

Aus der Klinik für
Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der
Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. W. Böttiger

Die Rolle von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK

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

vorgelegt von
Jeremy Acuna
aus Köln

promoviert am 04. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. T. Hucho
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Koch

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 keine Unterstützungsleistungen erhalten.

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 Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Tim Hucho und Herr Dr. rer. nat. Anibal Garza Carbajal von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von der medizinisch-technischen Assistentin Frau Stephanie Brosig, sowie den biologisch-technischen Assistentinnen Maike Siobal und Jennifer Klimek durchgeführt worden.

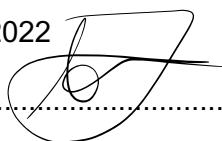
Die Unterstützung beinhaltete das Ansetzen des Neurobasal A-Mediums, die Beschichtung der Mikrotiterplatte, die Dissektion der Spinalganglien an den Versuchstieren, die Trituration sowie die Stimulation und Fixation der Zellen und die Durchführung der Immunhistochemie der Zellen. Ich führte unter Anleitung von Dr. rer. nat. Anibal Garza Carbajal die High-Content-Screening Mikroskopie sowie die graphische Darstellung und Analyse durch.

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 27.01.2022

Unterschrift:



Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Tim Hucho für die freundliche Aufnahme in das Forschungsteam und das interessante Forschungsthema danken. Außerdem möchte ich mich für die stets gute Betreuung bedanken.

Dr. Anibal Garza Carbajal möchte ich für die Einführung in das Thema, für die Betreuung und für seine wertvollen Ratschläge danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen der AG Hucho, das sind Alina, Andreea, Hanna, Jörg, Jennifer, Katharina, Leo, Maike, Marianne, Petra und Stephanie für das positive Arbeitsklima und die stets hilfsbereite Art aller Mitarbeiter bedanken.

Außerhalb des Labors möchte ich meiner Familie und Freunden danken. Meinen Eltern Cesar und Lorenza, meinem Bruder Lawrence und meiner Schwester Christina, die mich finanziell und moralisch stets unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei meiner Schwester für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Meinem besten Freund Joel möchte ich danken, dass er mich stets motiviert gehalten hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Ehefrau Alice bedanken, welche mich seit dem Beginn meines Studiums immer unterstützt hat. Ohne ihren emotionalen Halt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	9
2.1 Schmerz.....	9
2.1.2 Nozizeption.....	10
2.1.3 Schmerzmodulation und Sensibilisierung.....	11
2.1.4 CAMP, Proteinkinase A und Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 in der Schmerztransduktion	12
2.2 Der Glial cell line-derived neurotrophic factor - GDNF	16
2.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Tiere.....	20
3.2 Ansetzen des Neurobasal A-Mediums.....	20
3.3 Beschichtung der Mikrotiterplatte	21
3.4 Dissektion der Spinalganglien.....	21
3.5 Trituration – Vereinzelung der Zellen	23
3.6 Stimulation und Fixation	24
3.7 Immunhistochemie	24
3.8 High-Content-Screening Mikroskopie.....	25
3.9 Graphische Darstellung und Analyse.....	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1 Die Prästimulation mit GDNF verstärkt die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Forskolin	27
4.2 Die pERK-Intensität ist von der GDNF-Konzentration abhängig	29
4.3 GDNF beeinflusst bei einer Forskolin-Stimulation den cAMP-Crosstalk zu ERK unabhängig von PKA	31
4.4 GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs mit anhaltender Phase der pERK-Aktivierung.....	33
4.5 Die späte Phase der pERK-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist abhängig von PKA.....	35
4.6 Die pERK-/pRII-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist unabhängig von GRK2/3.....	37

4.7	Die frühe Phase der pERK-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist von PKC/Calcium abhängig.....	39
4.8	Die frühe Phase der ERK1/2-Phosphorylierung durch GDNF und Serotonin ist abhängig von MEK1/2	41
4.9	GDNF beeinflusst unter 007 den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2 43	
4.10	GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch den Epac Aktivator 007 unabhängig von GRK2/3	47
4.11	Nach dem Auswaschen von GDNF bleiben die Effekte des neurotrophischen Faktors erhalten	48
4.12	Die frühe Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von Priming; die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion.....	51
5.	Diskussion.....	55
5.1	GDNF und Forskolin.....	56
5.2	GDNF und die GPCRs	60
5.2.1	Prostaglandin E2	60
5.2.2	Cicaprost	62
5.2.3	Serotonin.....	63
5.3	GDNF und der Epac-Aktivator 007	67
5.4	GDNF führt ein Priming der Zellen herbei	69
5.5	Ausblick.....	72
6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang.....	91
7.1	Abbildungsverzeichnis	91
8	Vorabveröffentlichungen.....	92

Abkürzungsverzeichnis

007	8-CPT-2Me-cAMP
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
ART	Artemin
CHO	Chinese hamster ovary
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DOMS	Delayed onset muscle soreness
DRG	Dorsal Root Ganglion
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
FDC	Follicular dendritic cells
FGF	Fibroblast growth factor
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFL	GDNF-family of ligand
GFRα	GDNF-family receptor- α
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HCN	Hyperpolarization activated cation channels
HEK-293	Human embryonic kidney 293
HEL	Human erythroleukemia cells
hIP	Human prostacyclin receptor
hIP-CHO	Human prostacyclin receptor-chinese hamster ovary
HUVEN	Human umbilical vein endothelial cell
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	Interleukin
JNK1/2/3	c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3
LC	Lengthening contraction
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase

MDP	Mediale parvozelluläre Division
MEK	MAP2K
mIP-CHO	Mouse prostacyclin receptor - chinese hamster ovary
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NG108-15-Zellen	Neuroblastom-Gliom Zellen
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NGSB	Normal Goat Serum Blocking
NLK	Nemo-like kinase
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NTN	Neurturin
PDGF	Platelet-derived growth factor
pERK	Phosphorylated ERK
PGE2	Prostaglandin E2
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
pRII	Phospho PKA-RII
PSP	Persephin
PTB	Phosphotyrosine-binding domain
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SEM	Standardabweichung
SH2	Src homology 2
SK-N-SH cells	Menschliche Neuroblastom Zellen
SOS	Son of sevenless
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TGF-β	Transforming growth factor- β
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
UCHL1	Ubiquitin C-terminales Hydrolaseisozym L1
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die Rolle von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK. Hierzu wurden die Spinalganglien männlicher Sprague Dawley Ratten entnommen, das Gewebe der Spinalganglien gelöst und die Zellen vereinzelt sowie auf eine Mikrotiterplatte verteilt. Hiernach erfolgte die Prästimulation mit GDNF über Nacht bzw. 24 Stunden. Zur Forschung nutzten wir die High Content Screening Mikroskopie. Sie ermöglichte objektive, qualitative und quantitative Analysen an einer Vielzahl von Neuronen eines Tieres. Die intrazellulären Veränderungen wurden mit Hilfe schmerzsensibilisierender Mediatoren anhand der Zielproteine PKA-II und ERK1/2 bzw. ihrer phosphorylierten Zustände untersucht.

In der ersten experimentellen Serie konnte gezeigt werden, dass die Prästimulation mit GDNF die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Forskolin verstärkt. Daraufhin ließ sich nachweisen, dass GDNF in Abhängigkeit von seiner Konzentration die pERK-Intensität steigert. Höhere GDNF-Konzentrationen führten zu verstärkter ERK1/2-Phosphorylierung. Es konnten zwei Phasen der ERK-Aktivierung beobachtet werden: eine frühe Phase mit dem Klimax und mit anschließendem Abfall auf eine anhaltende Phase der ERK-Aktivierung. Dabei ist die ERK-Aktivierung unabhängig von PKA.

Als Nächstes untersuchten wir die Wirkung von GDNF in Zusammenhang mit den Mediatoren der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Hierbei verstärkt GDNF die ERK1/2-Aktivierung ebenso mit 2 Phasen. Eine frühe Phase, in der sich der Klimax zeigt, mit anschließendem Abfall auf eine anhaltende Phase der ERK-Aktivierung. Dabei ist die späte Phase der ERK-Aktivierung abhängig von PKA. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die pERK/pRII-Aktivierung durch GPCRs unabhängig von GRK2/3 und Protein Kinase C/Calcium ist. Die frühe Phase zeigte eine Abhängigkeit von MEK1/2.

Anschließend untersuchten wir den Einfluss von GDNF auf den EPAC-Aktivator 007. Auch hier konnte eine frühe Phase der ERK Aktivierung gezeigt werden, welche auf ein Plateau absank. Dabei ist die ERK1/2 Phosphorylierung durch 007 abhängig von Epac2 und unabhängig von GRK2/3.

Zuletzt untersuchten wir in einem Wash-out Experiment, ob die Wirkung von GDNF erhalten blieb. Auch unter Abwesenheit des neurotropischen Faktors blieben die Effekte erhalten, nachdem eine Prästimulation mit GDNF erfolgte. Dabei ist die frühe Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von Priming und die anhaltende Phase das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion.

2. Einleitung

2.1 Schmerz

Definition:

Nach der International Association for the Study of Pain von 1979 bis 1994 ist Schmerz "ein unangenehmes sensorisches und emotionales Ereignis, welches mit aktueller oder potenzieller Gewebsschädigung einhergeht oder im Begriff einer solchen Schädigung steht." (Loeser et al., 1979 to 1994).

Akuter Schmerz dient als Frühwarnsystem für den Körper, um ihn vor potentiellen Gewebsschäden zu schützen (Hardacker & Tolley, 2004). Er tritt bei einer Schädigung auf z. B. während bzw. nach einem Trauma oder einer Verbrennung. Im Gegensatz dazu ist chronischer Schmerz ein zeitlich länger andauernder Schmerz. Er kann sich zu einem Syndrom mit eigenem Krankheitswert entwickeln. Hierbei haben die Schmerzen die Warn- bzw. Schutzfunktion verloren. Chronischer Schmerz hat häufig nicht nur eine einzige schmerzauslösende Ursache, sondern ist oftmals multifaktoriell bedingt (Schulte am Esch et al., 2011).

Chronische Schmerzen stellen ein globales ökonomisches Problem dar. Schätzungsweise 20 % der Erwachsenen leiden weltweit an chronischen Schmerzen. Des Weiteren werden jedes Jahr weitere 10 % mit chronischen Schmerzen diagnostiziert (Breivik, Collett, Ventafridda, Cohen, & Gallacher, 2006; Goldberg & McGee, 2011). 20 % dieser chronischen Schmerzpatienten leiden an Begleiterkrankungen wie z. B. Depressionen (Breivik et al., 2006).

Akute Schmerzen sind in der Regel leichter zu behandeln. Der auslösende Faktor hat oftmals einen konkreten Beginn, z. B. nach einer Operation und ist somit leichter objektivierbar. Eine Therapie kann dementsprechend frühzeitig eingeleitet werden. Bei der Behandlung chronischer Schmerzen stehen die Mediziner oft vor dem Problem, keine kausale körperliche oder psychosoziale Ursache zu finden (Schulte am Esch et al., 2011).

2.1.2 Nozizeption

Nozizeption ist der sensorische Mechanismus, der es Tieren ermöglicht potenzielle gewebsschädigende Reize wahrzunehmen und zu vermeiden. In diesem Prozess werden thermische, mechanische oder chemische Reize von einer Subpopulation peripherer Nervenfasern, den Nozizeptoren erkannt (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009; Tracey, 2017). Dabei ist es möglich, dass Schmerzrezeptoren auf nur eine Art von Stimulus oder mehrere Stimulusarten gleichzeitig reagieren. Wird der Schmerzrezeptor stimuliert, wird ein nozizeptiver Impuls bis in das zentrale Nervensystem (ZNS) weitergeleitet (Kelly, Ahmad, & Brull, 2001). Die nozizeptive Transduktion bezieht sich auf den Prozess, in dem externe Reize in elektrische Signale umgewandelt werden (McEntire et al., 2016). Der Impuls kann mittels zwei verschiedener Arten von Neuronen weitergeleitet, den A-delta- und den C-Nervenfasern. A-delta-Nervenfasern haben im Gegensatz zu den C-Nervenfasern einen größeren Durchmesser, da sie myelinisiert sind. Sie leiten den Schmerz, der als scharf bzw. verletzender Schmerz wahrgenommen wird schnell weiter. C-Fasern sind unmyelinisiert und kleiner im Durchmesser. Die Schmerzweiterleitung durch C-Nervenfasern erfolgt langsamer und wird als dumpfer Schmerz wahrgenommen (Kelly et al., 2001). Die Zellkörper der Nervenfasern liegen in den Spinalganglien als pseudounipolare Nervenzellen vor (Tandrup, 1995). Von dort leiten primär afferenten Neurone das Signal in das Hinterhorn des Rückenmarks (Basbaum et al., 2009). Hier wird das Signal auf Neurone zweiter Ordnung übertragen. Diese kreuzen durch die Commissura alba nach kontralateral und gelangen im Tractus spinothalamicus zum Thalamus und zum somatosensorischen Kortex (Kelly et al., 2001). Der Thalamus dient als Verschaltungsstelle für die Signale, welche vom bzw. zum Kortex gelangen. Dabei findet neben der Verschaltung auch eine Modulation und Koordination der einzelnen Signale statt. Der Thalamus übernimmt die Rolle als „Tor zum Bewusstsein“. Hierbei kann man weiterhin den lateralen Thalamus in die sensorisch-diskriminative Komponente und den medialen Thalamus in die affektiv-emotionale Komponente unterteilen (R. Schmidt, F. Lang, & G. Thews, 2005).

Im Kortex erfolgt letztendlich die bewusste Schmerzwahrnehmung. Die beteiligten Komponenten der Schmerzwahrnehmung sind neben dem primären und sekundären somatosensorischen Kortex (S1 und S2) auch der insuläre Kortex, der anteriore cinguläre Kortex und der präfrontale Kortex (Apkarian, Bushnell, Treede, & Zubieta, 2005).

2.1.3 Schmerzmodulation und Sensibilisierung

Der Schmerz, der im Alltag wahrgenommen wird, unterscheidet sich mechanistisch von dem Schmerz, der z. B. nach Gewebsschäden oder Nervenschäden auftritt (Woolf, 1989). Gewebsverletzungen führen zur Modifizierung der peripheren und zentralen Schmerzsensibilität. Durch periphere Sensibilisierung kommt es zur Reduktion der Reizschwelle, die zur Aktivierung der peripheren afferenten Nozizeptoren nötig ist (Woolf & Chong, 1993). Im Gegensatz dazu kann z. B. eine periphere Entzündung mit dem daraus resultierenden persistierenden nozizeptiven Input zu einer erhöhten Freisetzung von Neurotransmittern (Glutamat, Substanz P, Calcitonin gene-related peptide, Brain-derived neurotrophic factor) führen. Durch Signaltransduktion erzeugen diese Neurotransmitter im Rückenmark und Gehirn einen Zustand neuronaler Übererregbarkeit und Hyperaktivität. Dieser Zustand wird als zentrale Sensibilisierung bezeichnet (Ji, Nackley, Huh, Terrando, & Maixner, 2018; Woolf, 1983; Woolf & Salter, 2000).

Man spricht von Allodynie, wenn ein harmloser Stimulus, wie z. B. eine leichte Berührung oder Wärme, als schmerzhaft wahrgenommen wird. Bei der Hyperalgesie werden leicht schmerzhaft stimuli als stark schmerzhaft empfunden (Basbaum et al., 2009).

Primäre Hyperalgesie bezieht sich dabei auf Sensibilisierung innerhalb und sekundäre Hyperalgesie auf Sensibilisierung außerhalb des verletzten Gebietes (Woolf & Chong, 1993).

Die Hypersensitivität manifestiert sich in der Steigerung der Reizantwort auf schädigende Stimuli und in der Senkung der Schmerzschwelle. Das rezeptive Feld der Nervenzellen des Hinterhorns ist nicht unveränderlich, sondern kann eine Reihe von Veränderungen durchlaufen. Diese Veränderungen können in der Größenzunahme des peripheren Rezeptorfeldes (räumliche Komponente), Veränderungen der Selektivität des Rezeptors bezüglich mechanischen, thermischen oder chemischen Stimuli (Modalität) oder Veränderung in der Aktivität des Rezeptors bezüglich der zeitlichen Abstimmung mit dem Stimulus (zeitliche Komponente) resultieren (Kelly et al., 2001; Willis & Coggeshall, 1991).

2.1.4 cAMP, Proteinkinase A und Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 in der Schmerztransduktion

In unseren Experimenten messen wir die Korrelation der Stimulantien zum Schmerz anhand der Proteinkinase A- und der Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2-Phosphorylierung. Da das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) hierbei auch eine wichtige Rolle spielt, werde ich im Folgenden näher auf diese Thematik eingehen.

Der erste zelluläre second messenger, der entdeckt wurde, war das zyklische Adenosinmonophosphat. Es wurde als erstes Molekül mit Schmerzsensitivierung in Verbindung gebracht (Hucho & Levine, 2007). Dabei zeigte die intradermale Injektion von membrangängigen cAMP-Analoga bzw. die Aktivierung der Adenylatzyklase mittels Forskolin eine Sensitivierung von Schmerzfasern bzw. eine Hyperalgesie gegenüber physikalischen Stimuli (Ferreira, Lorenzetti, & De Campos, 1990; Kress, Rodl, & Reeh, 1996; Taiwo, Bjerknes, Goetzl, & Levine, 1989). Signale, die über cAMP induziert werden erfolgen über die Aktivität seines Bindungspartners Protein Kinase A (PKA) (Hucho & Levine, 2007). Die cAMP-abhängige Protein Kinase A ist eine Serin/Threonin-Phosphotransferase. Es ist in ihrer inaktiven Form ein tetrameres Holoenzym. Hierbei besteht es aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten (Taylor, Buechler, & Yonemoto, 1990).

Bei niedrigen cAMP-Konzentrationen liegt PKA als inaktives R_2C_2 Holoenzym vor. Nach Bindung des second-messengers cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, trennt sich das Holoenzym in seine regulatorischen und katalytischen Untereinheiten (Taylor et al., 1990). Die katalytischen Untereinheiten können ihr Ziel phosphorylieren und somit viele zelluläre Vorgänge steuern (Pidoux & Tasken, 2010). Hierbei gibt es jedoch eine große Variabilität in der quarternären Struktur von PKA-Holoenzymen, die von verschiedenen Autoren beschrieben wird (Boettcher et al., 2011; Kim, Cheng, Saldanha, & Taylor, 2007; Vigil, Blumenthal, Taylor, & Trewhella, 2006; Wu, Brown, von Daake, & Taylor, 2007; P. Zhang et al., 2012).

Alpha-Untereinheiten werden sowohl in nicht-neuronalen als auch in neuronalen Geweben exprimiert, wohingegen beta-Untereinheiten vorwiegend in neuronalen Zellen exprimiert werden (Cadd & McKnight, 1989). Hierbei wird die RII- β -Untereinheit vorwiegend in nozizeptiven Neuronen exprimiert (Isensee, Diskar, Waldherr, Buschow, Hasenauer, Prinz, Allgower, et al., 2014).

Viele extrazelluläre Mediatoren wie z. B. Prostaglandin, Serotonin, Epinephrin und Endothelin modulieren die Nozizeption über den G-protein-gekoppelten Rezeptor

(GPCR). Nach der Bindung des Liganden kommt es zur Aktivierung der Adenylatzyklase, was zur Steigerung der cAMP-Konzentration führt (Alasbahi & Melzig, 2012). Die Adenylatzyklase existiert in mindestens neun verschiedenen Isoformen. Die verschiedenen Isoformen zeigen unterschiedliche Gewebeverteilungen und unterschiedliche biochemische sowie pharmakologische Eigenschaften auf. Forskolin ist dabei ein allgemeiner Aktivator aller Isoformen mit Ausnahme der Isoform Adenylatzyklase 9 (Alasbahi & Melzig, 2012; Dahle, Myhre, Aasen, & Wang, 2005; Defer, Best-Belpomme, & Hanoune, 2000; Hacker et al., 1998). Die Injektion von membrangängigen cAMP-Analoga bzw. Adenylatzyklaseaktivatoren senken den Schwellenwert, der zur Aktivierung der Nozizeptoren nötig ist, was letztendlich zur Hyperalgesie führt (Ferreira et al., 1990; Taiwo et al., 1989; Taiwo & Levine, 1991).

Die cAMP-Zielproteine, welche zu Hypersensitivität führen, sind vielzählig und nicht klar definiert. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A und die sogenannten "hyperpolarization activated cation channels (HCN-Kanäle)" werden beide direkt von cAMP aktiviert und sind mit in der Sensitivierung von Nozizeptoren involviert (Emery, Young, Berrococo, Chen, & McNaughton, 2011; Hucho & Levine, 2007; Malmberg, Chen, Tonegawa, & Basbaum, 1997; Schnorr et al., 2014). Gängige Schmerzmedikamente wie z. B. Opiode bzw. andere Nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs) zielen indirekt auf PKA (Pierre, Eschenhagen, Geisslinger, & Scholich, 2009). Aley et al. zeigte z. B., dass die Injektion von PKA-Inhibitoren zur Reduktion der Hyperalgesie führte, welche durch Entzündungsmediatoren ausgelöst wurde (Aley & Levine, 1999).

PKA phosphoryliert und sensitiviert Ionenkanäle wie z. B. spannungsgesteuerte Natriumkanäle NaV1.8 und den transient receptor potential channel TRPV1. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Funktionalität der Nozizeptoren (Bhave et al., 2002; England, Bevan, & Docherty, 1996; Fitzgerald, Okuse, Wood, Dolphin, & Moss, 1999; Jeske et al., 2008; Rathee et al., 2002; C. Wang, Li, & Huang, 2007; X. Zhang, Li, & McNaughton, 2008). Die Aktivierung von cAMP response-element-binding protein (CREB), welches womöglich ein Zielprotein von PKA ist, induziert Genexpression, welche für die langfristige Sensitivierung nötig ist (Ji, Kohno, Moore, & Woolf, 2003).

CAMP kann außerdem die Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) aktivieren (Frodin, Peraldi, & Van Obberghen, 1994; Vossler et al., 1997).

Die Familie der Extracellular-signal Regulated Kinases gehört zur Gruppe der Mitogen-activated protein kinases (MAPKs). MAPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, welche extrazelluläre Stimuli in eine große Reihe von zellulären Antworten umwandeln können.

Sie werden durch diverse Stimuli wie z. B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone, zellulärer Stress und Zellhaftung aktiviert (Widmann, Gibson, Jarpe, & Johnson, 1999). In Säugetieren werden 14 MAPKs beschrieben. Diese werden in sieben Gruppen unterteilt. Zu den konventionellen MAPKs gehören die extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3 (JNK1/2/3), p38 isoforms (α , β , γ , und δ) und ERK5. Atypische MAPKs beinhalten ERK3/4, ERK7 und Nemo-like kinase (NLK). Die bisher am meisten untersuchten Gruppen der MAPKs sind ERK1/2, JNKs und die p38 Isoformen (Cargnello & Roux, 2011; Coulombe & Meloche, 2007; Widmann et al., 1999).

ERK1 und ERK2 zeigen eine Ähnlichkeit von 83 % bezüglich ihrer Aminosäuresequenz. Sie werden in vielen Geweben exprimiert und zeigen ein besonders hohes Vorkommen im Gehirn, Skelettmuskel, Thymus und Herz (Boulton et al., 1990; Cargnello & Roux, 2011; Widmann et al., 1999). Dabei spielt ERK eine Rolle in der Regulation von vielen verschiedenen Prozessen wie z. B. Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Lernen, Überleben und Apoptose (Shaul & Seger, 2007).

ERK1 und ERK2 werden durch Wachstumsfaktoren wie z. B. platelet-derived growth factor (PDGF), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Nervenwachstumsfaktor (NGF) aktiviert (Boulton et al., 1990). Weiterhin werden sie auch durch Liganden für GPCRs, Zytokine und durch osmotischen Stress aktiviert (Raman, Chen, & Cobb, 2007). Das ERK1/2 Modul der Säugetiere besteht aus den MAPKKs (MAPKK Kinase) A-Raf, B-Raf und Raf-1, den MAPKKs (MAPK Kinase) MEK1 und MEK2 sowie den MAPKs ERK1 und ERK2 (Raman et al., 2007; Shaul & Seger, 2007). Dieses Modul wird vornehmlich von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) aktiviert, welche sich an der Zelloberfläche befinden. Bindet ein Ligand an den Rezeptor kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung, welches zur Autophosphorylierung von Tyrosin Resten des intrazellulären Anteils führt. Die phosphorylierten Reste dienen als Bindungsstellen für Proteine, welche Src homology 2 (SH2) oder phosphotyrosine-binding (PTB) Domänen enthalten wie z. B. Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Die am besten charakterisierte Signalkaskade zur Ras Aktivierung wird durch SOS (son of sevenless), einem Guanin-Nucleotide-Austauschfaktor (GEF), vermittelt. SOS führt, in Interaktion mit Grb2, zum Austausch von GDP mit GTP im Ras. Jetzt kann Ras mit seinem Zieleffektor Raf interagieren, der Kinase zur Initiierung des ERK1/2-Moduls (Karnoub & Weinberg, 2008). Die Signalwege, die zur ERK1/2-Phosphorylierung führen sind sehr vielfältig und kompliziert. Dabei wird die ERK-Aktivierung z. B. auch durch die Protein Kinase A und

Protein Kinase C (PKC) beschrieben (Hundle, McMahon, Dadgar, & Messing, 1995; Ji, Gereau, Malcangio, & Strichartz, 2009).

Ein Zusammenhang zwischen ERK und Hyperalgesie wird von vielen Autoren eindeutig beschrieben (Aley et al., 2001; Galan, Lopez-Garcia, Cervero, & Laird, 2002; Hucho & Levine, 2007; Ji, Baba, Brenner, & Woolf, 1999). So zeigte z. B. Galan et al., dass ERK-Aktivierung durch seine Phosphorylierung eine spezifische Rolle in der Aufrechterhaltung von Hyperalgesie bzgl. viszeralem Schmerz spielt (Galan, Cervero, & Laird, 2003). Forschungsergebnisse zeigen auch, dass ERK in dem Prozess der Nozizeption bezüglich somatischem Schmerz eine Rolle spielt. Dabei wird im Rattenmodell ERK1 und ERK2 durch akute schädliche Stimuli wie Formalin bzw. Capsaicin vermehrt exprimiert und in Hinterhornneuronen rasch aktiviert (Ji et al., 1999; Karim, Wang, & Gereau, 2001; Thomas & Hunt, 1993).

Weiterhin lässt sich zeigen, dass sowohl periphere als auch zentrale Entzündungen zu vermehrter ERK1/2-Phosphorylierung und zu Allodynie bzw. erhöhter Schmerzsensibilität führen (Karim et al., 2001; Obata et al., 2004). Obata und Noguchi zeigten, dass ERK-Phosphorylierung in Spinalganglien und Hinterhornneuronen als Antwort auf noxische Stimuli von peripheren Nerven auftritt. Diese ERK-Aktivierung trägt zur Aufrechterhaltung von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen bei (Obata & Noguchi, 2004).

2.2 Der Glial cell line-derived neurotrophic factor - GDNF

Der Glial cell line-derived neurotrophic factor gehört mit Artemin (ART), Persephin (PSP) und Neurturin (NTN) zur GDNF family of neurotrophic factors (Airaksinen, Titievsky, & Saarma, 1999). Diese neurotrophischen Faktoren werden oftmals auch als GDNF-family of ligand bezeichnet (Airaksinen & Saarma, 2002).

Anfangs wurde GDNF aus einer Ratten Glia Zelllinie B49 isoliert (L. F. Lin, Doherty, Lile, Bektesh, & Collins, 1993). GDNF gehört mit den anderen neurotrophischen Faktoren (GFLs) zur transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily. Diese enthalten sieben Cystein-Reste mit dem selben Abstandsverhältnis wie andere Mitglieder der TGF- β Familie (L. F. Lin et al., 1993).

Verity et al. demonstrierte den Anstieg der GDNF-Synthese bzw. Freisetzung in Ratten C6 Glioblastom-Zellen durch den fibroblast growth factor (FGF) -1, -2, -9 und den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin (IL) 1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Des Weiteren kann die GDNF-Synthese und -Freisetzung durch viele Signalwege aktiviert werden. Die dafür verantwortlichen Proteine bzw. Stimuli sind hierbei z. B. die Protein Kinase C, cyclisches Adenosinmonophosphat, Typ 2A Protein-Phosphatasen, Ca²⁺-Einstrom, Stickstoffmonoxid (NO) und oxidativer Stress (Verity et al., 1998).

Alle GFLs, einschließlich GDNF, wirken über die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Diese wurde erstmals im Jahre 1985 als Protoonkogen beschrieben (Takahashi, 2001). Die RTK ist ein Transmembranprotein, welches die Zellmembran nur einmal durchquert (Singlepass-Transmembranprotein). Dabei liegen 4 cadherin-like repeats extrazellulär und eine Tyrosinkinase-Domäne intrazellulär (Airaksinen & Saarma, 2002).

Es kommt zur Aktivierung von RET bei Bindung der GFLs an den GDNF-family receptor- α (GFR α). Dabei sind die GFR α über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden. Es gibt vier verschiedene GFR α -Rezeptoren (GFR α 1-4). Sie binden unterschiedlich spezifisch an die vier GFLs. So bindet z. B. GDNF vorwiegend an den GFR α -1 Rezeptor (Airaksinen et al., 1999; Baloh, Enomoto, Johnson, & Milbrandt, 2000; Lindahl et al., 2001; Takahashi, 2001). Nach dem ursprünglichen Modell von Jing et al. bindet ein GDNF-Dimer an monomere oder dimere GFR α 1-Rezeptoren. Dieser Komplex interagiert mit zwei RTKs. Es kommt zur Homodimerisation und zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste (Jing et al., 1996).

GDNF hat dabei viele verschiedene Effekte. Es fördert z. B. das Überleben von vielen verschiedenen Neuronen. Dazu gehören sowohl autonome Subpopulationen peripherer sensorischer Neurone als auch zentrale dopaminerge, noradrenerge und motorische Neurone (Arenas, Trupp, Akerud, & Ibanez, 1995; Buj-Bello, Buchman, Horton, Rosenthal, & Davies, 1995; Hearn, Murphy, & Newgreen, 1998; Henderson et al., 1994; Heuckeroth, Lampe, Johnson, & Milbrandt, 1998; L. F. Lin et al., 1993; Trupp et al., 1995). Experimente mit GDNF knock-out Mäusen zeigten, dass der Glial cell line-derived neurotrophic factor eine wichtige Rolle in der enterischen Innervation und Nieren- bzw. Harnleiterentwicklung spielt (Granholm et al., 1997; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996).

In vielen in vitro Experimenten ließ sich zeigen, dass GDNF neuroprotektive und reparative Effekte aufweist (Beck et al., 1995; Kearns & Gash, 1995; L. Li et al., 1995; Oppenheim et al., 1995; Tomac et al., 1995; Yan, Matheson, & Lopez, 1995; Zurn, Baetge, Hammang, Tan, & Aebischer, 1994). Im Rattenmodell und bei Rhesusaffen zeigte pharmakologisch induzierter Morbus Parkinson Symptombesserung durch den Einsatz von GDNF (Gash et al., 1996; Hoffer et al., 1994). Diese Eigenschaft gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen möchte man sich zunutze machen, um z. B. der Behandlung von Parkinson oder der amyotrophen Lateralsklerose näher zu kommen (Sanchez et al., 1996; Verity et al., 1998).

Nutt et al. beschrieb jedoch in einer Doppelblindstudie dass die Gabe von GDNF durch einen implantierten intrazerebroventrikulären Katheter die Symptome des Parkinson nicht verbessert. Ein Grund hierfür ist möglicherweise, dass GDNF die Zielgewebe, hierrunter das Putamen und die Substantia nigra nicht erreicht (Nutt et al., 2003). In einer weiteren placebokontrollierten doppelblind Studie von Lang et al. konnte keine signifikante Differenz in der Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) motor score erreicht werden. Als signifikant wurde eine Differenz von 25 % betrachtet (Lang et al., 2006). Die UPDRS ist die weit verbreitetste verwendete Skala für die klinische Untersuchung des Patienten mit Morbus Parkinson (Goetz et al., 2007).

Außerdem spielt GDNF im Schmerzmodell eine wichtige Rolle. Dabei zeigen sich gegenteilige Effekte in der Nozizeption. Die molekularen und zellulären Mechanismen dahinter sind bis heute noch schlecht verstanden (Devesa & Ferrer-Montiel, 2014). So zeigte Albers et al., dass erhöhte GDNF Level in der Haut den Schwellenwert für mechanische Reize in mechanosensitiven C-Fasern senkt. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Expression mechanosensitiver Kanäle (Albers, Woodbury, Ritter, Davis, &

Koerber, 2006). Malin et al. verdeutlichte in seiner Arbeit, dass die lokale Applikation von GFLs in die Hinterpfote von Mäusen thermale Hyperalgesie hervorruft (Malin et al., 2006). GDNF wirkt jedoch auch antinozizeptiv. Sakai et al. kam zu dem Ergebnis, dass GDNF mit neural cell adhesion molecule (NCAM) im Rattenmodell bzgl. neuropathischen Schmerzen analgetisch wirkt (Sakai, Asada, Seno, & Suzuki, 2008).

2.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Wirkungsspektrum von GDNF ist sehr vielfältig. Nach dem heutigen Wissensstand ist erwiesen, dass GDNF zu Hyperalgesie führen kann. Die genauen Mechanismen bzw. Prozesse, die zu GDNF induzierter Hyperalgesie führen, sind nur partiell beschrieben.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit soll die Rolle von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK näher verstanden werden. Hierbei liegt der Fokus dieser Arbeit auf den Signalwegen bzw. der Phosphorylierung der Extracellular-signal regulated Kinase 1/2 und der Protein Kinase A-II.

Folgende Fragen wurden genauer untersucht: Verstärkt die Prästimulation mit GDNF die Phosphorylierung der Kinasen? Ist diese Phosphorylierung abhängig von der benutzten GDNF-Dosis? Ist der cAMP-Crosstalk zu ERK unter Einfluss von GDNF abhängig von PKA? Wie beeinflusst GDNF die ERK-Phosphorylierung durch GPCRs? Wie verhalten sich die Kinasen bzw. die GDNF-prästimulierten Zellen bei einem Überangebot von cAMP durch die Hemmung der Phosphodiesterase bei Stimulation durch GPCRs? Welche Rolle spielt GRK2/3 in der Kinetik der GPCRs? Welche Rolle hat PKC und Calcium in der Kinetik der GPCRs? Wie beeinflusst MEK1/2 die Kinetik der GPCRs? Welche Rolle spielt GDNF in diesen Signalwegen?

Welche Rolle spielt Epac im cAMP-Crosstalk zu ERK? Wie verhalten sich hier die Kinasen bei Inhibition von PKA, Proteinkinase C/Calcium oder Epac? Was bewirkt GDNF in diesem Zusammenhang?

Sind die Effekte von GDNF abhängig von seiner Anwesenheit? Findet durch die Prästimulation von GDNF ein Priming in den Zellen statt?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Männliche Sprague Dawley Ratten (230-330 g) wurden von der Firma Harlan erhalten. Alle Experimente wurden nach dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Dies erfolgte mit der Zulassung des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz NRW (LANUV NRW, Lizenz 84-02.05.20.13.045).

3.2 Ansetzen des Neurobasal A-Mediums

Material:

- B-27 Supplement 1:50, Invitrogen, #17504
- L-Glutamate 1:270,3 (74 µl/20 ml NB, f.c. 25 µM, 1 mg/ml stock, 25µM=3,7 ug/ml), Sigma-Aldrich #27647
- L-Glutamine 1:400 (50 µl/20 ml NB, f.c. 0,5 mM, 200 mM stock), Sigma-Aldrich, #G6392
- Neurobasal-A Medium 1:1, Invitrogen, #12349-015
- Penicillin/Streptomycin 1:100, Life Technologies, #DE17-802E

Methode:

Zur Lagerung und Anfertigung einer Zellkultur wurden die oben genannten Biochemikalien in dem aufgeführten Verhältnis zusammengefügt. Das angefertigte Neurobasal A-Medium ist nötig, um die entnommenen Spinalganglien am Leben zu erhalten. Dabei sollte das Medium keine Veränderungen auf die Stoffwechselprozesse ausüben, um unsere Experimente nicht zu verfälschen. Das B-27 besteht vor allem aus Insulin und ist in der Kombination mit den Aminosäuren für das Überleben der Neurone unerlässlich. Das Hinzufügen von Antibiotika, in diesem Fall Penicillin und Streptomycin, soll das Wachstum von Bakterien unterbinden.

3.3 Beschichtung der Mikrotiterplatte

Material:

- Poly-L-Ornithine Hydrochloride, Sigma, #P2533
- Laminin, Invitrogen, #23017-015
- Mikrotiterplatte: 96 well TC surface plate: Greiner !BioOne, Black,#655090
- 8-Kanal-Sauger

Methode:

Die Mikrotiterplatte wird mit Poly-L-Ornithine und Laminin beschichtet. Dabei wurden 50 µl der Ornithin-Laminin-Lösung pro Well hinzugefügt. Anschließend musste die Mikrotiterplatte mit Ornithin-Laminin-Lösung für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren. Ohne die Beschichtung wäre es den Neuronen nicht möglich, sich sicher am Boden der Mikrotiterplatte anzuheften.

Kurz vor Aussaat der Neurone auf die Mikrotiterplatte, wurde der Ornithin-Laminin-Rest, mithilfe eines 8-Kanal-Saugers entfernt.

3.4 Dissektion der Spinalganglien

Material:

- 1x kleine Petrischale mit 2,5 ml Neurobasal A-Medium, Invitrogen, #12349-015
- 1x kleine Petrischale mit 2,5 ml MEM, Invitrogen, #42360-024
- 70% Ethanol
- Chirurgische Pinzette
- Gebogene Pinzette
- Gerade Pinzette (klein)
- Guillotine
- Kollagenase P (5 U/ml), Roche #1213857
- Medizinischer Seitenschneider
- Mikrofederschere
- Mikroskop
- Rongeur
- Skalpell mit Wechselklinge

Methode:

Die Dissektion der Spinalganglien wurde an männlichen Ratten durchgeführt. Diese wurden mithilfe von Kohlenstoffdioxid langsam narkotisiert und getötet. Die Ratte wurde entnommen, sobald keine Atmung und Bewegung mehr festzustellen war. Um den Tod der Ratte sicherzustellen, entnahm man die Ratte aus dem Käfig und komprimierte eine Pfote um einen Schmerzreiz auszulösen. Ein Ausbleiben einer Reaktion galt als Todeszeichen.

Für die Dokumentation war das anschließende Wiegen der toten Ratte nötig. Darauf folgte die Desinfektion der Ratte mit 70 % Ethanol und anschließender Dekapitation mithilfe einer Guillotine. Unter rhythmischer und schneller Kompression der Brustkorbes ermöglichten wir das Ausbluten der Ratte, da dies die spätere Isolation der Spinalganglien erleichtert.

Die Präparation begann mit einer medialen länglichen Inzision der Haut vom Hals bis zum Schwanz mit dem Skalpell. Um möglichst freie Sicht auf die Rückenmuskulatur zu haben, wurde die Haut zusätzlich seitlich abpräpariert. Es folgten zwei paravertebrale Schnitte entlang der Wirbelsäule. Daraufhin wurde die der Wirbelsäule aufliegenden Muskulatur mithilfe einer chirurgischen Pinzette von kranial nach kaudal abgezogen. Des Weiteren wurde seitlich abstehende Muskulatur sauber von der Wirbelsäule abpräpariert.

Mithilfe eines Rongeurs wurde auf zervikaler Ebene ein Zugang zum Rückenmarkskanal geschaffen. Mithilfe des medizinischen Seitenschneiders erfolgte die Freilegung des gesamten Rückenmarkskanals samt Rückenmark bis hin zum Becken.

Die Spinalganglien befinden sich in den Foramina intervertebralia. Unter dem Mikroskop wurde das Rückenmark vorsichtig zur Seite geschoben, sodass die Spinalganglien sichtbar wurden. Um die Ganglien möglichst wenig zu verletzen, wurde mithilfe einer gebogenen Pinzette hinter dem sichtbaren Ganglion gegriffen und mit der Mikrofederschere die Verbindung zunächst zur Peripherie und anschließend zum Rückenmark zertrennt.

Die zwölf Spinalganglien von L1 bis L6 wurden in einer Petrischale mit 2,5 ml MEM gesammelt. Anschließend wurden diese von überschüssigem Blut, anhängendem Gewebe und Rückenmarkshäuten so gut wie möglich gesäubert. Dies erfolgte mithilfe der geraden und gebogenen Pinzette. Zuletzt wurden die gesäuberten Spinalganglien in der Petrischale mit 2,5 ml Neurobasal A-Medium gegeben und mit 100 µl Kollagenase für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂-Luftkonzentration inkubiert.

3.5 Trituration – Vereinzeln der Zellen

Material:

- 3x 15 ml Falcon tube
- 8-Kanal-Pipette
- Bovine Serum Albumine: Sigma-Aldrich, # A2153-100G
- GDNF, PeproTech, # 450-10-10
- Mikrotiterplatte: 96 well TC surface plate: Greiner !BioOne, Black, #655090
- Neurobasal-A Medium, Invitrogen, #12349-015
- Pasteurpipette mit schmaler Öffnung
- Pasteurpipette mit weiter Öffnung
- Sigmacote, Sigma-Aldrich, # SL2-100ML
- Zentrifuge

Methode:

Nach der einstündigen Inkubation mit 100 µl Kollagenase wurden die Spinalganglien mit einer Pasteurpipette mit der weiten Öffnung in ein Falcontube mit 2,5 ml Neurobasal-A Medium überführt. Nach einer Wartezeit von 30 Sekunden sammelten sich die Ganglien auf dem Boden des Falcontubes. Das angesammelte Zellpellet wurde in ein zweites Röhrchen mit 2,5 ml Neurobasalmedium überführt. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette mit weiter Öffnung auf- und abpipettiert. Durch das Auf- und Abpipettieren entstehen in der Pasteurpipette Turbulenzen, welche das Gewebe der Spinalganglien lösen und die Zellen vereinzeln. Nach einer Wartezeit von 30 Sekunden wurde der Vorgang in einem dritten Falcontube wiederholt, diesmal jedoch mit einer Pasteurpipette mit schmaler Öffnung. Dies stellte sicher, dass sich auch kleine Gewebsreste lösen.

Die Zellsuspension wurde daraufhin auf 1,5 ml 15%iges Bovine Serum Albumin (BSA) vorsichtig und langsam überführt, sodass zwei Phasen zu erkennen sind. Das BSA hat aufgrund des hohen Proteinanteils eine höhere Dichte, sodass sich die Zellsuspension darüber sammelte. Es diente als Filter, welche bei der Zentrifugation (8 min, 180 G, 20 °C, Beschleunigung = 8, Bremsung = 4) nur die kleinen vereinzelt Nervenzellen durch lässt.

Das nach Zentrifugation in der oberen Phase verbliebene Gewebe und Medium wurden entfernt und in 1 ml Neurobasal A-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden weitere 6 ml Neurobasal A- Medium hinzugefügt. Je nach Experiment, wurden 32 bis 96 Wells

der Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl der Zellsuspension mithilfe einer 8-Kanal-Pipette befüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für zwei Stunden inkubiert, damit sich die Zellen von dem physikalischen Stress erholen konnten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde in jedes Well 30 ng GDNF/ml hinzugefügt und über Nacht bzw. 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.6 Stimulation und Fixation

Die Stimulation und Fixation der Zellen erfolgte mithilfe eines Inkubators auf einem Wärmeblock bei 37 °C. Hierzu wurden entsprechend des Plattenplans 12,5 µl der Stimulantien auf eine V-bottom plate gegeben. 50 µl Medium der Mikrotiterplatte werden mithilfe einer 8-Kanalpipette auf die V-bottom plate überführt. Das Medium und die Stimulantien werden insgesamt 3 Mal durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dies erfolgte im Pip-Modus der 8-Kanalpipette bei der Geschwindigkeit 3 hoch und 2 runter. Im Anschluss wurden 50 µl der V-bottom plate entsprechend des Zeitplans auf die Mikrotiterplatte zurück überführt.

Hierbei ist zu beachten, dass die Konzentration der Stimulantien in der V-bottom plate 10-fach der gewünschten Konzentration entsprechen muss, da durch das Hinzufügen von 50 µl Medium die Konzentration um den Faktor 5 abnimmt. Durch das Rücküberführen von wieder 50 µl Medium und Stimulus in die vorhandenen 50 µl Medium der Mikrotiterplatte wird die Konzentration nochmals halbiert. Die Kontrollgruppen wurden mithilfe von Puffern und Stammlösungen behandelt.

Die Fixation bzw. der Stopp der Stimulation wird durch die Hinzugabe von 100 µl 8 % PFA pro Well eingeleitet (Pip-Modus: 7 hoch, 3 runter). Nach 10 Minuten wird das Medium entfernt und durch 100 µl DPBS ersetzt. Diesen Vorgang bezeichnen wir als Waschen. Um sicherzustellen, dass keine PFA-Reste in den Wells vorhanden sind, wird anschließend in 10-minütigen Abständen die Mikrotiterplatte noch weitere 2 Mal gewaschen (Pip-Modus: 4 hoch, 3 runter).

3.7 Immunhistochemie

Bevor die Zellen mit den Antikörpern behandelt wurden, war es nötig die Neurone zu blocken und zu permeabilisieren. Die Zellen wurden deshalb mit Normal Goat Serum Blocking (NGSB) behandelt. Dies stellte sicher, dass die Antikörper in die Zelle gelangen

und spezifischer binden können. Hierfür wurde das DPBS mit 50 µl NGSB pro Well ersetzt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgten drei Waschgänge für 10 Minuten mit 100 µl DPBS pro Well (Pip-Modus: 4 hoch, 3 runter).

Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper, welcher in 1 % BSA gelöst wurde. Bei den verwendeten Primärantikörpern handelte es sich um ch-PGP (1:2000), ra-pRII (1:1000) und mo-pERK (1:250). Hierzu wurde mithilfe einer 8-Kanalpipette das DPBS entfernt und 30 µl Primärantikörper pro Well hinzugegeben. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte bei 4 °C über Nacht gelagert.

Es erfolgten drei weitere Waschvorgänge mit 100 µl DPBS für je 10 Minuten. Die Sekundärantikörper wurden in PBS im Verhältnis 1:1000 gelöst. Dabei handelte es sich um die Sekundärantikörper go-A488-ch, go-A568-ra und do-A647-mo. Dabei wurden 50 µl pro Well des Sekundärantikörpers sowie DAPI (1:100) benutzt. Es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde unter Lichtschutz.

Nach drei Waschvorgängen mit 100 µl DPBS für 10 Minuten wurde jedes Well mit 200 µl DPBS befüllt und mit Aluminium-Klebefolie versiegelt.

3.8 High-Content-Screening Mikroskopie

Die Analyse der sensorischen Neurone erfordert quantitative Methoden, welche die Analyse einer großen Anzahl von Neuronen ermöglicht, um die Population in ihrer Gesamtheit beschreiben zu können. Um dies zu erreichen, haben wir das Verfahren der High-Content-Screening Mikroskopie (HCS) angewandt. Die HCS-Mikroskopie nimmt automatisiert Bilder von markierten DRG-Kulturen in Multiwell-Platten in bis zu vier Fluoreszenzwellenlängenkanälen auf. Die Neurone werden anhand ihrer Expression des neuronalen Markers Ubiquitin C-terminales Hydrolaseisozym L1 (UCHL1, auch bekannt als PGP9.5) in Kombination mit Objektauswahlparametern identifiziert. Diese sind für die kugelförmige Geometrie von Neuronen nach Kurzzeitkultur optimiert (Andres, Meyer, Dina, Levine, & Hucho, 2010; Isensee, Diskar, Waldherr, Buschow, Hasenauer, Prinz, Allgöwer, et al., 2014; Isensee, Schild, Schwede, & Hucho, 2017; Isensee, Wenzel, et al., 2014).

Die gefärbten Kulturen wurden anschließend im Thermo Scientific - Cellomics Array Scan VTI gescannt. Dazu wurde ein Standard Neuronen Protokoll benutzt. Die Bilder entstanden mithilfe eines 10x Objektivs und wurden mithilfe des Cellomics Software

Paketes analysiert. Dabei wurden die Bilder in der Auflösung 512 x 512 Pixel aufgenommen.

Die Hintergrundkorrektur der Bilder in der UCHL1-Färbung erfolgte mithilfe eines Tiefpassfilters. Diese wurden in Binärbilder konvertiert (bei festgelegtem Schwellenwert) und geometrisch segmentiert. Die Neuronen wurden über Objekt-Selektionsparameter identifiziert – Größe: 165-5500 μm^2 ; Kreisform ($\text{Umfang}^2/4\pi$ Feld): 1-3; Länge-zu-Breite-Verhältnis 1-2; Durchschnittliche Intensität: 1000-12000; Totale Intensität: 24×10^4 - 4×10^7 . Bildmasken wurden benutzt, um die Signale in den anderen Kanälen zu quantifizieren.

Um den Spill-over zwischen den drei Fluoreszenz-Kanälen herauszunehmen, wurden drei Wells zur Kontrolle gescannt - Well 1: UCHL1; Well 2: UCHL1 + Antikörper 2; Well 3: UCHL1 + Antikörper 3. Die Spillover-Werte wurden dann in eine symmetrische Matrix gesetzt. Anschließend wurden diese mittels Matrix Algebra invertiert, um Kompensationswerte zu erhalten. Dies erfolgte unter Verwendung der Software R (Version 3.2.3). Diese Werte konnten dann zur Kompensation des Spill-overs benutzt werden (Roederer, 2002).

3.9 Graphische Darstellung und Analyse

Die Daten der Kontroll- bzw. nicht-stimulierten Zellen wurden auf den Mittelwert 1 oder 1000 normalisiert, um die Variabilitäten der totalen Intensität innerhalb einer experimentellen Serie auszugleichen.

Abbildungen wurden anschließend mit den normalisierten Daten über die GraphPad Software Prism 7 und später Prism 8 erstellt. Die statistische Analyse erfolgte auch mittels Prism 7 und Prism 8. Als statistischer Test wurde der Two-way Anova multiple comparisons gewählt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde unter einem p-Wert von 0,05 als signifikant bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Die Prästimulation mit GDNF verstärkt die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Forskolin

In dieser experimentellen Serie wollten wir herausfinden, wie sich die Prästimulation mit GDNF über 24 Stunden bzw. über Nacht auf eine Stimulation mit Forskolin auswirkt. Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und regt somit die Produktion von cAMP an (Taiwo & Levine, 1991). Hier wurden die Zellen mit GDNF über 24 Stunden prästimuliert und anschließend mit Forskolin in verschiedenen Dosen (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 μM) für 5 bzw. 30 Minuten stimuliert.

Insgesamt ließ sich zum 5-Minuten-Zeitpunkt (Abb. 1A) eine stärkere pERK-Intensität nach Stimulation mit Forskolin aufweisen als zum 30-Minuten-Zeitpunkt (Abb. 1B). Steigende Forskolin Konzentrationen zeigten hier steigende pERK-Aktivität. Dabei zeigte sich die maximale ERK1/2-Phosphorylierung bei einer Konzentration von 10 μM Forskolin mit ungefähr 2,25-facher Steigerung gegenüber dem Basalwert von ERK. Sowohl nach 5 Minuten als auch nach 30 Minuten zeigte die Prästimulation mit GDNF eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 durch die Stimulation mit Forskolin. Zum 5-Minuten-Zeitpunkt ließen sich für die Dosen 1 μM ($F_{1,28} = 75,19$; $p = 0,0159$), 3 μM ($p = 0,0003$), 10 μM ($p < 0,0001$) und 30 μM ($p < 0,0001$) Forskolin statistisch signifikante Steigerungen der ERK1/2-Phosphorylierung beobachten (Abb. 1A). Zum 30-Minuten-Zeitpunkt ließen sich für die Dosen 3 μM ($F_{1,28} = 31,35$; $p = 0,0194$) und 10 μM ($p = 0,0317$) Forskolin statistisch signifikante Steigerungen der ERK1/2-Phosphorylierung beobachten (Abb. 1B). Bei einer Prästimulation mit GDNF und einer Konzentration von 10 μM Forskolin stieg die pERK-Intensität bis auf das 1,6-fache an.

Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine verstärkte Phospho-Intensität von PKA-RII durch Forskolin. Dies galt sowohl für die 5-minütige (Abb. 1C, $F_{1,28} = 0,2368$; $p > 0,9999$) als auch die 30-minütige Stimulation (Abb. 1D, $F_{1,28} = 0,01323$; $p > 0,9999$). Hier verliefen die Kurven trotz GDNF-Behandlung sowohl zum 5-Minuten-Zeitpunkt als auch zum 30-Minuten-Zeitpunkt sehr nah beieinander. Wie in pERK zeigten steigende Forskolin Konzentrationen steigende pRII-Intensitäten auf. Nach 30 Minuten war auch hier ein Abfall der pRII-Intensität bei einer Konzentration von 30 μM Forskolin und GDNF Prästimulation zu beobachten.

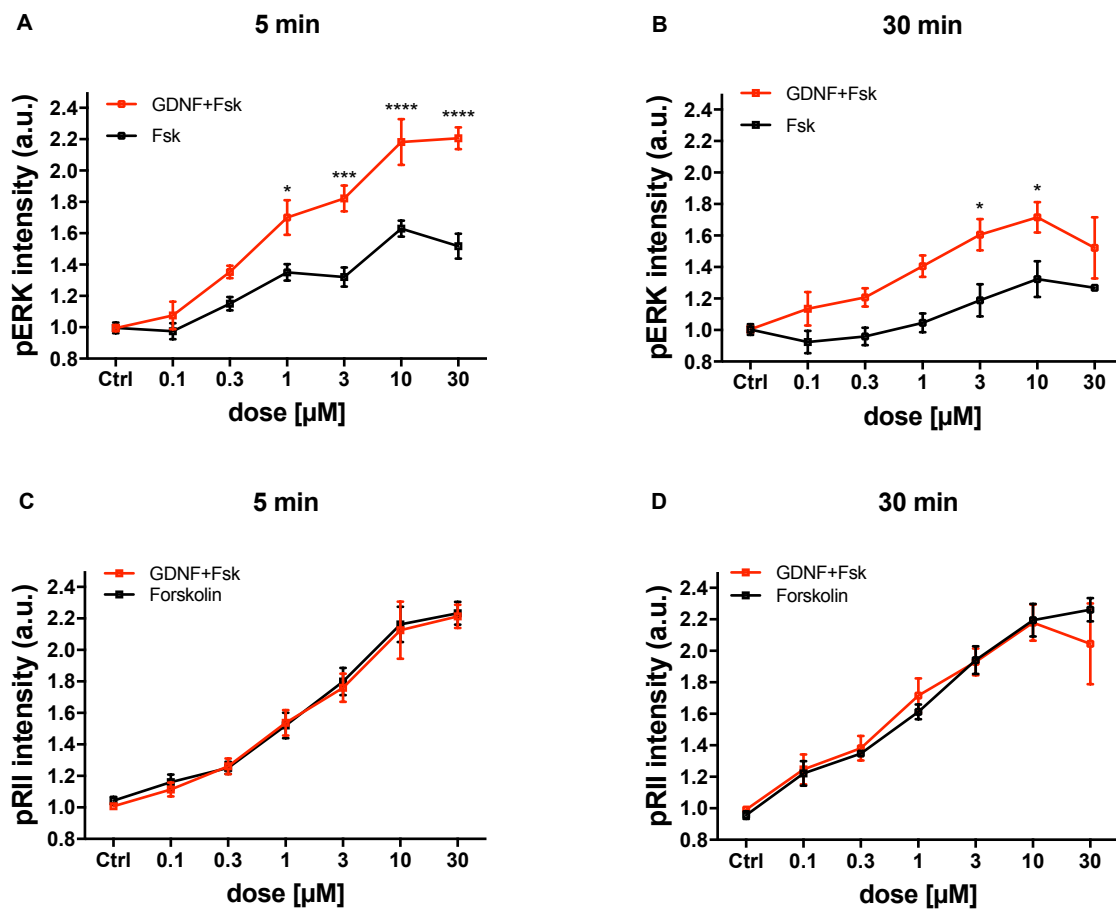


Abbildung 1: Dosis-Wirkungs-Kurve der pERK- (A) und pRII-Intensität (B) nach 5- und 30- minütiger Stimulation mit Forskolin

(A) Prästimulation mit GDNF führte zu verstärkter Antwort auf Forskolin (Fsk) in pERK. Forskolin steigerte konzentrationsabhängig (Dosis 0,1 μM - 30 μM) die pERK-Intensität. (B) Prästimulation mit GDNF führte zu keiner verstärkten Antwort auf Forskolin in pRII. Forskolin führte mit steigender Konzentration zu verstärkter pRII-Intensität. Normalisierte pERK- und pRII-Intensitäten unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl). Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Forskolin und GDNF+Forskolin.

4.2 Die pERK-Intensität ist von der GDNF-Konzentration abhängig

Im weiteren Verlauf wollten wir uns anschauen wie sich verschiedene GDNF Konzentrationen auf die ERK1/2-Phosphorylierung auswirkt. Hierzu wurden zur 24-stündigen Prästimulation die Zellen mit 0.1, 0.3, 1, 3, 10 und 30 ng GDNF/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 oder 30 Minuten mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Wie bereits zuvor aufgezeigt, verstärkte GDNF auch hier die Forskolin vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung zum 5- und 30-Minuten-Zeitpunkt. Auch zeigte die ERK1/2-Phosphorylierung nach 5 Minuten (Abb. 2A) höhere Werte im Vergleich zur 30-minütigen Stimulation (Abb. 2B). Des Weiteren war die pERK-Intensität abhängig von der benutzten GDNF Dosis. Bei höheren GDNF-Konzentrationen war eine erhöhte pERK-Intensität zu beobachten. In dieser experimentellen Serie lag der Höchstpunkt der pERK-Intensität bei 30 ng GDNF/ml. Dies galt sowohl für die 5-minütige (pERK=2,3, $F_{1,32} = 198,5$; $p < 0,0001$) als auch die 30-minütige Stimulation (pERK=1,9, $F_{1,32} = 142,6$; $p = 0,0001$). Bei der Stimulation mit 10 μ M Forskolin ließen sich ab einer Konzentration von 3 ng GDNF/ml statistisch signifikante Steigerungen (bzgl. der Kontrollgruppe) der pERK-Intensität beobachten (5 min: $F_{1,32} = 198,5$; $p = 0,0002$; 30 min: $F_{1,32} = 142,6$; $p = 0,0001$). Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich zum 30-Minuten-Zeitpunkt eine signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung ab einer Konzentration von 10 ng GDNF/ml ($F_{1,32} = 142,6$; $p = 0,0022$).

Durch die Stimulation mit Forskolin stieg die pRII-Intensität zum 5-Minuten-Zeitpunkt bis auf das 1,8-fache an (Abb. 2C). Hier führte die Prästimulation mit steigender GDNF-Konzentration über 24 Stunden keinen verstärkenden Effekt auf die pRII-Intensität bei der Stimulation mit 10 μ M Forskolin herbei. Auch zum 30-Minuten-Zeitpunkt war das gleiche Verhalten zu beobachten (Abb. 2D). Dies suggeriert uns, dass GDNF mit Forskolin die pERK-Aktivität verstärkt ohne die PKA-Antwort zu beeinflussen.

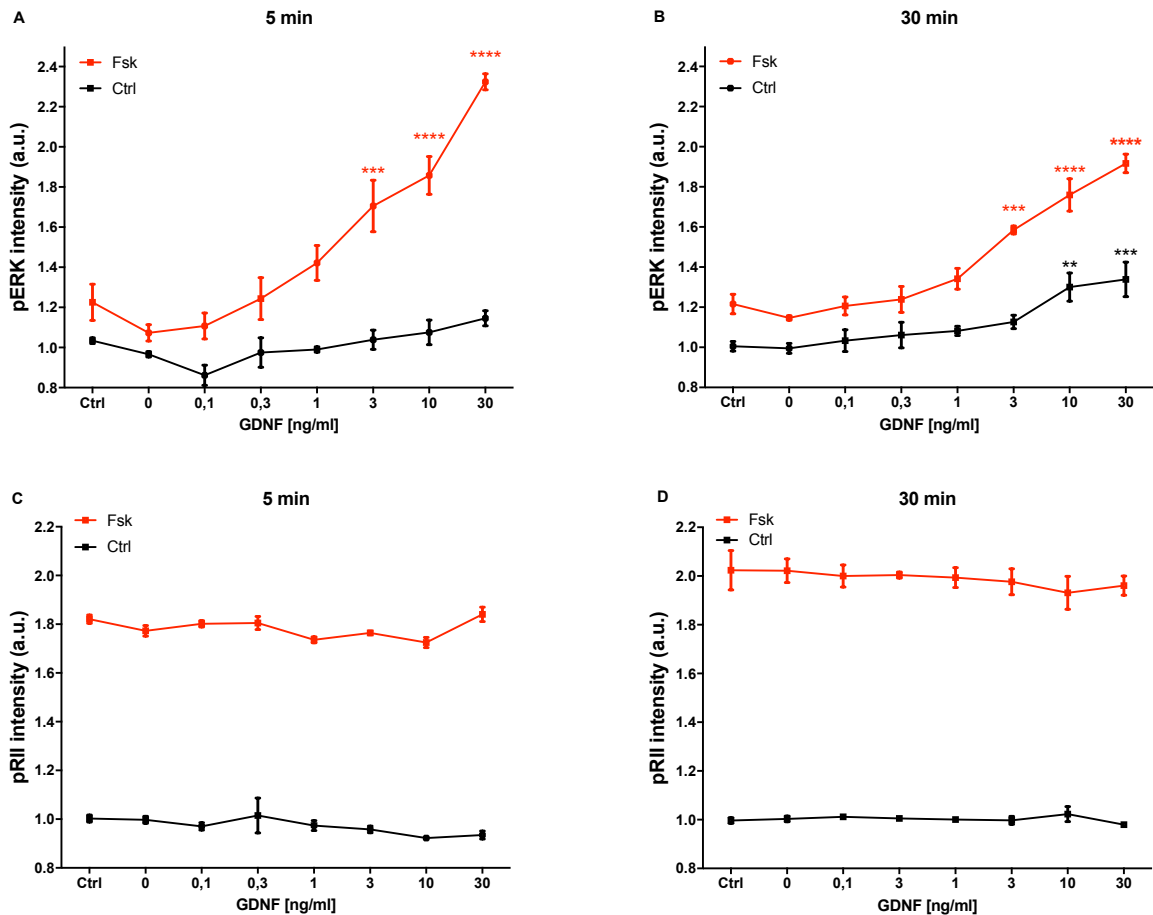


Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Kurve der pERK (A) und pRII-Intensität (B) bei unterschiedlichen GDNF Konzentrationen und einheitlicher Forskolin Konzentration

(A) Prästimulation mit GDNF in steigender Konzentration (0 - 30 ng/ml) und 5- bzw. 30-minütiger Stimulation mit 10 μ M Forskolin. Steigende GDNF-Konzentrationen zeigten ansteigende ERK1/2-Phosphorylierung. (B) Steigende GDNF Konzentrationen zeigten keinen verstärkenden Effekt in der pRII-Intensität auf die Stimulation mit 10 μ M Forskolin über 5 und 30 Minuten. Normalisierte pERK- und pRII-Intensitäten unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl). Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen den verschiedenen GDNF-Konzentrationen und der Kontrollgruppe (Ctrl/GDNF-Ctrl).

4.3 GDNF beeinflusst bei einer Forskolin-Stimulation den cAMP-Crosstalk zu ERK unabhängig von PKA

In dieser experimentellen Serie wurden die Zellen mit 30 ng GDNF/ml über Nacht prästimuliert und mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Die Zellen wurden hierzu über 0, 2,5, 5, 15, 30 bzw. 60 Minuten mit Forskolin stimuliert. Die Experimente sollten dazu dienen, um uns die PKA-Abhängigkeit von GDNF im cAMP-Crosstalk zu Erk zu veranschaulichen. Hierzu benutzten wir H89. H89 ist ein PKA-Inhibitor (Hidaka, Hagiwara, & Chijiwa, 1990). Bevor die Stimulation mit Forskolin begann, wurde ein Teil der Zellen mit 20 μ M H89 über 60 Minuten inhibiert.

Die alleinige Stimulation durch Forskolin zeigte in pERK einen zweiphasigen Verlauf. Nach 5 Minuten war der Höhepunkt bei 1,4-facher pERK-Aktivität (Abb. 3A, $F_{1,24} = 58,49$; $p < 0,0001$) erreicht, woraufhin die pERK-Intensität zum 10-Minuten-Zeitpunkt absank und sich daraufhin ein Plateau wieder bei ungefähr 1,4 ausbildete. Unter der Mitbehandlung von H89 kam es zur Abschwächung der ERK1/2-Phosphorylierung zu allen Zeitpunkten, welcher nur zum 60-Minuten-Zeitpunkt eine signifikante Inhibition zeigte ($F_{1,24} = 16,63$; $p = 0,0233$). Unter Einfluss von GDNF ließ sich unter Stimulation von Forskolin ein zweiphasiger Verlauf beobachten. Nach 5 Minuten war der Höhepunkt bei ungefähr 2,3 pERK-Intensität erreicht und sank daraufhin ab (Abb. 3A). Ab der 30. Minute stellte sich ein Plateau bei ca. 1,8-facher pERK-Intensität ein. Hierbei zeigte sich eine signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung zu allen Zeitpunkten ($F_{1,24} = 334,4$; $p < 0,0001$). Wird diese Gruppe mit Hilfe von H89 inhibiert, zeigte sich eine Teilabschwächung der ERK1/2-Phosphorylierung in der Plateauphase um 30 %, jedoch zeigte sich hier keine statistische Signifikanz ($F_{1,24} = 11,63$; $p > 0,05$). Der Höhepunkt der pERK-Intensität zum 5-Minuten-Zeitpunkt zeigte nur ein geringes Ansprechen auf H89. GDNF beeinflusst hier den cAMP-Crosstalk zu ERK unabhängig von PKA.

Durch eine 5-minütige Forskolin-Stimulation zeigte sich ein Anstieg auf das 2,0-fache der pRII-Aktivität (Abb. 3B, $F_{1,24} = 126,0$; $p = 0,001$). Dieser blieb über die Zeitspanne bis zur 60. Minute konstant. Eine Inhibition durch H89 zeigte ein geringes Absinken der PKA-RII-Phosphorylierung um ungefähr 0,2 ($F_{1,24} = 1,683$; $p > 0,05$). Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede bei der Stimulation mit Forskolin (Abb. 3B, $F_{1,24} = 195,6$; $p < 0,0001$) bzw. Forskolin und H89 ($F_{1,24} = 2,327$; $p > 0,05$) in den pRII-Intensitäten.

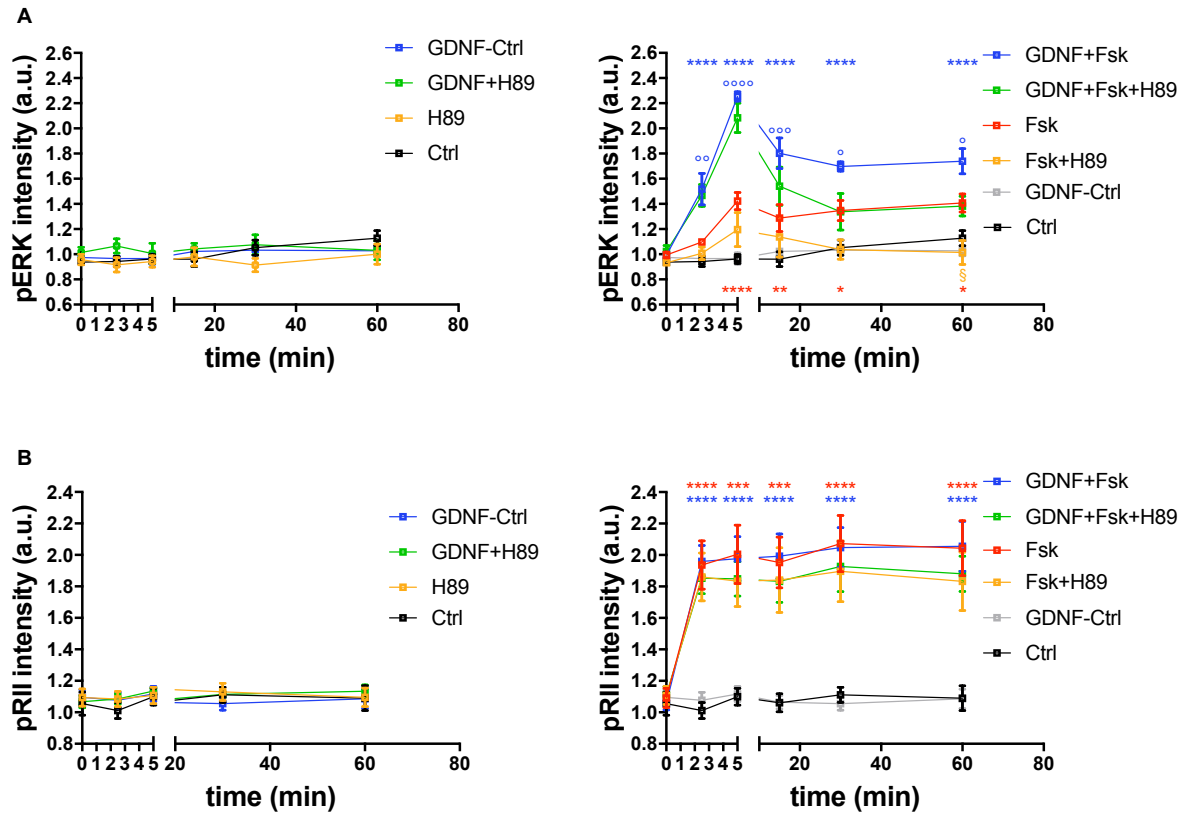


Abbildung 3: GDNF beeinflusst den cAMP-Crosstalk zu ERK unabhängig von PKA

Normalisierte pERK- **(A)** und pRII-Kinetik **(B)** unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl) über 60 Minuten. Zur besseren Übersicht wurden die Kontrollkonditionen separat links aufgeführt. Die Stimulation durch Forskolin (10 μ M) zeigte einen zweiphasigen Verlauf. Der Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung wurde zum 5-Minuten-Zeitpunkt erreicht und zeigte daraufhin ein Absinken auf eine Plateauphase. Inhibition mit H89 (20 μ M) führte zu keiner signifikanten Senkung der prästimulierten Zellreihen. **(B)** Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede in den pRII-Intensitäten durch die Stimulation mit Forskolin (10 μ M). H89 (20 μ M) verursachte ein nicht signifikantes Absinken der pRII-Intensität. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001, °°°° p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus; § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001, §§§§ p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

4.4 GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs mit anhaltender Phase der pERK-Aktivierung

Um die Wirkung GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK weiter zu verstehen, benutzten wir in unserem Experiment den Neurotransmitter Serotonin (5-HT), das Prostaglandin E2 (PGE-2) und ein Prostaglandinanalogen Cicaprost. Es sind Stimulantien, die über G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wirken (Berger, 2009; McCorvy & Roth, 2015; Skierska, Rondou, & Van Craenenbroeck, 2017). Nach einer 24-stündigen Prästimulation mit 30 ng GDNF/ml wurden die Zellen mit 1 μ M 5-HT, 10 μ M PGE-2 und 10 μ M Cicaprost für 2,5, 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten stimuliert.

Zellen, die nicht mit GDNF prästimuliert wurden, zeigten in der frühen Phase (Minute 1 bis 5) den Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung durch Cicaprost (Abb. 4A₁, $F_{1,24} = 0,8668$; $p > 0,05$) und 5-HT (Abb. 4B₁, $F_{1,24} = 1,337$; $p > 0,05$) bei ungefähr 1,2-facher pERK-Aktivierung. Daraufhin zeigte sich ab dem 15-Minuten-Zeitpunkt das Erreichen der Grundlinie. PGE-2 zeigte zu keinem Zeitpunkt Intensitätserhöhungen von pERK (Abb. 4C₁, $F_{1,24} = 1,848$; $p > 0,05$).

Zuvor prästimulierte Zellen mittels GDNF zeigten sowohl durch 5-HT und Cicaprost als auch durch PGE-2 eine signifikante Erhöhung der pERK-Intensität. Der Verlauf gestaltete sich wie zuvor. Der Höhepunkt wurde durch alle drei Stimulantien in der frühen Phase der ERK-Aktivierung (Serotonin = 2,0, $F_{1,24} = 26,99$, $p < 0,0001$; Cicaprost = 1,9, $F_{1,24} = 66,58$, $p < 0,0001$; Prostaglandin E2 = 1,6, $F_{1,24} = 38,62$, $p < 0,0001$) erreicht und zeigte daraufhin ein Absinken. Hier wurde die Grundlinie jedoch nicht erreicht. Es bildete sich eine anhaltende Phase der pERK-Aktivierung aus.

Cicaprost (Abb. 4A₂), Serotonin (Abb. 4B₂) und Prostaglandin E2 (Abb. 4C₂) zeigten zudem eine Verstärkung der PKA-RII-Phosphorylierung. Diese zeigte in der frühen Phase ihren Höhepunkt (Serotonin=1,6, $F_{1,28} = 715,9$, $p < 0,0001$; Cicaprost=1,6, $F_{1,28} = 981$, $p < 0,0001$; Prostaglandin E2= 1,4, $F_{1,28} = 453,6$; $p < 0,0001$) und sank daraufhin ab. Diese erreichte bei allen drei Stimulantien nach 30 bis 60 Minuten ein Plateau. Cicaprost zeigte dabei den höchsten Ausschlag zum 5-Minuten-Zeitpunkt mit ungefähr 1,7-facher pRII-Aktivität. Die Prästimulation mit GDNF zeigte dabei keine wesentlichen Unterschiede zur nicht-prästimulierten Gruppe in der Phosphorylierung von PKA-RII.

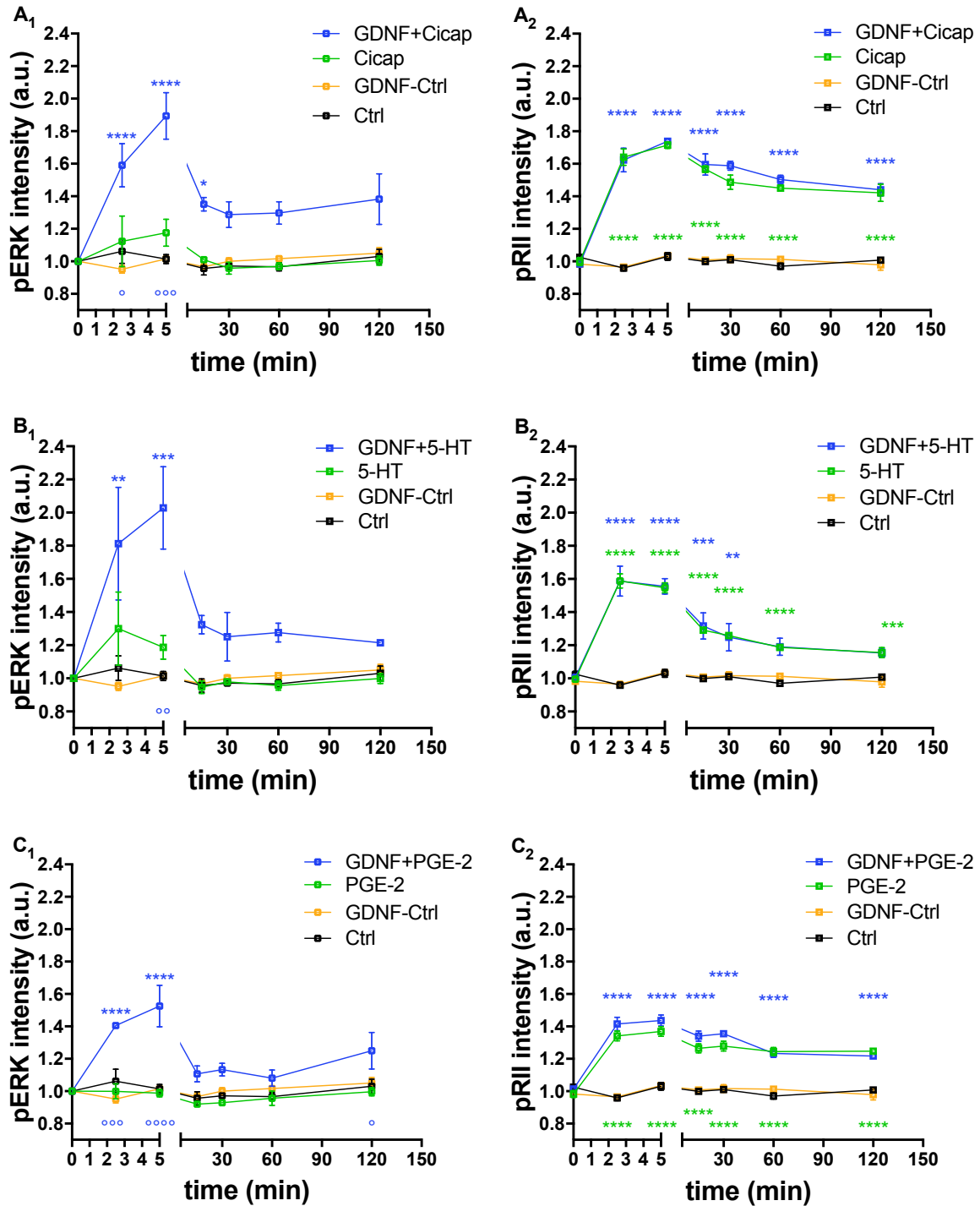


Abbildung 4: GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs mit anhaltender Phase der pERK-Aktivierung

Normalisierte pERK- (links) und pRII-Kinetik (rechts) unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl) über 120 Minuten nach Stimulation mit **(A)** 1 μ M Serotonin (5-HT), **(B)** 10 μ M Cicaprost (Cicap) und **(C)** 10 μ M Prostaglandin E2 (PGE-2). GDNF-prästimulierte Zellen zeigten eine deutliche Verstärkung der pERK-Intensität durch alle 3 Stimulantien. Es zeigte sich der Höhepunkt in der frühen Phase der ERK-Aktivierung mit Absinken auf eine anhaltende Phase der pERK-Aktivierung. Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede in pRII im Vergleich zur nicht-prästimulierten Gruppe. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001, °°°° p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus.

4.5 Die späte Phase der pERK-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist abhängig von PKA

Um weiter den Einfluss von GDNF bezüglich der GPCRs zu untersuchen, benutzten wir den unspezifischen Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Hube, Lee, Rohrig, & Hauner, 1999). Wenn der cAMP-Spiegel für die Vermittlung der Aktivierung verantwortlich wäre, würde eine Verlängerung der rezeptorinduzierten cAMP-Spiegel durch IBMX zu einer Verlängerung der Serotonin induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führen. Hierzu wurden die Zellen mit 30 ng GDNF/ml über 24 Stunden prästimuliert und anschließend unter Zugabe von 1 μ M Serotonin (5-HT) über 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Als Inhibitor der Phosphodiesterase benutzten wir 30 Minuten vor Stimulationsbeginn 100 μ M IBMX und zusätzlich den PKA-Inhibitor H89 (20 μ M).

Wie zuvor zeigte sich ohne GDNF zum 5-Minuten-Zeitpunkt der Höhepunkt der pERK-Intensität durch 5-HT bei 1,3-facher pERK-Aktivität (Abb. 5A, $F_{1,28} = 12,29$; $p < 0,0001$). Daraufhin folgte ein Absinken der pERK-Intensität bis zur Grundlinie zum 30-Minuten-Zeitpunkt. H89 zeigte bezüglich der ERK1/2-Phosphorylierung keinen besonderen Effekt ($F_{1,30} = 0,1469$; $p > 0,05$). Durch die Inhibition der Phosphodiesterase mittels IBMX zeigte sich eine erhöhte pERK-Intensität durch 5-HT, welche zum 30- ($F_{1,29} = 20,59$; $p = 0,0198$) und 60-Minuten-Zeitpunkt ($F_{1,29} = 20,59$; $p = 0,0322$) signifikant waren. Der Klimax wurde zum 5-Minuten-Zeitpunkt erreicht, gefolgt von einem Absinken bis zur 30. Minute zu einer anhaltenden Phase der pERK-Aktivierung. Die Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch IBMX verlängert. Dies weist darauf hin, dass der Crosstalk in der späten Phase auf die Anwesenheit von cAMP angewiesen ist. Durch die zusätzliche Inhibierung von PKA durch H89 zeigte sich eine Abschwächung der Wirkung durch IBMX. Hier wurde die Grundlinie wieder fast erreicht. Unter zusätzlicher Prästimulation durch GDNF zeigte sich durch 5-HT eine signifikante Wirkungsverstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung (ABB. 5A, 5B). Der Höhepunkt war bei ungefähr 2,3-facher pERK-Aktivität zum 5-Minuten-Zeitpunkt ($F_{1,29} = 201,2$; $p < 0,0001$) zu beobachten, woraufhin ein Absinken zu einem Plateau bei 1,4 zu beobachten war. Durch die Inhibierung mittels H89 zeigte sich in der frühen Phase eine nicht signifikante Abschwächung von ungefähr 10 % (Abb. 5B, $F_{1,30} = 13,54$; $p > 0,05$). In der späten Phase war eine signifikante Reduktion um ungefähr 20 % ($F_{1,30} = 13,54$; $p = 0,0473$) zum 30-Minuten-Zeitpunkt zu beobachten. Zellen, die mit 5-HT und IBMX

behandelt wurden zeigten durch die Prästimulation mit GDNF eine verstärkte pERK-Intensität der späten Phase. Hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant ($F_{1,30} = 4,542$; $p > 0,05$). Die frühe Phase zeigte keine Veränderung. Der Zusatz von H89 führte zum Verlust des Effektes durch IBMX in pERK. Die frühe Phase der pERK-Aktivierung ist unabhängig von der Phosphodiesterase.

Die Stimulation durch 5-HT zeigte in pRII den Höhepunkt zum 5-Minuten-Zeitpunkt bei ungefähr 1,7 (Abb. 5C, $F_{1,28} = 215,7$; $p < 0,0001$). Daraufhin folgte das Absinken der PKA-RII-Phospho-Intensität bis auf ein Plateau bei 1,4. Hierbei war der Unterschied zur Baseline durchgehend signifikant. Die zusätzliche Stimulation mittels IBMX führte zur signifikanten Steigerung der pRII-Intensität zu allen Zeitpunkten ($F_{1,30} = 100,3$; $p = 0,0234$ bis $p < 0,0001$). Wurden die 5-HT stimulierten Zellen mittels H89 inhibiert, erfolgte nur eine leichte Reduktion der PKA-RII-Phosphorylierung ($F_{1,30} = 0,5232$; $p > 0,05$). Dies betraf sowohl die IBMX unbehandelten als auch die IBMX behandelten ($F_{1,30} = 5,316$; $p > 0,05$) Zellen. Die Prästimulation mittels GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 5C, 5D). Der Vergleich zwischen 5-HT und 5-HT+GDNF ergab keine signifikanten Unterschiede in pRII (Abb. 5C, $F_{1,30} = 5,904$; $p > 0,05$).

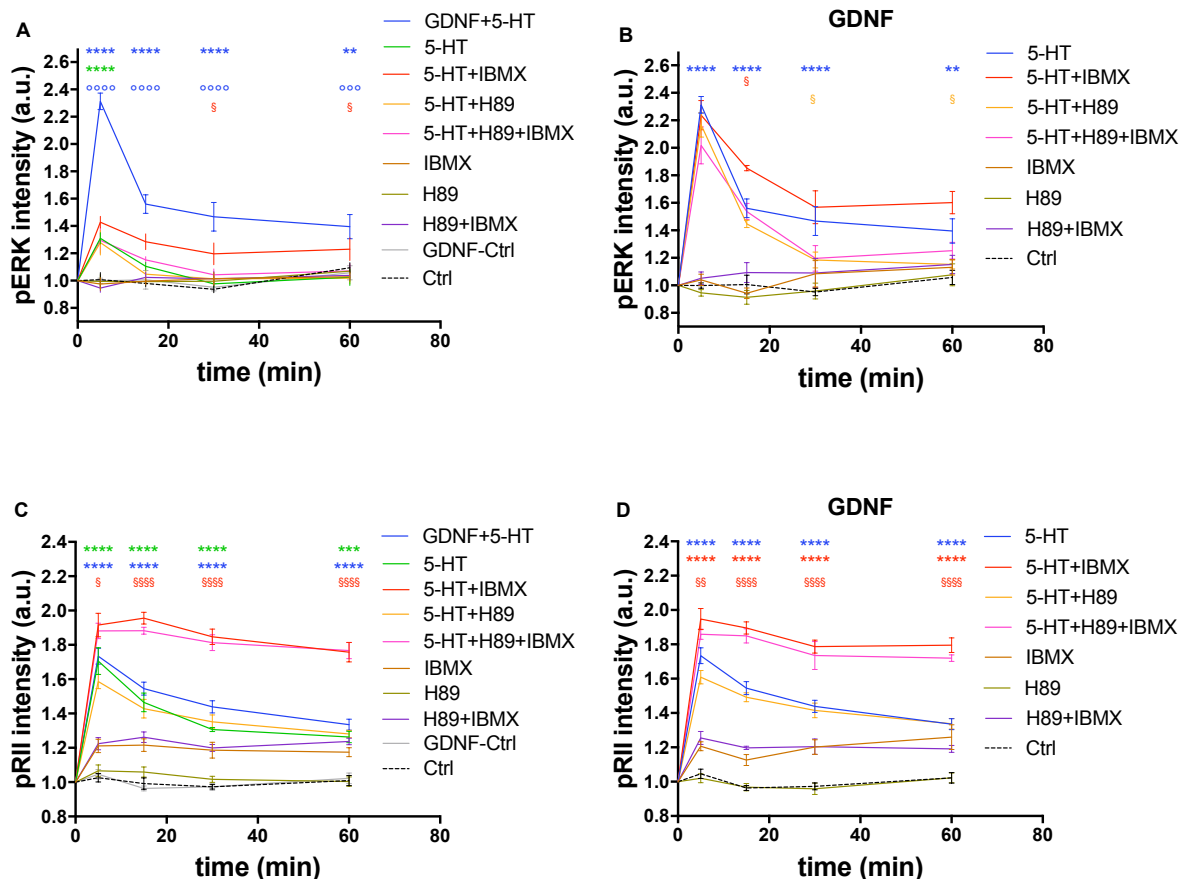


Abbildung 5: Die späte Phase der pERK-Aktivierung durch Serotonin ist abhängig von PKA

Normalisierte pERK- **(A, B)** und pRII-Kinetik **(C, D)** zu den Kontrollbedingungen (Ctrl, IBMX, H89) über 60 Minuten. Links ohne (A, C), rechts (B, D) mit Prästimulation durch 30 ng GDNF/ml über 24 Stunden. Weitere benutzte Wirkstoffe: 1 μ M Serotonin (5-HT), 100 μ M IBMX, 20 μ M H89. **(A)** Die Stimulation mit 5-HT zeigte einen frühen Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung, gefolgt von einem Absinken auf die Grundlinie. H89 inhibierte nur die späte Phase der ERK1/2-Phosphorylierung. IBMX verstärkte die pERK-Intensität durch 5-HT in der späten Phase. Zusätzlich führte dies zu einer anhaltenden Phase der ERK1/2-Phosphorylierung. Durch H89 kam es zum Wirkungsverlust von IBMX. **(B)** Durch die Prästimulation mit GDNF und Stimulation mit 5-HT zeigte sich eine deutliche Wirkungsverstärkung und eine anhaltende Phase der pERK-Intensität. H89 schwächte dabei signifikant die späte Phase der pERK-Intensität ab. 5-HT und IBMX zeigten eine nicht signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung der späten Phase. H89 führte zum Verlust des Effektes durch IBMX. **(C)** 5-HT zeigte zum 5-Minuten-Zeitpunkt seinen Höhepunkt in pRII, woraufhin ein Absinken der pRII-Intensität erfolgte. IBMX führte zu deutlicher Wirkungssteigerung von 5-HT. H89 zeigte sowohl durch die alleinige Stimulation durch 5-HT als auch durch die Kombination von 5-HT und IBMX nur leichte Reduktion der PKA-RII-Phospho-Intensität. **(D)** Die Prästimulation mittels GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede. Werte gemittelt \pm SEM. n = 4 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001, °°°° p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus; § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001, §§§§ p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

4.6 Die pERK-/pRII-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist unabhängig von GRK2/3

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen führen zur Phosphorylierung und zur Bindung von Arrestin an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Er führt somit zu seiner Desensibilisierung (Gurevich & Gurevich, 2019). In dieser experimentellen Serie möchten wir untersuchen ob diese Desensibilisierung Auswirkung auf eine Stimulation mit GDNF und der GPCRs auf ERK hat.

Hierzu wurden die Zellen mit 30 ng GDNF/ml über 24 Stunden prästimuliert und anschließend mit 1 μ M Serotonin (5-HT) über 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Um den Einfluss von GRK2/3 zu veranschaulichen, wurde der Inhibitor Takeda (cmpd101) benutzt (Thal, Yeow, Schoenau, Huber, & Tesmer, 2011). Hierzu wurden die Zellen mit 10 μ M Takeda über 60 Minuten inkubiert, bevor die Serotonin-Stimulation begann.

Zellen, die mit 5-HT stimuliert wurden, zeigten in der frühen Phase zum 5-Minuten-Zeitpunkt eine signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung bei ungefähr 1,4-facher pERK-Aktivität (Abb. 6A, $F_{1,20} = 2,564$; p = 0,0002). Daraufhin folgte das Absinken der pERK-Aktivität zurück auf die Grundlinie. Die 30-minütige Inhibition mit Takeda zeigte keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Serotonin-Stimulation ($F_{1,20} = 1,106$; p > 0,05). Die Prästimulation mit GDNF zeigte eine deutlich signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung durch die Stimulation mit 5-HT. Hier lag der Höhepunkt auch zum 5-Minuten-Zeitpunkt bei 2,6 (Abb. 6A, $F_{1,20} = 162,6$; p < 0,0001) und zeigte ein Absinken auf ein Plateau bei ungefähr 1,5-facher pERK-Aktivität. Bei der Präinkubation mit Takeda und anschließender Stimulation mit 5-HT zeigten sich keine

Unterschiede zum 5-Minuten-Zeitpunkt. In der 15. und 30. Minute war eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der pERK-Intensität um 10 % zu beobachten ($F_{1,20} = 1,891$; $p > 0,05$).

Die PKA-RII-Phospho-Intensität zeigte durch die Stimulation mit Serotonin den Höhepunkt bei 1,6 zum 5-Minuten-Zeitpunkt (Abb. 6B, $F_{1,20} = 388,6$; $p < 0,0001$). Darauf folgte das stetige Absinken der PKA-RII-Phospho-Intensität auf ein Plateau bei ungefähr 1,25. Dabei blieb zu jedem Zeitpunkt die Steigerung der PKA-RII-Phospho-Intensität im Vergleich zur Baseline signifikant ($F_{1,20} = 388,6$; $p < 0,0001$). Die zusätzliche Präinkubation mit Takeda zeigte keine signifikanten Unterschiede ($F_{1,20} = 7,190$; $p > 0,05$). Die Prästimulation mit GDNF zeigte bei der Stimulation mit Serotonin ($F_{1,20} = 10,39$; $p > 0,05$) bzw. Serotonin+Takeda ($F_{1,20} = 2,484$; $p > 0,05$) auch keine signifikanten Unterschiede in der pRII-Kinetik (Abb. 6B). Die Veränderungen in der Kinetik von pERK und pRII durch GDNF sind unabhängig von GRK2/3.

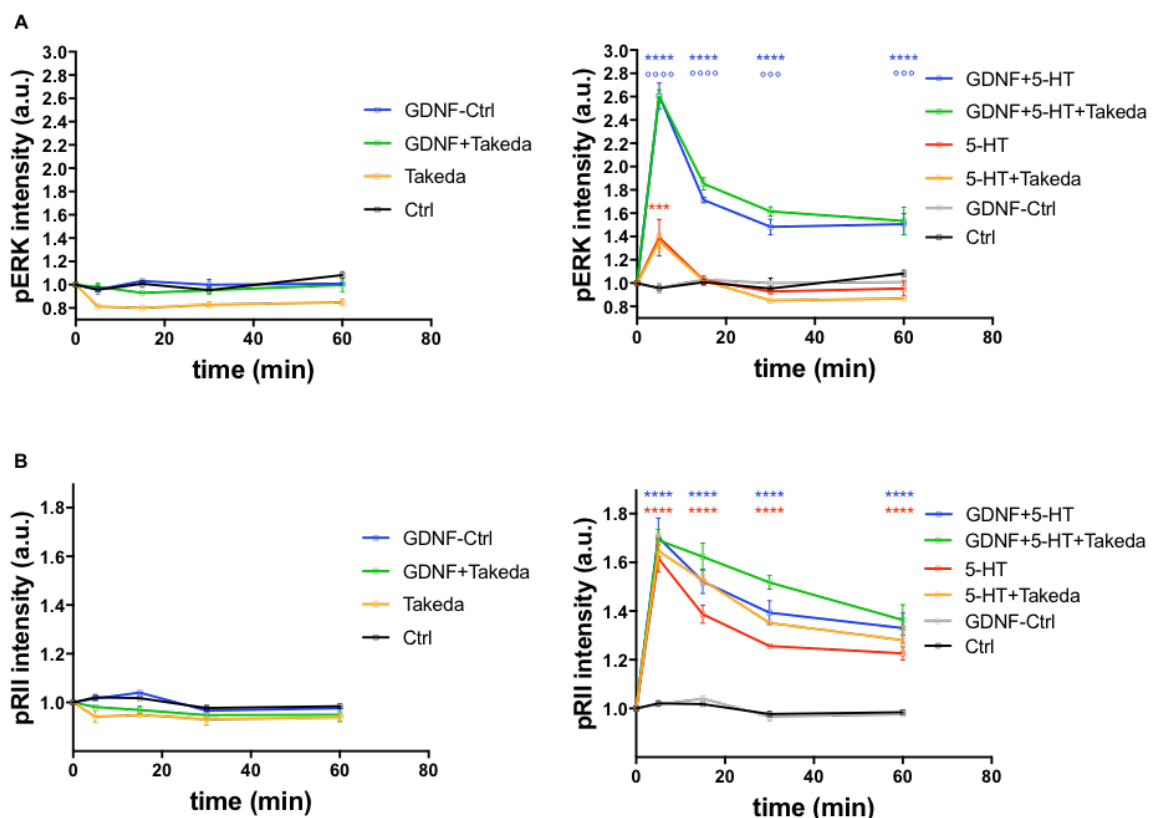


Abbildung 6: Die pERK- und pRII-Aktivierung durch Serotonin ist unabhängig von GRK2/3

Normalisierte pERK- (A) und pRII-Kinetik (B) unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl) über 60 Minuten. Zur besseren Übersicht wurden die Kontrollkonditionen separat links aufgeführt. Weitere benutzte Wirkstoffe: 1 μ M Serotonin (5-HT), 10 μ M Takeda. (A) Die Stimulation mit 5-HT zeigte einen frühen Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung, gefolgt von einem Absinken bis zur Grundlinie. Die zusätzliche Inhibierung mit Hilfe von Takeda zeigte keine wesentlichen Unterschiede. Die Stimulation mit GDNF zeigte eine Verstärkung der pERK-Intensität durch 5-HT. Hier ließ sich der Höhepunkt zum 5-Minuten-Zeitpunkt, gefolgt von einem Absinken auf ein Plateau, beobachten. Takeda zeigte keine signifikante Auswirkung auf die pERK-Intensität. (B) 5-HT zeigte zum 5-Minuten-Zeitpunkt seinen

Höhepunkt in pRII, woraufhin ein Absinken der pRII-Intensität auf ein Plateau folgte. Die zusätzliche Präinkubation mit Takeda bewirkte eine nicht signifikante Steigerung um ungefähr 15 % der RII-Phosphorylierung in der späten Phase. Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede in der PKA-RII-Phospho-Intensität. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001, °°°° p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus.

4.7 Die frühe Phase der pERK-Aktivierung durch GDNF und Serotonin ist von PKC/Calcium abhängig

In der Literatur wird die Aktivierung von ERK durch Serotonin in Abhängigkeit der calciumabhängigen Proteinkinase C beschrieben (Crow, Xue-Bian, Siddiqi, & Neary, 2001; Greene et al., 2000). Wir wollten uns die Wirkung der Protein Kinase C in der Kinetik der GPCRs mit GDNF in ERK veranschaulichen. Hierzu benutzten wir 5 μ M des Proteinkinase C-Inhibitors Bisindolylmaleimide (BIM) und 3 mM des Calcium-Antagonisten Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N' tetraessigsäure (EGTA) (Miller & Smith, 1984; Okazaki, Yoshida, Teshima, & Shimada, 2011; Toullec et al., 1991). Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden mit 30 ng GDNF prästimuliert und anschließend für 30 Minuten mit BIM und EGTA behandelt, bevor die Stimulation mit 1 μ M Serotonin begann. Dabei wurden die Zellen über 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert.

Zellen, die nur mit 5-HT stimuliert wurden, zeigten nach 5 Minuten den Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung bei circa 1,4-facher pERK-Aktivität (Abb. 7A, $F_{1,20} = 4,235$; p < 0,0001). Daraufhin folgte ein rasches Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung auf die Grundlinie. Der Zusatz von BIM und EGTA zeigte eine signifikant starke Inhibition der pERK-Aktivität in der 5. Minute ($F_{1,20} = 5,251e-009$; p = 0,0072). Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte eine deutliche Wirkungsverstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung auf ungefähr 2,4 zum 5 Minuten-Zeitpunkt (Abb. 7A, $F_{1,20} = 128,6$; p < 0,0001). Daraufhin folgte ein Absinken der pERK-Intensität auf ein Plateau bei 1,4 zur 30. ($F_{1,20} = 128,6$; p = 0,0014) bzw. 60. Minute ($F_{1,20} = 128,6$; p = 0,0022). BIM und EGTA bewirkten ein signifikantes Herabsinken der ERK1/2-Phosphorylierung um circa 50 % in der frühen Phase ($F_{1,20} = 18,15$; p = 0,0003). In der späten Phase zeigte sich die nicht signifikante Abschwächung der pERK-Intensität um 10 % ($F_{1,20} = 18,15$; p > 0,05).

Die pRII-Intensität stieg durch Serotonin auf ungefähr 1,7 zum 5-Minuten-Zeitpunkt an (Abb. 7B, $F_{1,20} = 221,0$; p < 0,0001). Daraufhin folgte ein stetiges Absinken der pRII-Intensität auf ungefähr 1,3 bis zur 60. Minute ($F_{1,20} = 221,0$; p = 0,0004). Der Zusatz von BIM+EGTA bewirkte zu allen Zeitpunkten eine leichte Abschwächung der PKA-RII-

Phospho-Intensität um circa 10-15 % ($F_{1,20} = 2,614$; $p > 0,05$). Die zusätzliche 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Veränderungen der pRII-Kinetik (Abb. 7B). Nur zum 5 Minuten Zeitpunkt war eine signifikante Abschwächung durch BIM und EGTA sichtbar ($F_{1,20} = 20,93$; $p = 0,0096$).

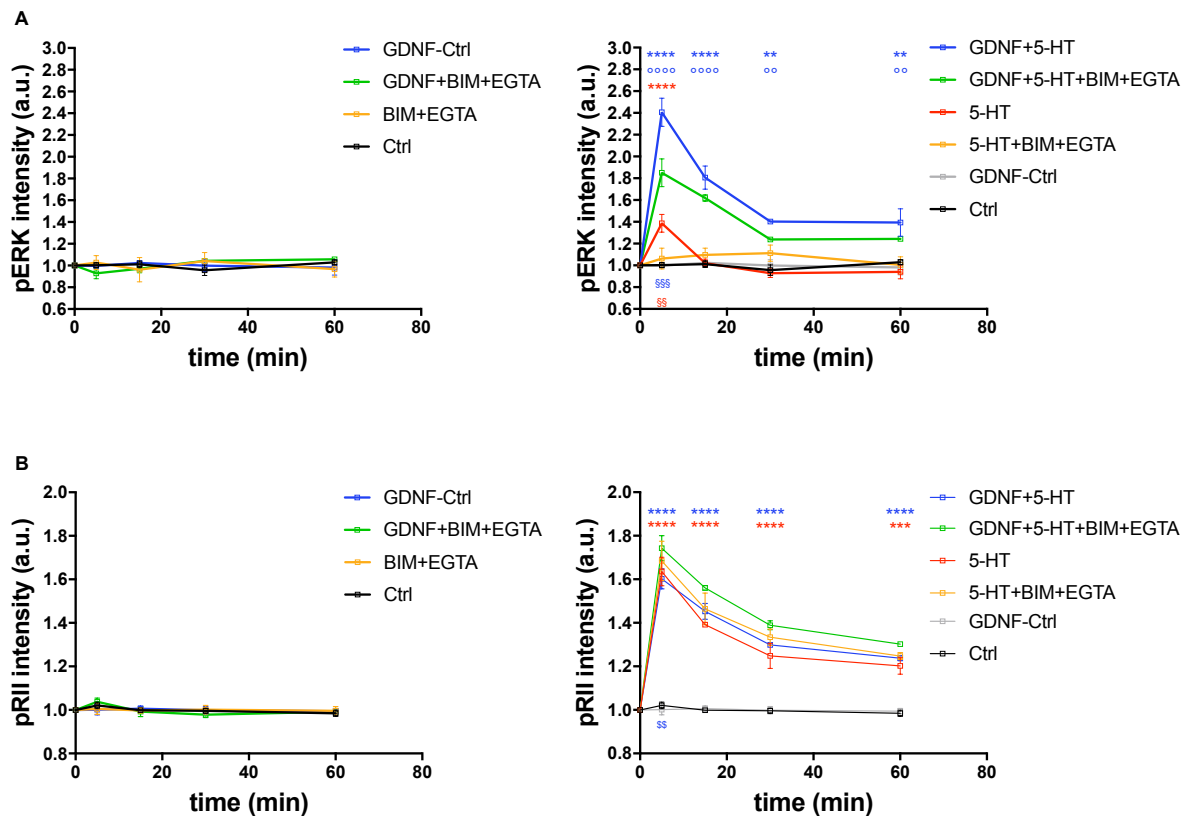


Abbildung 7: Die frühe Phase der pERK-Aktivierung durch GPCRs ist von PKC/Calcium abhängig

Normalisierte pERK- **(A)** und pRII-Kinetik **(B)** unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl, BIM+EGTA) über 60 Minuten. Zur besseren Übersicht wurden die Kontrollkonditionen separat links aufgeführt. Weitere benutzte Wirkstoffe: 1 μ M Serotonin (5-HT), 5 μ M BIM, 3 mM EGTA. **(A)** Die Stimulation mit 5-HT zeigte den Höhepunkt der pERK-Intensität in der frühen Phase, gefolgt von einem Absinken bis zur Grundlinie. Der Zusatz von BIM und EGTA bewirkte eine deutliche Abschwächung der pERK-Intensität in der frühen Phase. Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte eine deutliche Wirkungsverstärkung der pERK-Intensität zu allen Zeitpunkten. Die Inhibition mit BIM und EGTA zeigte auch eine deutliche Abschwächung in der frühen Phase der ERK1/2-Phosphorylierung. **(B)** Die Stimulation mit 5-HT zeigte in der frühen Phase den Höhepunkt der PKA-RII-Phospho-Intensität. Daraufhin folgte ein stetiges Absinken der pRII-Intensität. Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der PKA-RII-Phospho-Intensität. Die Inhibition mit BIM+EGTA zeigte zum 5-Minuten-Zeitpunkt einen Abfall der pRII-Intensität unter GDNF und 5-HT. Werte gemittelt \pm SEM. $n = 3$ Tiere pro Gruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; $^{\circ}$ $p < 0,05$, $^{\circ\circ}$ $p < 0,01$, $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0,001$, $^{\circ\circ\circ\circ}$ $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus; \S $p < 0,05$, $\S\S$ $p < 0,01$, $\S\S\S$ $p < 0,001$, $\S\S\S\S$ $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

4.8 Die frühe Phase der ERK1/2-Phosphorylierung durch GDNF und Serotonin ist abhängig von MEK1/2

Ziel dieser experimentellen Serie war es, den Einfluss von MEK1/2 auf den cAMP-Crosstalk zu ERK zu veranschaulichen. Hierzu wurden nach einer 24-stündigen Prästimulation mit 30 ng GDNF/ml die Zellreihen mit 1 μ M Serotonin über 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Bevor die Stimulation mit Serotonin begann, wurden einige Zellreihen mit dem MEK1/2-Inhibitor Selumetinib (Dymond et al., 2017) in verschiedenen Dosen (10 nM, 100 nM, 1000 nM) für 30 Minuten inkubiert.

Die Stimulation mit Serotonin zeigte ihren Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung bereits zum 5-Minuten-Zeitpunkt bei circa 1,45-facher pERK-Aktivität (Abb. 8A, $F_{1,20} = 5,178$; $p < 0,0027$). Daraufhin folgte ein stetiges Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung. Ab der 30. Minute wurde dabei die Grundlinie wieder erreicht. Die Inhibition mit 10 nM ($F_{1,20} = 0,03216$; $p > 0,05$) und 100 nM ($F_{1,20} = 0,01647$; $p > 0,05$) Selumetinib führte zu keinem signifikanten Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung durch Serotonin zum 5-Minuten-Zeitpunkt. Lediglich die Inhibition mit Selumetinib in der Höchstdosis von 1000 nM zeigte keine pERK-Aktivität zum 5-Minuten-Zeitpunkt ($F_{1,20} = 3,443$; $p = 0,0045$). Die Prästimulation mit GDNF bewirkte einen signifikanten Anstieg der pERK-Intensität (Abb. 8A, 8B). Die Stimulation mit Serotonin hatte ihren Klimax zum 5-Minuten-Zeitpunkt bei ungefähr 2,1 ($F_{1,20} = 122,3$; $p < 0,0001$). Daraufhin folgte ein Absinken der pERK-Intensität. Ab der 30. Minute bildete sich ein Plateau bei einer ERK1/2-Phosphorylierung von 1,4 aus ($F_{1,20} = 122,3$; $p < 0,0066$). Die zusätzliche Inhibition mit Selumetinib führte in der Dosis 10 nM zu einem geringen Absinken der pERK-Intensität in der späten Phase (Abb. 8B, $F_{1,20} = 0,1243$; $p > 0,05$). 100 nM Selumetinib zeigte keine Veränderung in der frühen Phase der ERK-Aktivierung ($F_{1,20} = 0,1043$; $p > 0,05$). In der 60. Minute ließ sich ein nicht signifikantes Absinken der pERK-Intensität von ungefähr 1,5 auf circa 1,2 beobachten ($F_{1,20} = 0,1043$; $p > 0,05$). Als die Dosis von Selumetinib nochmal um das 10-fache erhöht wurde, führte der Gebrauch von 1000 nM Selumetinib und 1 μ M Serotonin zu einem signifikanten Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung in der frühen Phase. Zum 5-Minuten-Zeitpunkt wurde der Höhepunkt der pERK-Intensität von ungefähr 2,1 auf ungefähr 1,5 gesenkt ($F_{1,20} = 33,64$; $p = 0,0012$). Die ERK1/2-Phosphorylierung ist also abhängig von MEK1/2.

Die Stimulation mit Serotonin zeigte auch in pRII ihren Höhepunkt nach 5 Minuten bei ungefähr 1,55-facher pRII-Aktivität (Abb. 8C, $F_{1,20} = 217,7$; $p < 0,0001$). Daraufhin zeigte

die Stimulation mit Serotonin ein stetiges Absinken der PKA-RII-Phospho-Intensität auf ungefähr 1,15 zum 60-Minuten-Zeitpunkt ($F_{1,20} = 217,7$; $p = 0,0001$). Die Inkubation mit Selumetinib in verschiedenen Dosen führte dabei zu keinen relevanten Veränderungen. Auch die Prästimulation mit GDNF über 24 Stunden zeigte keine signifikante Veränderung der PKA-RII-Phospho-Intensitäten bei der Stimulation mit Serotonin bzw. Inhibition mittels Selumetinib (Abb. 8C, 8D).

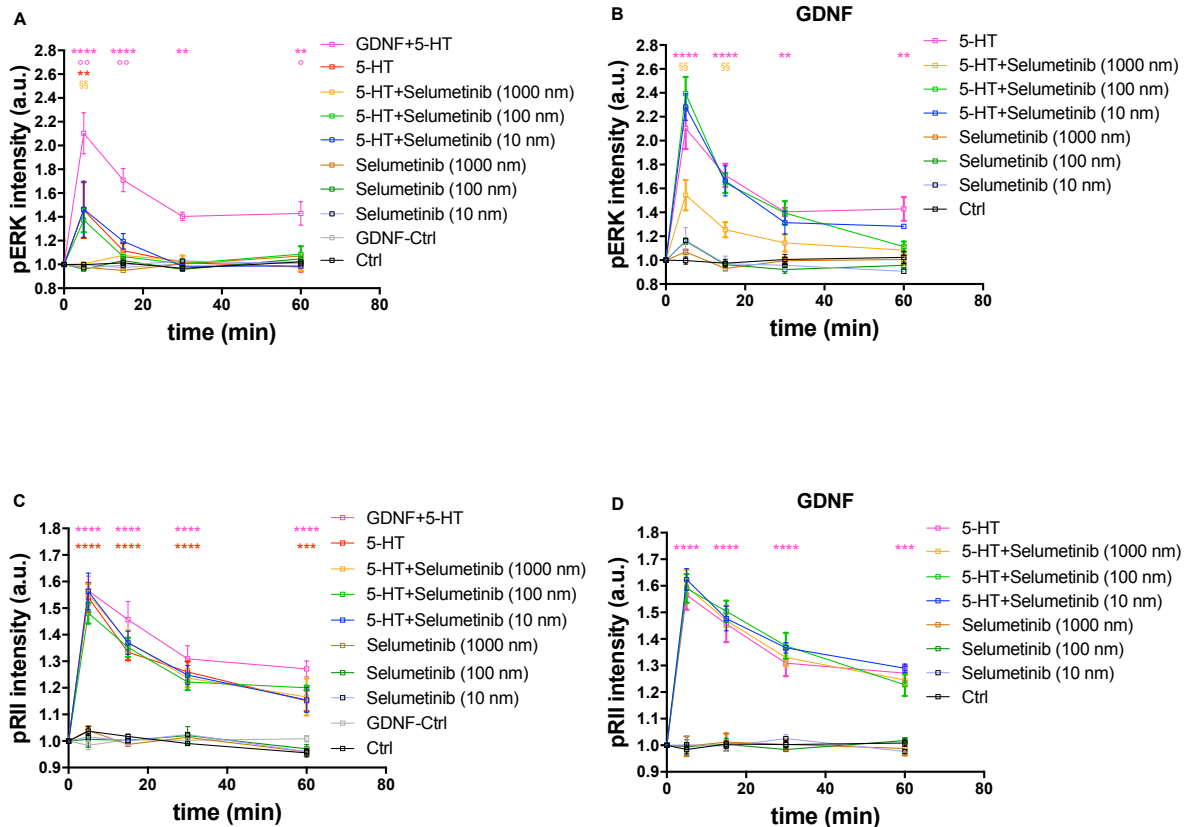


Abbildung 8: Die frühe Phase der ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs ist abhängig von MEK1/2

Normalisierte pERK- (A, B) und pRII-Kinetik (C, D) unter Kontrollbedingungen (Ctrl; 10 nM, 100 nM und 1000 nM Selumetinib). B und D zeigen Konditionen, in der alle Zellreihen mit 30 ng GDNF/ml prästimuliert wurden. Weitere benutzte Wirkstoffe: 1 μ M Serotonin (5-HT); 10, 100 und 1000 nM Selumetinib. (A) Die Stimulation mit Serotonin zeigte eine frühe Phase der ERK-Aktivierung und einen raschen Abfall bis auf die Grundlinie. Ab einer Dosis von 1000 nM Selumetinib kam es zu einem Abfall der pERK-Intensität bis auf die Grundlinie. (B) Die Prästimulation mit GDNF zeigte einen deutlichen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung zu allen Zeitpunkten. Auch hier zeigte Selumetinib seine Wirkung durch den Abfall der pERK-Intensität erst ab der Dosis 1000 nM. Hier kam es in der frühen Phase der ERK1/2-Phosphorylierung zu einem Abfall. (C, D) Durch Serotonin kam es zum Höhepunkt der PKA-RII-Phosphorylierung zum 5-Minuten-Zeitpunkt. Daraufhin folgte ein Absinken auf ein bestehendes Plateau der pRII-Intensität. Selumetinib führte zu keiner Reduktion der pRII-Intensität. Auch die Prästimulation mit 30 ng GDNF/ml zeigte keine Unterschiede. Werte gemittelt \pm SEM. $n = 3$ Tiere pro Gruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; $\circ p < 0,05$, $\circ\circ p < 0,01$, $\circ\circ\circ p < 0,001$, $\circ\circ\circ\circ p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus; $\S p < 0,05$, $\S\S p < 0,01$, $\S\S\S p < 0,001$, $\S\S\S\S p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

4.9 GDNF beeinflusst unter 007 den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2

In der Literatur wird die Aktivierung von ERK durch 007 beschrieben (Chen et al., 2004; Fang & Olah, 2007). Um den Einfluss von GDNF auf den Epac-Aktivator 007 näher zu verstehen, benutzten wir den Epac2-Inhibitor ESI-05, den PKA-Inhibitor H89 und den Proteinkinase C- bzw. Calcium-Antagonisten BIM und EGTA. Hierzu wurden die Zellen über 24 Stunden mit 30 ng GDNF/ml prästimuliert und anschließend mit 30 μ M 007 für 5 bzw. 30 Minuten stimuliert. 30 Minuten bevor die Stimulation mit 007 begann, wurden einige Zellreihen mit 10 μ M ESI-05, 20 μ M H89 oder 5 μ M BIM plus 3 mM EGTA präinkubiert.

Die Stimulation mit 007 bewirkte zum 5-Minuten-Zeitpunkt eine Steigerung der pERK-Intensität auf ungefähr 1,5 (Abb. 9A, $F_{2,2} = 10,34$; $p = 0,0098$). Die Präinkubation mit ESI-05 bewirkte dabei eine signifikante Inhibition der pERK-Intensität durch 007 bis auf die Grundlinie ($F_{2,2} = 7,382$; $p = 0,0071$). Die Inhibition von PKA mit Hilfe von H89 zeigte ein nicht signifikantes Absinken der pERK-Intensität durch 007 auf 1,4 ($F_{2,2} = 4,202$; $p > 0,2217$). Die Präinkubation mit BIM plus EGTA bewirkte eine nicht signifikant unterschiedliche ERK1/2-Phosphorylierung bzgl. 007 auf 1,3 ($F_{2,2} = 2044$; $p > 0,05$). Die zusätzliche Prästimulation mit GDNF über 24 Stunden bewirkte zum 5-Minuten-Zeitpunkt eine deutliche Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung durch 007 um das 2,3-fache (Abb. 9B, GDNF+007 vs. GDNF-Ctrl: $F_{2,2} = 91,26$; $p = 0,0006$). Auch hier bewirkte ESI-05 trotz GDNF-Prästimulation die signifikante Inhibition der pERK-Intensität bis auf 1,2 ($F_{2,2} = 6,215$; $p = 0,0016$). Im Gegensatz dazu führte die Inhibition mittels H89 ein geringfügiges Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung auf ungefähr 2,0 herbei ($F_{2,2} = 2,053$; $p > 0,05$). BIM plus EGTA führte zu einer signifikanten Reduktion der pERK-Intensität auf ungefähr 1,6 ($F_{2,2} = 1,008$; $p = 0,0249$). Die 30-minütige Stimulation mit 007 bewirkte eine Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung auf ungefähr 1,4 (Abb. 9C, $F_{2,2} = 7,751$; $p = 0,0194$). Die Präinkubation mit ESI-05 inhibierte die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant bis fast auf die Grundlinie ($F_{2,2} = 13,42$; $p = 0,0373$). H89 inhibierte diese ERK1/2-Phosphorylierung auf eine Intensität von 1,3. BIM plus EGTA führte zu keiner signifikant unterschiedlichen ERK1/2-Phosphorylierung bzgl. 007 ($F_{2,2} = 10,61$; $p > 0,05$).

Die zusätzliche Prästimulation mit GDNF bewirkte zum 30-Minuten-Zeitpunkt eine deutliche Steigerung der pERK-Intensität durch 007 auf ungefähr 2,0 (Abb. 9D,

GDNF+007 vs. GDNF-Ctrl: $F_{2,2} = 36,89$; $p = 0,0004$). Auch hier zeigte sich durch die Präinkubation mit ESI-05 ein signifikantes Absinken der pERK-Intensität auf 1,4 ($F_{2,2} = 1,337$; $p = 0,0090$). H89 führte zu einem signifikanten Absinken der pERK-Intensität auf circa 1,6 ($F_{2,2} = 1,192$; $p = 0,0247$). BIM plus EGTA zeigte trotz GDNF keine signifikant unterschiedliche Inhibition ($F_{2,2} = 1,185$; $p = 0,0652$). ESI-05 blockierte also sowohl bei 5- als auch 30-minütiger 007-Stimulation die ERK1/2-Phosphorylierung vollständig. Die GDNF prästimulierten Zellreihen zeigten dabei auch eine signifikante Reduktion der pERK-Intensität durch ESI-05. Die Verstärkung der pERK-Intensität durch GDNF und 007 ist dabei nur zu einem geringfügigen Teil PKA-abhängig. Die Veränderung des cAMP-Crosstalk zu ERK durch GDNF erfolgt unabhängig von PKC.

Nach 5-minütiger 007-Stimulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der pRII-Intensität auf ungefähr 2,0 (Abb. 10A, $F_{2,2} = 83,82$; $p < 0,0001$). Die Präinkubation mit ESI-05 bewirkte hierbei ein signifikantes Absinken der pRII-Intensität auf circa 1,7 ($F_{2,2} = 1,460$; $p = 0,0019$). Die Inhibition mittels H89 ($F_{2,2} = 2,218$; $p > 0,05$) oder BIM plus EGTA ($F_{2,2} = 1,208$; $p > 0,05$) zeigte nur ein unwesentliches Absinken der pRII-Intensität. Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte dabei keine Verstärkung pRII-Intensität zum 5-Minuten-Zeitpunkt durch 007 (Abb. 10B, GDNF+007 vs. 007: $F_{2,2} = 1,262$; $p > 0,05$). Sowohl ESI-05 ($F_{2,2} = 2,261$; $p = 0,0069$) als auch BIM plus EGTA ($F_{2,2} = 1,630$; $p = 0,1992$) zeigten hier trotz GDNF-Prästimulation das gleiche Verhalten im Vergleich zur Nicht-GDNF-prästimulierten Gruppe. H89 zeigte ein signifikantes Absinken der pRII-Intensität auf 1,9 ($F_{2,2} = 76,72$; $p = 0,0231$).

Die Stimulation mit 007 über 30 Minuten zeigte ähnliche Ergebnisse. Nach 30-minütiger Stimulation mit 007 zeigte sich ein Anstieg der PKA-RII-Phospho-Intensität auf circa 2,2 (Abb. 10C, $F_{2,2} = 105,2$; $p < 0,0001$). ESI-05 bewirkte hier eine signifikante Reduktion der PKA-RII-Phospho-Intensität auf ungefähr 2,0 ($F_{2,2} = 60,11$; $p = 0,0096$). H89 führte zu einer signifikanten Reduktion der pRII-Intensität durch 007 auf circa 1,9 ($F_{2,2} = 1,062$; $p = 0,0116$). BIM plus EGTA führten zu einer nicht signifikant unterschiedlichen pRII-Intensität von 2,1 ($F_{2,2} = 1,655$; $p > 0,05$). Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF zeigte keine wesentlichen Unterschiede zur nicht-prästimulierten Gruppe (Abb. 10D). Sowohl ESI-05 ($F_{2,2} = 1,547$; $p > 0,05$) als auch BIM plus EGTA ($F_{2,2} = 2,331$; $p > 0,05$) blockierten nur einen geringen Teil der pRII-Intensität. H89 zeigte eine signifikante pRII-Intensitätsveränderung ($F_{2,2} = 3,498$; $p = 0,0035$) durch die Prästimulation mit GDNF.

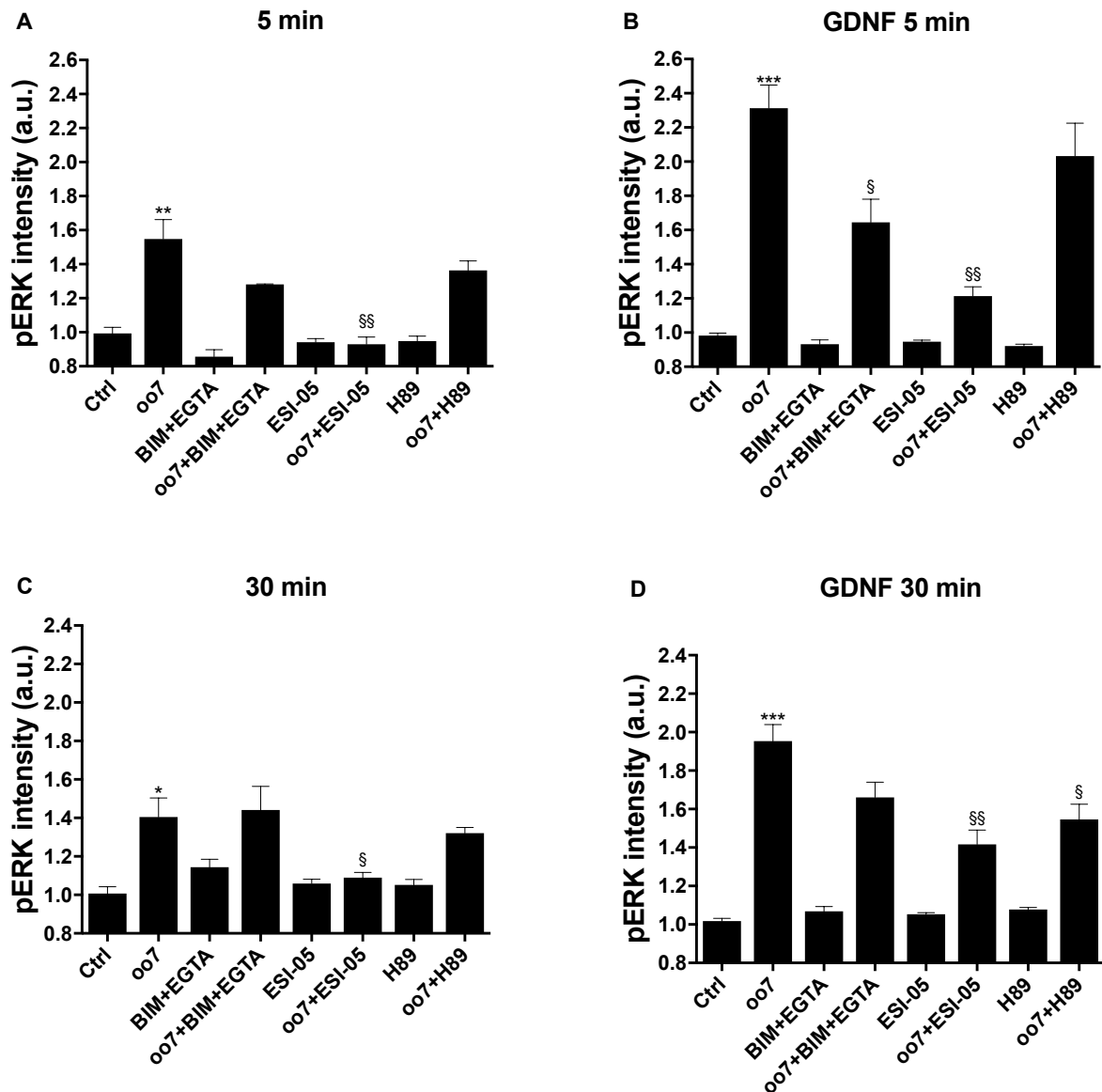


Abbildung 9: GDNF beeinflusst unter 007 den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2

Normalisierte pERK-Kinetik unter Kontrollbedingungen (Ctrl, BIM+EGTA, ESI-05, H89). **(A)** ohne, **(B)** mit 24-stündiger Prästimulation 30 ng GDNF/ml. Weitere benutzte Wirkstoffe: 30 μ M 007, 10 μ M ESI-05, 20 μ M H89 und 5 μ M BIM plus 3 mM EGTA. **(A)** Die 5-minütige Stimulation mit 007 bewirkte einen signifikanten Anstieg der pERK-Intensität. BIM+EGTA führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der Phosphorylierung. ESI-05 führte zu einer signifikanten Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung bis auf die Grundlinie. Die Inhibition mit H89 führte zu einer geringen pERK-Intensitätsabnahme. **(B)** Die Prästimulation mit GDNF führte zu einer deutlichen Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung. Die Inhibition mit BIM+EGTA oder ESI-05 führte zu einem signifikanten Abfall der pERK-Intensität. **(C)** Die 30-minütige Stimulation mit 007 führte zu einem signifikanten Anstieg der pERK-Intensität. Die Inhibition mit BIM+EGTA führte keinen Abfall der pERK-Intensität herbei. ESI-05 inhibierte die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant bis fast auf die Grundlinie. Durch H89 kam es zu einem geringen Absinken der pERK-Intensität. **(D)** Die Prästimulation mit GDNF zeigte eine deutliche Steigerung der pERK-Intensität durch 007. BIM+EGTA führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der pERK-Intensität. Die Inhibition mit ESI-05 ließ die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant herabsinken. Durch H89 sank die pERK-Intensität signifikant. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001, §§§§ p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

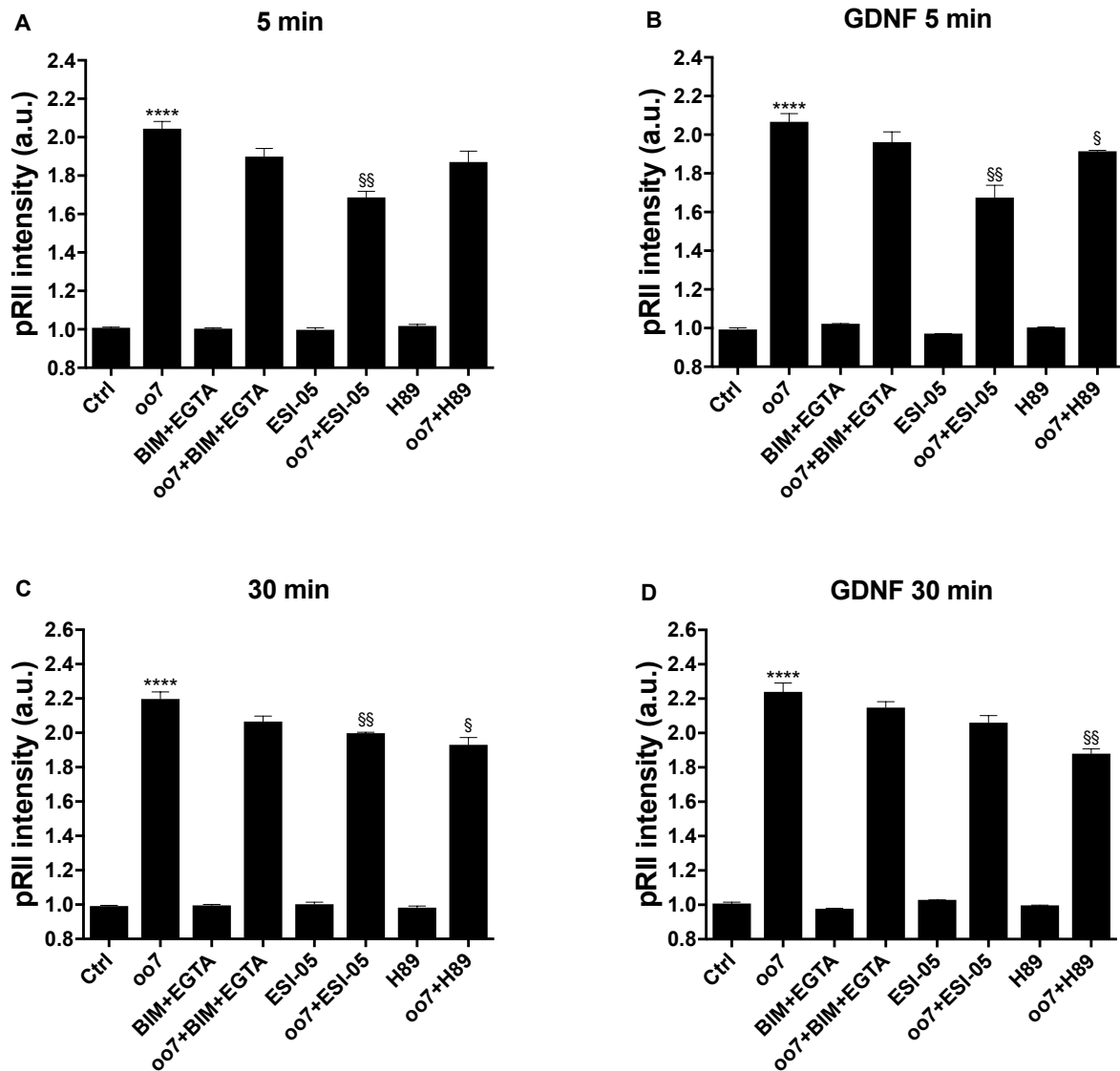


Abbildung 10: GDNF beeinflusst den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von *Epac2*

Normalisierte pRII-Kinetik unter Kontrollbedingungen (Ctrl, BIM+EGTA, ESI-05, H89). **(A)** ohne, **(B)** mit 24-stündiger Prästimulation 30 ng GDNF/ml. Weitere benutzte Wirkstoffe: 30 μ M 007, 10 μ M ESI-05, 20 μ M H89 und 5 μ M BIM plus 3mM EGTA. **(A)** Die 5-minütige Stimulation mit 007 führte zu einem Anstieg der pRII-Intensität. Durch BIM+EGTA sank diese geringfügig ab. Die Inhibition mit ESI-05 führte zu einem signifikantem Herabsinken der PKA-RII-Phosphorylierung. H89 bewirkte eine nicht signifikante Inhibition der pRII-Intensität. **(B)** Die Prästimulation mit GDNF bewirkte keine Steigerung der pRII-Intensität durch 007. Hier zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied durch die Inhibition mit H89. **(C)** Die 30-minütige Stimulation mit 007 zeigte einen Anstieg der pRII-Intensität. Die Inhibition mit BIM+EGTA bewirkte einen geringen Abfall der pRII-Intensität. ESI-05 bzw. H89 bewirkte einen Abfall der pRII-Intensität auf 2,0 bzw. 1,9. **(D)** Die Prästimulation mit GDNF zeigte keinen Anstieg der PKA-RII-Phosphorylierung durch 007. Nur die Inhibition mit H89 zeigte einen signifikanten Abfall der pRII-Intensität auf 1,9. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001, §§§§ p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen stimulierter und inhibierter Kondition.

4.10 GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch den Epac Aktivator 007 unabhängig von GRK2/3

Um weiterhin den Einfluss von GDNF in der pERK- und pRII-Kinetik zu verstehen, benutzen wir 30 μM des Epac-Aktivators 8-CPT-2Me-cAMP (007) (Parnell, Palmer, & Yarwood, 2015). Dabei wurden die Zellen über 24 Stunden mit 30 ng GDNF/ml prästimuliert und anschließend mit 007 für 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Um den Einfluss von GRK2/3 zu sehen, wurde der Inhibitor Takeda (cmpd101) benutzt. Hierzu wurden die Zellen mit 10 μM Takeda über 60 Minuten inkubiert, bevor die 007-Stimulation begann.

Zellen, die mit 007 stimuliert wurden, zeigten den Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung zum 5-Minuten-Zeitpunkt bei ungefähr 1,6-facher pERK-Aktivität (Abb. 11A, $F_{1,20} = 136,2$; $p < 0,0001$). Daraufhin folgte ein Absinken der ERK-Aktivität auf ungefähr 1,4 zum 30 Minuten Zeitpunkt zu einem Plateau ($F_{1,20} = 136,2$; $p = 0,0002$). Hier blieben die pERK-Intensitäten stets signifikant im Vergleich zur Baseline. Der Einsatz des GRK2/3-Inhibitors zeigte mit 007 in der frühen Phase eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der ERK-Aktivität ($F_{1,20} = 0,9291$; $p > 0,05$). Unter dem Einfluss von GDNF stieg die durch 007 induzierte ERK1/2-Phosphorylierung stark und signifikant an. Hier zeigte sich der Höhepunkt in der 5. Minute bei circa 2,5-facher pERK-Aktivität (Abb. 11A, $F_{1,20} = 60,38$; $p < 0,0001$). Auch hier folgte ein Absinken der ERK-Aktivität bis zur 30. Minute auf ungefähr 1,8 ($F_{1,20} = 60,38$; $p = 0,0206$) und erreichte hier sein Plateau. Takeda zeigte in der frühen Phase in den prästimulierten Zellreihen eine leichte Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung um 10 %. In der späten Phase war ein leichtes Absinken der ERK1/2-Phosphorylierung um 10 % zu beobachten. Takeda zeigte dabei jedoch keine signifikante Veränderung ($F_{1,20} = 0,01706$; $p > 0,05$).

Die PKA-RII-Phospho-Intensität stieg signifikant durch die Stimulation mit 007 auf das 2,4-fache an (Abb. 11B, $F_{1,20} = 1281$; $p < 0,0001$) und bildete ein Plateau zwischen 2,4 und 2,6. Die Inhibition von GRK2/3 mittels Takeda zeigte keinen Einfluss auf die PKA-RII-Phospho-Intensität ($F_{1,20} = 0,1803$; $p > 0,05$). Die Prästimulation mit GDNF über 24 Stunden zeigte keine Veränderung der pRII-Kinetik in der Stimulation mit 007 (Abb. 11B, $F_{1,20} = 0,7288$; $p > 0,05$). bzw. der Inhibition mit Takeda ($F_{1,20} = 0,4520$; $p > 0,05$).

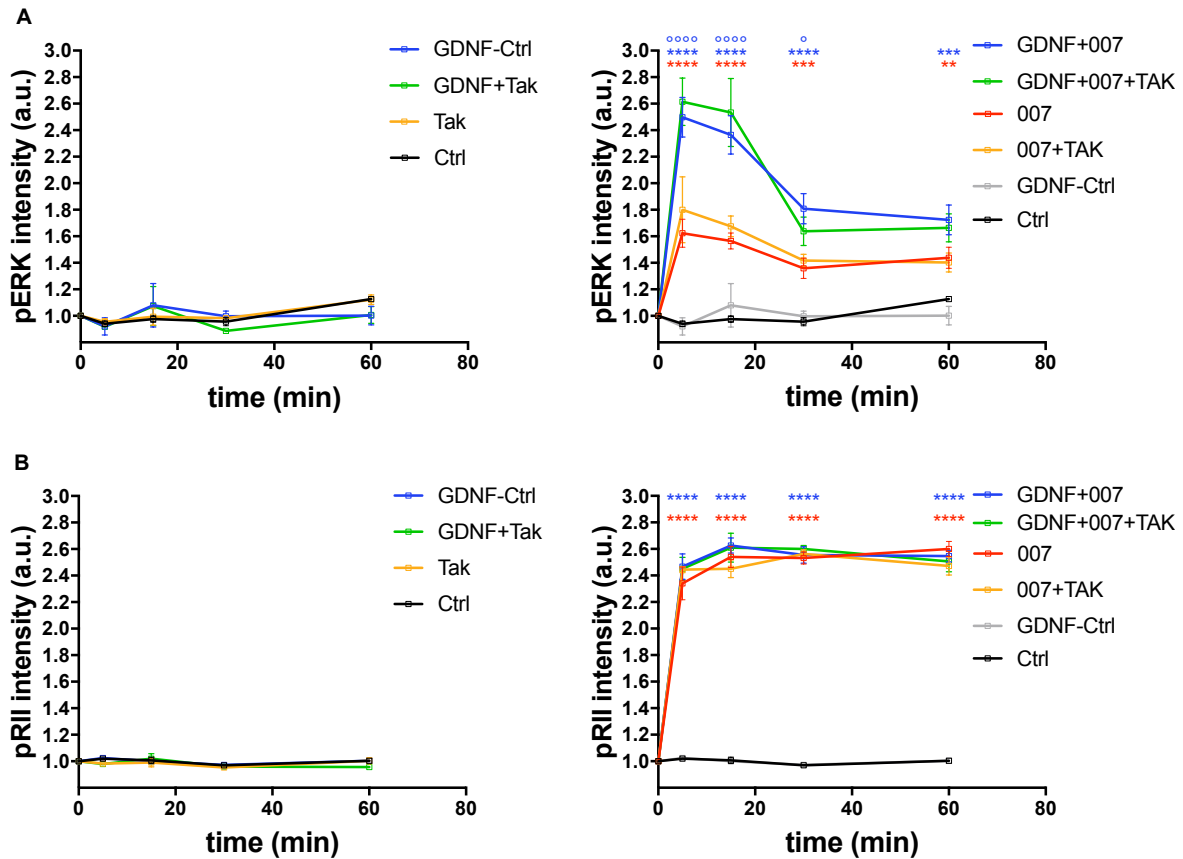


Abbildung 11: GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch den Epac-Aktivator 007 unabhängig von GRK2/3

Normalisierte pERK- **(A)** und pRII-Kinetik **(B)** unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl) über 60 Minuten. Zur besseren Übersicht wurden die Kontrollkonditionen separat links aufgeführt. Weitere benutzte Wirkstoffe: 007 (30 μ M), Takeda (10 μ M). 007 zeigte seinen Höhepunkt der ERK1/2-Phosphorylierung zum 5-Minuten-Zeitpunkt. Daraufhin folgte ein Absinken zu einem Plateau. In Kombination mit Takeda zeigte 007 keine signifikante Veränderung. Die Prästimulation mit GDNF zeigte eine deutliche Steigerung der pERK-Intensität durch 007. Die Inhibition mit Takeda führte zu keiner signifikanten Veränderung der pERK-Intensität. **(B)** Die Stimulation mit 007 zeigte eine Erhöhung der pRII-Intensität mit Ausbildung eines Plateaus. Takeda zeigte keine wesentliche Veränderung der pRII-Kinetik durch 007. Auch die Prästimulation mit GDNF zeigte keine Veränderung der pRII-Kinetik durch 007 und Takeda. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001, °°°° p < 0,0001 zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus.

4.11 Nach dem Auswaschen von GDNF bleiben die Effekte des neurotrophen Faktors erhalten

In dieser experimentellen Serie wollten wir untersuchen, was ein Auswaschen des neurotrophen Faktors GDNF nach einer 24-stündigen Inkubation bewirkt. Zur Visualisierung wurden zusätzlich Daten aus den vorherigen Experimenten erhoben, um diese mit der neuen experimentellen Serie zu vergleichen. Die Daten aus den vorherigen Experimenten wurden in der Abbildung 12 grau gestuft. Zellreihen, in denen GDNF bzw. die Zellen ausgewaschen wurden, gehören der neuen experimentellen Serie an

(schwarz gestuft). Diese wurden in der Abbildung schwarz gestuft. Die Zellen wurden zunächst über 24 Stunden mit 30 ng GDNF/ml prästimuliert. Anschließend wurde 2/3 des Mediums einiger Zellreihen 7 Mal ausgewaschen. Es resultierte eine Endkonzentration von 0,0137 ng GDNF/ml. Anschließend erfolgte eine 5- bzw. 30-minütige Stimulation mit 10 μ M Forskolin.

Washout cycle	GDNF (ng/ml)
0	30
1	10
2	3.33
3	1.11
4	0.37
5	0.12
6	0.04
7	0.01

Zellen, die nach dem Auswaschen 5 Minuten mit Forskolin stimuliert wurden, zeigten einen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung auf ungefähr 1,5 (Abb. 12A, $F_{2,2} = 11,46$; $p < 0,0001$). Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF bewirkte eine Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung auf das circa 2,4-fache (Abb. 12A, $F_{2,2} = 7,365$; $p < 0,0001$). Im Vergleich (GDNF+Fsk vs. Fsk) kam es zu einer deutlich signifikanten Verstärkung der pERK-Intensität ($F_{2,2} = 11,06$; $p < 0,0004$). Zellen, welche nach dem Auswaschen 30 Minuten mit Forskolin stimuliert wurden, zeigten eine pERK-Intensität von ungefähr 1,4 (Abb. 12B, $F_{2,2} = 5,602$; $p = 0,0002$). GDNF verstärkte dabei die ERK1/2-Phosphorylierung auf ungefähr 1,6 (Abb. 12B, $F_{2,2} = 6,899$; $p < 0,0001$). Im Vergleich (GDNF+Fsk vs. Fsk) kam es auch hier zu einem signifikanten Anstieg der pERK-Intensität ($F_{2,2} = 1,232$; $p = 0,0081$). In Kontrast zum herangezogenen Datensatz zeigten die Zellreihen das gleiche Verhalten. Trotz der Auswaschung von GDNF, blieben die Effekte bezüglich der ERK1/2-Phosphorylierung erhalten.

Durch das Auswaschen und einer 5-minütigen Stimulation mit Forskolin kam es zu einem Anstieg der PKA-RII-Phospho-Intensität auf das circa 2,25-fache (Abb. 12C, $F_{2,2} = 9,342$; $p < 0,0001$). Die GDNF-vorbehandelten Zellen zeigten nach der Forskolin-Stimulation hierbei sehr ähnliche Ergebnisse in der pRII-Intensität (Abb. 12C, $F_{2,2} = 4,331$; $p < 0,0001$). Im Vergleich (GDNF+Fsk vs. Fsk) war kein signifikanter Anstieg der

pRII-Intensität zu beobachten ($F_{2,2} = 1,074$; $p > 0,05$). Zellreihen zeigten unter 30-minütiger Stimulation mit Forskolin eine pRII-Intensität von ungefähr 2,1 (Abb. 12D, $F_{2,2} = 13,62$; $p = 0,0066$). Auch die GDNF-prästimulierten Zellreihen zeigten hier sehr ähnliche pRII-Intensitäten (Abb. 12D, $F_{2,2} = 9,373$; $p = 0,0018$). Das Auswaschen des neurotrophischen Faktors zeigte sowohl nach 5-minütiger als auch nach 30-minütiger Stimulation keine Unterschiede im Verhalten der PKA-RII-Phospho-Intensitäten im Vergleich zum herangezogenen Datensatz. Insgesamt ließ sich zeigen, dass nach der 24-stündigen Prästimulation mit GDNF auch unter Abwesenheit des neurotrophischen Faktors die Effekte erhalten bleiben.

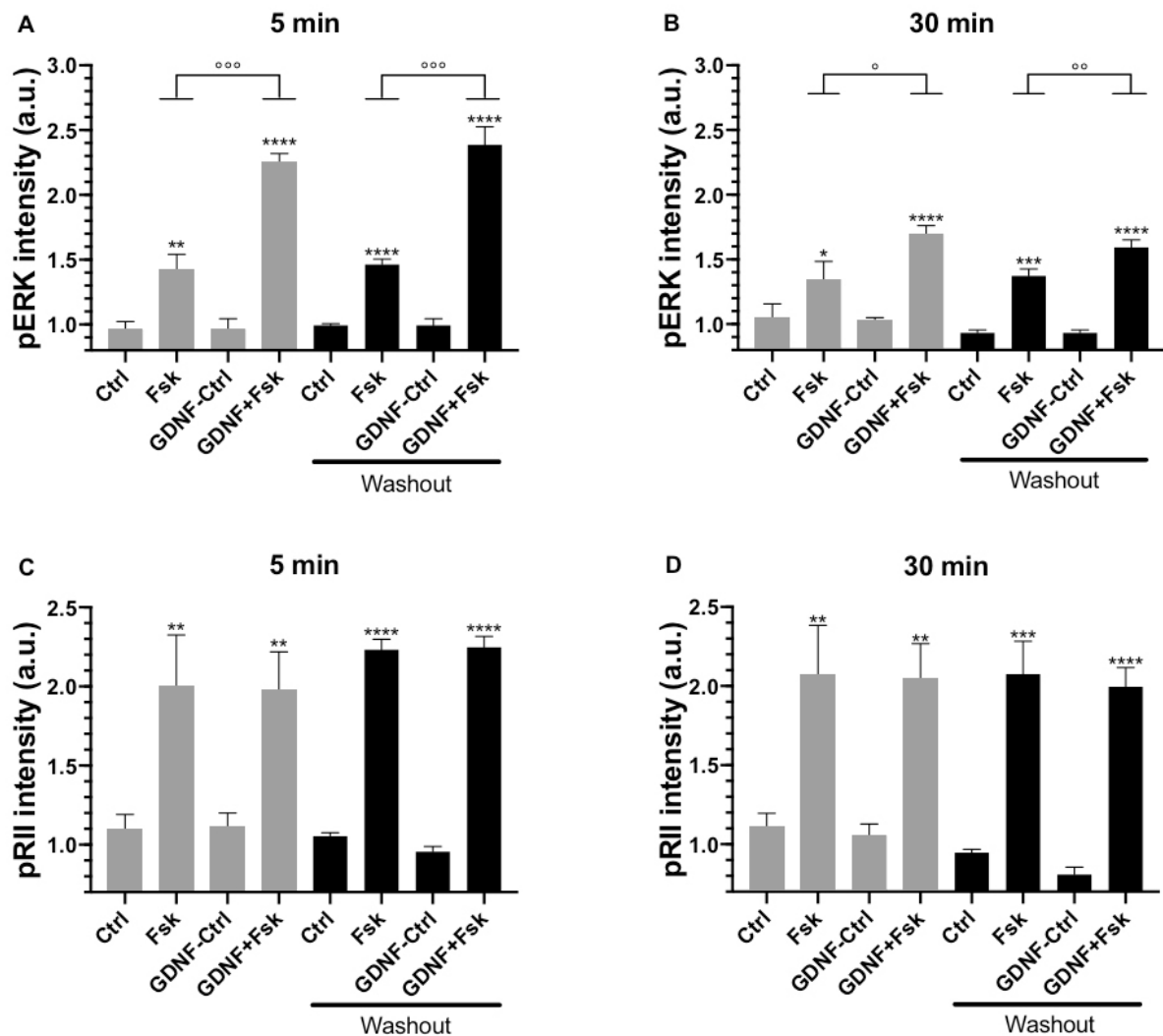


Abbildung 12: Nach dem Auswaschen von GDNF bleiben die Effekte des neurotrophischen Faktors erhalten. Normalisierte pERK- (A) und pRII-Intensitäten (B) unter Kontrollbedingungen (Ctrl, GDNF-Ctrl). 24-stündige Prästimulation mit 30 ng GDNF/ml und 5- (links) bzw. 30-minütige (rechts) Stimulation mit 10 μ M Forskolin. Daten aus vorherigen Experimenten wurden zur Visualisierung links zusätzlich eingefügt (graulich gestuft). Zellreihen, die ausgewaschen wurden, entsprechen dem neuen Datensatz (schwarz gestuft).

(A) Nach der Auswaschung von GDNF bleiben die Effekte in pERK erhalten. (B) Die Auswaschung von GDNF zeigte keine Unterschiede in pRII im Vergleich zu den nicht ausgewaschenen Zellreihen. Werte gemittelt \pm SEM. $n = 3$ Tiere pro Gruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen der Baseline und Stimulus; $^{\circ}$ $p < 0,05$, $^{\circ\circ}$ $p < 0,01$, $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0,001$, $^{\circ\circ\circ\circ}$ $p < 0,0001$ zeigt die Signifikanzlevel zwischen Stimulus und GDNF+Stimulus.

4.12 Die frühe Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von Priming; die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion

In dieser experimentellen Serie wollten wir die akute und späte Phase der ERK-Aktivierung näher verstehen. Dabei wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Prästimulation mit 30 ng GDNF/ml mit verschiedenen Wirkstoffen für 5 bzw. 30

Minuten stimuliert. Dabei handelte es sich um 30 μM 007, 10 μM Forskolin und 1 μM Serotonin. Vor der Stimulation wurden einige Zellreihen für 30 Minuten mit dem RET-Inhibitor XL-184 (4 μM) inkubiert (Y. Zhang, Guessous, Kofman, Schiff, & Abounader, 2010). RET wird aktiviert, wenn die GDNF-family of ligand (GFLs) an den GDNF-family receptor- α (GFR α) Rezeptoren bindet, um so weitere Prozesse in der Zelle in Gang zu setzen (Airaksinen et al., 1999; Takahashi, 2001).

Zellen, die mit XL-184 vorbehandelt wurden, zeigten nach 5-minütiger Stimulation (Abb. 13A) mit dem Wirkstoff 007 eine Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung auf 1,5 ($F_{2,2} = 163,7$; $p > 0,05$). Forskolin ($F_{2,2} = 8,353$; $p = 0,0036$) und Serotonin ($F_{2,2} = 70,47$; $p > 0,05$) bewirkten eine Steigerung der pERK-Intensität auf das 1,3-fache. Die 24-stündige Prästimulation mit GDNF verstärkte die ERK1/2-Phosphorylierung durch 007, Forskolin und Serotonin signifikant (Abb. 13A). Bei der Stimulation mit 007 kam es zu einem signifikanten Anstieg der pERK-Intensität von circa 1,5 auf ungefähr 2,2 ($F_{2,2} = 3,970$; $p = 0,0179$). Bei der 5-minütigen Stimulation mit Forskolin bewirkte GDNF die signifikante Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung von 1,3 auf fast 2,0 ($F_{2,2} = 14,46$; $p = 0,0118$). Die Stimulation mit Serotonin zeigte einen signifikanten Anstieg der pERK-Intensität durch GDNF von 1,3 auf 2,0 ($F_{2,2} = 2,510$; $p = 0,0247$). Im Vergleich zu den Zellreihen, welche nicht mit dem RET Inhibitor behandelt wurden, zeigten die Zellreihen zum 5-Minuten-Zeitpunkt das gleiche Verhalten unter GDNF (Abb. 13A). Auch hier verstärkte GDNF die ERK1/2-Phosphorylierung durch 007 ($F_{2,2} = 2,044$; $p = 0,0089$), Forskolin ($F_{2,2} = 3,501$; $p = 0,0004$) und Serotonin ($F_{2,2} = 2,026$; $p = 0,0032$) signifikant.

Nach 30-minütiger Inkubation mit XL-184 und anschließender Stimulation (Abb. 13B) mit 007 ($F_{2,2} = 9,549$; $p = 0,0012$) und Forskolin ($F_{2,2} = 2,635$; $p = 0,0001$) über 30 Minuten beobachteten wir eine Steigerung der pERK-Intensität auf 1,4. Serotonin zeigte eine geringe ERK1/2-Phosphorylierung von 1,1 ($F_{2,2} = 1,214$; $p > 0,05$). In den XL-184-inkubierten Zellreihen zeigte die Prästimulation mit GDNF (Abb. 13B) keine signifikante Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung durch die Stimulantien (007: $F_{2,2} = 4,034$, $p > 0,05$; Forskolin: $F_{2,2} = 12,92$, $p > 0,05$; Serotonin: $F_{2,2} = 21,99$, $p > 0,05$) mehr. Verglichen mit den XL-184 unbehandelten Zellen führte die Inhibition zum Wirkungsverlust von GDNF zum 30-Minuten-Zeitpunkt in pERK (Abb. 13B). Die akute Phase der ERK-Aktivierung ist ein Ergebnis von Priming, wobei die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion ist.

Zum 5-Minuten-Zeitpunkt (Abb. 13C) zeigte sich durch die Inhibition mit XL-184 und anschließender Stimulation mit 007 eine pRII-Intensität von ungefähr 2,0 ($F_{2,2} = 20,63$; $p < 0,0001$). Forskolin zeigte bei einer Stimulation von 5 Minuten eine PKA-RII-Phospho-Intensität von circa 1,8 ($F_{2,2} = 72,20$; $p = 0,0001$). Serotonin als dritter Wirkstoff zeigte hier eine pRII-Intensität von ungefähr 1,4 ($F_{2,2} = 37,44$; $p = 0,0004$). Die Prästimulation mit GDNF (Abb. 13C) und anschließender Stimulation mit 007 ($F_{2,2} = 4,253$; $p > 0,05$), Forskolin ($F_{2,2} = 1,852$; $p > 0,05$) oder Serotonin ($F_{2,2} = 1,143$; $p > 0,05$) zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede in den pRII-Intensitäten zur nicht-prästimulierten Gruppe. Die Inhibition mit XL-184 und anschließender 30-minütiger Stimulation durch 007 bzw. Forskolin (Abb. 13D) zeigte im Vergleich zur Stimulation über 5 Minuten einen leichten, nicht signifikanten, Anstieg der PKA-RII-Phospho-Intensität. Serotonin zeigte hier einen Abfall der pRII-Intensität. Bezüglich GDNF zeigte sich jedoch das gleiche Verhalten. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung durch den neurotrophischen Faktor (Abb. 13D). Die XL-184 unbehandelten Zellreihen zeigten nach 30-minütiger Stimulation mit Serotonin einen signifikanten Anstieg ($F_{2,2} = 1,09,8$; $p = 0,0496$). Dieser war in der XL-184-inhibierten Zellreihe nicht mehr zu beobachten ($F_{2,2} = 1,518$; $p > 0,05$). Im Vergleich zeigten sich insgesamt keine wesentlichen Unterschiede in pRII, trotz der Inhibition mit XL-184 (Abb. 13D).

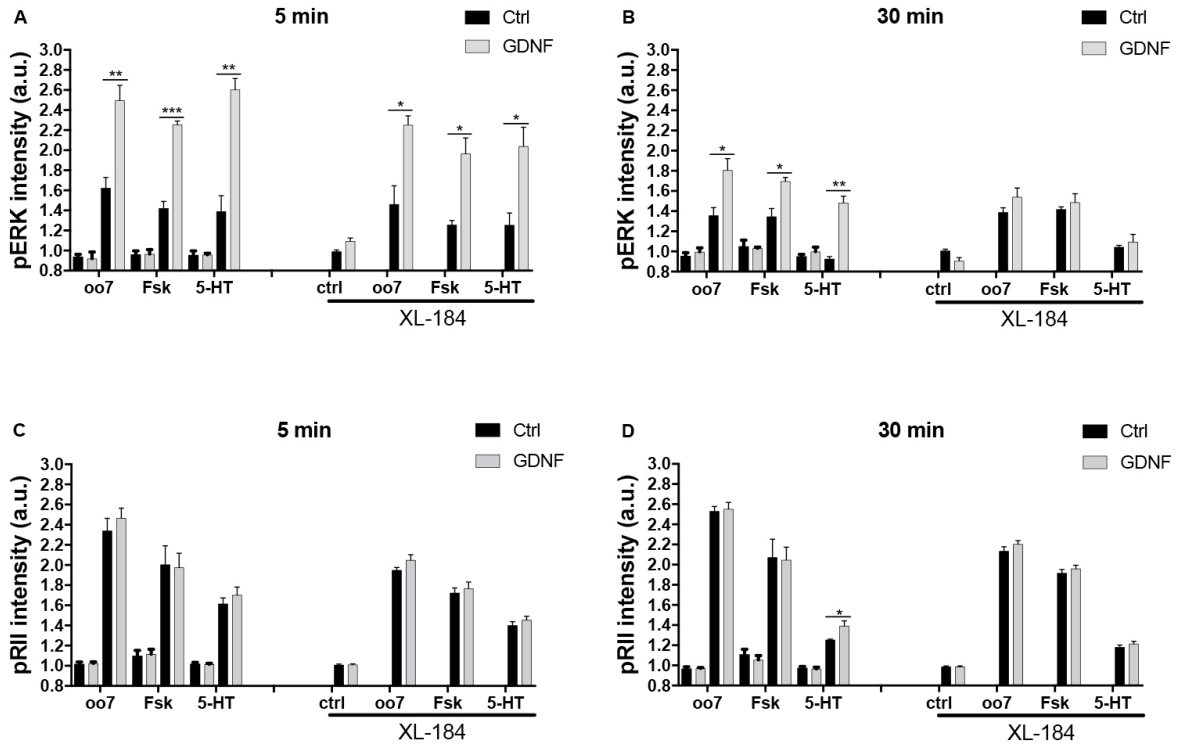


Abbildung 13: Die frühe Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von Priming; die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung ist ein Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion

Normalisierte pERK- (A) und pRII-Kinetik (B) unter Kontrollbedingungen (Ctrl). Schwarz ohne, graue Balken mit 24-stündiger Prästimulation 30 ng GDNF/ml. Weitere benutzte Wirkstoffe: 30 μ M 007, 10 μ M Forskolin (Fsk), 1 μ M Serotonin (5-HT), 4 μ M XL-184. (A) Zellreihen, die mit XL-184 inhibiert wurden, zeigten durch GDNF weiterhin den deutlichen Anstieg in pERK nach 5-minütiger Stimulation. Nach 30-minütiger Stimulation konnte kein signifikanter Anstieg durch die GDNF-Prästimulation in pERK nachgewiesen werden. (B) Die Prästimulation mit GDNF zeigte keine Veränderung in pRII. Werte gemittelt \pm SEM. n = 3 Tiere pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 zeigt Signifikanzlevel zwischen den gekennzeichneten Konditionen. Die Signifikanzlevel zur Grundlinie sind in der Grafik nicht aufgezeigt.

5. Diskussion

In dieser wissenschaftlichen Arbeit hatten wir das Ziel, die Rolle von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK näher zu verstehen. Die Forschung wurde mit Hilfe der Methode der HCS-Mikroskopie am Rattenmodell durchgeführt. Hierzu wurde die Wirkung von GDNF und diversen Stimulantien/Inhibitoren an nozizeptiven Neuronen untersucht.

Dabei veranschaulichten wir uns die intrazellulären und schmerzsensibilisierenden Signalwege anhand der zwei Kinasen ERK1/2 und PKA-RII.

Unsere Ergebnisse zeigten:

- a) GDNF verstärkte die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Forskolin. Dabei war die Phosphorylierung von der GDNF-Konzentration abhängig. Der cAMP-Crosstalk zu ERK wurde durch GDNF unabhängig von PKA beeinflusst.
- b) GDNF verstärkte die Phosphorylierung von ERK1/2 durch GPCRS mit anhaltender Phase der ERK Aktivierung. Dabei war die frühe Phase der ERK-Aktivierung von PKC/Calcium abhängig. Die späte Phase der ERK-Aktivierung war abhängig von PKA. Die GPCR vermittelte pERK- bzw. pRII-Aktivierung war unabhängig von GRK2/3.
- c) GDNF beeinflusst den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2. Die Epac vermittelte pERK- bzw. pRII-Aktivierung war unabhängig von GRK2/3.
- d) GDNF führt ein Priming der Zellen herbei. Dabei ist die frühe Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von Priming und die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion.

5.1 GDNF und Forskolin

In den Experimenten 3.1, 3.2, 3.3 wurde Forskolin verwendet. In unseren Experimenten ließ sich zeigen (siehe 3.1), dass höhere Forskolin-Dosen mit einer höheren Aktivierung von pERK und pRII in Zusammenhang stehen. Dies suggeriert, dass erhöhte cAMP-Level zu einer erhöhten ERK- und PKA-Phosphorylierung führen. Dies lässt sich auch mit der gegebenen Literatur vereinbaren.

Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und regt infolgedessen die Produktion von cAMP an (Taiwo & Levine, 1991). Durch das cAMP wird die cAMP-abhängige Protein Kinase A aktiviert. Es bindet an die zwei regulatorischen Untereinheiten der Protein Kinase A, sodass die aktive katalytische Untereinheit frei wird (De Cesare & Sassone-Corsi, 2000; Delghandi, Johannessen, & Moens, 2005; Shaywitz & Greenberg, 1999). Racowsky zeigte den dosisabhängigen-Anstieg zwischen Forskolin und cAMP in Oozyten von Schweinen. Hohe Forskolin-Dosen führten hier zu höherem cAMP-Anstieg. Ein Zusammenhang zwischen cAMP und ERK/PKA wurde hierbei nicht untersucht (Racowsky, 1985). Rudolph et al. beschrieb den zeit- und dosisabhängigen Zusammenhang zwischen cAMP und ERK1/2 in T84-Zellen, einer intestinalen kryptenartigen Zelllinie. Hierbei führten erhöhte cAMP-Dosen auch zu erhöhter ERK1/2-Aktivität (Rudolph, Poccia, & Cohen, 2004).

Isensee et al. zeigte die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen cAMP und der PKA-RII-Phosphorylierung. Auch hier führten erhöhte cAMP-Dosen zu erhöhter PKA-RII-Intensität in Ratten (Isensee, Diskar, Waldherr, Buschow, Hasenauer, Prinz, Allgower, et al., 2014). Levenson et al. zeigte z. B., dass Forskolin die PKA und pERK2 Aktivität in Hippocampusnervenzellen in Ratten signifikant erhöht (Levenson et al., 2004).

Impey et al. beschrieb den Anstieg der ERK-Phospho-Intensität mittels Forskolin in PC12 und Hippocampusneuronen von Mäusen (Impey et al., 1998). Hierbei zeigten Patterson sowie Sharma et al., dass ERK-Aktivität für eine Forskolin-induzierte Langzeitpotentierung in Hippocampusneuronen benötigt wird (Patterson et al., 2001; Sharma, Singh, & Sharma, 2014). Tassin et al. zeigte die Erhöhung der pERK-Aktivität mittels Forskolin in Nervenzellen des Striatum von Mäusen (Tassin, Benavides, Plattner, Nishi, & Bibb, 2015).

In der Kinetik von 3.3 konnten wir zwei Phasen der ERK-Aktivierung durch Forskolin veranschaulichen. Hier war der Höhepunkt der Stimulation nach 5 Minuten zu beobachten. Anschließend zeigte sich ein Abfall der ERK-Aktivität mit der Ausbildung

einer Plateauphase. Im Gegensatz dazu zeigte die PKA-RII-Phosphointensität einen raschen Anstieg mit sofortiger Ausbildung eines Plateaus.

Isensee et al. zeigte in einer Kinetik von 120 Minuten mittels high content screening Mikroskopie keine Plateauausbildung der ERK1/2-Aktivität im Rattenmodell. Durch die Forskolinstimulation war ab dem Stimulationsbeginn sogar ein stetiger Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung zu beobachten. Die PKA-RII-Phosphointensität zeigte den nahezu identischen Verlauf. Das Zeitverlaufsexperiment weist auch auf eine lang anhaltende RII-Phosphorylierung hin (Isensee et al., 2018). In einer Kinetik von 3 Stunden zeigte Rudolph et al. einen mit unseren Ergebnissen vergleichbaren Verlauf. Im Western Blot wurden hier Stimulationszeiten von 15 Minuten, 1 Stunde und 3 Stunden ausgewählt. Hier war durch den Einsatz von 8-bromo-cAMP der Höhepunkt zum 15 Minuten-Zeitpunkt, mit anschließendem Abfall der pERK-Intensität, zu beobachten. In dieser experimentellen Reihe wurden nur die drei gegebenen Zeitpunkte untersucht. Ein engmaschigerer Beobachtungsverlauf würde uns hier noch mehr Aufschluss über die frühe Phase der ERK-Aktivierung geben (Rudolph et al., 2004).

Des Weiteren war in 3.3 durch die Inhibition mit H89 die signifikante Abschwächung der ERK-Aktivität zum 60-Minuten-Zeitpunkt zu beobachten. Die frühe Phase der ERK-Aktivierung zeigte dabei keine signifikante Abschwächung. Dies suggeriert, dass die frühe Phase der ERK-Aktivierung unabhängig von PKA ist. In pRII zeigte sich keine signifikante Abschwächung durch H89.

In den Experimenten von Yanping Li et al. zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. In einem Western Blot wurden Hek293 Zellen (Human embryonic kidney cells) mittels Forskolin und IBMX, einem nicht selektiven Phosphodiesterase-Inhibitor, stimuliert. H89 blockierte die ERK-Aktivierung durch cAMP während der anhaltenden Phase vollständig (10. - 20. Minute), während die frühe Phase der ERK-Aktivierung (2. - 5. Minute) nur teilweise blockiert wurde (Y. Li, Dillon, Takahashi, Earley, & Stork, 2016). Zanassie et al. beschrieb ähnliche Ergebnisse. In Striatum Zellen von Ratten wurde der 10-Minuten-Zeitpunkt untersucht. Hier führte die Stimulation mit Forskolin über 10 Minuten sowie die Inhibition mit H89 zu einer Abschwächung der ERK2-Phosphorylierung. In diesen Experimenten wurde nur ein Zeitpunkt untersucht. Ein Zeitverlaufsexperiment würde uns mehr Aufschluss über das Verhalten von ERK in der frühen und anhaltenden Phase der ERK-Aktivierung geben. Wei-Peng Li et al. zeigte in einer 15-minütigen Stimulation von PC12-Zellen mit Forskolin eine Inhibition der

ERK1/2-Phosphorylierung durch H89. Auch hier wurde nur ein alleiniger Zeitpunkt untersucht (W. P. Li et al., 2018).

Yao et al. untersuchte die PKA-abhängige ERK1-Aktivierung bei einer Stimulation mit Forskolin in PC12-Zellen. Im Gegensatz zu unseren bisher beschriebenen Ergebnissen zeigt Yao et al. in einem Zeitverlaufsexperiment von über 120 Minuten die PKA-abhängige ERK1-Aktivierung auch in der frühen Phase der ERK-Aktivierung (Yao, York, Misra-Press, Carr, & Stork, 1998).

In unseren Experimenten 3.1 bis 3.3 konnten wir deutlich veranschaulichen, wie GDNF die Wirkung von Forskolin in pERK verstärkt. Dabei lässt sich in dem Zeitverlaufsexperiment von 3.3 weiterhin der zweiphasige Verlauf der pERK-Intensität mit dem frühen raschen Anstieg und dem anschließenden Abfall in eine Plateauphase aufweisen. GDNF erhöhte dabei die Amplitude der ERK-Phosphorylierung sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Forskolin-Konzentrationen (1 bis 10 μM). Die GDNF-Prästimulation scheint demnach die Wirkung in Richtung ERK um einen cAMP-Konzentrations-unabhängigen Faktor zu verstärken. Des Weiteren zeigte das Dosis-Wirkungsexperiment von 3.2, dass ansteigende GDNF-Konzentrationen zu erhöhten pERK-Intensitäten führen. Hierbei war die maximale pERK-Intensität zum 5-Minuten-Zeitpunkt mit der höchsten GDNF-Dosis (30 ng/ml) zu beobachten. Aus unseren Experimenten geht jedoch nicht hervor, ab welcher GDNF-Dosis ein Plateau der pERK-Intensität erreicht wird. Weitere Experimente mit höheren GDNF-Konzentrationen würden hier mehr Aufschluss bringen.

Die Phospho-Intensität von PKA-RII war in unseren Experimenten (siehe 3.3.) durch die Präinkubation mit GDNF unbeeinflusst. GDNF und Forskolin verstärken die pERK-Aktivität ohne dabei die PKA-Antwort zu beeinflussen. Sowohl die Datenlage zur Rolle von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK als auch die Literatur bezüglich unserem durchgeführten experimentellen Modell sind sehr gering ausgeprägt.

Neben GDNF gehört auch Artemin, Persephin und Neurturin zur GDNF family of neurotrophic factors. Diese neurotrophen Faktoren werden auch als GDNF-family of ligand (GFL) bezeichnet. In der Literatur gibt es viele Studien die neben GDNF auch eine Aktivierung der ERK-Phosphorylierung durch die anderen GFLs beschreiben (Airaksinen & Saarma, 2002; Airaksinen et al., 1999; Hauck et al., 2006; Jeong, Park, & Park, 2008; Soler et al., 1999; Wolf, Rothermel, & Robitzki, 2008; Yoong & Too, 2007; Zhu et al., 2020).

In einer Studie von Bogen et al. wurden Ratten einmalig eine intradermale Injektion von 10 ng GDNF appliziert, um Hyperalgesie auszulösen. Inhibitoren von PLC γ , PI3K, MEK1/2 und CDK5 milderten die GDNF-Hyperalgesie signifikant, während Inhibitoren von PKA und PKC keinen Effekt auf die GDNF-Hyperalgesie hatten (Bogen, Joseph, Chen, & Levine, 2008).

In der Literatur gibt es viele Quellen, die eine Steigerung der ERK-Phosphorylierung durch GDNF in verschiedenen Zellen beschreiben. So beschreibt Su et al., dass die Stimulation von Chondrosarkom-Zellen mit GDNF zu einer erhöhten Phosphorylierung von MEK und ERK führt. Dieser Prozess spielt über weitere Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Migration und Metastasierung von menschlichen Krebszellen (Su et al., 2009). Manfredsson et al. beschrieb, wie die nigrostriatale GDNF-Überexpression im Hypothalamus von Ratten zu einer Aktivierung der ERK-Phosphorylierung führt. Hierbei war jedoch nur eine kleine Population von Neuronen der Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) Neurone betroffen, welche sich spezifisch in der medialen parvozellulären Division (MDP) des paraventriculären Nukleus des Hypothalamus befinden (Manfredsson et al., 2009).

Hasegawa et al. beschrieb, dass GDNF-Signalisierung für die Aufrechterhaltung und/oder Aktivierung von ERK1/2 in GFR α 1-positiven Spermatogonien von Mäusen erforderlich ist (Hasegawa, Namekawa, & Saga, 2013). Salvatore et al. beschrieb in GDNF-behandelten Ratten eine Steigerung der Tyrosinhydroxylase-Phosphorylierung an Serin 31 im Striatum um 40 % und in der Substantia nigra um 250 %. In der Substantia nigra war ein signifikanter Anstieg der ERK1-Phosphorylierung und im Striatum war ein signifikanter Anstieg der ERK2-Phosphorylierung zu beobachten (Salvatore et al., 2004). Wie auch in unseren Experimenten wies Boscia et al. im Hippocampus von Ratten eine dosis- und zeitabhängige ERK-Phosphorylierung durch GDNF nach. GDNF-Konzentrationen von 100 ng/ml bzw. 200 ng/ml bewirkten eine starke Aktivierung von ERK nach 30 Minuten. Diese blieb bis zu 60 Minuten bestehen. Eine Rückkehr zum Basallevel wurde nach 24 Stunden GDNF-Stimulation beobachtet (Boscia et al., 2009).

5.2 GDNF und die GPCRs

In unseren Experimenten von 3.4 untersuchten wir die Wirkung der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) Cicaprost, Prostaglandin E2 und Serotonin. Die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind die größte Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren. Ungefähr 800 Rezeptoren wurden im menschlichen Genom identifiziert (Bjarnadottir et al., 2006).

In der Literatur gibt es viele beschriebene mögliche Signalwege, über die ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ERKs aktivieren kann. Hierbei ist eine Einteilung in zwei Haupt-Signalwege möglich. Der erste Weg führt über die klassische G-Protein-Aktivierung, welche von second messengern abhängen, wie PKA, PKC und Phosphatidylinositol-3-Kinase, Ras- oder Rap-Austauschfaktoren und schließlich die Aktivierung von Rezeptor-(epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor [EGF-R]) oder Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen (Src) (Luttrell, 2005). Der zweite Signalweg benötigt keine G-Proteine. Dieser Signalweg erfolgt nach der Entkopplung der G-Proteine und involviert β -Arrestine, welche an dieser Entkopplung beteiligt sind (Lefkowitz & Shenoy, 2005; Q. Wang, Lu, Zhao, & Limbird, 2006).

Sowohl durch Cicaprost als auch durch Serotonin ließ sich der Klimax der pERK-Aktivität in der frühen Phase der ERK-Aktivierung beobachten. Durch Prostaglandin E2 war kein Anstieg der pERK-Aktivität in Abwesenheit von GDNF zu beobachten.

5.2.1 Prostaglandin E2

Die Prostanoiden sind die Cyclooxygenase-Metabolite der Arachidonsäure. Sie umfassen Prostaglandin (PG) D2, PGE2, PGF2, PGI2 und Thromboxin A2. Sie üben eine Vielzahl von Wirkungen in verschiedenen Geweben bzw. Zellen aus. Hierunter gehören z. B. die Entspannung und Kontraktion von glatten Muskeln, die Regulation der Sekretion und Motilität im Gastrointestinaltrakt und vieles mehr. Für uns interessant ist die Modulation der neuronalen Aktivität, indem sie entweder die Ausschüttung von Neurotransmittern hemmen bzw. stimulieren und so sensorische Fasern für schädliche Reize sensibilisieren (Narumiya, Sugimoto, & Ushikubi, 1999). So werden pathogene Mechanismen vermittelt, wie z. B. Entzündungsreaktionen, gesteigerte Hypersensitivität oder Thermosensitivität (Domenichiello, Wilhite, Keyes, & Ramsden, 2017; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Tabarean, Behrens, Bartfai, & Korn, 2004).

Durch die Stimulation mit PGE2 kommt es durch die GPCRs zur Stimulation der Adenylatzyklase, welches cAMP generiert. Dieses führt zur Aktivierung der PKA-II. Hierdurch kommt es zur Hyperalgesie in primär afferenten Nozizeptoren (Hucho & Levine, 2007; Pierre et al., 2009; Taiwo et al., 1989; Taiwo & Levine, 1991).

In 3.4 konnte in unseren Experimenten kein Anstieg der pERK-Aktivierung durch PGE2 in Abwesenheit von GDNF nachgewiesen werden. Die pRII-Intensität stieg jedoch. Dies könnte z. B. an unserer genutzten PGE2-Konzentration liegen. So zeigte z. B. Jin et al. die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen PGE2 und ERK. Erhöhte PGE2-Konzentrationen führten dabei zu erhöhter ERK-Aktivität (Jin, Wang, Zhang, Yang, & Wang, 2007).

In der Literatur ist die Aktivierung von ERK und PKA durch PGE2 mehrfach beschrieben (Garza Carbajal et al., 2020; Kang, Li, Xu, Reinach, & Lu, 2000; Krysan et al., 2005; St-Jacques & Ma, 2011; L. Zhang et al., 2007). Im Gegensatz hierzu zeigte Cho et al. anhand von human follicular dendritic cell-like cells (human FDC-like cells), dass PGE2 nicht die phosphorylierten Formen von ERK erhöht. PGE2 reduzierte die ERK-Phosphorylierung 60 und 120 Minuten nach der Stimulation um etwa 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Cho & Choe, 2020).

Erst durch die Prästimulation mit GDNF konnte in unseren Experimenten eine Steigerung der ERK-Phosphorylierung durch PGE2 induziert werden. Die Steigerung der ERK-Intensität war hierbei in der frühen Phase der ERK-Aktivierung zu beobachten (siehe 3.4 Abb. 4 C.). Cox-2 synthetisiert Prostaglandine aus Arachidonsäure (Inoue et al., 2006). Murase et al. beschrieb in männlichen Sprague Dawley Ratten, dass kurz nach dem Training Cox-2 hochreguliert wurde, welche zu einer Hochregulierung von GDNF im Muskel führte (Murase et al., 2013). Die durch Cox-2 ausgelöste mechanische Hyperalgesie ist mit für die Entwicklung von "delayed onset muscle soreness" (DOMS) verantwortlich. DOMS kann dabei durch eine verlängernde/exzentrische Kontraktion (lengthening contraction, LC) ausgelöst werden. Die intramuskuläre Injektion von anti-GDNF-Antikörpern 2 Tage nach exzentrischer Kontraktion hob DOMS teilweise, aber signifikant, auf. Die Hochregulation von GDNF war also an der Aufrechterhaltung von DOMS beteiligt (Mizumura & Taguchi, 2016; Murase et al., 2013).

Alvarez et al. beschrieb eine GDNF-dosisabhängige anhaltende mechanische Hyperalgesie in Ratten. Bei der Applikation von höheren Dosen von GDNF war eine länger anhaltende mechanische Hyperalgesie zu beobachten. Die niedrigste untersuchte Dosis (0,1 ng/20 µl) induzierte eine signifikante mechanische Hyperalgesie, welche 1 Woche anhielt. Die höchste Dosis (10 ng/ 20µl) induzierte eine Hyperalgesie, welche 3

Wochen anhielt. 10 Tage nachdem die Hyperalgesie nachließ, induzierte die Injektion von Prostaglandin E2 eine verlängerte mechanische Hyperalgesie (72 Stunden gegenüber 4 Stunden). Um zu bestimmen, ob IB4(+) Nozizeptoren, das Ziel von GDNF, einen Zusammenhang mit der GDNF-induzierten Muskelhyperalgesie haben, wurden Ratten intrathekal mit IB4-Saporin vorbehandelt. Hierdurch wurde die Population von IB4(+) Neuronen reduziert. Die selektive neurotoxische Destruktion von IB4(+) Nozizeptoren schwächte hierbei sowohl die GDNF-Hyperalgesie als auch das GDNF induzierte hyperalgesische Priming ab (Alvarez, Chen, Bogen, Green, & Levine, 2012).

Die Datenlage zur Rolle und den Mechanismen von Prostaglandin E2 und GDNF im cAMP crosstalk zu ERK ist nur sehr gering. Jedoch wird hier der Zusammenhang der Komponenten im Schmerzmodell deutlich.

5.2.2 Cicaprost

Der menschliche Prostacyclin-Rezeptor (hIP - human prostacyclin receptor) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), der zur Familie der Prostanoid-Rezeptoren gehört (Narumiya et al., 1999). Cicaprost ist ein oral aktives und metabolisch stabiles Analogon von Prostacyclin (Belch et al., 1993). In den Experimenten von Lo et al. konnte anhand von human erythroleukemie (HEL) Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige ERK-Phosphorylierung durch Cicaprost nachgewiesen werden. Die ausgewählten Cicaprostkonzentrationen lagen bei 0, 10, 30, 100, 300 und 1000 nM. Ein signifikanter Anstieg war ab 30 nM und das Maximum der pERK-Aktivität bei 100 nM zu beobachten. In der 45-minütigen Kinetik mit 100 nm Cicaprost zeigte sich, anders als in unseren Experimenten, bis zur Minute 45 eine anhaltende und stets ansteigende ERK-Phosphorylierung. Eine Verlängerung der Kinetik wäre interessant, um zu sehen, ob die anhaltende Phase auch über einen längeren Zeitraum bestehen bleibt oder ob ein Abfall der pERK-Aktivität zu beobachten wäre (Lo, Wise, & Wong, 2006).

Auch Chu et al. konnte in chinesischen Hamster Eierstockzellen, welche menschliche (hIP-Cho) oder Maus-Prostazyklin-Rezeptoren (mIP-CHO) exprimieren, eine zeitabhängige Aktivierung von ERK1 und ERK2 nachweisen. Wie auch in unseren Experimenten zu sehen, war der Klimax der ERK-Aktivierung in der frühen Phase zum 5-Minuten Zeitpunkt zu beobachten und blieb bis zu 30 Minuten lang erhöht. Dieser Effekt war jedoch nicht in menschlichen Neuroblastom-Zellen (SK-M-SH) oder

Ratten/Maus Neuroblastom-Gliom-Zellen (NG108-15) zu beobachten, welche endogene IP-Rezeptoren exprimieren (Chu, Chow, Wong, & Wise, 2004).

In 3.4 zeigten wir durch die Stimulation mit Cicaprost eine anhaltende Phase der pRII-Aktivität. Dabei zeigte sich das Maximum der pRII-Aktivität in der frühen Phase.

Fetalvero et al. untersuchte das Priming von menschlichen Myometrium Zellen durch Prostacycline. Hierbei handelt es sich zwar nicht um Nervenzellen, jedoch zeigte Fetalvero et al. ebenfalls eine transient erhöhte PKA-Aktivität mit einem Spitzenwert bei 20 Minuten und einer Abnahme ab der 60. Minute. Die untersuchten Zeitpunkte lagen bei 0, 20, 60 und 90. Zusätzlich konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung von PKA durch Cicaprost nachgewiesen werden (Fetalvero et al., 2008).

Lawler et al. demonstrierte anhand von HEK293-Zellen, dass der mIP einer Cicaprost-induzierten PKA-Phosphorylierung unterliegt. Hierbei wurde gezeigt, dass mIP^{S357A}, eine zielgerichtete Mutante des mIP, keiner Cicaprost-induzierten Phosphorylierung unterzieht, welche zeigte, dass Serin 357 der Zielrückstand für die PKA-abhängige Phosphorylierung ist (Lawler, Miggin, & Kinsella, 2018).

Durch die 24-stündige Prästimulation mit GDNF konnte eine deutliche Steigerung der frühen Phase ERK-Aktivierung mittels Cicaprost nachgewiesen werden (siehe 3.4. Abb. 4). Es konnte auch eine Steigerung der späten Phase nachgewiesen werden, welche jedoch nicht signifikant war. Die Auswirkung von Cicaprost im cAMP Crosstalk zu ERK ist in Verbindung mit GDNF in der Literatur jedoch bisher unerforscht.

5.2.3 Serotonin

Serotonin und Serotoninrezeptoren sind wichtig für die Regulierung vieler Gehirnfunktionen. Die Dysregulation des serotonergen Systems ist in die Pathogenese vieler psychiatrischer und neurologischer Störungen verwickelt.

Zusammen mit anderen proinflammatorischen Mediatoren (Prostaglandine, Histamin, Bradykinin, Milchsäure) ist Serotonin einer der aktiven Bestandteile, der zu verletzungs- oder entzündungs-induzierten Schmerzen beiträgt. Subkutane oder intravenöse Injektionen von 5-HT lösen Exzitation und Sensibilisierung der primären nozizeptiven afferenten Fasern (A δ und C-Fasern) aus und tragen so zur peripheren Sensibilisierung und Hyperalgesie bei (Sommer, 2004; Viguiet, Michot, Hamon, & Bourgoin, 2013). Die periphere, pronozizeptive Rolle von Serotonin ist in der Literatur gut erforscht. Die Wirkung auf der Ebene des Rückenmarks und der supraspinalen Strukturen sind dabei

sehr variabel und weiterhin Gegenstand der Forschung (Bardin, 2011; Bardin, Bardin, Lavarenne, & Eschalier, 1997; Kayser, Latrémolière, Hamon, & Bourgoin, 2011; Millan, 2002).

Die Aktivierung von ERK und PKA durch Serotonin ist in der Literatur weit vertreten (Barnes & Sharp, 1999; Crow et al., 2001; Eglén, Wong, Dumuis, & Bockaert, 1995; Grueb, Rohrbach, Schlote, & Mielke, 2012; Heine, Ponimaskin, Bickmeyer, & Richter, 2002; Huang & Kandel, 2007; S. L. Lin, Setya, Johnson-Farley, & Cowen, 2002; Müller & Carew, 1998; Svenningsson et al., 2002; Torres, Arfken, & Andrade, 1996; Watts, Yang, Banes, & Baez, 2001).

Norum et al. zeigte die Aktivierung von ERK-1 und 2 durch die Serotonin Rezeptoren 5-HT_{4(b)} und 5-HT_{4(a)} in HEK293-Zellen (Human embryonic kidney 293) (Norum, Hart, & Levy, 2003). Barthet et al. untersuchte, ob diese Aktivierung auch in Neuronen stattfindet. Eine 5-HT_{4R} induzierte Aktivierung von ERKs konnte in kultivierten Colliculi Neuronen von swiss mouse Embryos beobachtet werden, mit dem unerwarteten Befund, dass die Aktivierung ein überwiegend PKA-unabhängiges Ereignis war (Barthet et al., 2007). Dies spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wider (siehe 3.5 Abbildung 5). Der direkte Vergleich ist jedoch aufgrund eines deutlich unterschiedlichen Modells erschwert zu stellen. In Abwesenheit von GDNF ist in unseren Experimenten die 5-HT induzierte ERK Aktivierung auch ein PKA-unabhängiges Ereignis. Z. B. zeigte Lin et al. an Hippocampus Neuronen und PC12-Zellen, dass die ERK-Aktivierung von 5-HT₇-Rezeptoren durch einen Proteinkinase A unabhängigen Signalweg erfolgt, welcher Epac nutzen kann.

Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen von Yun et al. eine PKA-abhängige ERK-Phosphorylierung durch 5-HT an Gehirnen von Sprague-Dawley Ratten (Yun et al., 2007). Auch in den Experimenten von Norum et al. sowie Liu et al. konnte eine PKA-abhängige ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Liu et al., 2019; Norum et al., 2003).

In unseren Experimenten (siehe 3.5) konnte gezeigt werden, dass die späte Phase der pERK-Aktivierung durch die Inhibition der Phosphodiesterase verlängert wird. Auch war eine Verlängerung der pRII-Aktivität zu beobachten. Die Datenlage hierzu ist sehr gering. Isensee et al. konnte in männlichen Wistar Ratten auch durch Inhibition der Phosphodiesterase eine verlängerte Phase der pERK-Aktivierung und pRII-Aktivität nachweisen (Isensee et al., 2017).

In 3.7 konnten wir unter Abwesenheit von GDNF keine signifikante Verstärkung oder Abschwächung durch die Inhibition von PKC/Calcium nachweisen. In der Literatur zeigten die Experimente von Adayev et al. ebenso keine PKC-abhängige Aktivierung von ERK1/2 in Hippocampusneuronen von Maus HN2-5-Zellen beobachtet werden (Adayev, Ray, Sondhi, Sobocki, & Banerjee, 2003).

Im Gegensatz dazu zeigte Crow et al. eine PKC-abhängige ERK-Phosphorylierung durch 5-HT in der Nacktschneckenmuschel *Hermissenda* (Crow et al., 2001). Ebenso konnte Greene et al. in renalen Mesangium Zellen der Sprague Dawley Ratte eine PKC-abhängige ERK-Phosphorylierung nachweisen (Greene et al., 2000). Hutchinson et al. zeigte in der Spitzmaus *Cryptosia parva*, dass die durch 5-HT₃-Rezeptorstimulation evozierte ERK1/2-Aktivierung ein Calciumabhängiger Prozess ist. Hierbei ist ein extrazellulärer Ca²⁺ Einstrom durch L-Typ Calcium Kanäle notwendig (Hutchinson, Zhong, Chebolu, Wilson, & Darmani, 2015).

In 3.8 wurde die Rolle von MEK1/2 in der ERK1/2 Phosphorylierung durch die Aktivierung mit 5-HT untersucht. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen (10, 100, 1000 nM) von Selumetinib benutzt. In der frühen Phase der ERK-Aktivierung konnte bei der Höchstkonzentration von Selumetinib (1000 nM) eine MEK1/2-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Geringere Konzentrationen hatten keine signifikante Auswirkung. In der Literatur lassen sich ähnliche Ergebnisse finden. Crow et al. nutzte den MEK1-Inhibitor PD098059 oder U0126. Die Vorbehandlung mit dem MEK1-Inhibitor blockierte die durch Serotonin induzierte Phosphorylierung von ERK (Crow et al., 2001). Della Rocca et al. kam zu dem Ergebnis, dass die CAM-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den 5-HT_{1A}-Rezeptor eine Rolle in der Endozytose des Rezeptors spielt, welcher ein notwendiger Schritt für die Aktivierung von MEK und anschließend von ERK1/2 ist (Della Rocca et al., 1999).

In den Experimenten von 3.4 bis 3.8 konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Prästimulation mit GDNF und anschließender Serotonin Stimulation sowohl zu einer deutlichen Verstärkung der ERK-Aktivierung führt als auch eine anhaltende Phase der ERK-Aktivierung induziert. Unsere Experimente basierten auf einer Kinetik von 60 Minuten. Eine Verlängerung des Zeitintervalls wäre interessant, um zu sehen, wie lange die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung bestehen bleibt. Nach der Prästimulation mit GDNF konnten wir zeigen, dass die späte Phase der ERK-Aktivierung abhängig von PKA ist (siehe 3.5 Abb. 5). Die Hemmung der Phosphodiesterase (durch IBMX) und somit die Erhöhung der cAMP-Spiegel wirkten sich nicht signifikant auf die Steigerung der

anhaltenden Phase der ERK-Phosphorylierung aus. Bei einer zusätzlichen Hemmung von PKA (mit H89) erlosch der Effekt von IBMX nahezu vollständig (siehe 3.5 Abb. 5). Dies suggeriert, dass entweder das Aktionsfeld von cAMP durch die höhere Konzentration größer wird oder, dass durch GDNF PKA stärker in das Aktionsfeld wandert. Die G-Protein-gekoppelte Rezeptordesensibilisierung durch die Inhibition von GRK2/3 mit dem Wirkstoff Takeda konnte keine signifikante Veränderung der pERK-Intensität vermitteln (siehe 3.6 Abb. 6). Die Idee dieser Experimente war, dass eine mögliche Inhibition der GRK2/3-Rückkopplungsschleife zu einer Veränderung der GPCR Aktivierung zur Folge hat. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Wir nutzten in unseren Experimenten jedoch nur eine Konzentration von 10 μ M Takeda mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Um unsere Aussage zu bekräftigen, dass die pERK-Aktivierung durch GPCRs unabhängig von GRK2/3 sind, wären weitere Experimente mit höheren Konzentrationen und möglicher längerer Inkubationszeit nötig. Die Hemmung von PKC/Calcium mittels BIM und EGTA konnte eine signifikante Reduktion der pERK-Aktivität in der frühen Phase induzieren. Die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung war hiervon jedoch nicht signifikant betroffen (siehe 3.7 Abb. 7). Zuletzt untersuchten wir den Einfluss von MEK1/2 auf die GDNF-prästimulierten Zellen. Nur in der Höchstkonzentration von 1000 nM Selumetinib (MEK1/2-Inhibitor) konnte eine Abschwächung der ERK-Aktivierung beobachtet werden. Dabei war nur die frühe Phase der ERK-Aktivierung signifikant betroffen (siehe 3.8 Abb. 8). Zusammen mit den Ergebnissen aus 3.5 lässt sich schließen, dass PKA sich upstream von ERK befindet. Dies lässt sich auch mit der gegebenen Literatur vereinbaren (Briaud, Lingohr, Dickson, Wrede, & Rhodes, 2003; Hu & Gereau, 2003; Hu, Glauner, & Gereau, 2003; Pouysségur, Volmat, & Lenormand, 2002; Tronson et al., 2008). Wird MEK inhibiert, zeigen sich kaum Änderungen in der pRII-Aktivität (siehe 3.8 Abb. 8). Wird jedoch PKA inhibiert (siehe 3.5 Abb. 5), zeigt sich eine deutliche Abschwächung von ERK. Der Signalweg suggeriert, nur unidirektional zu fungieren.

Die Daten über GDNF und Serotonin im cAMP Crosstalk zu ERK sind in der Literatur nur spärlich erforscht. Eine enge Interaktion der Systeme lässt sich jedoch darstellen. Verschiedene Quellen zeigen, dass 5-HT zu einer GDNF-Freisetzung in C6-Gliomzellen der Ratte führt. Dabei korreliert die schnelle ERK-Phosphorylierung positiv mit der darauffolgenden GDNF-Freisetzung (Hisaoka et al., 2004; Hisaoka et al., 2007; Tsuchioka, Takebayashi, Hisaoka, Maeda, & Nakata, 2008).

Auch im Bereich der Forschung für Antidepressiva, wie z. B. die der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs), lässt sich die Verbindung zwischen GDNF und dem 5-HT-System darstellen. So haben mehrere Studien gezeigt, dass die GDNF-Expression und -Sekretion nach einmaliger oder chronischer Gabe von SSRIs sowohl in Zellkulturen als auch im Serum von Patienten mit Depressionen nach einer antidepressiven Therapie ansteigt (Golan, Schreiber, & Avissar, 2011; Hisaoka et al., 2001; Mercier et al., 2004; X. Zhang, Zhang, et al., 2008). Dass Depressionen und chronische Schmerzen zusammen hängen, ist gut erforscht (de Heer et al., 2014; IsHak et al., 2018; Robinson et al., 2009; Sheng, Liu, Wang, Cui, & Zhang, 2017; Von Korff & Simon, 1996). Die Schmerzsensibilisierungssignalwege auf zellulärer Ebene zu analysieren, ist jedoch weiterhin Forschungsgegenstand.

5.3 GDNF und der Epac-Aktivator 007

In den Experimenten von 3.9 und 3.10 untersuchten wir die Wirkung des Epac-Aktivators 8-CPT-2Me-cAMP (007).

Unsere Experimente zeigte eine zwei-phasige ERK1/2-Phosphorylierung durch die Stimulation mit 007. Der Klimax war in der frühen Phase der ERK-Aktivierung zu beobachten mit anschließendem Absinken auf ein anhaltendes Plateau (siehe 3.10 Abb. 11). Durch die Inhibition von PKA mit H89 konnte keine signifikante Reduktion der pERK-Aktivität beobachtet werden. Es kam also zu einer PKA-unabhängigen ERK-Aktivierung durch 007.

Fang et al. beschrieb die PKA-unabhängige ERK1/2-Phosphorylierung in Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) durch 007. Hier stieg die ERK1/2-Phosphorylierung nach 15 Minuten um das zweifache mit einer Rückkehr zum Basalniveau nach 30 Minuten (Fang & Olah, 2007). Keiper et al. beschrieb die ERK1/2-Aktivierung in HEK293-Zellen und N1E115-Neuroblastomzellen durch 007 (Keiper et al., 2004). In einer Studie von Chen et al. konnte die ERK1/2-Phosphorylierung durch 007 in MC4-Osteoblastenzelllinie beobachtet werden (Chen et al., 2004).

Im Gegensatz dazu beschrieb Wang et al., dass in der Tumorzelllinie AtT20 die Epac-vermittelte Aktivierung von Rap1 nicht an der ERK-Signalisierung beteiligt ist (Z. Wang et al., 2006). Enserink et al. kam zu vergleichbaren Ergebnissen wie Wang et al. Hierbei wurden CHO-Zellen, OVCAR3-Zellen, PC12-Zellen sowie HEK293T-Zellen untersucht (Enserink et al., 2002).

Daten von Obara et al zeigen, dass Rap1 und ERKs, bei einer Stimulation mit 007, durch einen PKA-abhängigen Mechanismus in PC12-Zellen aktiviert werden können (Obara, Labudda, Dillon, & Stork, 2004).

ESI-05 ist ein selektiver EPAC2 Inhibitor (Rehmann, 2013; Tsalkova et al., 2012). Hintergrund der Experimente in 3.9 war, dass wenn 007 den Crosstalk zu ERK durch etwas anderes als EPAC2 aktiviert, z. B. EPAC1 oder ein Off-Target, sollte keine Wirkung durch ESI-05 zu erwarten sein. Durch den Einsatz des Epac Inhibitors ESI-05 kam es jedoch zu einer deutlichen Reduktion der pERK-Aktivität (siehe 3.9). Es ist also anzunehmen, dass 007 den Crosstalk zu ERK über EPAC2 induziert. Schwede et al. beschreibt in seiner Studie, dass 007 ein effizienter Aktivator von Epac1, jedoch ein schwacher Aktivator für Epac2 ist (Schwede et al., 2015). Viele Studien nutzen jedoch 007, um EPAC2-vermittelte biologische Effekte zu untersuchen (Chepurny et al., 2009; Eliasson et al., 2003; Shibasaki et al., 2007; Woolfrey et al., 2009). In diesen Studien wurden jedoch deutlich höhere Konzentrationen von 007 genutzt. 007 könnte daher in der Lage sein, eine ausreichende EPAC2-Aktivierung zu induzieren, wenn es in hohen Konzentrationen angewendet wird.

Nach der Prästimulation mit GDNF kam es zu einer signifikanten Steigerung der pERK-Intensität durch 007 bis zur 30. Minute (siehe 3.9 Abb. 9 und 3.10 Abb. 11). Eine Steigerung in der pRII-Intensität konnte dabei nicht beobachtet werden (siehe 3.10 Abb. 11). ESI-05 konnte dabei sowohl in der frühen Phase, als auch in der späten Phase der ERK1/2-Phosphorylierung eine signifikante Reduktion bewirken. Durch H89 kam es nur in der späten Phase zu einer Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung (siehe 3.9 Abb. 9). Die Inhibition von GRK2/3 durch Takeda zeigte keine Veränderung der Kinetik. Dies betraf sowohl die GDNF prästimulierten, als auch die nicht GDNF prästimulierten Zellreihen (siehe 3.10 Abb. 11). Gründe für die veränderte Kinetik könnte z. B. eine veränderte Rezeptor-Liganden-Affinität sein. Möglich wäre aber auch eine veränderte Proteinexpression, welche zu einer verstärkten ERK1/2-Phosphorylierung führt.

In der Literatur gibt es aufgrund des gering ausgeprägten Forschungsstandes kaum vergleichbare Ergebnisse. In den Experimenten von Wan et al. konnte bei der Stimulation mit Neurturin, einem neurotrophischen Faktor der GDNF-family of ligands (Airaksinen & Saarma, 2002), und 8-CPT-2Me-cAMP keine anhaltende ERK1/2-Aktivierung nachweisen.

Wang et al. untersuchte das GDNF Priming an Mäusen. In männlichen, als auch in weiblichen Mäusen konnte, nach dem GDNF-Priming, eine deutliche Verlängerung der

Hyperalgesie Antwort auf eine intraplantare Injektion von PGE2 beobachtet werden. Die orale Gabe eines Epac Inhibitors ESI-09 (Singhmar et al., 2016) reduzierte die Dauer der PGE2-Hyperalgesie. Die Ergebnisse deuten auf eine Verlängerung der PGE2-Allodynie hin, welche mit der Aktivierung eines Epac-vermittelten Signalweges in Verbindung steht (H. J. Wang, Gu, Eijkelkamp, Heijnen, & Kavelaars, 2018). Ein Zusammenhang mit Epac und GDNF lässt sich im Schmerzmodell erahnen, jedoch sind weitere Experimente nötig um die Signalwege weiter zu erörtern.

5.4 GDNF führt ein Priming der Zellen herbei

In unseren Experimenten konnten wir nachweisen, dass GDNF ein Priming der Zellen herbeiführt. Die erste Form des hyperalgesischen Primings, welche als Priming vom Typ I bezeichnet wird, wird durch Gewebeschäden, Zytokine (Dina, Green, & Levine, 2008; Ferrari, Araldi, & Levine, 2015; Joseph & Levine, 2010) und Wachstumsfaktoren wie z. B. GDNF ausgelöst. Das Typ-I Priming hängt des Weiteren von Proteintranslation ab und ist auf Isolektin B4-positive Nozizeptoren beschränkt (Bogen, Alessandri-Haber, Chu, Gear, & Levine, 2012; Burton et al., 2017; Ferrari, Bogen, & Levine, 2014; Ferrari, Bogen, Reichling, & Levine, 2015; Melemedjian et al., 2010; Parada, Yeh, Reichling, & Levine, 2003; Vasko et al., 2014). Das Typ-II Priming kommt durch die wiederholte Opioid Exposition zu Stande (Araldi, Ferrari, & Levine, 2015; Dina et al., 2008; Melemedjian et al., 2014). Außerdem hängt das Typ-II Priming nicht von Proteintranslation ab. Im Gegensatz zum Typ-I Priming findet sich ersteres in IB4-negativen Nozizeptoren (Araldi et al., 2015; Araldi, Ferrari, & Levine, 2016).

In der experimentellen Reihe von 3.11 konnten wir veranschaulichen, dass nach einer 24-stündigen Präinkubation und anschließendem Auswaschen von GDNF die Wirkung des neurotrophischen Faktors erhalten blieb. Hier liegt es nahe, dass Vorgänge wie z. B. Proteinexpression für die anhaltende Wirkung von GDNF verantwortlich sind. Sowohl in der frühen als auch in der anhalten Phase der ERK-Aktivierung war eine deutliche Steigerung der pERK-Intensität zu beobachten. In pRII zeigte sich sowohl vor als auch nach dem Auswaschen von GDNF keine Veränderung durch die Stimulation mit Forskolin. Intrazelluläre Vorgänge wie z. B. Proteinexpression könnten in Gange gesetzt werden, welche zu bleibender Wirkung des neurotrophischen Faktors führen.

In 3.12 arbeiteten wir mit dem RET-Inhibitor XL-184. Eine Aktivierung von RET erfolgt, wenn die GDNF-family of ligand (GFLs) an den GDNF-family receptor- α (GFR α) bindet.

Zwar stehen die intrazellulären Ereignisse, wie z. B. Proliferation, Überleben, Neuritenwachstum und Differenzierung, nach einer GDNF-abhängigen RET-Aktivierung in starkem Zusammenhang, jedoch sind die spezifischen Signalwege noch wenig erforscht (Airaksinen et al., 1999; Kaplan & Miller, 1997; Takahashi, 2001). Es ist jedoch dabei zu beachten, dass auch eine RET-unabhängige Signalisierung von GDNF über GFR α Moleküle möglich ist (Airaksinen et al., 1999; Ibáñez, Paratcha, & Ledda, 2020; Poteryaev et al., 1999). Durch die auf Rezeptorebene erfolgte Inhibition von RET wurde nur die späte Phase der ERK-Aktivierung beeinflusst (siehe 3.12 Abb. 13). Die Effekte von GDNF blieben in der frühen Phase der ERK-Aktivierung erhalten. Dies suggeriert uns, dass die frühe Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von Priming und die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung das Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion ist.

Der derzeitige Wissensstand zu Experimenten, die unserem Untersuchungsmodell entsprechen ist sehr gering. Eine Publikation von Yang et al. untersuchte, wie GDNF den läsionsbedingten Tod von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn von embryonalen Sprague-Dawley Ratten verhindert (Embryonaler Tag 14). Hier wurde gezeigt, dass GDNF die Erregbarkeit von kultivierten Mittelhirnneuronen akut potenziert hat, indem es transiente A-Typ-K⁺-Kanäle gehemmt hat. Hierbei war der Effekt nach dem Auswaschen von GDNF jedoch komplett reversibel. Des Weiteren zeigte Yang et al., dass dieser Mechanismus durch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 vermittelt wird (Yang et al., 2001).

Nicole et al. zeigte an fetalen OF1 (Oncins France 1) Mäusen des 14. bis 16. Gestationstages, dass GDNF den apoptotischen neuronalen Tod von kortikalen Kulturen, hierunter Neurone und Astrozyten, nicht verhindert, sondern selektiv den langsam ausgelösten NMDA-Rezeptor-induzierten exzitotoxischen neuronalen Tod über eine direkte Wirkung auf kortikale Neurone abschwächt. Auch nach dem Auswaschen von GDNF blieb die NMDA-Rezeptorfunktion reduziert, was darauf hindeutet, dass die GDNF-Anwendung eine intrazelluläre Signalisierungsantwort auf die Modulation der NMDA-Rezeptorfunktion ausgelöst hat. Des Weiteren konnte Nicole et al. zeigen, dass eine Vorbehandlung mit GDNF den NMDA-induzierten Calciumeinstrom reduziert, welcher wahrscheinlich aus einer Verringerung der NMDA-Rezeptoraktivität und nicht aus einer verbesserten Puffer- oder Extrusionskapazität für Calcium resultiert. Auch konnte gezeigt werden, dass ein ERK-Aktivierungspfad für die GDNF-vermittelte Reduktion der NMDA-induzierten Kalziumantwort notwendig ist (Nicole et al., 2001).

Sajadi et al. untersuchte die vorübergehende und anhaltende Wirkung von GDNF in Ratten mit Morbus Parkinson. Hier kam es zum Einsatz von gentechnisch veränderten Zellen, welche eine direkte Zufuhr von GDNF ins Gehirn bewirkte.

Die Zellen befinden sich in einer Hohlfaser aus einer selektiv permeablen Polymermembran, die die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff nach innen und die Sekretion des trophischen Faktors nach außen ermöglicht (Kishima et al., 2004; Sautter et al., 1998). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Schwimmggeschwindigkeit durch die anhaltende und transiente GDNF-Abgabe. Die Experimente suggerieren, dass GDNF nur vorübergehend abgegeben werden muss, um eine verlängerte funktionelle Regenerationswirkung zu ermöglichen. Es ist jedoch nicht klar, ob eine transiente oder langfristige GDNF-Gabe erforderlich ist, um eine nachhaltige Symptomverbesserung beim Morbus Parkinson zu erreichen (Sajadi, Bensadoun, Schneider, Lo Bianco, & Aebischer, 2006).

In der Literatur wurde bereits von vielen Autoren beschrieben, dass GDNF IB4(+)-afferente Nozizeptor-Populationen sensibilisiert (Alvarez et al., 2012; Amaya et al., 2004; Bogen et al., 2008; Malin et al., 2006). Auch wird beschrieben, dass eine Stimulation mit PGE2 von GDNF-sensibilisierten Zellen zu einer transienten mechanischen Hyperalgesie sowie zu einer verlängerten Schmerzreaktion in Skelettmuskeln von Ratten führt (Alvarez et al., 2012; Hendrich, Alvarez, Chen, & Levine, 2012). Dabei beschrieben Joseph und Levine, dass das GDNF-induzierte Hyperalgesie-Priming auf die IB4(+)-Nozizeptoren beschränkt ist und vom PKC ϵ Signalweg abhängig ist (Joseph & Levine, 2010).

Wang et al. konnte das Hyperalgesie-Priming durch GDNF sowohl an männlichen als auch an weiblichen Mäusen aufzeigen. Eine intraplantare Injektion von GDNF hatte eine 12-tägige Hyperalgesie zur Folge. Am 14. Tag waren die Schmerzschwellen bei beiden Geschlechtern wieder auf der Grundlinie. Eine anschließende Injektion von PGE2 induzierte mechanische Hyperalgesie bei beiden Geschlechtern, die mehr als 72 Stunden anhielt. Dies war signifikant länger als bei der Kontrollgruppe, dessen Hyperalgesie nach 8 Stunden abzunehmen begann und innerhalb von 24 Stunden vollständig abklang (H. J. Wang et al., 2018). Das Phänomen des Primings durch GDNF wurde, wie man sehen kann, in der Literatur sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt. Welche genauen zellulären Mechanismen dazu beitragen, ist jedoch noch unvollständig gelöst.

5.5 Ausblick

Diese Arbeit verwendete die Untersuchungsmethode der HCS-Mikroskopie. Als einer der ersten Laboratorien wurde sie von der AG Hucho genutzt und ständig weiterentwickelt sowie optimiert. Sie ermöglicht sowohl quantitative als auch qualitative Ergebnisse. Es ist eine sehr sensitive Untersuchungsmethode, welche die Forschung an vielen Zellen ermöglicht. So konnten über 15.000 Neurone eines Tieres untersucht werden. Durch die große Anzahl an Neuronen pro Tier ist dementsprechend eine deutliche Reduktion der Tierzahl möglich. Im Gegensatz zur manuellen Fluoreszenzmikroskopie wird jede einzelne Zelle durch den Untersucher analysiert. Es ist eine sehr zeitaufwändige Arbeit, welche zusätzlich den subjektiven Aspekt mit in die Forschung bringt. Die Forschung von GDNF im cAMP-Crosstalk zu ERK ist eine sehr spezifische Forschungsfrage. Die Datenlage ist daher bisher kaum ausgeprägt. Vergleiche mit anderen Autoren waren infolgedessen sehr schwierig. Diese Arbeit bietet jedoch dementsprechend einen Ansatzpunkt für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

Unsere Forschung beinhaltete keine in vivo Experimente an Ratten. Es wäre interessant zu sehen, inwiefern sich unsere Ergebnisse des hyperalgesischen Primings mit in vivo Experimenten überschneiden oder unterscheiden. Des Weiteren ist GDNF ein sehr interessanter Wachstumsfaktor für die Schmerz-, die neurologische und die Tumorforschung. Bis heute konnte jedoch noch kein Einsatz in der Behandlung von Krankheiten wie z. B. Morbus Parkinson etabliert werden. Ob GDNF jemals ein Ansatzpunkt in der Klinik zur Behandlung von chronischen Schmerzen, Krebserkrankungen oder neurologischen Erkrankungen wird, verbleibt vorerst unklar.

6 Literaturverzeichnis

- Adayev, T., Ray, I., Sondhi, R., Sobocki, T., & Banerjee, P. (2003). The G protein-coupled 5-HT_{1A} receptor causes suppression of caspase-3 through MAPK and protein kinase Calpha. *Biochim Biophys Acta*, *1640*(1), 85-96. doi:10.1016/s0167-4889(03)00023-5
- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, *3*(5), 383-394. doi:10.1038/nrn812
- Airaksinen, M. S., Titievsky, A., & Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci*, *13*(5), 313-325. doi:10.1006/mcne.1999.0754
- Alasbahi, R. H., & Melzig, M. F. (2012). Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Pharmazie*, *67*(1), 5-13.
- Albers, K. M., Woodbury, C. J., Ritter, A. M., Davis, B. M., & Koerber, H. R. (2006). Glial cell-line-derived neurotrophic factor expression in skin alters the mechanical sensitivity of cutaneous nociceptors. *J Neurosci*, *26*(11), 2981-2990. doi:10.1523/jneurosci.4863-05.2006
- Aley, K. O., & Levine, J. D. (1999). Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*, *19*(6), 2181-2186.
- Aley, K. O., Martin, A., McMahon, T., Mok, J., Levine, J. D., & Messing, R. O. (2001). Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*, *21*(17), 6933-6939.
- Alvarez, P., Chen, X., Bogen, O., Green, P. G., & Levine, J. D. (2012). IB₄(+) nociceptors mediate persistent muscle pain induced by GDNF. *J Neurophysiol*, *108*(9), 2545-2553. doi:10.1152/jn.00576.2012
- Amaya, F., Shimosato, G., Nagano, M., Ueda, M., Hashimoto, S., Tanaka, Y., . . . Tanaka, M. (2004). NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*, *20*(9), 2303-2310. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03701.x
- Andres, C., Meyer, S., Dina, O. A., Levine, J. D., & Hucho, T. (2010). Quantitative automated microscopy (QuAM) elucidates growth factor specific signalling in pain sensitization. *Mol Pain*, *6*, 98. doi:10.1186/1744-8069-6-98
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., & Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, *9*(4), 463-484. doi:10.1016/j.ejpain.2004.11.001
- Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2015). Repeated Mu-Opioid Exposure Induces a Novel Form of the Hyperalgesic Priming Model for Transition to Chronic Pain. *J Neurosci*, *35*(36), 12502-12517. doi:10.1523/jneurosci.1673-15.2015
- Araldi, D., Ferrari, L. F., & Levine, J. D. (2016). Adenosine-A1 receptor agonist induced hyperalgesic priming type II. *Pain*, *157*(3), 698-709. doi:10.1097/j.pain.0000000000000421
- Arenas, E., Trupp, M., Akerud, P., & Ibanez, C. F. (1995). GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*, *15*(6), 1465-1473.
- Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., Jr., & Milbrandt, J. (2000). The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*, *10*(1), 103-110.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol*, *22*(5-6), 390-404. doi:10.1097/FBP.0b013e328349aae4

- Bardin, L., Bardin, M., Lavarenne, J., & Eschalier, A. (1997). Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp Brain Res*, *113*(1), 81-87. doi:10.1007/bf02454144
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, *38*(8), 1083-1152. doi:10.1016/s0028-3908(99)00010-6
- Barthet, G., Framery, B., Gaven, F., Pellissier, L., Reiter, E., Claeysen, S., . . . Dumuis, A. (2007). 5-hydroxytryptamine 4 receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on Src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 1979-1991. doi:10.1091/mbc.e06-12-1080
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
- Beck, K. D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R. A., . . . Hefti, F. (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, *373*(6512), 339-341. doi:10.1038/373339a0
- Belch, J. J., McLaren, M., Lau, C. S., Mackay, I. R., Bancroft, A., McEwen, J., & Thompson, J. M. (1993). Cicaprost, an orally active prostacyclin analogue: its effects on platelet aggregation and skin blood flow in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, *35*(6), 643-647. doi:10.1111/j.1365-2125.1993.tb04195.x
- Berger, M. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *60*, 355-366. doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S., & Gereau, R. W. t. (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, *35*(4), 721-731.
- Bjarnadottir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schioth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, *88*(3), 263-273. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.001
- Boettcher, A. J., Wu, J., Kim, C., Yang, J., Bruystens, J., Cheung, N., . . . Taylor, S. S. (2011). Realizing the allosteric potential of the tetrameric protein kinase A R1 α holoenzyme. *Structure*, *19*(2), 265-276. doi:10.1016/j.str.2010.12.005
- Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Chu, C., Gear, R. W., & Levine, J. D. (2012). Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKC ϵ activation of CPEB. *J Neurosci*, *32*(6), 2018-2026. doi:10.1523/jneurosci.5138-11.2012
- Bogen, O., Joseph, E. K., Chen, X., & Levine, J. D. (2008). GDNF hyperalgesia is mediated by PLC γ , MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. *Eur J Neurosci*, *28*(1), 12-19. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06308.x
- Boscia, F., Esposito, C. L., Di Crisci, A., de Franciscis, V., Annunziato, L., & Cerchia, L. (2009). GDNF selectively induces microglial activation and neuronal survival in CA1/CA3 hippocampal regions exposed to NMDA insult through Ret/ERK signalling. *PLoS One*, *4*(8), e6486. doi:10.1371/journal.pone.0006486
- Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., & Cobb, M. H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, *249*(4964), 64-67.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*, *10*(4), 287-333. doi:10.1016/j.ejpain.2005.06.009

- Briaud, I., Lingohr, M. K., Dickson, L. M., Wrede, C. E., & Rhodes, C. J. (2003). Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, *52*(4), 974-983. doi:10.2337/diabetes.52.4.974
- Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., & Davies, A. M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*, *15*(4), 821-828.
- Burton, M. D., Tillu, D. V., Mazhar, K., Mejia, G. L., Asiedu, M. N., Inyang, K., . . . Price, T. J. (2017). Pharmacological activation of AMPK inhibits incision-evoked mechanical hypersensitivity and the development of hyperalgesic priming in mice. *Neuroscience*, *359*, 119-129. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.020
- Cadd, G., & McKnight, G. S. (1989). Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron*, *3*(1), 71-79.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, *75*(1), 50-83. doi:10.1128/membr.00031-10
- Chen, C., Koh, A. J., Datta, N. S., Zhang, J., Keller, E. T., Xiao, G., . . . McCauley, L. K. (2004). Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J Biol Chem*, *279*(28), 29121-29129. doi:10.1074/jbc.M313000200
- Chepurny, O. G., Leech, C. A., Kelley, G. G., Dzhura, I., Dzhura, E., Li, X., . . . Holz, G. G. (2009). Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *J Biol Chem*, *284*(16), 10728-10736. doi:10.1074/jbc.M900166200
- Cho, W., & Choe, J. (2020). Prostaglandin E2 stimulates COX-2 expression via mitogen-activated protein kinase p38 but not ERK in human follicular dendritic cell-like cells. *BMC Immunol*, *21*(1), 20. doi:10.1186/s12865-020-00347-y
- Chu, K. M., Chow, K. B., Wong, Y. H., & Wise, H. (2004). Prostacyclin receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Cell Signal*, *16*(4), 477-486. doi:10.1016/j.cellsig.2003.09.004
- Coulombe, P., & Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(8), 1376-1387. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.001
- Crow, T., Xue-Bian, J. J., Siddiqi, V., & Neary, J. T. (2001). Serotonin activation of the ERK pathway in Hermisenda: contribution of calcium-dependent protein kinase C. *J Neurochem*, *78*(2), 358-364. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00404.x
- Dahle, M. K., Myhre, A. E., Aasen, A. O., & Wang, J. E. (2005). Effects of forskolin on Kupffer cell production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha differ from those of endogenous adenylyl cyclase activators: possible role for adenylyl cyclase 9. *Infect Immun*, *73*(11), 7290-7296. doi:10.1128/iai.73.11.7290-7296.2005
- De Cesare, D., & Sassone-Corsi, P. (2000). Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, *64*, 343-369.
- de Heer, E. W., Gerrits, M. M., Beekman, A. T., Dekker, J., van Marwijk, H. W., de Waal, M. W., . . . van der Feltz-Cornelis, C. M. (2014). The association of depression and anxiety with pain: a study from NESDA. *PLoS One*, *9*(10), e106907. doi:10.1371/journal.pone.0106907
- Defer, N., Best-Belpomme, M., & Hanoune, J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol*, *279*(3), F400-416. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.3.F400

- Delghandi, M. P., Johannessen, M., & Moens, U. (2005). The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal*, *17*(11), 1343-1351. doi:10.1016/j.cellsig.2005.02.003
- Della Rocca, G. J., Mukhin, Y. V., Garnovskaya, M. N., Daaka, Y., Clark, G. J., Luttrell, L. M., . . . Raymond, J. R. (1999). Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. *J Biol Chem*, *274*(8), 4749-4753. doi:10.1074/jbc.274.8.4749
- Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Neurotrophins, endocannabinoids and thermo-transient receptor potential: a threesome in pain signalling. *Eur J Neurosci*, *39*(3), 353-362. doi:10.1111/ejn.12455
- Dina, O. A., Green, P. G., & Levine, J. D. (2008). Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*, *152*(2), 521-525. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.006
- Domenichiello, A. F., Wilhite, B. C., Keyes, G. S., & Ramsden, C. E. (2017). A dose response study of the effect of prostaglandin E₂ on thermal nociceptive sensitivity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *126*, 20-24. doi:10.1016/j.plefa.2017.08.015
- Dymond, A. W., Elks, C., Martin, P., Carlile, D. J., Mariani, G., Lovick, S., . . . So, K. (2017). Pharmacokinetics and pharmacogenetics of the MEK1/2 inhibitor, selumetinib, in Asian and Western healthy subjects: a pooled analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, *73*(6), 717-726. doi:10.1007/s00228-017-2217-3
- Eglen, R. M., Wong, E. H., Dumuis, A., & Bockaert, J. (1995). Central 5-HT₄ receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *16*(11), 391-398. doi:10.1016/s0165-6147(00)89081-1
- Eliasson, L., Ma, X., Renström, E., Barg, S., Berggren, P. O., Galvanovskis, J., . . . Rorsman, P. (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol*, *121*(3), 181-197. doi:10.1085/jgp.20028707
- Emery, E. C., Young, G. T., Berrocoso, E. M., Chen, L., & McNaughton, P. A. (2011). HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science*, *333*(6048), 1462-1466. doi:10.1126/science.1206243
- England, S., Bevan, S., & Docherty, R. J. (1996). PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol*, *495* (Pt 2)(Pt 2), 429-440.
- Enserink, J. M., Christensen, A. E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H. G., . . . Bos, J. L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*, *4*(11), 901-906. doi:10.1038/ncb874
- Fang, Y., & Olah, M. E. (2007). Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1). *J Pharmacol Exp Ther*, *322*(3), 1189-1200. doi:10.1124/jpet.107.119933
- Ferrari, L. F., Araldi, D., & Levine, J. D. (2015). Distinct terminal and cell body mechanisms in the nociceptor mediate hyperalgesic priming. *J Neurosci*, *35*(15), 6107-6116. doi:10.1523/jneurosci.5085-14.2015
- Ferrari, L. F., Bogen, O., & Levine, J. D. (2014). Second messengers mediating the expression of neuroplasticity in a model of chronic pain in the rat. *J Pain*, *15*(3), 312-320. doi:10.1016/j.jpain.2013.12.005

- Ferrari, L. F., Bogen, O., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2015). Accounting for the delay in the transition from acute to chronic pain: axonal and nuclear mechanisms. *J Neurosci*, *35*(2), 495-507. doi:10.1523/jneurosci.5147-13.2015
- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., & De Campos, D. I. (1990). Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, *42*(3), 365-371.
- Fetalvero, K. M., Zhang, P., Shyu, M., Young, B. T., Hwa, J., Young, R. C., & Martin, K. A. (2008). Prostacyclin primes pregnant human myometrium for an enhanced contractile response in parturition. *J Clin Invest*, *118*(12), 3966-3979. doi:10.1172/jci33800
- Fitzgerald, E. M., Okuse, K., Wood, J. N., Dolphin, A. C., & Moss, S. J. (1999). cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol*, *516* (Pt 2), 433-446.
- Frodin, M., Peraldi, P., & Van Obberghen, E. (1994). Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem*, *269*(8), 6207-6214.
- Galan, A., Cervero, F., & Laird, J. M. (2003). Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. *Brain Res Mol Brain Res*, *116*(1-2), 126-134.
- Galan, A., Lopez-Garcia, J. A., Cervero, F., & Laird, J. M. (2002). Activation of spinal extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. *Neurosci Lett*, *322*(1), 37-40.
- Garza Carbajal, A., Ebersberger, A., Thiel, A., Ferrari, L., Acuna, J., Brosig, S., . . . Hucho, T. (2020). Oncostatin M induces hyperalgesic priming and amplifies signaling of cAMP to ERK by RapGEF2 and PKA. *J Neurochem*. doi:10.1111/jnc.15172
- Gash, D. M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W. A., Yi, A., Simmerman, L., . . . Gerhardt, G. A. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, *380*(6571), 252-255. doi:10.1038/380252a0
- Goetz, C. G., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stebbins, G. T., . . . LaPelle, N. (2007). Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord*, *22*(1), 41-47. doi:10.1002/mds.21198
- Golan, M., Schreiber, G., & Avissar, S. (2011). Antidepressants elevate GDNF expression and release from C₆ glioma cells in a β -arrestin1-dependent, CREB interactive pathway. *Int J Neuropsychopharmacol*, *14*(10), 1289-1300. doi:10.1017/s1461145710001550
- Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, *11*, 770. doi:10.1186/1471-2458-11-770
- Granholt, A. C., Srivastava, N., Mott, J. L., Henry, S., Henry, M., Westphal, H., . . . Hoffer, B. J. (1997). Morphological alterations in the peripheral and central nervous systems of mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): immunohistochemical studies. *J Neurosci*, *17*(3), 1168-1178.
- Greene, E. L., Houghton, O., Collinsworth, G., Garnovskaya, M. N., Nagai, T., Sajjad, T., . . . Raymond, J. R. (2000). 5-HT_{2A} receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, *278*(4), F650-658. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.4.F650
- Grueb, M., Rohrbach, J. M., Schlote, T., & Mielke, J. (2012). Serotonin (5-HT₇) receptor-stimulated activation of cAMP-PKA pathway in bovine corneal epithelial and endothelial cells. *Ophthalmic Res*, *48*(1), 22-27. doi:10.1159/000334912
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol*, *10*, 125. doi:10.3389/fphar.2019.00125

- Hacker, B. M., Tomlinson, J. E., Wayman, G. A., Sultana, R., Chan, G., Villacres, E., . . . Storm, D. R. (1998). Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics*, *50*(1), 97-104. doi:10.1006/geno.1998.5293
- Hardacker, D. M., & Tolley, J. A. (2004). Postoperative neuraxial pain relief in the pediatric patient. *Semin Pediatr Surg*, *13*(3), 203-209. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S1055858604000411/1-s2.0-S1055858604000411-main.pdf?tid=07b23ef2-8b2d-4431-8423-f9b9987d536f&acdnat=1538643670_456607535c1206d084a60a50e816c77f
- Hasegawa, K., Namekawa, S. H., & Saga, Y. (2013). MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells. *Stem Cells*, *31*(11), 2517-2527. doi:10.1002/stem.1486
- Hauck, S. M., Kinkl, N., Deeg, C. A., Swiatek-de Lange, M., Schöffmann, S., & Ueffing, M. (2006). GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Mol Cell Biol*, *26*(7), 2746-2757. doi:10.1128/mcb.26.7.2746-2757.2006
- Hearn, C. J., Murphy, M., & Newgreen, D. (1998). GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol*, *197*(1), 93-105. doi:10.1006/dbio.1998.8876
- Heine, M., Ponimaskin, E., Bickmeyer, U., & Richter, D. W. (2002). 5-HT-receptor-induced changes of the intracellular cAMP level monitored by a hyperpolarization-activated cation channel. *Pflugers Arch*, *443*(3), 418-426. doi:10.1007/s004240100690
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., . . . et al. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, *266*(5187), 1062-1064.
- Hendrich, J., Alvarez, P., Chen, X., & Levine, J. D. (2012). GDNF induces mechanical hyperalgesia in muscle by reducing I(BK) in isolectin B4-positive nociceptors. *Neuroscience*, *219*, 204-213. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.06.011
- Heuckeroth, R. O., Lampe, P. A., Johnson, E. M., & Milbrandt, J. (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol*, *200*(1), 116-129. doi:10.1006/dbio.1998.8955
- Hidaka, H., Hagiwara, M., & Chijiwa, T. (1990). Molecular pharmacology of protein kinases. *Neurochem Res*, *15*(4), 431-434.
- Hisaoka, K., Nishida, A., Koda, T., Miyata, M., Zensho, H., Morinobu, S., . . . Yamawaki, S. (2001). Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. *J Neurochem*, *79*(1), 25-34. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00531.x
- Hisaoka, K., Nishida, A., Takebayashi, M., Koda, T., Yamawaki, S., & Nakata, Y. (2004). Serotonin increases glial cell line-derived neurotrophic factor release in rat C6 glioblastoma cells. *Brain Res*, *1002*(1-2), 167-170. doi:10.1016/j.brainres.2004.01.009
- Hisaoka, K., Takebayashi, M., Tsuchioka, M., Maeda, N., Nakata, Y., & Yamawaki, S. (2007). Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor production through monoamine-independent activation of protein tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase in glial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, *321*(1), 148-157. doi:10.1124/jpet.106.116558
- Hoffer, B. J., Hoffman, A., Bowenkamp, K., Huettl, P., Hudson, J., Martin, D., . . . Gerhardt, G. A. (1994). Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett*, *182*(1), 107-111.

- Hu, H. J., & Gereau, R. W. t. (2003). ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. Modulation of neuronal excitability. *J Neurophysiol*, *90*(3), 1680-1688. doi:10.1152/jn.00341.2003
- Hu, H. J., Glauner, K. S., & Gereau, R. W. t. (2003). ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents. *J Neurophysiol*, *90*(3), 1671-1679. doi:10.1152/jn.00340.2003
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (2007). 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J Neurosci*, *27*(12), 3111-3119. doi:10.1523/jneurosci.3908-06.2007
- Hube, F., Lee, Y. M., Rohrig, K., & Hauner, H. (1999). The phosphodiesterase inhibitor IBMX suppresses TNF-alpha expression in human adipocyte precursor cells: a possible explanation for its adipogenic effect. *Horm Metab Res*, *31*(6), 359-362. doi:10.1055/s-2007-978754
- Hucho, T., & Levine, J. D. (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*, *55*(3), 365-376. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.008
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., & Messing, R. O. (1995). Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem*, *270*(50), 30134-30140.
- Hutchinson, T. E., Zhong, W., Chebolu, S., Wilson, S. M., & Darmani, N. A. (2015). L-type calcium channels contribute to 5-HT₃-receptor-evoked CaMKII α and ERK activation and induction of emesis in the least shrew (*Cryptotis parva*). *Eur J Pharmacol*, *755*, 110-118. doi:10.1016/j.ejphar.2015.02.042
- Ibáñez, C. F., Paratcha, G., & Ledda, F. (2020). RET-independent signaling by GDNF ligands and GFR α receptors. *Cell Tissue Res*, *382*(1), 71-82. doi:10.1007/s00441-020-03261-2
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., . . . Storm, D. R. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, *21*(4), 869-883. doi:10.1016/s0896-6273(00)80602-9
- Inoue, A., Iwasa, M., Nishikura, Y., Ogawa, S., Nakasuka, A., & Nakata, Y. (2006). The long-term exposure of rat cultured dorsal root ganglion cells to bradykinin induced the release of prostaglandin E₂ by the activation of cyclooxygenase-2. *Neurosci Lett*, *401*(3), 242-247. doi:10.1016/j.neulet.2006.03.026
- Isensee, J., Diskar, M., Waldherr, S., Buschow, R., Hasenauer, J., Prinz, A., . . . Hucho, T. (2014). Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. *J Cell Sci*, *127*(Pt 1), 216-229. doi:10.1242/jcs.136580
- Isensee, J., Diskar, M., Waldherr, S., Buschow, R., Hasenauer, J., Prinz, A., . . . Hucho, T. (2014). Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. *J Cell Sci*, *127*(Pt 1), 216-229. doi:10.1242/jcs.136580
- Isensee, J., Kaufholz, M., Knape, M. J., Hasenauer, J., Hammerich, H., Gonczarowska-Jorge, H., . . . Hucho, T. (2018). PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination. *J Cell Biol*, *217*(6), 2167-2184. doi:10.1083/jcb.201708053

- Isensee, J., Schild, C., Schwede, F., & Hucho, T. (2017). Crosstalk from cAMP to ERK1/2 emerges during postnatal maturation of nociceptive neurons and is maintained during aging. *J Cell Sci*, *130*(13), 2134-2146. doi:10.1242/jcs.197327
- Isensee, J., Wenzel, C., Buschow, R., Weissmann, R., Kuss, A. W., & Hucho, T. (2014). Subgroup-elimination transcriptomics identifies signaling proteins that define subclasses of TRPV1-positive neurons and a novel paracrine circuit. *PLoS One*, *9*(12), e115731. doi:10.1371/journal.pone.0115731
- IsHak, W. W., Wen, R. Y., Naghdechi, L., Vanle, B., Dang, J., Knosp, M., . . . Louy, C. (2018). Pain and Depression: A Systematic Review. *Harv Rev Psychiatry*, *26*(6), 352-363. doi:10.1097/hrp.0000000000000198
- Jeong, D. G., Park, W. K., & Park, S. (2008). Artemin activates axonal growth via SFK and ERK-dependent signalling pathways in mature dorsal root ganglia neurons. *Cell Biochem Funct*, *26*(2), 210-220. doi:10.1002/cbf.1436
- Jeske, N. A., Diogenes, A., Ruparel, N. B., Fehrenbacher, J. C., Henry, M., Akopian, A. N., & Hargreaves, K. M. (2008). A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. *Pain*, *138*(3), 604-616. doi:10.1016/j.pain.2008.02.022
- Ji, R. R., Baba, H., Brenner, G. J., & Woolf, C. J. (1999). Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*, *2*(12), 1114-1119. doi:10.1038/16040
- Ji, R. R., Gereau, R. W. t., Malcangio, M., & Strichartz, G. R. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*, *60*(1), 135-148. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.011
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., & Woolf, C. J. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, *26*(12), 696-705. doi:10.1016/j.tins.2003.09.017
- Ji, R. R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., & Maixner, W. (2018). Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*, *129*(2), 343-366. doi:10.1097/aln.0000000000002130
- Jin, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Yang, B., & Wang, W. H. (2007). PGE2 inhibits apical K channels in the CCD through activation of the MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, *293*(4), F1299-1307. doi:10.1152/ajprenal.00293.2007
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., . . . Fox, G. M. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, *85*(7), 1113-1124.
- Joseph, E. K., & Levine, J. D. (2010). Hyperalgesic priming is restricted to isolectin B4-positive nociceptors. *Neuroscience*, *169*(1), 431-435. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.082
- Kang, S. S., Li, T., Xu, D., Reinach, P. S., & Lu, L. (2000). Inhibitory effect of PGE2 on EGF-induced MAP kinase activity and rabbit corneal epithelial proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*(8), 2164-2169. Retrieved from <https://watermark.silverchair.com/7g070002164.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW Ercy7Dm3ZL 9Cf3qfKAc485ysgAAAjMwggIvBgkqhkiG9w0BBwaggIgMIICHAIBADCCAhUGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQM09ZaXY Z13s49XmrBAGeQgIIB5sTA BYJJKrA TyaPNWrKRLsEHmk8EGEFAGdr0Kwbjs0Fl AhZZGllfV30BzA-1aZ65pX6hhN4CpTzx6uPp8W4kI 0bGFQwD2GscQP95SlwV4QaDr0z2Bsl0DGi8qCvElyPYBh0lVbwbD pfG2utIDgBSx6TU4epC-HaEfTby09rFosZBANytmqtgrhi-4vchWsqWjINvTh-DsF2qvX0xgfp74niuHGK5-VIB8myOlKYbr4ecUxdtT-lkkCtxzpBvyloz-ifjLl oXut OdMt8FK3CFv57APCMA8hryxlvZhJgiZDVpLuWoCgflDb->

8epiPEpjXJ0ej0S0WPzgArFFLb97mvifj6o3F6QiKVMzERzx5H05KfjL5kBvftKzMVc
VnW_cLfrBmxTzDApaFlv5F7_440TOyzUwyCYyt_CUKIRwoLNgQS6sbM4o_eLx-r-
ErunhtAEX2_d6C4oYID7wCTWka6JGQP01KUVcYcWpNu5Q8BZoBzell0V1Kx1vQ
Pb64msi1qgwzWzCyil-EAX56BRx0fHo_F7w1EAp01oqHqEQBa-
S5l1f9nLC6QvPdN7rRwMQCuDdkpiOfiBzYlfxLkmRBrYQ60UmkiXl28IFbr9dVkX
N62KPCmLajuk3wco1iGknSFA

- Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2), 213-221. doi:10.1016/s0955-0674(97)80065-8
- Karim, F., Wang, C. C., & Gereau, R. W. t. (2001). Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci*, 21(11), 3771-3779.
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 517-531. doi:10.1038/nrm2438
- Kayser, V., Latrémolière, A., Hamon, M., & Bourgoin, S. (2011). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulations of the anti-allodynic effects of 5-HT1B/1D receptor stimulation in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur J Pain*, 15(5), 451-458. doi:10.1016/j.ejpain.2010.09.012
- Kearns, C. M., & Gash, D. M. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res*, 672(1-2), 104-111.
- Keiper, M., Stope, M. B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., Vom Dorp, F., . . . Schmidt, M. (2004). Epac- and Ca²⁺-controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279(45), 46497-46508. doi:10.1074/jbc.M403604200
- Kelly, D. J., Ahmad, M., & Brull, S. J. (2001). Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. *Can J Anaesth*, 48(10), 1000-1010. doi:10.1007/bf03016591
- Kim, C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., & Taylor, S. S. (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*, 130(6), 1032-1043. doi:10.1016/j.cell.2007.07.018
- Kishima, H., Poyot, T., Bloch, J., Dauguet, J., Conde, F., Dolle, F., . . . Hantraye, P. (2004). Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis*, 16(2), 428-439. doi:10.1016/j.nbd.2004.03.012
- Kress, M., Rodl, J., & Reeh, P. W. (1996). Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro. *Neuroscience*, 74(2), 609-617.
- Krysan, K., Reckamp, K. L., Dalwadi, H., Sharma, S., Rozengurt, E., Dohadwala, M., & Dubinett, S. M. (2005). Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. *Cancer Res*, 65(14), 6275-6281. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-0216
- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., . . . Traub, M. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 59(3), 459-466. doi:10.1002/ana.20737
- Lawler, O. A., Miggin, S. M., & Kinsella, B. T. (2018). Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem*, 293(28), 11046. doi:10.1074/jbc.AAC118.004491

- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, *308*(5721), 512-517. doi:10.1126/science.1109237
- Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., & Sweatt, J. D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*, *279*(39), 40545-40559. doi:10.1074/jbc.M402229200
- Li, L., Wu, W., Lin, L. F., Lei, M., Oppenheim, R. W., & Houenou, L. J. (1995). Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(21), 9771-9775.
- Li, W. P., Ma, K., Jiang, X. Y., Yang, R., Lu, P. H., Nie, B. M., & Lu, Y. (2018). Molecular mechanism of panaxydol on promoting axonal growth in PC12 cells. *Neural Regen Res*, *13*(11), 1927-1936. doi:10.4103/1673-5374.239439
- Li, Y., Dillon, T. J., Takahashi, M., Earley, K. T., & Stork, P. J. (2016). Protein Kinase A-independent Ras Protein Activation Cooperates with Rap1 Protein to Mediate Activation of the Extracellular Signal-regulated Kinases (ERK) by cAMP. *J Biol Chem*, *291*(41), 21584-21595. doi:10.1074/jbc.M116.730978
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, *260*(5111), 1130-1132.
- Lin, S. L., Setya, S., Johnson-Farley, N. N., & Cowen, D. S. (2002). Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol*, *136*(7), 1072-1078. doi:10.1038/sj.bjp.0704809
- Lindahl, M., Poteryaev, D., Yu, L., Arumae, U., Timmusk, T., Bongarzone, I., . . . Saarma, M. (2001). Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem*, *276*(12), 9344-9351. doi:10.1074/jbc.M008279200
- Liu, P., Yin, Y. L., Wang, T., Hou, L., Wang, X. X., Wang, M., . . . Jiang, Y. (2019). Ligand-induced activation of ERK1/2 signaling by constitutively active G(s)-coupled 5-HT receptors. *Acta Pharmacol Sin*, *40*(9), 1157-1167. doi:10.1038/s41401-018-0204-6
- Lo, R. K., Wise, H., & Wong, Y. H. (2006). Prostacyclin receptor induces STAT1 and STAT3 phosphorylations in human erythroleukemia cells: a mechanism requiring PTX-insensitive G proteins, ERK and JNK. *Cell Signal*, *18*(3), 307-317. doi:10.1016/j.cellsig.2005.05.001
- Loeser, J. D., Lars Arendt-Nielsen, D., Ralf Baron, G., Allan Basbaum, U., Michael Bond, U., Harald Breivik, N., . . . Alain Woda, F. (1979 to 1994). Retrieved from [http://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/Publications2/ClassificationofChronicPain/Part III-PainTerms.pdf](http://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/Publications2/ClassificationofChronicPain/PartIII-PainTerms.pdf)
- Luttrell, L. M. (2005). Composition and function of g protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J Mol Neurosci*, *26*(2-3), 253-264. doi:10.1385/jmn:26:2-3:253
- Malin, S. A., Molliver, D. C., Koerber, H. R., Cornuet, P., Frye, R., Albers, K. M., & Davis, B. M. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J Neurosci*, *26*(33), 8588-8599. doi:10.1523/jneurosci.1726-06.2006
- Malmberg, A. B., Chen, C., Tonegawa, S., & Basbaum, A. I. (1997). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science*, *278*(5336), 279-283.

- Manfredsson, F. P., Tumer, N., Erdos, B., Landa, T., Broxson, C. S., Sullivan, L. F., . . . Mandel, R. J. (2009). Nigrostriatal rAAV-mediated GDNF overexpression induces robust weight loss in a rat model of age-related obesity. *Mol Ther*, *17*(6), 980-991. doi:10.1038/mt.2009.45
- McCorvy, J. D., & Roth, B. L. (2015). Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, *150*, 129-142. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.01.009
- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., . . . Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Rev Clin Pharmacol*, *9*(8), 1069-1080. doi:10.1080/17512433.2016.1183481
- Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Peebles, K. A., Yan, J., Ertz, N., . . . Price, T. J. (2010). IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci*, *30*(45), 15113-15123. doi:10.1523/jneurosci.3947-10.2010
- Melemedjian, O. K., Tillu, D. V., Moy, J. K., Asiedu, M. N., Mandell, E. K., Ghosh, S., . . . Price, T. J. (2014). Local translation and retrograde axonal transport of CREB regulates IL-6-induced nociceptive plasticity. *Mol Pain*, *10*, 45. doi:10.1186/1744-8069-10-45
- Mercier, G., Lennon, A. M., Renouf, B., Dessouroux, A., Ramaugé, M., Courtin, F., & Pierre, M. (2004). MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. *J Mol Neurosci*, *24*(2), 207-216. doi:10.1385/jmn:24:2:207
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, *66*(6), 355-474. doi:10.1016/s0301-0082(02)00009-6
- Miller, D. J., & Smith, G. L. (1984). EGTA purity and the buffering of calcium ions in physiological solutions. *Am J Physiol*, *246*(1 Pt 1), C160-166. doi:10.1152/ajpcell.1984.246.1.C160
- Mizumura, K., & Taguchi, T. (2016). Delayed onset muscle soreness: Involvement of neurotrophic factors. *J Physiol Sci*, *66*(1), 43-52. doi:10.1007/s12576-015-0397-0
- Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., . . . Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, *382*(6586), 76-79. doi:10.1038/382076a0
- Müller, U., & Carew, T. J. (1998). Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in Aplysia sensory neurons. *Neuron*, *21*(6), 1423-1434. doi:10.1016/s0896-6273(00)80660-1
- Murase, S., Terazawa, E., Hirate, K., Yamanaka, H., Kanda, H., Noguchi, K., . . . Mizumura, K. (2013). Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats. *J Physiol*, *591*(12), 3035-3048. doi:10.1113/jphysiol.2012.249235
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, *79*(4), 1193-1226. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1193
- Nicole, O., Ali, C., Docagne, F., Plawinski, L., MacKenzie, E. T., Vivien, D., & Buisson, A. (2001). Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*, *21*(9), 3024-3033. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6762559/pdf/ns003024.pdf>

- Norum, J. H., Hart, K., & Levy, F. O. (2003). Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT₄(b) and 5-HT₇(a). *J Biol Chem*, *278*(5), 3098-3104. doi:10.1074/jbc.M206237200
- Nutt, J. G., Burchiel, K. J., Comella, C. L., Jankovic, J., Lang, A. E., Laws, E. R., Jr., . . . Wooten, G. F. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, *60*(1), 69-73. doi:10.1212/wnl.60.1.69
- Obara, Y., Labudda, K., Dillon, T. J., & Stork, P. J. (2004). PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. *J Cell Sci*, *117*(Pt 25), 6085-6094. doi:10.1242/jcs.01527
- Obata, K., & Noguchi, K. (2004). MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci*, *74*(21), 2643-2653. doi:10.1016/j.lfs.2004.01.007
- Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A., & Noguchi, K. (2004). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body. *Neuroscience*, *126*(4), 1011-1021. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.036
- Okazaki, T., Yoshida, S., Teshima, H., & Shimada, M. (2011). The addition of calcium ion chelator, EGTA to thawing solution improves fertilizing ability in frozen-thawed boar sperm. *Anim Sci J*, *82*(3), 412-419. doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00856.x
- Oppenheim, R. W., Houenou, L. J., Johnson, J. E., Lin, L. F., Li, L., Lo, A. C., . . . Wang, S. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, *373*(6512), 344-346. doi:10.1038/373344a0
- Parada, C. A., Yeh, J. J., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2003). Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, *120*(1), 219-226. doi:10.1016/s0306-4522(03)00267-7
- Parnell, E., Palmer, T. M., & Yarwood, S. J. (2015). The future of EPAC-targeted therapies: agonism versus antagonism. *Trends Pharmacol Sci*, *36*(4), 203-214. doi:10.1016/j.tips.2015.02.003
- Patterson, S. L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K. C., Scanlin, H., Drake, C., & Kandel, E. R. (2001). Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*, *32*(1), 123-140. doi:10.1016/s0896-6273(01)00443-3
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., . . . Westphal, H. (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*, *382*(6586), 73-76. doi:10.1038/382073a0
- Pidoux, G., & Tasken, K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol*, *44*(5), 271-284. doi:10.1677/jme-10-0010
- Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G., & Scholich, K. (2009). Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(4), 321-335. doi:10.1038/nrd2827
- Poteryaev, D., Titievsky, A., Sun, Y. F., Thomas-Crusells, J., Lindahl, M., Billaud, M., . . . Saarma, M. (1999). GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett*, *463*(1-2), 63-66. doi:10.1016/s0014-5793(99)01590-2
- Pouysségur, J., Volmat, V., & Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*, *64*(5-6), 755-763. doi:10.1016/s0006-2952(02)01135-8
- R. Schmidt, F. Lang, & G. Thews. (2005). Physiologie des Menschen 29. Auflage, Kapitel 15 Nozizeption und Schmerz. Heidelberg: Springer, . 318-333.

- Racowsky, C. (1985). Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J Reprod Fertil*, 74(1), 9-21. doi:10.1530/jrf.0.0740009
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392
- Rathee, P. K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G. K., Wang, S. Y., . . . Kress, M. (2002). PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*, 22(11), 4740-4745. doi:20026461
- Rehmann, H. (2013). Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep*, 3, 3032. doi:10.1038/srep03032
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5), 986-1000. doi:10.1161/atvbaha.110.207449
- Robinson, M. J., Edwards, S. E., Iyengar, S., Bymaster, F., Clark, M., & Katon, W. (2009). Depression and pain. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 5031-5051. doi:10.2741/3585
- Roederer, M. (2002). Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom, Chapter 1, Unit 1.14*. doi:10.1002/0471142956.cy0114s22
- Rudolph, J. A., Poccia, J. L., & Cohen, M. B. (2004). Cyclic AMP activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2: implications for intestinal cell survival through the transient inhibition of apoptosis. *J Biol Chem*, 279(15), 14828-14834. doi:10.1074/jbc.M310289200
- Sajadi, A., Bensadoun, J. C., Schneider, B. L., Lo Bianco, C., & Aebischer, P. (2006). Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis*, 22(1), 119-129. doi:10.1016/j.nbd.2005.10.006
- Sakai, A., Asada, M., Seno, N., & Suzuki, H. (2008). Involvement of neural cell adhesion molecule signaling in glial cell line-derived neurotrophic factor-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 137(2), 378-388. doi:10.1016/j.pain.2007.09.020
- Salvatore, M. F., Zhang, J. L., Large, D. M., Wilson, P. E., Gash, C. R., Thomas, T. C., . . . Gerhardt, G. A. (2004). Striatal GDNF administration increases tyrosine hydroxylase phosphorylation in the rat striatum and substantia nigra. *J Neurochem*, 90(1), 245-254. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02496.x
- Sanchez, M. P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S. A., & Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 382(6586), 70-73. doi:10.1038/382070a0
- Sautter, J., Tseng, J. L., Braguglia, D., Aebischer, P., Spenger, C., Seiler, R. W., . . . Zurn, A. D. (1998). Implants of polymer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cell line-derived neurotrophic factor improve survival, growth, and function of fetal dopaminergic grafts. *Exp Neurol*, 149(1), 230-236. doi:10.1006/exnr.1997.6718
- Schnorr, S., Eberhardt, M., Kistner, K., Rajab, H., Kasser, J., Hess, A., . . . Herrmann, S. (2014). HCN2 channels account for mechanical (but not heat) hyperalgesia during long-standing inflammation. *Pain*, 155(6), 1079-1090. doi:10.1016/j.pain.2014.02.006
- Schulte am Esch, J., Bause, H., Kochs, E., Scholz, J., Standl, T., & C., W. (2011). *Duale Reihe Anästhesie: Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie (4. Auflage)*, Stuttgart, . S. 593.

- Schwede, F., Bertinetti, D., Langerijs, C. N., Hadders, M. A., Wienk, H., Ellenbroek, J. H., . . . Rehmman, H. (2015). Structure-guided design of selective Epac1 and Epac2 agonists. *PLoS Biol*, *13*(1), e1002038. doi:10.1371/journal.pbio.1002038
- Sharma, K. P., Singh, J. B., & Sharma, S. K. (2014). Mechanisms of cAMP-induced sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in the hippocampus. *Neuroreport*, *25*(7), 470-474. doi:10.1097/wnr.0000000000000117
- Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(8), 1213-1226. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, *68*, 821-861. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.821
- Sheng, J., Liu, S., Wang, Y., Cui, R., & Zhang, X. (2017). The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain. *Neural Plast*, *2017*, 9724371. doi:10.1155/2017/9724371
- Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., . . . Seino, S. (2007). Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(49), 19333-19338. doi:10.1073/pnas.0707054104
- Singhmar, P., Huo, X., Eijkelkamp, N., Berciano, S. R., Baameur, F., Mei, F. C., . . . Kavelaars, A. (2016). Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(11), 3036-3041. doi:10.1073/pnas.1516036113
- Skieterska, K., Rondou, P., & Van Craenenbroeck, K. (2017). Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination. *Int J Mol Sci*, *18*(5). doi:10.3390/ijms18050923
- Soler, R. M., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, J. R., & Comella, J. X. (1999). Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci*, *19*(21), 9160-9169. doi:10.1523/jneurosci.19-21-09160.1999
- Sommer, C. (2004). Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol*, *30*(2), 117-125. doi:10.1385/mn:30:2:117
- St-Jacques, B., & Ma, W. (2011). Role of prostaglandin E2 in the synthesis of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in primary sensory neurons: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem*, *118*(5), 841-854. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07230.x
- Su, C. M., Lu, D. Y., Hsu, C. J., Chen, H. T., Huang, C. Y., Yang, W. H., . . . Tang, C. H. (2009). Glial cell-derived neurotrophic factor increases migration of human chondrosarcoma cells via ERK and NF-kappaB pathways. *J Cell Physiol*, *220*(2), 499-507. doi:10.1002/jcp.21802
- Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Liu, F., Fienberg, A. A., Nomikos, G. G., & Greengard, P. (2002). DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(5), 3188-3193. doi:10.1073/pnas.052712699
- Tabarean, I. V., Behrens, M. M., Bartfai, T., & Korn, H. (2004). Prostaglandin E2-increased thermosensitivity of anterior hypothalamic neurons is associated with depressed inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(8), 2590-2595. doi:10.1073/pnas.0308718101

- Taiwo, Y. O., Bjerknes, L. K., Goetzl, E. J., & Levine, J. D. (1989). Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, *32*(3), 577-580.
- Taiwo, Y. O., & Levine, J. D. (1991). Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience*, *44*(1), 131-135. doi:10.1016/0306-4522(91)90255-m
- Takahashi, M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, *12*(4), 361-373.
- Tandrup, T. (1995). Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root. *J Comp Neurol*, *357*(3), 341-347. doi:10.1002/cne.903570302
- Tassin, T. C., Benavides, D. R., Plattner, F., Nishi, A., & Bibb, J. A. (2015). Regulation of ERK Kinase by MEK1 Kinase Inhibition in the Brain. *J Biol Chem*, *290*(26), 16319-16329. doi:10.1074/jbc.M115.654897
- Taylor, S. S., Buechler, J. A., & Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, *59*, 971-1005. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.004543
- Thal, D. M., Yeow, R. Y., Schoenau, C., Huber, J., & Tesmer, J. J. (2011). Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Mol Pharmacol*, *80*(2), 294-303. doi:10.1124/mol.111.071522
- Thomas, K. L., & Hunt, S. P. (1993). The regional distribution of extracellularly regulated kinase-1 and -2 messenger RNA in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, *56*(3), 741-757.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L. F., Ogren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., & Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, *373*(6512), 335-339. doi:10.1038/373335a0
- Torres, G. E., Arfken, C. L., & Andrade, R. (1996). 5-Hydroxytryptamine₄ receptors reduce afterhyperpolarization in hippocampus by inhibiting calcium-induced calcium release. *Mol Pharmacol*, *50*(5), 1316-1322. Retrieved from <https://molpharm.aspetjournals.org/content/50/5/1316.long>
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., . . . et al. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*, *266*(24), 15771-15781.
- Tracey, W. D., Jr. (2017). Nociception. *Curr Biol*, *27*(4), R129-r133. doi:10.1016/j.cub.2017.01.037
- Tronson, N. C., Schrick, C., Fischer, A., Sananbenesi, F., Pagès, G., Pouyssegur, J., & Radulovic, J. (2008). Regulatory mechanisms of fear extinction and depression-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, *33*(7), 1570-1583. doi:10.1038/sj.npp.1301550
- Trupp, M., Ryden, M., Jornvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E., & Ibanez, C. F. (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol*, *130*(1), 137-148.
- Tsalkova, T., Mei, F. C., Li, S., Chepurny, O. G., Leech, C. A., Liu, T., . . . Cheng, X. (2012). Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(45), 18613-18618. doi:10.1073/pnas.1210209109
- Tsuchioka, M., Takebayashi, M., Hisaoka, K., Maeda, N., & Nakata, Y. (2008). Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6

- glioma cells. *J Neurochem*, 106(1), 244-257. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05357.x
- Vasko, M. R., Habashy Malty, R., Guo, C., Duarte, D. B., Zhang, Y., & Nicol, G. D. (2014). Nerve growth factor mediates a switch in intracellular signaling for PGE2-induced sensitization of sensory neurons from protein kinase A to Epac. *PLoS One*, 9(8), e104529. doi:10.1371/journal.pone.0104529
- Verity, A. N., Wyatt, T. L., Hajos, B., Eglén, R. M., Baecker, P. A., & Johnson, R. M. (1998). Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor release from rat C6 glioblastoma cells. *J Neurochem*, 70(2), 531-539.
- Vigil, D., Blumenthal, D. K., Taylor, S. S., & Trewthella, J. (2006). Solution scattering reveals large differences in the global structures of type II protein kinase A isoforms. *J Mol Biol*, 357(3), 880-889. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.006
- Viguier, F., Michot, B., Hamon, M., & Bourgoïn, S. (2013). Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol*, 716(1-3), 8-16. doi:10.1016/j.ejphar.2013.01.074
- Von Korff, M., & Simon, G. (1996). The relationship between pain and depression. *Br J Psychiatry Suppl*(30), 101-108.
- Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S., & Stork, P. J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 89(1), 73-82.
- Wang, C., Li, G. W., & Huang, L. Y. (2007). Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain*, 3, 22. doi:10.1186/1744-8069-3-22
- Wang, H. J., Gu, H. X., Eijkelkamp, N., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2018). Low GRK2 Underlies Hyperalgesic Priming by Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor. *Front Pharmacol*, 9, 592. doi:10.3389/fphar.2018.00592
- Wang, Q., Lu, R., Zhao, J., & Limbird, L. E. (2006). Arrestin serves as a molecular switch, linking endogenous alpha2-adrenergic receptor to SRC-dependent, but not SRC-independent, ERK activation. *J Biol Chem*, 281(36), 25948-25955. doi:10.1074/jbc.M605415200
- Wang, Z., Dillon, T. J., Pokala, V., Mishra, S., Labudda, K., Hunter, B., & Stork, P. J. (2006). Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol Cell Biol*, 26(6), 2130-2145. doi:10.1128/mcb.26.6.2130-2145.2006
- Watts, S. W., Yang, P., Banes, A. K., & Baez, M. (2001). Activation of Erk mitogen-activated protein kinase proteins by vascular serotonin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38(4), 539-551. doi:10.1097/00005344-200110000-00006
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1), 143-180. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.143
- Willis, W. D., & Coggeshall, R. E. (1991). Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. 2nd ed. New York: Plenum.
- Wolf, C., Rothermel, A., & Robitzki, A. A. (2008). Neurturin, a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor family, affects the development of acetylcholinesterase-positive cells in a three-dimensional model system of retinogenesis. *J Neurochem*, 107(1), 96-104. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05594.x
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306(5944), 686-688. doi:10.1038/306686a0

- Woolf, C. J. (1989). Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth*, 63(2), 139-146.
- Woolf, C. J., & Chong, M. S. (1993). Preemptive analgesia--treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg*, 77(2), 362-379.
- Woolf, C. J., & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472), 1765-1769. doi:10.1126/science.288.5472.1765
- Woolfrey, K. M., Srivastava, D. P., Photowala, H., Yamashita, M., Barbolina, M. V., Cahill, M. E., . . . Penzes, P. (2009). Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines. *Nat Neurosci*, 12(10), 1275-1284. doi:10.1038/nn.2386
- Wu, J., Brown, S. H., von Daake, S., & Taylor, S. S. (2007). PKA type IIalpha holoenzyme reveals a combinatorial strategy for isoform diversity. *Science*, 318(5848), 274-279. doi:10.1126/science.1146447
- Yan, Q., Matheson, C., & Lopez, O. T. (1995). In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*, 373(6512), 341-344. doi:10.1038/373341a0
- Yang, F., Feng, L., Zheng, F., Johnson, S. W., Du, J., Shen, L., . . . Lu, B. (2001). GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci*, 4(11), 1071-1078. doi:10.1038/nn734
- Yao, H., York, R. D., Misra-Press, A., Carr, D. W., & Stork, P. J. (1998). The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem*, 273(14), 8240-8247. doi:10.1074/jbc.273.14.8240
- Yoong, L. F., & Too, H. P. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin inhibit neurite outgrowth and activate RhoA through GFR alpha 2b, an alternatively spliced isoform of GFR alpha 2. *J Neurosci*, 27(21), 5603-5614. doi:10.1523/jneurosci.4552-06.2007
- Yun, H. M., Kim, S., Kim, H. J., Kostenis, E., Kim, J. I., Seong, J. Y., . . . Rhim, H. (2007). The novel cellular mechanism of human 5-HT6 receptor through an interaction with Fyn. *J Biol Chem*, 282(8), 5496-5505. doi:10.1074/jbc.M606215200
- Zhang, L., Jiang, L., Sun, Q., Peng, T., Lou, K., Liu, N., & Leng, J. (2007). Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells: involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling. *Mol Cell Biochem*, 305(1-2), 19-26. doi:10.1007/s11010-007-9523-5
- Zhang, P., Smith-Nguyen, E. V., Keshwani, M. M., Deal, M. S., Kornev, A. P., & Taylor, S. S. (2012). Structure and allostery of the PKA RIIβ tetrameric holoenzyme. *Science*, 335(6069), 712-716. doi:10.1126/science.1213979
- Zhang, X., Li, L., & McNaughton, P. A. (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59(3), 450-461. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.015
- Zhang, X., Zhang, Z., Xie, C., Xi, G., Zhou, H., Zhang, Y., & Sha, W. (2008). Effect of treatment on serum glial cell line-derived neurotrophic factor in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(3), 886-890. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.01.004
- Zhang, Y., Guessous, F., Kofman, A., Schiff, D., & Abounader, R. (2010). XL-184, a MET, VEGFR-2 and RET kinase inhibitor for the treatment of thyroid cancer, glioblastoma multiforme and NSCLC. *IDrugs*, 13(2), 112-121. Retrieved from

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268517/pdf/nihms-351144.pdf>

- Zhu, S., Li, Y., Bennett, S., Chen, J., Weng, I. Z., Huang, L., . . . Xu, J. (2020). The role of glial cell line-derived neurotrophic factor family member artemin in neurological disorders and cancers. *Cell Prolif*, 53(7), e12860. doi:10.1111/cpr.12860
- Zurn, A. D., Baetge, E. E., Hammang, J. P., Tan, S. A., & Aebischer, P. (1994). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*, 6(1), 113-118.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Dosis-Wirkungs-Kurve der pERK- (A) und pRII-Intensität (B) nach 5- und 30-minütiger Stimulation mit Forskolin.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Kurve der pERK (A) und pRII-Intensität (B) bei unterschiedlichen GDNF Konzentrationen und einheitlicher Forskolin Konzentration</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 3: GDNF beeinflusst den cAMP-Crosstalk zu ERK unabhängig von PKA</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 4: GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs mit anhaltender Phase der pERK-Aktivierung</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 5: Die späte Phase der pERK-Aktivierung durch Serotonin ist abhängig von PKA</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 6: Die pERK- und pRII-Aktivierung durch Serotonin ist unabhängig von GRK2/3</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 7: Die frühe Phase der pERK-Aktivierung durch GPCRs ist von PKC/Calcium abhängig</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 8: Die frühe Phase der ERK1/2-Phosphorylierung durch GPCRs ist abhängig von MEK1/2.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 9: GDNF beeinflusst unter 007 den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 10: GDNF beeinflusst den cAMP-Crosstalk zu ERK abhängig von Epac2</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 11: GDNF verstärkt die ERK1/2-Phosphorylierung durch den Epac-Aktivator 007 unabhängig von GRK2/3.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 12: Nach dem Auswaschen von GDNF bleiben die Effekte des neurotrophen Faktors erhalten.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 13: Die frühe Phase der ERK-Aktivierung ist das Ergebnis von Priming; die anhaltende Phase der ERK-Aktivierung ist ein Ergebnis von anhaltender Signaltransduktion.....</i>	<i>54</i>

8 Vorabveröffentlichungen

1. Garza Carbajal A, Ebersberger A, Thiel A, Ferrari L, Acuna J, Brosig S, Isensee J, Moeller K, Siobal M, Rose-John S, Levine J, Schaible HG, Hucho T. Oncostatin M induces hyperalgesic priming and amplifies signaling of cAMP to ERK by RapGEF2 and PKA. *J Neurochem*. 2020 Sep 3. doi: 10.1111/jnc.15172. Epub ahead of print. PMID: 32885411.