-elektrophile Verbindungen aktiviert werden.¹²³⁻¹²⁵ Eine häufig verwendete Substanz ist das aus Senföl gewonnene, flüchtige AITC.^{97, 124-126} AITC kann zudem mit anderen Kationenkanälen interagieren.^{127, 128}

Daher wurden in den zuvor beschriebenen Experimenten die Zellkammern, in denen die Stimulation der primär sensorischen Neurone mit AITC stattfand, versiegelt.

Die Substanz PF-4840154 (*Caiman Chemicals*) wurde spezifisch als Agonist für TRPA1 entwickelt und ist nicht volatil.^{123, 125, 129}

Ziel der folgenden Experimente war es zu prüfen, ob PF-4840154 in unterschiedlichen Konzentrationen eine Aktivierung der PKA-II und ERK1/2 in primärsensorischen Neuronen der Ratte bewirkt.

Dazu wurden Übernachtskulturen primär sensorischer Neurone der Ratte in einem Dosis-Wirkungs-Experiment mit verschiedenen Konzentrationen von PF-4840154 (0 μ M, 0,04 μ M, 0,2 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 125 μ M) für 2 Minuten und 40 Sekunden stimuliert. Die Stimulation mit KCl in verschiedenen Konzentrationen (0-80 mM) diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde DMSO in PBS gelöst verwendet (Endkonzentration 0,25 %). AITC in verschiedenen Konzentrationen (0-125 mM) diente als Vergleich als weiterer TRPA1 Agonist.

Zur Detektion der Aktivität von PKA-II und ERK1/2 in primär sensorischen Neuronen, wurden immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität der sekundären Antikörper wurde mit Hilfe der *High Content Screening* Mikroskopie quantifiziert und ausgewertet.

Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorielle ANOVA, der Bonferroni-Test diente als Post-hoc Analyse. Die Grafen wurden mit GraphPad Prism 6 erstellt. Es wurde eine nichtlineare Regression mit Kurvenanpassung (drei Parameter, Standard Hill Slope) verwendet.

Die Negativkontrolle führte zu keiner Änderung der pRII Intensität.

Stimulationen mit PF-4840154 führten bis zu einer Konzentration von 5 μ M zu keiner Änderung der PKA-II Aktivität. PF-4840154 führte ab einer Konzentration von 25 μ M zu einer signifikanten Aktivierung der PKA-II. Dieser Aktivitätsanstieg setzte sich in den Konzentrationen von 125 μ M fort und erreichte einen maximalen Anstieg auf das 1,2-Fache des Kontrollwerts ($p < 0,001$, SEM $\pm$ 0,025).

Stimulationen mit AITC führten ab einer Konzentration von 1 mM zu einer signifikanten PKA-II Aktivierung. Je höher die verwendete AITC Konzentration, desto größer war die

Steigerung der PKA-II Aktivität. Das Maximum der durch AITC-induzierten PKA-II Aktivität wurde bei einer 125 mM Stimulation erreicht und es kam zu einem Anstieg auf das 1,587-Fache des Ausgangswerts ($p < 0,001$, SEM $\pm$ 0,054).

Stimulationen mit KCl bewirkten ab einer Konzentration von 20 mM einen signifikanten Anstieg der PKA-II Aktivität.

Die mittleren effektiven Dosen in diesem Experiment waren wie folgt: die EC_{50} von PF-4840154 betrug 20,22 μ M, die EC_{50} von AITC betrug 7,652 mM, die EC_{50} von KCl betrug 13,36 mM. Die logarithmischen EC_{50} stellten sich wie folgt dar: PF-4840154: -4,696 (95 % KI: -5,211 bis -4,178), AITC: -2,116 (95 % KI: -2,414 bis -1,818) und KCl -1,874 (95 % KI: -2,150 bis -1,598). Im Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von PF-4840154, AITC und KCl miteinander, zeigte sich dass sich die Kurven unterscheiden ($p < 0,0001$, $F_{(6, 158)} 7,152$).

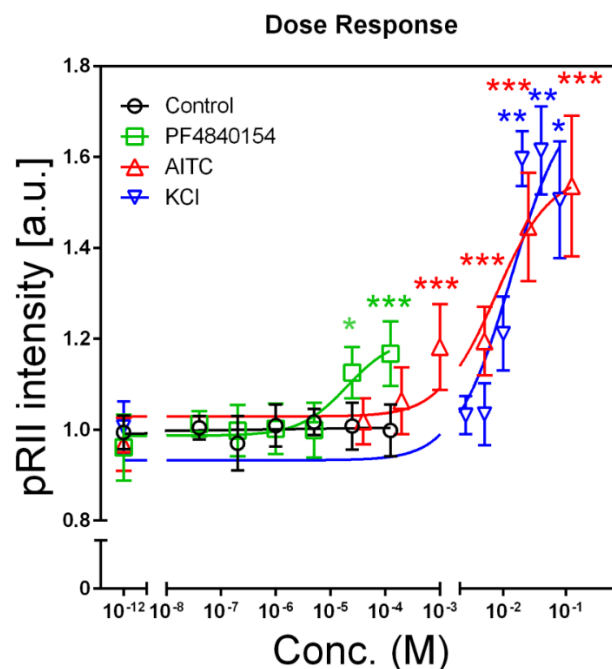


Abbildung 18: Die Stimulation mit PF-4840154 in höheren Konzentrationen von führte zur signifikanten Erhöhung der pRII- Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.

Dosis-Antwort Kurven der pRII-Intensität in primär sensorischen Neuronen der Ratte ohne vorausgegangene Prästimulation. Stimulation mit PF-4840154, Negativkontrolle, AITC oder KCl für 2 Minuten 40 Sekunden. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Stimulation mit Negativkontrolle und der jeweiligen Stimulation, $F_{(6, 158)} 7.152$ Sum of squares, PF4840154: PF-4840154, Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in PBS gelöst) KCl: Kaliumchlorid, AITC: Allylisothiocyanat, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 8$.

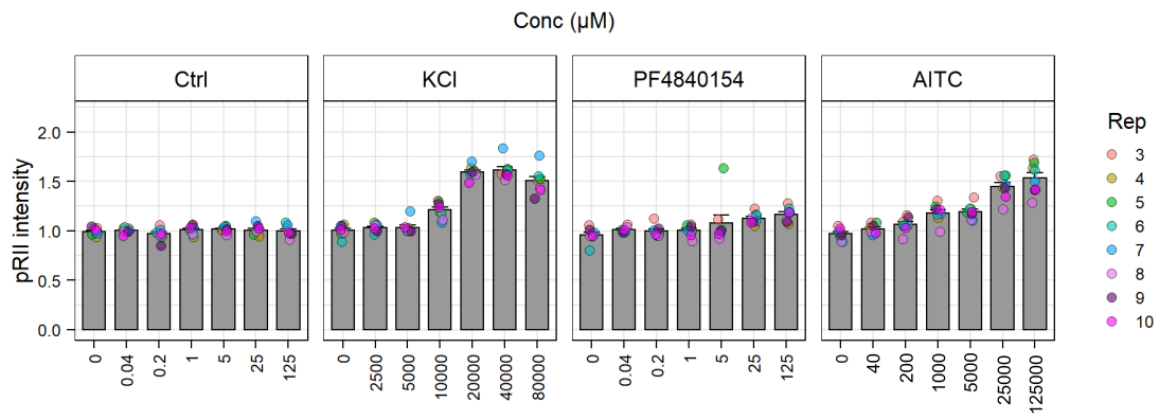


Abbildung 19: Höhere Konzentrationen von PF-4840154 führten zur Erhöhung der pRII-Intensität.

Balkendiagramm der mittleren pRII-Intensität in primär sensorischen Neuronen der Ratte bei verschiedener Dosierungen von Negativkontrolle, KCl, PF-4840154 und AITC, ohne vorausgegangene Prästimulation. Stimulation mit PF-4840154 (0 μM -125 μM), Negativkontrolle (0 μM -125 μM), KCl (0 mM – 80mM), AITC (0 mM-125 mM) für 2 Minuten 40 Sekunden, Stimulation mit KCl (40 mM) dient als Referenzwert, PF4840154: PF-4840154, Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in PBS gelöst) KCl: Kaliumchlorid, verschiedene Punkte zeigen die Intensitäten der einzelnen Replikate an. n = 8.

In der Auswertung der pERK1/2 Intensität führte die Stimulation mit der Negativkontrolle (DMSO in PBS gelöst) zu keiner Änderung der pERK1/2 Intensität.

Die Stimulation mit PF-4840154 beeinflusste die ERK1/2 Aktivität in primär sensorischen Neuronen selbst in hohen Dosen nicht. Eine EC_{50} -Wert für PF-4840154 konnte mit dem Modell (3 Parameter-fit Modell) nicht bestimmt werden. .

Stimulationen mit AITC steigerten in den Konzentrationen von 5 mM, 25 mM und 125 mM die ERK1/2 Aktivität signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Die größte Steigerung der ERK1/2 Aktivität war in der 25 mM Stimulation zu beobachten. Es kam zu einem Anstieg auf das 1,402-Fache ($p < 0,001$, SEM $\pm 0,032$) des Ausgangswerts. Die EC_{50} der pERK1/2-Intensität von AITC betrug 5,475 (95 % KI 1,691 bis 17,72).

Die Stimulationen mit KCl in den Dosierungen von 0 mM bis 80 mM führten zu keiner signifikanten Änderung der pERK1/2-Intensität. Die EC_{50} der KCl-Stimulation ließ sich trotzdem berechnen und betrug 4,180 mM (95 % KI 0,8177 bis 21,36).

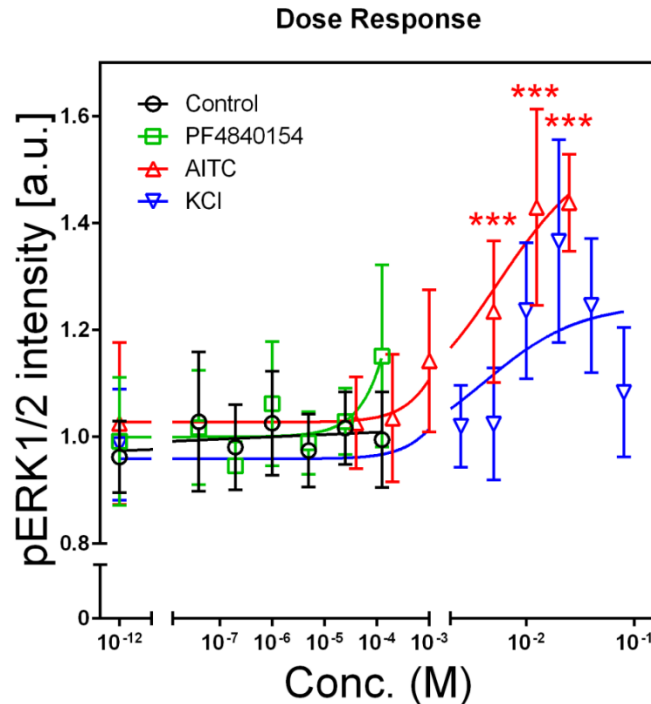


Abbildung 20: Die Stimulation mit PF-4840154 in höheren Konzentrationen von führte zu keiner signifikanten Erhöhung der pRII- Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.

Dosis-Antwort Kurven der pERK1/2-Intensität in primär sensorischen Neuronen der Ratte ohne vorausgegangene Prästimulation. Stimulation mit PF-4840154, Negativkontrolle, AITC oder KCl für 2 Minuten 40 Sekunden. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Stimulation mit Negativkontrolle und der jeweiligen Stimulation, PF4840154: PF-4840154, Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in PBS gelöst) KCl: Kaliumchlorid, AITC: Allylisothiocyanat, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n = 8$

4.13. Hohe Dosen von PF4840154 induzieren Calciuminflux

Das vorherige Experiment zeigte, dass eine Stimulation mit dem TRPA1-Agonisten PF-4840154 erst ab einer Konzentration von 25 μM zu einer signifikanten Erhöhung der pRII-Intensität und somit einer PKA-II Aktivierung führt. Im Vergleich zu AITC war der Effekt von PF-4840154 auf die PKA-II geringer ausgeprägt.

In der Literatur wird die EC_{50} für die Aktivierung der TRPA1-Kanäle der Ratte wurde mit $97 \pm 4.7 \text{ nM}$ angegeben. In In-vivo-Experimenten zeigte bereits eine Konzentration von 30 nM eine Wirkung.¹²⁵ Hoebart et al. konnten mit PF-4840154 in einer Konzentration von 2 μM eine Aktivierung der TRPA1-Kanäle nachweisen.¹²⁹ Diese Konzentrationen liegen unter den im Vorexperiment benötigten Konzentrationen von PF-4840154.

Frühere Studien verwendeten den Calciumeinstrom in die Zellen als funktionellen Ausleseparameter zur Beurteilung der Wirksamkeit von PF-4840154.^{125,129}

Im vorliegenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Stimulation von primär sensorischen Neuronen der Ratte mit PF-4840154 in den Konzentrationen von 5 μM bis 125 μM einen Calciumeinstrom auslösen kann.

Hierzu wurden Übernachtskulturen der primär sensorischen Neuronen der Ratte mit Calbryte 360 AM (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Anschließend wurden Zellbilder mit der *Leica Application Suite X.Ink Life Science Software* in einer Geschwindigkeit von 1 Hz aufgenommen.

Zunächst wurde eine Grundintensität über 20 Sekunden aufgenommen. Anschließend wurden die Stimulantien hinzugegeben. PF-4840154 wurde in den Konzentrationen 5 μ M, 25 μ M oder 125 μ M und AITC wurde in den Konzentrationen 5 mM, 25 mM oder 125 mM verwendet. Als Positivkontrolle diente Kaliumchlorid in einer Endkonzentration von 40 mM. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO in Salz-Lösung verwendet (Endkonzentration 1,28 %). Nach Applikation der jeweiligen Stimulantien wurden für 40 Sekunden Aufnahmen in einer Geschwindigkeit von 1 Hz gemacht, um einen Calciumeinstrom zu dokumentieren.

Es folgte die Zugabe von 40 mM Kaliumchlorid und die Bildaufnahme für weitere 20 Sekunden in einer Geschwindigkeit von 1 Hz. Dies diente zur Identifizierung der grundsätzlich reaktionsfähigen Zellen.

Nur Zellen, die auf Kaliumchlorid reagierten, wurden für die folgende Auswertung berücksichtigt.

Im Mittel zeigten 3,09 % der mit der Negativkontrolle behandelten Zelleneinen Calciumeinstrom (SD $\pm$ 2,03).

Im Mittel zeigten 18,11 % (SD $\pm$ 4,33), der mit 5 mM AITC stimulierten Zellen einen Calciumeinstrom. Die Stimulationen mit AITC in höheren Konzentrationen führte zu einem höheren Anteil an mit Calciumeinstrom-reagierender Zellen. Bei 25 mM betrug dieser im Mittel 47,03 % (SD $\pm$ 6,05) und bei 125 mM 51,44 % (SD $\pm$ 11,19).

Der Anteil der Zellen, die einen Calciumeinstrom nach Stimulation mit PF-4840154 in einer Konzentration von 5 μ M zeigten, betrug im Mittel 3,27 % (SD $\pm$ 2,43). Die Konzentrationen von 25 μ M und 125 μ M führte im Mittel zu einem Anteil von 8,60 % (SD $\pm$ 4,14), bzw. 15,05 % (SD $\pm$ 3,47) an reagierender Zellen (Abb. 28). Der Anteil der Zellen, die einen Calciumeinstrom zeigten war sowohl bei den Stimulationen mit AITC, als auch mit PF-4840154 konzentrationsabhängig.

Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab den Calciumeinstrom betreffend einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Konditionen ($F(2,4) = 46,9$, $p = 1,75 \times 10^{-12}$).

Als Posthoc Test wurde der Tuckey-Test mit einem gewähltem Alpha-Niveau von 0,05 verwendet. Es zeigte sich, dass die Positivkontrolle (40 mM KCl) zu einen signifikant höheren Anteil an Calciumeinstrom-zeigenden Neurone im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung) führte.

Die Stimulationen mit AITC in den Konzentrationen von 25 mM und 125 mM führten im Vergleich zur Negativkontrolle jeweils zu einem signifikant höheren Anteil an Neuronen, die einen Calciumeinstrom aufwiesen. Weder die Stimulation mit AITC in der Konzentration 5 mM noch die Stimulationen mit PF-4840154 in den Konzentrationen von 5 μ M bis 125 μ M zeigten einen signifikant höheren Anteil an Calciumeinstrom-zeigenden Neuronen im Vergleich zur Negativkontrolle.

In diesen Stimulationen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Positivkontrolle mit KCl.

Ein separater t-Test zwischen der Negativkontrolle und der Stimulation mit 125 μ M PF-4840154 ergab allerdings eine signifikante Zunahme des Calciumeinstroms ($p < 0,05$).

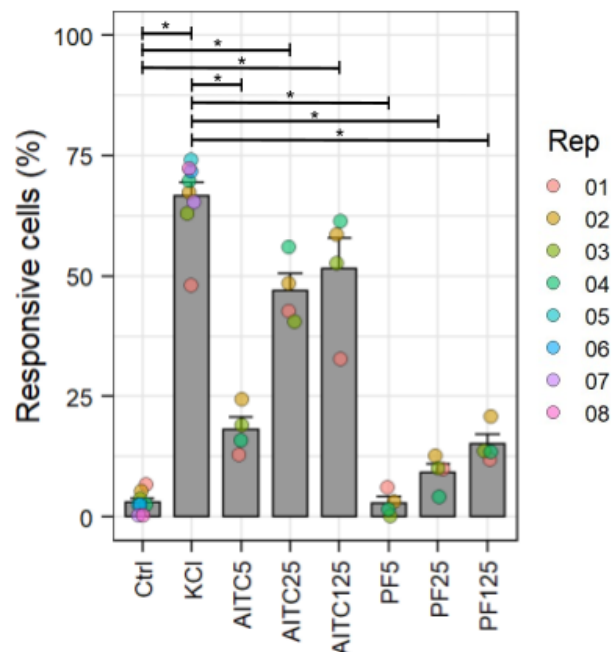


Abbildung 21: Anteil der Zellen, die nach Stimulation einen Calciumeinstrom zeigten

Balkendiagramm des Prozentsatzes der primär sensorischen Neurone, die einen Calciumeinstrom zeigten vor Hinzugabe der 40 mM KCl zum Abschluss. Zellen wurden entweder mit AITC in den Dosierungen 5 mM, 25 mM, 125 mM, oder mit PF-4840154 in den Dosierungen 5 μ M, 25 μ M oder 125 μ M behandelt. KCl (40 mM) diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel (DMSO in Saliner-Lösung Endkonzentration 1,28 %) verwendet. Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test, * $p < 0,05$, PF5: PF-4840154 5 μ M, PF25: PF-4840154 25 μ M, PF125: PF-4840154 125 μ M, AITC5: Allylisoithiocyanat 5 mM, AITC25: Allylisoithiocyanat 25 mM, AITC125: Allylisoithiocyanat 125 mM, Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung) KCl: Kaliumchlorid, verschiedene Punkte zeigen den Prozentsatz der einzelnen Replikate an. $n = 4$, Weitere statistisch signifikante Unterschiede wurden der Übersicht halber weggelassen $p < 0,05$: AITC5 und AITC25, AITC5 und AITC125, AITC25 und PF5, AITC25 und PF25, AITC25 und PF125, AITC125 und PF5, AITC125 und PF25, AITC125 und PF125.

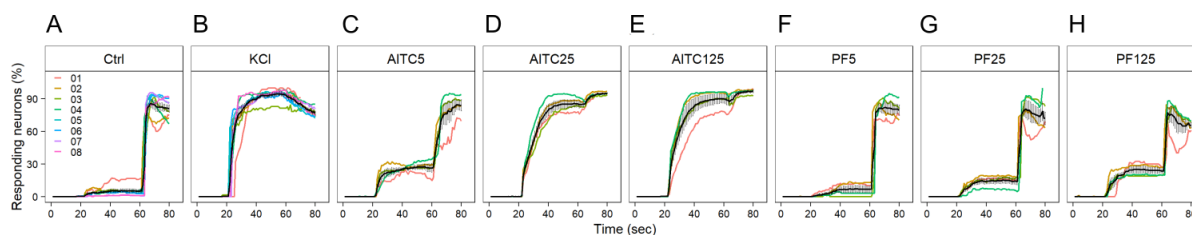


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils der KCl-responsiven reagierenden, primär sensorischen Neurone der Ratte.

Färbung mit Calbryte 260 AM Darstellung des Mittelwertes (schwarz) und der einzelnen Replikate. **A-H:** Zugabe KCl 40 mM nach 60 Sekunden **A:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung Endkonzentration 1,28 %, 20-40 Sekunden), **B:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit der Positivkontrolle (KCl 40 mM, 20-40 Sekunden), **C:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit AITC 5 mM (20-40 Sekunden), **D:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit AITC 25 mM (20-40 Sekunden), **E:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit AITC 125 mM (20-40 Sekunden), **F:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit PF-4840154 5 μM (20-40 Sekunden), **G:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit PF-4840154 25 μM (20-40 Sekunden), **H:** zeitlicher Verlauf der reagierenden Neurone, Stimulation mit PF-4840154 125 μM (20-40 Sekunden), A-H: schraffierte Flächen zeigen die Standardabweichung von dem Mittelwert an. Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung Endkonzentration 1,28%, KCl: Kaliumchlorid 40 mM, AITC5: Allylisoithiocyanat 5 mM, AITC25: Allylisoithiocyanat 25 mM, AITC125 Allylisoithiocyanat 125 mM, PF5: PF-4840154 5 μM, PF25: PF-4840154 25 μM, PF125: PF-4840154 125 μM, n = 4.

Im Vergleich der mittleren Intensitäten der Replikate zeigte sich, dass die Stimulationen mit PF-4840154 zu einem Anstieg der Calbryte 630 AM Intensität führten, welcher dosisabhängig war. In den Stimulationen mit PF-4840154 wurde der maximale Calbryte 630 AM Intensitätsanstieg nach etwa 40 Sekunden erreicht. Danach kam es jeweils zu einem Rückgang der Intensität, jedoch nicht zurück bis auf das Ausgangsniveau. Nach Zugabe von 40 mM KCl kam es jeweils zu einem erneuten Anstieg der Calbryte 630 AM Intensität. Die Stimulationen mit der Negativkontrolle und mit PF-4840154 in einer Konzentration von 5 μM zeigten keine signifikant voneinander abweichenden Signalverläufe. Stimulation mit 5 mM AITC und 125 μM PF-4840154 führten zu einem vergleichbar hohen Anstieg der Calbryte 630 AM Intensität um den Wert von 0,19.

Die Stimulationen mit AITC in den verschiedenen Dosierungen führten zu einem Anstieg der Calbryte 630 AM Intensität. Auch hier zeigte sich ein Rückgang der Intensität nach Erreichen des Intensitätsmaximums. Dieser war deutlich geringer im Vergleich zu den Stimulationen mit PF-4840154.

AITC in den Konzentrationen von 25 mM und 125 mM induzierte einen stärkeren Anstieg der Calbryte 360 AM-Intensität als die Stimulation mit PF-4840154 in allen getesteten Konzentration, mit 5 mM AITC sowie mit der Negativkontrolle. Die maximale erreichte Intensität in den Stimulationen mit AITC in den Konzentrationen 25 mM und 125 mM war ähnlich dem durch die Positivkontrolle induzierten Intensitätsanstieg

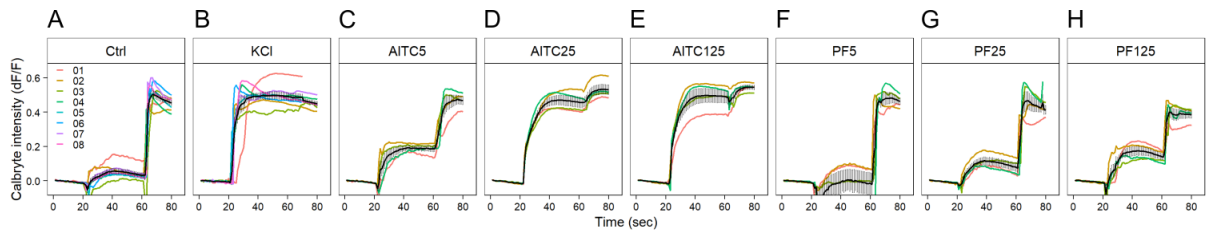


Abbildung 23: zeitlicher Verlauf der Calbryte 630 AM Intensität in auf KCl-responsiven, primär sensorischen Zellen der Ratte.

Darstellung des Mittelwertes aller Replikate (schwarz) und der einzelnen Replikate, **A-H**: Zugabe von KCl nach 60 Sekunden, **A**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM-Intensität, Stimulation mit Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung Endkonzentration 1,28 %, 20-40 Sekunden), **B**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM-Intensität, Stimulation mit der Positivkontrolle (KCl 40 mM, 20-40 Sekunden), **C**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit AITC 5 mM (20-40 Sekunden), **D**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit AITC 25 mM (20-40 Sekunden), **E**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit AITC 125 mM (20-40 Sekunden), **F**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit PF-4840154 5 µM (20-40 Sekunden), **G**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit PF-4840154 25 µM (20-40 Sekunden), **H**: zeitlicher Verlauf der mittleren Calbryte 630 AM Intensität, Stimulation mit PF-4840154 125 µM (20-40 Sekunden), A-H: schraffierte Flächen zeigen die Standardabweichung von dem Mittelwert an. Ctrl: Negativkontrolle (DMSO in Saliner-Lösung Endkonzentration 1,28%, KCl: Kaliumchlorid 40 mM, AITC5: Allylisothiocyanat 5 mM, AITC25: Allylisothiocyanat 25 mM, AITC125 Allylisothiocyanat 125 mM, PF5: PF-4840154 5 µM, PF25: PF-4840154 25 µM, PF125: PF-4840154 125 µM, n = 4

Die Stimulation mit PF-4840154 induzierte einen Calciumeinstrom in die nozizeptiven Neurone der Spinalganglien der Ratte. Gemäß einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test war dieser nicht statistisch signifikant. AITC führte in Konzentrationen von 25 mM und 125 mM zu einem statistisch signifikanten Calciumeintritt in die Neurone. Die Anwendung des t-Tests zeigte jedoch einen statistisch signifikanten Unterschied im Calciumeinstrom in die Zellen zwischen der Negativkontrolle und der Stimulation mit PF-4840154 in der Konzentration von 125 µM.

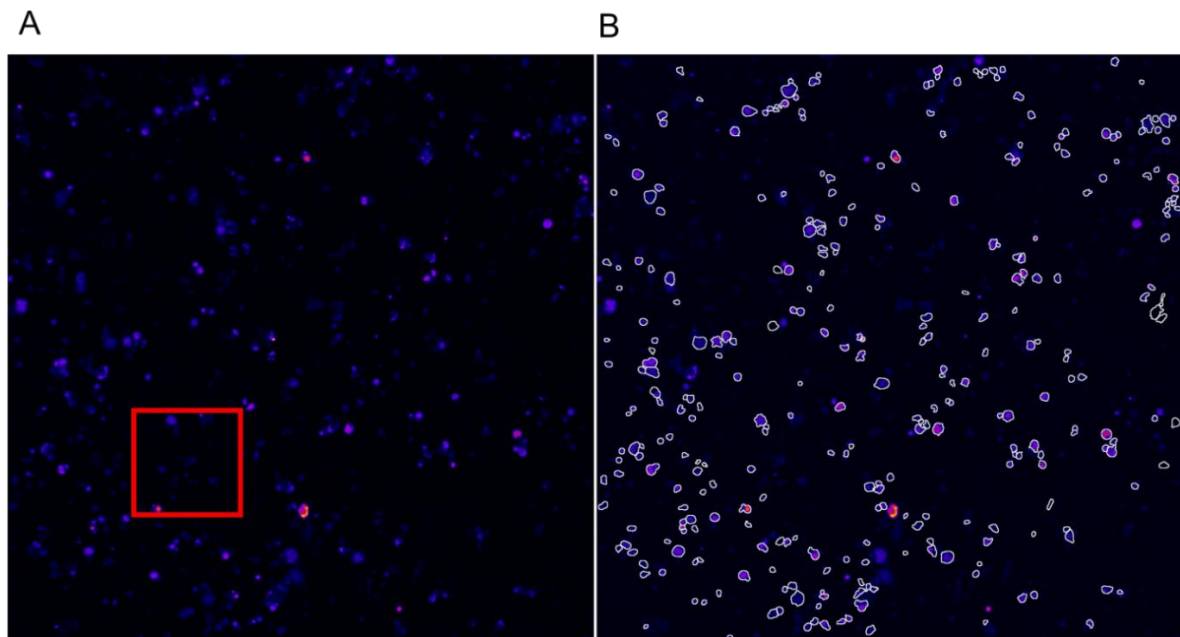


Abbildung 24 Mit Calbryte 360 AM behandelte primär sensorischen Neurone für das Calcium-Imaging.

A: primär sensorische Neurone, die mit Calbryte 360 AM behandelt für Calcium Imaging das Quadrat zeigt einen beispielhaften Ausschnitt. (vgl. Abb. 29) **B**: primär sensorische Neurone, die mit Calbryte 360 AM behandelt für Calcium Imaging, geeignete Nozizeptive Neurone wurden als ROI (region of Interest) weiß umrandet

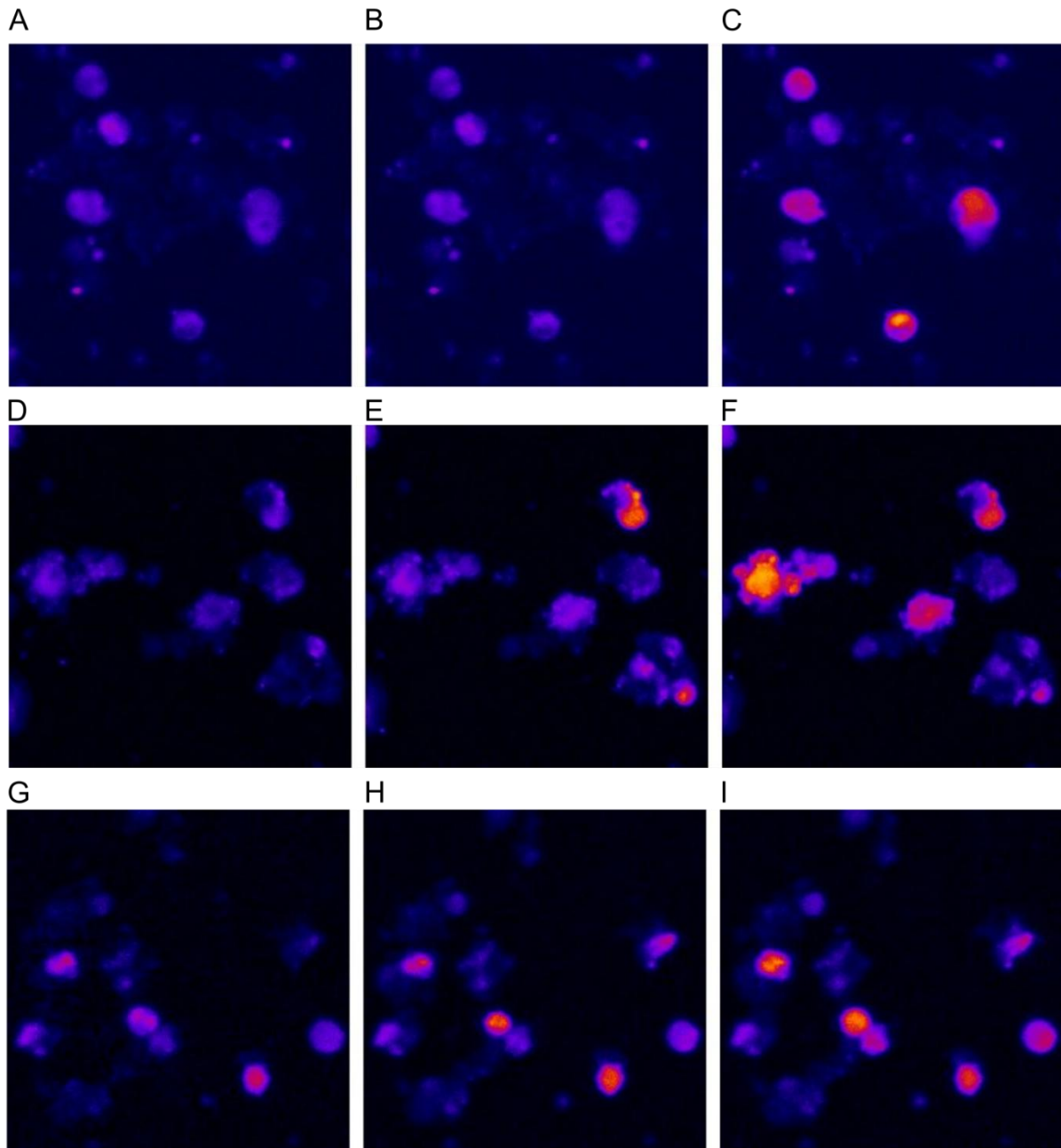


Abbildung 25: Bildausschnitte von Kulturen primär sensorischer Neurone der Ratte nach Färbung mit Calbryte 630 AM.

Bildaufnahme vor Stimulation (Bildaufnahme nach 10 Sekunden) nach jeweiliger Stimulation (Bildaufnahme nach 40 Sekunden) und nach Stimulation mit KCl 40 mM (Bildaufnahme nach 75 Sekunden). **A-C:** Stimulation primär sensorischer Neurone mit Negativkontrolle Ctrl (DMSO in Saliner-Lösung (Endkonzentration 1,28 %), **A:** Grundaufnahme vor Stimulation mit Negativkontrolle (10 Sekunden), **B:** Aufnahme nach Stimulation mit der Negativkontrolle (40 Sekunden), **C:** Aufnahme nach Stimulation mit KCl 40 mM (75 Sekunden) **D-F:** Stimulation primär sensorischer Neurone mit AITC 125 mM, **D:** Grundaufnahme vor Stimulation mit AITC 125 mM (10 Sekunden), **E:** Aufnahme nach der Stimulation mit AITC 125 mM (40 Sekunden), **F:** Aufnahme nach Stimulation mit KCl 40 mM (75 Sekunden), **G-I:** Stimulation primär sensorischer Neurone mit PF-4840154 **G:** Grundaufnahme vor Stimulation mit PF-4840154 (10 Sekunden), **H:** Aufnahme nach Stimulation mit PF-4840154 (40 Sekunden) **I:** Aufnahme nach Stimulation mit KCl 40 mM (75 Sekunden)

5. Diskussion

5.1. Die Aktivierung der PKA-II durch TRP Agonisten scheint unabhängig von cAMP und Opioid-unresponsiv zu sein.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Fragestellung, ob die Aktivierung der für Calcium permeablen, nicht-selektiven Kationenkanäle TRPV1 und TRPA1 mittels Capsaicin und AITC zu einer cAMP-abhängigen und Opioid-responsiven Aktivierung der PKA-II führt, vergleichbar mit der Serotonin-induzierten Aktivierung der PKA-II, oder ob es zu einer cAMP-unabhängigen und Opioid-unresponsiven PKA-II Aktivierung, vergleichbar mit der KCl-induzierten Depolarisation von sensorischen Neuronen, kommt. Dazu wurden nozizeptive Neurone von Ratten isoliert, über Nacht kultiviert und mit auf cAMP einflussnehmenden Substanzen prästimuliert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin und dem TRPA1-Agonisten AITC. Die Ergebnisse zeigten, dass die Prästimulation mit dem Morphinrezeptor-aktivierenden Fentanyl die PKA-II Aktivität in der Stimulation mit Serotonin vermindert. Die Aktivierung der Morphinrezeptoren führte zur Hemmung der Adenylylcyclase, welche für die Produktion von cAMP verantwortlich ist.^{118,130,131}

In Stimulationen mit Capsaicin und AITC blieb nach Prästimulation mit Fentanyl eine signifikante Änderung der PKA-II Aktivität aus. Opioide zeigten in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die TRPA1- und TRPV1-induzierten Aktivierung der PKA-II. Sie minderten jedoch in den Stimulationen mit Serotonin, welches die PKA-II cAMP-abhängig aktiviert, die PKA-II Aktivität.

Die Prästimulation mit dem inaktiven cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB^{60,132,133} alleine führte in länger andauernden Stimulationen zu einer Steigerung der PKA-II Aktivität. In der Serotonininduzierten PKA-II Aktivierung^{1,134} kam es zu einer Reduzierung der PKA-II Aktivität. In der TRPA1- und TRPV1-induzierten Aktivierung der PKA-II führte die Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB zu keiner verminderten Signalantwort. Die unerwartete Aktivierung der PKA-II durch Rp-cAMPS-pAB bei längerer Stimulation könnte auf eine Umwandlung des inaktiven Analogons in eine aktive Form zurückzuführen sein. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die unspezifische, mechanische Aktivierung durch die Stimulation selbst.

Prästimulation mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX führte zu einer Erhöhung des basalen PKA-II Aktivität. Nach Normalisierung der Daten auf den Zeitpunkt 0 der Kontrolle zeigte sich jedoch kein Unterschied mehr, ob die primär sensorische Neurone der Ratte mit IBMX oder der Negativkontrolle prästimuliert wurden. Dieser beobachtete Effekt stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht.¹

Bei der cAMP-abhängigen Serotonin-induzierten Aktivierung der PKA-II verlängerte IBMX wie erwartet den pRII-Anstieg¹ (s. Abb.14 A). Die Prästimulation mit IBMX führte über den Anstieg

der basalen PKA-II Aktivität auch in Stimulationen mit Capsaicin und AITC zu einer erhöhten pRII Intensität. Nach Normalisierung der Daten führte die Prästimulation mit IBMX zu keiner erhöhten PKA-II Aktivität in den Stimulationen mit Serotonin, Capsaicin, AITC oder der Negativkontrolle. Auch nach Normalisierung der Daten konnte in der Stimulation mit Serotonin die verlängerte Aktivierung der PKA-II gezeigt, jedoch ohne statistische Signifikanz, werden. In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe zeigte sich diese Verlängerung als statistisch signifikant.¹ Ursache der Abweichung in den vorliegenden Untersuchungen ist wahrscheinlich auf Ungenauigkeiten beim Pipettieren, beispielsweise, dass ein Rest der Stimulanzien in den Pipetten versehentlich zurückgeblieben ist, zurückzuführen. In den Stimulationen mit AITC und Capsaicin war nach Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen der Prästimulation mit IBMX oder der Negativkontrolle feststellbar, was für eine cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA-II spricht.

Auf die TRPA1- und TRPV1-medierte Aktivierung von ERK1/2 hatte weder die Prästimulation mit Fentanyl, noch IBMX einen signifikanten Einfluss.

Rp-cAMPS-pAB beeinflusste nicht die TRPV1- medierte, jedoch die TRPA1-medierte Aktivierung von ERK1/2. Hier bewirkte das das inaktive cAMP-Analogon, entgegen der Erwartungen einen Anstieg der ERK1/2 Aktivität in länger andauernden Stimulationen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Aktivierung von TRPA1 auch intrazelluläre Kaskaden initiiert werden, die eine Umwandlung in ein aktives cAMP-Analogon bewirken, welches die ERK1/2 aktiviert.

Der spezifische TRPA1-Agonist PF-484015 führte in einer Dosierung von 125 μ M zu einem signifikanten Anstieg der PKA-II Aktivierung.¹²⁵ Dies ist über das 1200-Fache der in der Literatur beschriebenen EC_{50} .¹²⁵ Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in der Literatur beschriebenen Experimente nicht an nozizeptiven Neuronen durchgeführt wurden und dass der Calciumeinstrom in die Zelle als Messgröße verwendet wurden.¹²⁵

PF-484015 erwies sich in den Experimenten, in denen die pRII und pERK1/2 Intensitäten als Messgröße verwendet wurden, als TRPA1-Agonist als ungeeignet, da es in diesen hohen Konzentrationen zum Ausfall von PF-484015 im Lösungsmittel kam. In der Auswertung der pERK1/2 Intensität nach Stimulation mit PF-484015, konnte im 3 Parameter-fit Modell die EC_{50} nicht sinnvoll errechnet werden, was darauf schließen lässt, dass die Stimulation keinem klassischen Dosis-Wirkungs-Modell entspricht.

Die Stimulation mit PF-484015 zeigte im Calcium-Imaging einen Calciumeinstrom in die nozizeptiven Neurone. In der Calcium-Bildgebung könnte der Anteil der Zellen, welche einen Calciumeinstrom aufwiesen falsch niedrig ausfallen, da bei Hinzugabe der Stimulantien die Zellen hätten weggespült werden können. Bei der Stimulation mit PF-484015 in einer Konzentration von 125 μ M konnte ein ähnlicher Intensitätsanstieg der Färbung wie bei der

Stimulation mit 5 mM AITC beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass PF-4840154 und AITC in diesen Dosierungen einen Calciumeinstrom über TRPA1 bewirken. Dass die höheren Dosen AITC zu einem höheren Intensitätsanstieg der Färbung führen könnten auf Interaktion mit anderen Kationenkanälen und somit einen unspezifischen Calciumeinstrom hindeuten.

5.2. Aktivierung der PKA kann unabhängig von cAMP erfolgen

Die Proteinkinase A wird in der Literatur häufig als cAMP-abhängige Kinase beschrieben.^{135,136}

Es gibt Hinweise, dass eine Aktivierung der PKA auch unabhängig von cyclischem Adenosinmonophosphat stattfinden kann. Die cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA scheint nach bisherigen Erkenntnissen jedoch seltener vorzukommen als cAMP-abhängige Aktivierung. In der Krebsforschung konnte gezeigt werden, dass *Transforming growth factor beta* (TGF β) die PKA in *Mink Lung epithelia cells* (Mv1Lu) unabhängig von cAMP aktivieren kann.¹³⁷ In einer prä-B-Zelllinie konnte ein Komplex aus der katalytischen Untereinheit der PKA und dem Transkriptionsfaktorinhibitor I κ B durch Degradation des Transkriptionsfaktorinhibitors die katalytische Untereinheit der PKA unabhängig von cAMP aktivieren.¹³⁸

Es gibt Hinweise, dass in Kardiomyozyten die PKA direkt durch Peroxynitrit und unabhängig von cAMP aktiviert werden kann.¹³⁹

Durch Interaktion von dem G-Protein G α 13 mit dem *A-kinase-anchoring protein 110* (AKAP110) kommt es zu einer Freisetzung und Aktivierung der PKA unabhängig von cAMP.¹⁴⁰ Bei AKAPS handelt es sich um Gerüst-Proteine, an welche die regulatorische Untereinheit der PKA gebunden ist. AKAPS dirigieren die PKA an spezifische intrazelluläre Kompartimente und stellen die Nähe von Substraten und Effektoren zur PKA her.^{140,141}

In der Literatur gibt es sowohl Hinweise dafür, dass die RII-Untereinheit, die vor allem in neuronalem Gewebe vorkommt, unabhängig von cAMP durch die katalytische Untereinheit phosphoryliert wird, als auch, dass die R-II-Untereinheit bereits im inaktivierten Zustand phosphoryliert ist und dass die Phosphorylierung cAMP-abhängig erfolgt.^{60,142,143} Dies könnte ein Hinweis für sowohl cAMP-abhängige als auch cAMP-unabhängige PKA-II Aktivierungswege sein, die parallel ablaufen könnten.

Die Schmerzforschung betreffend konnten *Isensee et al.* zeigen, dass die Depolarisation von nozizeptiven Neuronen zu mechanischer Hyperalgesie führt. Diese Depolarisation-induzierte Aktivierung der PKA-II wird durch den Calcium-Kanal Ca $_v$ 1.2 vermittelt und ist dabei unabhängig von cAMP.¹

5.3. TRPV1 und TRPA1 aktivieren PKA unabhängig von cAMP

Die Proteinkinase A ist an der Entstehung von Hyperalgesie und an der Sensitivierung von nozizeptiven Neuronen beteiligt.^{54,56} Das Verständnis, wie es zur Aktivierung der PKA kommt, kann zum besseren Verstehen von Schmerzzuständen führen und Ansatzpunkte für mögliche neue Therapien bieten.

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass Depolarisation zu mechanischer Hyperalgesie und PKA-II Aktivierung führt. Diese depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA ist unabhängig von cAMP¹. Die Transient Rezeptor Potential Kanäle TRPV1 und TRPA1 sind ebenfalls an der Entstehung von Hyperalgesie und Sensitivierung von nozizeptiven Neuronen beteiligt.^{78-80,83,85} Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass die TRPA1- und TRPV1-vermittelte Aktivierung der PKA-II unabhängig von cAMP verläuft. Durch Inhibition der cAMP-Produktion mittels Fentanyl wurde die G-Protein gekoppelte Aktivierung der PKA-II, welche cAMP abhängig verläuft, vermindert.^{1,60} Die Serotonin-Rezeptor vermittelte Aktivierung der cAMP-produzierenden Adenylylcyclase wurde durch Fentanyl gehemmt und die darauffolgende cAMP-abhängige Aktivierung der PKA vermindert. Die TRPA1- und TRPV1-vermittelte PKA Aktivierung wurde durch Inhibition der cAMP-Produktion nicht vermindert. Adenylylcyclase-abhängige cAMP-Produktion ist keine Voraussetzung für die TRPA1- und TRPV1-vermittelte Aktivierung der PKA. Das inaktive kompetitive cAMP-Analogon Rp-cAMPS-pAB zeigte einen Einfluss auf die G-Protein gekoppelte Aktivierung der PKA-II. In der Stimulation mit Serotonin kam es kompetitiv zur Stabilisierung der inaktiven Form der PKA-II und zur verminderten PKA-II Aktivität.^{1,60} In den Stimulationen mit Capsaicin und AITC verminderte das inaktive cAMP-Analogon die PKA Aktivität nicht und es kam zu keiner kompetitiven Hemmung der PKA-II Aktivierung. Dies scheint ein weiterer Hinweis dafür zu sein, dass cAMP in der TRPV1- und TRPA1-vermittelten Aktivierung der PKA nicht beteiligt ist.

Prästimulation mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX führte als alleinige Prästimulation und in den Stimulationen mit Serotonin, Capsaicin und IBMX zu einer vermehrten PKA-II Aktivität. Durch Hemmung der Phosphodiesterase und somit vermehrt verfügbaren cAMP in den Neuronen kommt es zu einer Erhöhung der basalen PKA-II Aktivität. In der Stimulation mit Serotonin kam es zudem zu einer prolongierten PKA-II Aktivierung, was die Abhängigkeit von cAMP verdeutlicht. In dieser Studie zeigte sich die verlängerte PKA-II Aktivierung als statistisch nicht signifikant. In anderen Studien konnte die Verlängerung der PKA-II Aktivierung wiederholt als statistisch signifikant nachgewiesen werden.^{1,60} Fehler während des Pipettierens der Stimulantien könnten ein Grund für diesen Unterschied sein. Prästimulation mit IBMX führte in den TRPV1- und TRPA1-PKA-II Aktivierung auch zu einer erhöhten basalen PKA-II Aktivität. Es scheint sich um einen synergistischen Effekt zu handeln.

Es kam jedoch zu keiner prolongierten PKA-II Antwort und nach Normalisierung der Daten auf den Zeitpunkt 0 der Kontrolle führt IBMX auch zu keiner Veränderung der PKA-II Aktivität mehr. Dies ist ebenfalls ein Hinweis für die cAMP-unabhängige PKA-II Aktivierung durch TRPA1 und TRPV1. Ähnlich zu diesen Ergebnissen konnten *Vetter et al.* zeigen, dass Prästimulation mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX und dem Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin zu einer erhöhten TRPV1 Aktivität und vermehrtem Capsaicin-induzierten Calciueinstrom führt.¹⁴⁴ In den hier vorliegenden Ergebnissen kam zu keiner Potenzierung der PKA Aktivität durch einen vermehrten Calciueinstrom.

Die Aktivierung der PKA-II-nachgeschalteten ERK1/2 wurde weder durch Prästimulation mit Fentanyl, Rp-cAMPS-pAB noch IBMX in den Stimulationen mit Capsaicin und AITC beeinflusst. Die Stimulation mit Serotonin führte zu keiner relevanten ERK1/2 Aktivität. ERK1/2 scheint somit keine nachgeschaltete Struktur der Signalkaskade in der Serotoninvermittelten PKA Aktivität zu sein. Die Aktivierung der ERK1/2 erfolgte in den Stimulationen mit Capsaicin und AITC unabhängig von cAMP. Ob die Aktivierung der ERK1/2 in den Stimulationen mit AITC und Capsaicin der PKA-II Aktivierung nachgeschaltet ist oder parallel zur PKA-II Aktivierung verläuft, lässt sich allein durch die vorliegende Studie nicht beantworten. Vorausgegangene Studien konnten in dieser Art Assay eine biologische Signalüberkreuzung (*crosstalk*) nachweisen.^{55,61}

AITC ist hoch volatil und ein Agonist für den TRPA1-Rezeptor.^{145,146} In Studien konnte auch nachgewiesen werden, dass AITC einen Einfluss auf den TRPV1-Kanal hat.^{147,148} Um den Einfluss anderer Rezeptoren auf die PKA-II Aktivierung auszuschließen, wurden die sensorischen Neurone der Dorsalganglien der Ratten mit dem spezifischen TRPA1 Agonisten PF-4840154 stimuliert. In der Testung verschiedener Dosen führten Konzentrationen von 0,08 µM bis 25 µM nicht zur PKA-II Aktivierung. Erst die Konzentrationen von 125 µM führte zu einem signifikanten Anstieg der PKA-II Aktivität. Dies ist über das 1200-Fache der in der Literatur beschriebenen EC₅₀.¹²⁵ In der Literatur wurde die PF-4840154 vermittelte TRPA1 Aktivierung mittels Calciueinstrom gemessen.¹²⁵ Zur Verifizierung, dass PF-4840154 auch in dem hier benutzen Assay einen Calciueinstrom durch TRPA1 Aktivierung bewirkt, wurde ein Calcium-Imaging durchgeführt. In der Dosierung von 125 µM zeigte PF-4840154 eine vergleichbare Intensität des Calciumfarbstoffs, wie AITC in einer Dosierung von 5 mM. Die höhere Dosierung, die im Calcium-Imaging und in der HCS-Mikroskopie für eine PKA-II Aktivierung benötigt wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in der Literatur mit PF-4840154 beschriebenen in vitro Experimente an mit TRPA1 transfizierten HEK129 Zellen und HEK293t Zellen, sowie an Dorsalganglien von Mäusen durchgeführt wurden.^{125,129} Zudem wurde im Calcium-Imaging PF-4840154 in DMSO gelöst verwendet. In den verwendeten Konzentrationen, kam es zum Ausfall von PF-4840154. Trotz Verwendung

eines Vortex-Schüttelmixers ist nicht auszuschließen, dass PF-4840154 tatsächlich in geringerer Konzentration gelöst vorlag.

Im Calcium-Imaging zeigten Konzentrationen von 25 mM und 125 mM von AITC im Vergleich zu einer Konzentration von 5 mM AITC, einen deutlich erhöhten Calcium-Influx. Hier könnte auch eine unspezifische Aktivierung von anderen Rezeptoren, beispielsweise TRPV1 stattgefunden haben und einen vermehrten Calciumeinstrom bewirkt haben.

5.4. Beeinflussung von TRPV1 und TRPA1 als Alternative zu Opioiden in der Schmerzbehandlung

Opioide sind für die Therapie von moderaten bis starken Schmerzen essentiell.^{149,150} Jedoch zeigen Opioide nicht in allen Fällen einen zufriedenstellenden analgetischen Effekt. Bei neuropathischen Schmerzen sind Opioide häufig nicht ausreichend wirksam und auch ca. 2-5 % der Patienten mit Krebs-assoziierten Schmerzen leiden an refraktären Schmerzen.¹⁵¹⁻¹⁵³ Die Behandlung mit Opioiden kann zu verschiedenen Nebenwirkungen führen. Dazu zählen unter anderem Toleranzentwicklung und paradoxe Hyperalgesie.^{149,154-157} Die Transienten Rezeptor Potential Vanilloid Typ 1 und Ankyrin-1 Kanäle stellen eine mögliche alternative Zielstruktur für die Behandlung von Schmerzen dar.

TRPV1-exprimierende Nervenfasern sind zusammen mit Neurokinin-1 Rezeptor-exprimierenden Zellen unter anderem an der Entstehung von spontanen Schmerzen und thermaler Hyperalgesie nach Spinal-Nerv-Ligation (*Spinal Nerve Ligation, SNL*) beteiligt. SNL stellt ein Modell für neuropathische Schmerzen dar. Durch Inhibition von TRPV1 konnten thermale Hyperalgesie und spontane Nervenschmerzen inhibiert werden.¹⁵⁸ Kang *et al.* konnten im Tiermodell anti-nozizeptives Verhalten in Mäusen mit inflammatorisch verursachten Schmerzen durch spinale Inhibition von TRPV-1 hervorrufen.¹⁵⁹

Durch Neuropathie induzierte mechanische und thermische Sensitivität konnten im Tiermodell durch lokale und perineurale Blockade von TRPV1 gemindert werden. In Kombination mit Opioiden führten jeweils nicht analgetische Dosierungen zur Reduktion der Sensitivität.¹⁶⁰

Es besteht eine Co-Lokalisation zwischen dem μ -Opioid-Rezeptor und TRPV1-Kanal in Zellen der dorsalen Spinalganglien. In mit μ -Opioid-Rezeptor und TRPV1 transfizierten HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Prästimulation mit Morphin keinen Einfluss auf den Capsaicin-induzierten Calciumeinstrom hat. Prästimulation mit dem Phosphodiesterase-Hemmer IBMX und den Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin führte zu vermehrtem Capsaicin-induzierten Calciuminflux. Diese cAMP-PKA abhängige Potenzierung der TRPV1 Aktivität konnte durch Morphin vermindert werden.¹⁴⁴

TRPA1 stellt neben TRPV1 eine weitere mögliche therapeutische Zielstruktur zur Behandlung von Schmerzen dar. Neben TRPV1 ist TRPA1 bei der Entstehung von spontanen Schmerzen bei Entzündung des Masseter-Muskels im Tiermodell beteiligt. In TRPV1-Knock-Out-Mäusen konnte lokale Inhibition von TRPA1 die Entstehung von spontanen Schmerzen zusätzlich reduzieren, was auf eine mögliche Interaktion der beiden Kanäle hinweist.¹⁶¹

Im Tiermodell ist die Injektion von Formalin eine gängige Methode, um Schmerzzustände hervorzurufen und den analgetischen Effekt chemischer Verbindungen zu testen. Die Applikation von Formalin verursacht auf zellulärer Ebene TRPA1-induzierten Calciumeinstrom. Durch Blockade der TRPA1 Kanäle, entweder auf genetischer Ebene oder pharmakologischer, konnten im Mausmodell Formalin-induzierte Schmerzen abgeschwächt werden.¹⁶²

Die Inhibition von TRPA1 konnte in einer Subpopulation von Patienten mit diabetischer Neuropathie die Schmerzen verbessern.¹⁶³

Die genetische Analyse der TRPA1-Kanäle von Schmerzpatienten zeigte TRPA1-Varianten, die in Patienten mit chronischen neuropathischen und nozioplastischen Schmerzen vorkamen, die bei den Kontrollgruppen nicht feststellbar waren. Dies zeigt das Potential von TRPA1 als Zielstruktur von neuen Schmerztherapien auf molekularer Ebene.¹⁶⁴

5.5. Stärken und Limitationen

Zu den Stärken der vorliegenden Experimente zählt, dass das Verfahren der High Content Screening-Mikroskopie in der Arbeitsgruppe gut etabliert ist.^{1,60} Das Verfahren ist reproduzierbar. Es ermöglicht eine Qualitätssicherung durch entsprechende Positiv- und Negativkontrollen, wodurch die Vergleichbarkeit der Experimente gegeben ist. Jedes Experiment besteht aus mindestens 4 Replica-Experimenten, sodass die Robustheit und Zuverlässigkeit eines einzelnen Experimentes erhöht wird. Mögliche Fehler können dadurch besser erkannt werden. Zudem gibt es noch weitere heterogene Qualitätsmerkmale, welche auf die vorliegenden Experimente zutreffen. Die Gesamtzellzahl pro Well hatte stets eine Mindestanzahl von 500 Zellen. Somit konnten mehr Zellen untersucht werden, als es in anderen Verfahren möglich ist. In allen zur Auswertung herangezogenen Zellen war stets UCHL1 (Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1) vorhanden. UCHL1 ist ein für Neuronen spezifischer Marker, sodass andere Zelltypen nicht in die Auswertung mit einfließen.^{114,165}

Bei den in die Auswertung eingeflossenen Zellen handelt es sich ausschließlich um lebende Zellen. Abgestorbene Zellen, die möglicherweise zur Verzerrung der Ergebnisse hätten führen können, wurden ausgeschlossen. Die Zellen, welche zur Quantifizierung der Antikörper-Signale herangezogen wurden, mussten zudem vorher festgelegte Merkmale (u.a. Rundheit, Größe) erfüllen.

Die Experimente wurden mit einem Goldstandard verglichen. Dazu zählte ein *population destination estimate*. Dort wurde die Verteilung der Größe der Zellen und die UCHL1-Intensität mit einer Standardpopulation verglichen. Der *destination error* wurde auf $\leq 5\%$ festgelegt. Die Plots der aus einzelnen Experimenten gewonnenen Daten mussten im Goldstandardbereich liegen, um als Replica-Experiment gewertet werden zu können.

Die vorliegenden Untersuchungen bieten somit aussagekräftige Einsicht in mögliche mechanistische Abläufe der Schmerzweiterleitung und liefern Ansätze für hierauf aufbauende Studien zur Entwicklung von therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten von Schmerzen.

Limitationen der Experimente sind, dass es sich um in vitro Modelle handelte und dass möglicherweise komplexe Interaktionen und Zellumgebungen, die in lebenden Organismen vorhanden sind, in diesen Experimenten nicht vollständig abgebildet werden konnten. Die experimentellen Gegebenheiten sind replizierbar, unterschieden sich jedoch von den physiologischen Gegebenheiten. Weiterführende Studien mit In-vivo-Experimenten könnten zur Verifizierung der hier gezeigten Ergebnisse beitragen.

Obwohl AITC ein gebräuchlicher Agonist für TRPA1 darstellt, konnte in Studien eine Beeinflussung von TRPV1 durch AITC festgestellt werden.^{147,148,166,167} Eine Kreuzaktivierung von anderen Rezeptoren kann nicht ausgeschlossen werden. Um eine Kreuzreaktion auszuschließen und die Reproduzierbarkeit der Experimente weiter zu überprüfen, könnte ein Versuchsaufbau mit einem spezifischen TRPA1-Agonisten, beispielsweise PF-4840154, in höheren Konzentrationen durchgeführt werden.

Die vorliegenden Experimente wurden an Kulturen von nozizeptiven Neuronen der dorsalen Spinalganglien der Ratte durchgeführt. Obwohl Schmerzmodelle in Tieren und tierische Zellkulturen sich als wertvoll für das Erforschen von Signaltransduktion, die Freisetzung von Neurotransmittern in Schmerzzuständen und Identifikation von Schmerzrezeptoren gezeigt haben, bleibt zu bedenken, dass die Expressionsmuster und endgültige Funktion der untersuchten Kanäle TRPV1 und TRPA1 sich in Ratten und Menschen unterscheiden können.^{168,169} Studien zeigten, dass Capsaicin-betreffend eine gewisse Vergleichbarkeit von Ratten und menschlichen DRGs besteht. Andere Identifikationsmerkmale, die in Nagetieren zur Subpopulationsanalyse von Neuronen benutzt werden, wie IB4, treffen auf menschliche Neurone nicht zu.¹⁷⁰

Die Implikation der hier herausgefundenen Ergebnisse für den Menschen gilt es weiter zu testen.

5.6. Ausblick auf die Zukunft

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die durch TRPV1- und TRPA1-induzierte PKA-II Aktivierung unabhängig von cAMP erfolgt. Sowohl TRPA1 als auch TRPV1 stellen potenzielle Zielstrukturen für neue medikamentöse Therapien zur Schmerzbehandlung dar.^{164,171} In der Behandlung von chronischen Schmerzen kann es durch die Langzeitbehandlung mit Opioiden zu diversen Nebenwirkungen kommen. Abhängig von der mechanistischen Ursache kann die Behandlung mit Opioiden zu einer nicht ausreichenden Schmerzlinderung führen. Die alleinige Opioidtherapie führt vor allem in chronischen Schmerzen nicht zu einer ausreichenden Analgesie.^{153,172}

Eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase A ist in persistierenden Schmerzen und Zuständen der Schmerzsensitivierung vorhanden.⁵⁴⁻⁵⁶

Die cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA kann ein Beispiel der mechanistischen Ursache für auf Opioid-nichtresponsive Schmerzen darstellen und eröffnet neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Therapien für Opioid-unresponsive, chronische Schmerzen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich um in vitro Experimente. In zukünftigen Experimenten sollten die hier dargestellten Ergebnisse in In-vivo-Modellen überprüft werden. Um bei der Aktivierung von TRPA1 mit AITC die Aktivierung andere Rezeptoren ausschließen zu können, sollte die Testungen mit anderen spezifischen TRPA1-Agnoisten erfolgen. Im letzten Schritt zur Testung einer klinischen Relevanz gilt es, die cAMP-unabhängige, TRPA1- und TRPV1-medierte Aktivierung der PKA-II am Menschen zu überprüfen.

Die Signalkaskaden in der Schmerzweiterleitung und Schmerzmodulation sind vielfältig und können auf verschiedenste Weise beeinflusst werden. Sie können parallel und unabhängig voneinander ablaufen und es kann zu Signalüberkreuzungen kommen. Es gilt zu testen, ob die cAMP-unabhängige Aktivierung auch weitere Signalwege beeinflussen kann.

Das Verstehen der molekularen Abläufe der Signaltransduktion bietet das Potential für weitere Forschung und neue Therapieansätze.

6. Literaturverzeichnis

1. Isensee J, van Cann M, Despang P, et al. Depolarization induces nociceptor sensitization by CaV1.2-mediated PKA-II activation. *J Cell Biol* 2021; **220**(10).
2. Bonezzi C, Fornasari D, Cricelli C, Magni A, Ventriglia G. Not All Pain is Created Equal: Basic Definitions and Diagnostic Work-Up. *Pain Ther* 2020; **9**(Suppl 1): 1-15.
3. Wolff R, Clar C, Lerch C, Kleijnen J. Epidemiologie von nicht tumorbedingten chronischen Schmerzen in Deutschland. *Der Schmerz* 2011; **25**(1): 26-44.
4. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2017; **390**(10100): 1211-59.
5. Cohen SP, Vase L, Hooten WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet* 2021; **397**(10289): 2082-97.
6. Treede R-D, Rief W, Barke A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *PAIN* 2019; **160**(1): 19-27.
7. Schmidt CO, Fahland RA, Kohlmann T. Epidemiologie und gesundheitsökonomische Aspekte des chronischen Schmerzes. *Schmerzpsychotherapie: Grundlagen–Diagnostik–Krankheitsbilder–Behandlung* 2011: 15-27.
8. Wenig CM, Schmidt CO, Kohlmann T, Schweikert B. Costs of back pain in Germany. *Eur J Pain* 2009; **13**(3): 280-6.
9. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 1979; **6**(3): 249.
10. Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020; **161**(9): 1976-82.
11. Schmidt H, Blechschmidt V. Noziplastischer Schmerz in Forschung und Praxis. *Der Schmerz* 2023; **37**(4): 242-9.
12. (IASP) IAftSoP. *IASP terminology*. 2017. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/?ItemNumber=1698&navItemNumber=576> (accessed 10.01.2024 2024).
13. Trouvin A-P, Perrot S. New concepts of pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2019; **33**(3): 1014-15.
14. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, et al. A new definition of neuropathic pain. Elsevier; 2011. p. 2204-5.
15. Kosek E, Cohen M, Baron R, et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 2016; **157**(7): 1382-6.
16. Fitzcharles M-A, Cohen SP, Clauw DJ, Littlejohn G, Usui C, Häuser W. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. *The Lancet* 2021; **397**(10289): 2098-110.
17. Treede RD, Hoheisel U, Wang D, Magerl W. Central sensitization: clinical utility of a physiological concept for the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems and for nociceptive pain. *Pain* 2022; **163**(Suppl 1): S99-S107.
18. Kosek E, Clauw D, Nijs J, et al. Chronic nociceptive pain affecting the musculoskeletal system: clinical criteria and grading system. *Pain* 2021; **162**(11): 2629-34.
19. Basbaum A, Jessell T. Principles of neural science. by Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, McGraw-Hill Medical, New York 2000: 472-91.
20. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; **139**(2): 267-84.
21. Ottestad E, Angst MS. Chapter 14 - Nociceptive Physiology. In: Hemmings HC, Egan TD, eds. Pharmacology and Physiology for Anesthesia. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013: 235-52.
22. Lefaucheur J-P. Chapter 8 - Clinical neurophysiology of pain. In: Levin KH, Chauvel P, eds. Handbook of Clinical Neurology: Elsevier; 2019: 121-48.
23. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 2002; **66**(6): 355-474.

24. Schünke M SE, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus LernAtlas der Anatomie. 2. Auflage ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag; 2009. . 2. Auflage ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thiee Verlag; 2009.
25. Baldry PE, Thompson JW. Chapter 6 - Neurophysiology of pain. In: Baldry PE, Thompson JW, eds. Acupuncture, Trigger Points and Musculoskeletal Pain (Third Edition). Edinburgh: Churchill Livingstone; 2005: 45-72.
26. Puopolo M, Mendell LM. Nociceptors: The Gateway to Pain☆. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology: Elsevier; 2017.
27. Lewin GR, Moshourab R. Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 2004; **61**(1): 30-44.
28. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; **413**(6852): 203-10.
29. Isensee J, Wenzel C, Buschow R, Weissmann R, Kuss AW, Hucho T. Subgroup-elimination transcriptomics identifies signaling proteins that define subclasses of TRPV1-positive neurons and a novel paracrine circuit. *PLoS One* 2014; **9**(12): e115731.
30. Basbaum AI. Chapter 3 - Basic Mechanisms. In: Argoff CE, McClean G, eds. Pain Management Secrets (Third Edition). Philadelphia: Mosby; 2009: 19-26.
31. Zupanc GKH. Peptidergic transmission: From morphological correlates to functional implications. *Micron* 1996; **27**(1): 35-91.
32. Golden JP, Hoshi M, Nassar MA, et al. RET Signaling Is Required for Survival and Normal Function of Nonpeptidergic Nociceptors. *The Journal of Neuroscience* 2010; **30**(11): 3983-94.
33. McCarberg B, Peppin J. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. *Pain Medicine* 2019; **20**(12): 2421-37.
34. Shiers SI, Sankaranarayanan I, Jeevakumar V, Cervantes A, Reese JC, Price TJ. Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology* 2021; **529**(10): 2771-88.
35. Kalia H, Trescot AM, Abd-Elseyed A. 33 - Peripheral Nerve Stimulation for Complex Regional Pain Syndrome. In: Abd-Elseyed A, Trescot AM, eds. Peripheral Nerve Stimulation. New Delhi: Elsevier; 2023: 225-32.
36. Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain and Headache Reports* 2017; **21**(6): 28.
37. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009; **10**(9): 895-926.
38. Curatolo M. Central Sensitization and Pain: Pathophysiologic and Clinical Insights. *Current Neuropharmacology* 2024; **22**(1): 15-22.
39. Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 2001; **294**(5544): 1024-30.
40. Hucho T, Levine JD. Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. *Neuron* 2007; **55**(3): 365-76.
41. Lewin GR, Lu Y, Park TJ. A plethora of painful molecules. *Current Opinion in Neurobiology* 2004; **14**(4): 443-9.
42. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine* 2010; **16**(11): 1248-57.
43. Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, Levine JD. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 1989; **32**(3): 577-80.
44. Taiwo YO, Levine JD. Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. *Brain Res* 1989; **492**(1-2): 400-3.
45. Alexander S, Mathie A, Peters J. G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *British Journal of Pharmacology* 2011; **164**(s1): S5-S113.
46. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 2018; **87**: 897-919.
47. Mafi A, Kim SK, Goddard WA, 3rd. The mechanism for ligand activation of the GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; **119**(18): e2110085119.

48. Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 1997; **9**(2): 134-42.
49. McCormick K, Baillie GS. Compartmentalisation of second messenger signalling pathways. *Current Opinion in Genetics & Development* 2014; **27**: 20-5.
50. Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**(12): 7599-602.
51. Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, Levine JD. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 1989; **32**(3): 577-80.
52. Taiwo YO, Levine JD. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 1991; **44**(1): 131-5.
53. Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; **108**(5): 671-80.
54. Malmberg AB. Protein kinase subtypes involved in injury-induced nociception. *Progress in Brain Research: Elsevier*; 2000: 51-9.
55. Isensee J, Diskar M, Waldherr S, et al. Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. *Journal of Cell Science* 2014; **127**(1): 216-29.
56. Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 1999; **19**(6): 2181-6.
57. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE: FRAMEWORK FOR A DIVERSE FAMILY OF REGULATORY ENZYMES. *Annual Review of Biochemistry* 1990; **59**(Volume 59, 1990): 971-1005.
58. Herberg FW, Taylor SS, Dostmann WRG. Active Site Mutations Define the Pathway for the Cooperative Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 1996; **35**(9): 2934-42.
59. Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**(10): 646-58.
60. Isensee J, Kaufholz M, Knape MJ, et al. PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination. *J Cell Biol* 2018; **217**(6): 2167-84.
61. Isensee J, Schild C, Schwede F, Hucho T. Crosstalk from cAMP to ERK1/2 emerges during postnatal maturation of nociceptive neurons and is maintained during aging. *Journal of Cell Science* 2017; **130**(13): 2134-46.
62. Greengard P. The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science* 2001; **294**(5544): 1024-30.
63. Ji R-R, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences* 2003; **26**(12): 696-705.
64. Kandel ER. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 2001; **294**(5544): 1030-8.
65. Souza ALS, Moreira FA, Almeida KR, Bertollo CM, Costa KA, Coelho MM. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *British Journal of Pharmacology* 2002; **135**(1): 239-47.
66. Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, Wang X-b. Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling. *The Journal of Neuroscience* 2005; **25**(21): 5109-16.
67. Crandall M, Kwash J, Yu W, White G. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *PAIN* 2002; **98**(1): 109-17.
68. Srinivasan R, Wolfe D, Goss J, et al. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 2008; **28**(7): 1241-54.
69. Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, García-Sanz N, Ferrer-Montiel A. Regulated Exocytosis Contributes to Protein Kinase C Potentiation of Vanilloid Receptor Activity *<sup>

70. Hundle B, McMahon T, Dadgar J, Messing RO. Overexpression of ϵ -Protein Kinase C Enhances Nerve Growth Factor-induced Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Neurite Outgrowth (*). *Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**(50): 30134-40.
71. Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* 2001; **21**(17): 6933-9.
72. Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sciences* 2004; **74**(21): 2643-53.
73. Ji R-R, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nature Neuroscience* 1999; **2**(12): 1114-9.
74. Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007; **55**(3): 365-76.
75. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; **426**(6966): 517-24.
76. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006; **68**: 619-47.
77. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2001; **2**(6): 387-96.
78. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**(1): 55-68.
79. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**(6653): 816-24.
80. Bhawe G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW. cAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation. *Neuron* 2002; **35**(4): 721-31.
81. Yao X, Kwan H-Y, Huang Y. Regulation of TRP Channels by Phosphorylation. *Neurosignals* 2006; **14**(6): 273-80.
82. Rosenbaum T, Morales-Lázaro SL, Islas LD. TRP channels: a journey towards a molecular understanding of pain. *Nature Reviews Neuroscience* 2022; **23**(10): 596-610.
83. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* 2007; **55**(3): 353-64.
84. Huang Y-Z, Ma J-X, Bian Y-J, et al. TRPV1 analgesics disturb core body temperature via a biased allosteric mechanism involving conformations distinct from that for nociception. *Neuron* 2024; **112**(11): 1815-31.e4.
85. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010; **120**(11): 3760-72.
86. Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 2018; **555**(7698): 662-6.
87. Weyer-Menkhoff I, Pinter A, Schlierbach H, Schänzer A, Lötsch J. Epidermal expression of human TRPM8, but not of TRPA1 ion channels, is associated with sensory responses to local skin cooling. *Pain* 2019; **160**(12): 2699-709.
88. Zhao J, Lin King JV, Paulsen CE, Cheng Y, Julius D. Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor. *Nature* 2020; **585**(7823): 141-5.
89. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 2007; **445**(7127): 541-5.
90. Hinman A, Chuang H-h, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; **103**(51): 19564-8.
91. Benarroch EE. Neuronal voltage-gated calcium channels. *Neurology* 2010; **74**(16): 1310-5.
92. Catterall WA. Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience Letters* 2010; **486**(2): 107-16.
93. De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA. Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the $\alpha 1$ subunit of the cardiac l-type calcium

- channel by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 1996; **35**(32): 10392-402.
94. Hell JW, Yokoyama CT, Wong ST, Warner C, Snutch TP, Catterall WA. Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 1993; **268**(26): 19451-7.
 95. Hosey MM, Chien AJ, Puri TS. Structure and Regulation of L-Type Calcium Channels: A Current Assessment of the Properties and Roles of Channel Subunits. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1996; **6**(8): 265-73.
 96. Anand U, Otto WR, Facer P, et al. TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neuroscience Letters* 2008; **438**(2): 221-7.
 97. Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H-h, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; **427**(6971): 260-5.
 98. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing. *The Journal of Neuroscience* 2005; **25**(16): 4052-61.
 99. Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2006; **17**(5): 582-91.
 100. Moriyama T, Higashi T, Togashi K, et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP Reveals Peripheral Nociceptive Mechanism of Prostaglandins. *Molecular Pain* 2005; **1**: 1744-8069-1-3.
 101. Meents JE, Fischer MJM, McNaughton PA. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PLOS ONE* 2017; **12**(1): e0170097.
 102. Rothermel JD, Stec WJ, Baraniak J, Jastorff B, Botelho LH. Inhibition of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp diastereomer of adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate. *J Biol Chem* 1983; **258**(20): 12125-8.
 103. Bacsikai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, et al. Spatially Resolved Dynamics of cAMP and Protein Kinase A Subunits in *Aplysia* Sensory Neurons. *Science* 1993; **260**(5105): 222-6.
 104. Badireddy S, Yunfeng G, Ritchie M, et al. Cyclic AMP Analog Blocks Kinase Activation by Stabilizing Inactive Conformation: Conformational Selection Highlights a New Concept in Allosteric Inhibitor Design ^{*}. *Molecular & Cellular Proteomics* 2011; **10**(3).
 105. Prinz A, Diskar M, Erlbruch A, Herberg FW. Novel, isotype-specific sensors for protein kinase A subunit interaction based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Cellular signalling* 2006; **18**(10): 1616-25.
 106. Gjertsen B, Mellgren G, Otten A, et al. Novel (Rp)-cAMPS Analogs as Tools for Inhibition of cAMP-kinase in Cell Culture: BASAL cAMP-KINASE ACTIVITY MODULATES INTERLEUKIN-1 β ACTION (*). *Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**(35): 20599-607.
 107. Wilkinson KD, Lee K, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The Neuron-Specific Protein PGP 9.5 Is a Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase. *Science* 1989; **246**(4930): 670-3.
 108. Isensee J, Kaufholz M, Knape MJ, et al. PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination. *Journal of Cell Biology* 2018; **217**(6): 2167-84.
 109. Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJ. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**(5): 3722-8.
 110. Nogueira E, Mangialavori IC, Loureiro A, et al. Peptide Anchor for Folate-Targeted Liposomal Delivery. *Biomacromolecules* 2015; **16**(9): 2904-10.
 111. Roederer M. Compensation in Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* 2002; **22**(1): 1.14.1-1.20.
 112. Andres C, Meyer S, Dina OA, Levine JD, Hucho T. Quantitative automated microscopy (QuAM) elucidates growth factor specific signalling in pain sensitization. *Mol Pain* 2010; **6**: 98.

113. Isensee J, Hucho T. HCS-Mikroskopie – ein Schlüssel zu intrazellulären Schmerzmechanismen. *BIOspektrum* 2017; **23**(3): 277-80.
114. UCHL1 ubiquitin C-terminal hydrolase L1 [Homo sapiens (human)]. 08-Sep-2024.
115. Day IN, Thompson RJ. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol* 2010; **90**(3): 327-62.
116. . Berlin, Boston: De Gruyter; 2016.
117. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. *MSOR connections* 2014; **1**.
118. Schoffemeer AN, Rice KC, Heijna MH, Hogenboom F, Mulder AH. Fentanyl isothiocyanate reveals the existence of physically associated mu- and delta-opioid receptors mediating inhibition of adenylate cyclase in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol* 1988; **149**(1-2): 179-82.
119. Isensee J, Krahé L, Moeller K, et al. Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Na^v1.7 knockout mice. *Science Signaling* 2017; **10**(461): eaah4874.
120. Levitan IB, Norman J. Different effects of cAMP and cGMP derivatives on the activity of an identified neuron: biochemical and electrophysiological analysis. *Brain Res* 1980; **187**(2): 415-29.
121. Schultz G, Hardman JG, Schultz K, Baird CE, Sutherland EW. The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; **70**(12): 3889-93.
122. Fredholm BB, Fuxe K, Agnati L. Effect of some phosphodiesterase inhibitors on central dopamine mechanisms. *Eur J Pharmacol* 1976; **38**(1): 31-8.
123. Samanta A, Kiselar J, Pumroy RA, Han S, Moiseenkova-Bell VY. Structural insights into the molecular mechanism of mouse TRPA1 activation and inhibition. *J Gen Physiol* 2018; **150**(5): 751-62.
124. Wu SW, Fowler DK, Shaffer FJ, Lindberg JEM, Peters JH. Ethyl Vanillin Activates TRPA1. *J Pharmacol Exp Ther* 2017; **362**(3): 368-77.
125. Ryckmans T, Aubdool AA, Bodkin JV, et al. Design and pharmacological evaluation of PF-4840154, a non-electrophilic reference agonist of the TrpA1 channel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; **21**(16): 4857-9.
126. Prober DA, Zimmerman S, Myers BR, et al. Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function. *J Neurosci* 2008; **28**(40): 10102-10.
127. Alpizar YA, Boonen B, Gees M, et al. Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. *Pflugers Arch* 2014; **466**(3): 507-15.
128. Gees M, Alpizar YA, Boonen B, et al. Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate. *Mol Pharmacol* 2013; **84**(3): 325-34.
129. Hoebart C, Rojas-Galvan NS, Ciotu CI, et al. No functional TRPA1 in cardiomyocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 2021; **232**(4): e13659.
130. Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA. Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; **72**(2): 590-4.
131. Hosford DA, Haigler HJ. Cyclic AMP, morphine, met-enkephalin and neuronal firing. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; **219**(2): 496-504.
132. Chepurny OG, Bertinetti D, Diskar M, et al. Stimulation of proglucagon gene expression by human GPR119 in enteroendocrine L-cell line GLUTag. *Mol Endocrinol* 2013; **27**(8): 1267-82.
133. Schwede F, Chepurny OG, Kaufholz M, et al. Rp-cAMPS Prodrugs Reveal the cAMP Dependence of First-Phase Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Mol Endocrinol* 2015; **29**(7): 988-1005.
134. Drozdov I, Svejda B, Gustafsson BI, et al. Gene network inference and biochemical assessment delineates GPCR pathways and CREB targets in small intestinal neuroendocrine neoplasia. *PLoS One* 2011; **6**(8): e22457.

135. Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annual review of physiology* 1994; **56**(1): 237-72.
136. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual review of biochemistry* 1990; **59**: 971-1005.
137. Zhang L, Duan CJ, Binkley C, et al. A Transforming Growth Factor β -Induced Smad3/Smad4 Complex Directly Activates Protein Kinase A. *Molecular and Cellular Biology* 2004; **24**(5): 2169-80.
138. Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The Transcriptional Activity of NF- κ B Is Regulated by the I κ B-Associated PKAc Subunit through a Cyclic AMP-Independent Mechanism. *Cell* 1997; **89**(3): 413-24.
139. Kohr MJ, Traynham CJ, Roof SR, Davis JP, Ziolo MT. cAMP-independent activation of protein kinase A by the peroxynitrite generator SIN-1 elicits positive inotropic effects in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; **48**(4): 645-8.
140. Niu J, Vaiskunaite R, Suzuki N, et al. Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation. *Current Biology* 2001; **11**(21): 1686-90.
141. Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. *Trends in cell biology* 1999; **9**(6): 216-21.
142. Zhang P, Knappe MJ, Ahuja LG, et al. Single Turnover Autophosphorylation Cycle of the PKA RII β Holoenzyme. *PLoS Biol* 2015; **13**(7): e1002192.
143. Zhang P, Smith-Nguyen EV, Keshwani MM, Deal MS, Kornev AP, Taylor SS. Structure and allostery of the PKA RII β tetrameric holoenzyme. *Science* 2012; **335**(6069): 712-6.
144. Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ, Cabot PJ. The μ Opioid Agonist Morphine Modulates Potentiation of Capsaicin-Evoked TRPV1 Responses through a Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase a Pathway. *Molecular Pain* 2006; **2**: 1744-8069-2-22.
145. Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, et al. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* 2006; **124**(6): 1269-82.
146. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2012; **464**(5): 425-58.
147. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochemical Pharmacology* 2007; **73**(10): 1646-56.
148. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, et al. The Capsaicin Receptor TRPV1 Is a Crucial Mediator of the Noxious Effects of Mustard Oil. *Current Biology* 2011; **21**(4): 316-21.
149. Angst Martin S, Clark J D. Opioid-induced Hyperalgesia: A Qualitative Systematic Review. *Anesthesiology* 2006; **104**(3): 570-87.
150. S1-Leitlinie Chronischer nicht tumorbedingter Schmerz, 2023.
151. Arnér S, Meyerson BA. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 1988; **33**(1): 11-23.
152. Sloan PA. Neuraxial pain relief for intractable cancer pain. *Current pain and headache reports* 2007; **11**: 283-9.
153. Glare P, Aubrey KR, Myles PS. Transition from acute to chronic pain after surgery. *The Lancet* 2019; **393**(10180): 1537-46.
154. Aley KO, Levine JD. Different mechanisms mediate development and expression of tolerance and dependence for peripheral mu-opioid antinociception in rat. *J Neurosci* 1997; **17**(20): 8018-23.
155. Vera-Portocarrero LP, Zhang E-T, King T, et al. Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain* 2007; **129**(1-2): 35-45.
156. King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals* 2005; **14**(4): 194-205.

157. Colvin LA, Bull F, Hales TG. Perioperative opioid analgesia—when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *The Lancet* 2019; **393**(10180): 1558-68.
158. King T, Qu C, Okun A, et al. Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity. *PAIN* 2011; **152**(9): 1997-2005.
159. Kang S-Y, Seo SY, Bang SK, Cho SJ, Choi K-H, Ryu Y. Inhibition of Spinal TRPV1 Reduces NMDA Receptor 2B Phosphorylation and Produces Anti-Nociceptive Effects in Mice with Inflammatory Pain. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; **22**(20): 11177.
160. Labuz D, Spahn V, Celik MÖ, Machelska H. Opioids and TRPV1 in the peripheral control of neuropathic pain – Defining a target site in the injured nerve. *Neuropharmacology* 2016; **101**: 330-40.
161. Wang S, Brigoli B, Lim J, Karley A, Chung M-K. Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. *Neuroscience* 2018; **384**: 290-9.
162. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(33): 13525-30.
163. Jain SM, Balamurugan R, Tandon M, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ISC 17536, an oral inhibitor of transient receptor potential ankyrin 1, in patients with painful diabetic peripheral neuropathy: impact of preserved small nerve fiber function. *PAIN* 2022; **163**(6): e738-e47.
164. Marchi M, Salvi E, Andelic M, et al. TRPA1 rare variants in chronic neuropathic and nociplastic pain patients. *PAIN* 2023; **164**(9): 2048-59.
165. Doran JF, Jackson P, Kynoch PAM, Thompson RJ. Isolation of PGP 9.5, a New Human Neurone-Specific Protein Detected by High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis. *Journal of Neurochemistry* 1983; **40**(6): 1542-7.
166. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 2005; **25**(16): 4052-61.
167. Bandell M, Story GM, Hwang SW, et al. Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 2004; **41**(6): 849-57.
168. Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; **55**(8): 949-65.
169. Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, Trang T. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *Journal of Neuroscience Research* 2017; **95**(6): 1242-56.
170. Körner J, Lampert A. Functional subgroups of rat and human sensory neurons: a systematic review of electrophysiological properties. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2022; **474**(4): 367-85.
171. Neuberger A, Oda M, Nikolaev YA, et al. Human TRPV1 structure and inhibition by the analgesic SB-366791. *Nat Commun* 2023; **14**(1): 2451.
172. Neuman MD, Bateman BT, Wunsch H. Inappropriate opioid prescription after surgery. *The Lancet* 2019; **393**(10180): 1547-57.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des generellen Signalweges der Nozizeption	18
Abbildung 2: Arbeitshypothese	31
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines 14 % BSA-Gradienten zur Gewinnung von Neuronen aus einer Zellsuspension.....	43
Abbildung 4: Darstellung der automatisierten Bildanalyse mittels HCS- Mikroskopie.....	49
Abbildung 5: Prästimulation mit Fentanyl führt zu einer Minderung des Signals der pRII Untereinheit in der Stimulation mit Serotonin in primär sensorischen Neuronen von Ratten.	55
Abbildung 6: Prästimulation mit Fentanyl beeinflusst die durch TRP Kanal Agonisten AITC und Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität in primär sensorischen Neuronen der Ratte nicht.	56
Abbildung 7: Prästimulation mit Fentanyl hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivierung in primär sensorischen Neuronen von Ratten nicht.	58
Abbildung 8: Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB führt in Langzeitstimulationen zu einem Anstieg der pRII Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.....	59
Abbildung 9 Prästimulation mit Rp-cAMPS-pAB inhibiert die PKA-II in Stimulationen mit Serotonin in primär sensorischen Neuronen von Ratten.	60
Abbildung 10: Rp-cAMPS-pAB hat keinen Einfluss auf die PKA-II nach Stimulationen mit AITC und Capsaicin in primär sensorischen Neuronen der Ratte:.....	62
Abbildung 11: Langzeitbehandlung mit Rp-cAMPS-pAB steigert in primärsensorischen Neuronen die ERK1/2 Aktivität:.....	63
Abbildung 12 Rp-cAMPS-pAB erhöht die Aktivität der ERK1/2 in Stimulationen mit AITC, nicht aber in Stimulationen mit Capsaicin oder Serotonin.....	64
Abbildung 13: Prästimulation mit IBMX erhöht die basale Aktivität der PKA-II in primär sensorischen Neuronen der Ratte.....	66
Abbildung 14: Prästimulation mit IBMX verlängert die Serotonin-induzierte PKA-II Aktivität, nicht aber die AITC- oder Capsaicin-induzierte PKA-II Aktivität	68
Abbildung 15: Darstellung der Normalisierten Daten der pRII Intensität der Prästimulation mit IBMX.	68
Abbildung 16: Prästimulation mit IBMX hat keinen Einfluss auf die ERK1/2 Aktivität in primär sensorischen Neuronen von Ratten nicht.	69
Abbildung 17: IBMX hat keinen Einfluss auf die pERK1/2 Intensität nach Stimulationen mit Serotonin, AITC oder Capsaicin in primär sensorischen Neuronen der Ratte:	70
Abbildung 19: Die Stimulation mit PF-4840154 in höheren Konzentrationen von führte zur signifikanten Erhöhung der pRII- Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.	72
Abbildung 20: Höhere Konzentrationen von PF-4840154 führten zur Erhöhung der pRII-Intensität.....	73
Abbildung 21: Die Stimulation mit PF-4840154 in höheren Konzentrationen von führte zu keiner signifikanten Erhöhung der pRII- Intensität in primär sensorischen Neuronen von Ratten.....	74
Abbildung 22: Anteil der Zellen, die nach Stimulation einen Calciumeinstrom zeigten.....	76
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils der KCl-responsiven reagierenden, primär sensorischen Neurone der Ratte.	77
Abbildung 24: zeitlicher Verlauf der Calbryte 630 AM Intensität in auf KCl-responsiven, primär sensorischen Zellen der Ratte.....	78
Abbildung 25 Mit Calbryte 360 AM behandelte primär sensorischen Neurone für das Calcium-Imaging.	78

Abbildung 26: Bildausschnitte von Kulturen primär sensorischer Neurone der Ratte nach Färbung mit Calbryte 630 AM.....	79
--	----

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete chirurgische Instrumente	32
Tabelle 2: verwendete (elektronische) Geräte	32
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 4: Verwendete Nährmedien	35
Tabelle 5: in den Nährmedien verwendete Zusätze	35
Tabelle 6: Reagenzien zur Zellkultur und Immunozytochemie	36
Tabelle 7: Für Calcium Imaging verwendete Salzlösung	37
Tabelle 8: verwendete Zusätze/Reagenzien für das Calcium Imaging	38
Tabelle 9: verwendeter Farbstoff für das Calcium Imaging.....	38
Tabelle 10: Zur mechanistischen Analyse verwendete Prästimulationen	38
Tabelle 11: Verwendete Rezeptorstimulantien	39
Tabelle 12: Verwendete Primäre Antikörper	39
Tabelle 13: Verwendete Sekundäre Antikörper	40
Tabelle 14: Verwendete Software.....	40

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Es wurden bisher keine Ergebnisse in „Peer Reviewed“ Zeitschriften veröffentlicht.