

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. W. Böttiger

Calcineurin in depolarisationsinduzierter Signalweiterleitung

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

vorgelegt von
Alexandra Hohnen
aus Willich

promoviert am 29. August 2024

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

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

Erklärung

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

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

Herr Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho
Herr Dr. Jörg Isensee

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

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

Das Experiment, in welchem primäre sensorische Neurone der Ratte mit Calcineurininhibitoren prästimuliert wurden und folglich mit Capsaicin stimuliert wurden, wurde vor Anfang der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Jörg Isensee durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.1-4.1.3 Abb. 5-8). Die Ergebnisse wurden mir von Herrn Dr. Jörg Isensee für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die übrigen in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden nach entsprechender Anleitung durch Herrn Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Herrn Dr. Jörg Isensee von mir selbst zum Teil mit Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentin Frau Siobal durchgeführt. Die Methodik der Experimente wurde zuvor von der Arbeitsgruppe Hucho etabliert. Das Design der Studie orientierte sich an der in der Arbeitsgruppe etablierten Methodik und wurde von Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Dr. Jörg Isensee entwickelt. Die einzelnen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho und Dr. Jörg Isensee ausgearbeitet. Zwischenergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe präsentiert und besprochen.

Die Auswertung der Daten erfolgte selbstständig unter der Anleitung von Herrn Dr. Jörg Isensee. Ebenso hat Herr Dr. Jörg Isensee mich bei der selbstständigen Erstellung der Abbildungen und der statistischen Auswertung der Daten angeleitet. Des Weiteren wurde mir Abb. 3 von Herrn Dr. Jörg Isensee für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

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 27.04.2024

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. Tim Hucho, der mich in seinem Labor willkommen geheißen hat und mir somit erst die Möglichkeit zu dieser Dissertation gegeben hat. Vielen Dank für die gute Betreuung und die stetige Ermutigung, Fragen stellen zu dürfen.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Universitätsprofessor Dr. Bernd W. Böttiger danken, der mir durch die sechsmonatige Freistellung, die experimentelle Forschungsarbeit im Labor ermöglichte.

Herrn Dr. Jörg Isensee möchte ich danken für die tägliche Betreuung, die Planung der Experimente, die kritische Besprechung der Ergebnisse und die Einführung in die Software „R“. Jörg, Du hast so manchen „Error“ schnell gelöst.

Dem gesamten Team der AG Hucho gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme. Ich habe mich bei Euch sehr wohl gefühlt. Vielen Dank für die angenehme Atmosphäre im Labor!

Maike und Lydia möchte ich für die geduldige Einführung in die Methodik der Experimente danken. Auf unzählige Fragen habt Ihr immer mit enormer Geduld geantwortet.

Petra, Dir möchte ich danken für alles Organisatorische und natürlich auch für die herzliche Aufnahme im Labor!

Max und Paul gilt mein Dank für sämtliche Erklärungen über die „In's“ und „Out's“ im Labor, dem Beistand beim ersten selbstständigen Scannen am Mikroskop und dem Austausch über unsere Projekte!

Kristin, Dir möchte ich danken für die kurzweiligen Stunden im Labor! Zusammen haben wir die Methodik gelernt und unseren Weg durch „R“ gesucht. Es hat viel Freude gemacht, gemeinsam im Labor zu arbeiten, und sich auch anschließend noch vor der Tür öfters auszutauschen.

Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Familie und Freunden, die mich während des gesamten Projektes begleitet haben.

Ramona, Danke für das Zuhören, Deine kritischen Fragen, das Korrekturlesen und Deine motivierenden Worte!

Mami und Papa, auch Euch gilt mein besonderer Dank. Ihr durftet alle Höhen und Tiefen meiner Gemütswelt erleben und habt mich immer wieder aufgeheitert!

Omi und Opa, Euch danke ich auch dafür, dass Ihr immer ein offenes Ohr sowie einen wertvollen Ratschlag hattet.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1. ZUSAMMENFASSUNG	13
2. EINLEITUNG	15
2.1 Die Reizaufnahme und Reizweiterleitung von Schmerzen erfolgt durch nozizeptive Neurone	16
2.1.1 Verschiedene Typen Nozizeptoren nehmen unterschiedliche Schmerzreize auf	17
2.2 Zentrale Sensitivierung führt zur Hyperalgesie und Chronifizierung	18
2.3 Periphere Sensitivierung	18
2.4 Intrazelluläre Signalkaskaden in Nozizeptoren	19
2.4.1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase A wird rezeptorabhängig aktiviert	19
2.4.2 Die PKA besteht aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten	19
2.4.3 Die PKA Isoform RII β dient als Marker für nozizeptive Neurone	20
2.4.4 Die PKA vermittelt die Kopplung von Exzitation und Transkription	20
2.4.5 Die Proteinkinase C und der Mitogen-activated protein kinase Signalweg sind Teil der Signalkaskade in Nozizeptoren	20
2.4.6 Die PKA moduliert die Aktivierung der Signalkaskaden	21
2.4.7 Spannungsabhängige Calciumkanäle als Zielstruktur der PKA	22
2.4.8 TRP-Kanäle als Zielstruktur der PKA	24
2.4.9 PKA wird auch durch Depolarisation aktiviert	25
2.5 Calcineurin als möglicher Gegenspieler der PKA-II	26
2.5.1 Calcineurin wird in nozizeptiven Neuronen exprimiert	27
2.6 Calcineurininhibitoren und Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome (CIPS)	29
2.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	30
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Material	33
3.1.1 Nährmedien, Zusätze und Reagenzien	33
3.1.2 Calcineurininhibitoren	34
3.1.3 Stimulanzen	34
3.1.4 Primäre Antikörper	35

3.1.5	Sekundäre Antikörper	36
3.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterial	36
3.1.7	Software	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Versuchstiere	39
3.2.2	Zellkultur primärer sensorischer Neurone	40
3.2.3	Stimulation primärer sensorischer Neurone	41
3.2.4	Fixierung der primären sensorischen Neurone	43
3.2.5	Immunzytochemie	43
3.2.6	High content screening (HCS)-Mikroskopie	44
3.2.7	Statistische Analyse	45
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	Calcineurininhibitoren erhöhen die Aktivität von PKA-II und ERK1/2 nach Depolarisation primärer sensorischer Neurone der Ratte	47
4.1.1	Der TRPV1-Kanalagonist Capsaicin bewirkt nicht die Aktivierung von PKA-II aber von ERK1/2 in einer Konzentration von 1 und 10 μM	48
4.1.2	Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin	50
4.1.3	Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin	53
4.1.4	Der TRPA1-Agonist AITC bewirkt die Aktivierung der PKA-II in einer Konzentration von 10 und 100 μM	55
4.1.5	Die Flüchtigkeit von AITC erfordert das Versiegeln der Zellkulturkammern direkt nach erfolgter Stimulation	56
4.1.6	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf AITC	58
4.1.7	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC	61
4.1.8	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf einen Calciumeinstrom durch Ionomycin	64
4.1.9	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf einen Calciumeinstrom durch Ionomycin	67
4.2	Calcineurininhibitoren verstärken die Phosphorylierung des L-Typ Calciumkanals Cav1.2 nach Depolarisation primärer sensorischer Neuronen der Ratte	68
4.2.1	Calcineurininhibitoren verstärken die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin	68
4.2.2	Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin	71
4.2.3	Calcineurininhibitoren verstärken nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC	73
4.2.4	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC	77
4.2.5	Calcineurininhibitoren verstärken nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach Induktion des Calciumeinstroms über Ionomycin	79

4.2.6	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 nach Induktion des Calciumeinstroms über Ionomycin	81
4.3	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II und der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	82
4.3.1	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	83
4.3.2	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	85
4.3.3	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	87
4.3.4	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	90
4.4	Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin stärker in CGRP-positiven Neuronen der Maus	92
4.5	Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus	96
5.	DISKUSSION	98
5.1	Die TRPV1-Kanal mediierte PKA-II Aktivierung und Ca _v 1.2 Phosphorylierung unterliegen der Regulation durch Calcineurin	99
5.2	Die TRPA1-Kanal mediierte PKA-II Aktivierung und Ca _v 1.2 Phosphorylierung unterliegen nicht der Regulation durch Calcineurin	101
5.3	Ungerichteter Calciumeinstrom in primäre sensorische Neurone führt nicht zur PKA-II Aktivierung und Ca _v 1.2 Phosphorylierung	104
5.4	ERK1/2 wird durch einen Calciumeinstrom induziert durch Aktivierung von TRP-Kanälen aktiviert	105
5.5	Die Effektgröße ist in primären sensorischen Neuronen von Mäusen kleiner als die in primären sensorischen Neuronen von Ratten	106
5.5.1	Die Expression von TRPV1-Kanälen unterscheidet sich in Mäusen und Ratten	106
5.6	Ausblick in die Zukunft	108
6.	LITERATURVERZEICHNIS	110
7.	ANHANG	117

7.1	Abbildungsverzeichnis	117
7.2	Tabellenverzeichnis	118
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	119

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
a.u.	Beliebige Einheit - <i>Arbitrary unit</i>
Abb.	Abbildung
AITC	Allylthiocyanat
AKAP79/150	<i>Protein kinase A anchoring protein 79/150</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumion
CACNA1C	Untereinheit alpha-1C des L-Typ Calciumkanals Ca _v 1.2
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin
Cap	Capsaicin
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CIPS	<i>Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ERK1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinases 1/2</i>
f.c.	<i>Final concentration</i> - Endkonzentration
FK oder FK506	Tacrolimus
FKBPs	FK506-bindende Proteine
g	Gramm
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCS-Mikroskopie	<i>High Content Screening</i> -Mikroskopie
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IB4	Isolektin B4
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>

Iono	Ionomycin
KCl	Kaliumchlorid
Konz.	Konzentration
m/s	Meter pro Sekunde
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	MAP/ERK-Kinase
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i>
NFATc4	<i>NFAT, cytoplasmic 4</i>
NGF	Nervenwachstumsfaktor, <i>nerve growth factor</i>
NGS	Normales Ziegenserum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKA-I	Typ I PKA
PKA-II	Typ II PKA
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP2B	Proteinphosphatase 2B, Calcineurin
PPP3CA/PPP3ca	α -Isoform der katalytischen Untereinheit von Calcineurin (Alpha-Isoform)
PPP3CB/PPP3cb	β -Isoform der katalytischen Untereinheit von Calcineurin (Beta-Isoform)
PPP3CC/PPP3cc	γ -Isoform der katalytischen Untereinheit von Calcineurin (Gamma-Isoform)
PPP3R1/Ppp3r1	β 1-Isoform der regulatorischen Untereinheit von Calcineurin
PPP3R2/Ppp3r2	β 2-Isoform der regulatorischen Untereinheit von Calcineurin
pRII	Phosphorylierte regulatorische Untereinheit der PKA-II
Prkar2b	PKA-II regulatorische Untereinheit beta
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler
TierSchG	Tierschutzgesetz

TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TrkA	Tropomyosinrezeptorkinase A
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin</i>
TRPA1	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin 1</i>
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
TRPM	<i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPML	<i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
TRPP	<i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
U	Einheiten - <i>Units</i>
UCHL1	Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YLDs	Lebensjahre mit Einschränkungen - <i>Years lived with disability</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Chronischer Schmerz erzeugt einen hohen Leidensdruck für alle Betroffenen. Die momentan zur Verfügung stehenden Therapieansätze sind jedoch in ihrer Effektivität begrenzt. Die Bedeutung von Mechanismen auf peripherer Ebene bei der Entstehung von chronischem Schmerz ist noch nicht vollständig untersucht. Im Hinblick auf die Entwicklung von neuen Therapien ist daher das Verständnis der molekularen Grundlagen, auch auf peripherer Ebene, von essentieller Bedeutung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Depolarisation nozizeptiver Neurone vermittelt durch den spannungsabhängigen L-Typ Kanal $Ca_v1.2$ zur Aktivierung der Typ II Proteinkinase A (PKA-II) führt, dass diese depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA-II mit der Sensitivierung des $Ca_v1.2$ -Kanals einhergeht und *in vivo* zur Entstehung von mechanischer Hyperalgesie führt. Ein Calciumeinstrom über Ionomycin hingegen führte nicht zur Aktivierung der PKA-II. Ferner ist nicht bekannt, ob ein Calciumeinstrom induziert durch alternative Wege wie beispielsweise durch die Aktivierung des *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1)- oder des *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* (TRPA1)-Kanals zur Aktivierung von PKA-II führt.

In anderen Zellmodellen vermittelt Calcineurin die Dephosphorylierung von $Ca_v1.2$ an Serin 1928 und stellt somit den Gegenspieler der $Ca_v1.2$ -PKA-Phosphorylierung dar. In bis zu 17 % der Patienten, welche Transplantation begleitende Therapie mit Calcineurininhibitoren erhalten, tritt das „*Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome* (CIPS)“ auf.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob Calcineurin den Unterschied zwischen der durch Kaliumchlorid (KCl) und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung begründen kann, ob die TRP-Agonisten Capsaicin und Allylisothiocyanat (AITC) zu Aktivierung von PKA-II führen und ob Calcineurininhibitoren diese Antwort modulieren.

Dissoziierte und kultivierte primäre sensorische Neurone von Ratten und Mäusen wurden daher mit Capsaicin (1 μ M), AITC (10, 100 μ M) und Ionomycin (1, 3 μ M) alleine oder in Kombination mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus (FK, 10 μ M) oder Cyclosporin A (CsA, 10 μ M) behandelt. Anschließend wurden die fixierten Zellen immunzytochemisch mit Antikörpern gegen die phosphorylierte regulatorische Untereinheit der PKA-II (pRII), phosphorylierte *Extracellular-signal regulated kinases 1/2* (pERK1/2) und p $Ca_v1.2$ gefärbt. Die Zellen wurden mittels *High Content Screening* (HCS)-Mikroskopie gescannt und analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Agonisten der TRPV1- und TRPA1-Kanäle zur Aktivierung von PKA-II und Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ führen. Die TRPV1-medierte Aktivierung der PKA-II sowie die Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ konnte durch Calcineurininhibitoren verstärkt werden, wobei diese Aktivitätssteigerung durch Calcineurininhibitoren nicht bei TRPA1-medierter PKA-II Aktivierung beobachtet wurde. Ferner konnte der Unterschied zwischen der durch KCl und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung in primären sensorischen Neuronen

nicht durch Calcineurin begründet werden. So führte weder die alleinige Behandlung mit Ionomycin noch die Kombination mit Calcineurininhibitoren und Ionomycin zur Aktivierung der PKA-II oder Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals.

Calcineurin erscheint als Gegenspieler von TRPV1-Agonisten-induzierter Phosphorylierung, nicht aber von TRPA1-Agonisten induzierter Phosphorylierung oder der Depolarisation durch Ionomycin. Als mögliche Erklärung könnte die Anordnung von Proteinkomplexen in Nozizeptoren dienen, welche eine Regulation der PKA-II durch Calcineurin ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen daher auf einen sehr spezifischen Mechanismus depolarisationsinduzierter Hyperalgesie hin, welcher Schmerz bei CIPS auf molekularem Niveau begründen könnte.

2. Einleitung

Schmerz wird als „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebsschädigung einhergeht oder einer solchen Gewebsschädigung ähnelt“¹ definiert. Da Schmerz ein hochkomplexer Prozess ist, der zudem von den Betroffenen sehr subjektiv und daher individuell wahrgenommen wird, wurde die seit 1979 geltende Definition von Schmerz der *International Association for the Study of Pain* (IASP) erst kürzlich um sechs weitere Kernaussagen ergänzt¹. Ziel dieser Aktualisierung und Ergänzung der Definition ist es, Schmerz allumfassender zu beschreiben und die Schmerztherapie zu verbessern. Eine dieser Kernaussagen lautet beispielsweise, dass Individuen das Schmerzkonzept durch ihre Lebenserfahrungen erlernen¹. So gewinnen auch soziale Komponenten der Schmerzerfahrung zunehmend in Therapieansätzen an Bedeutung, was ebenso die Komplexität von Schmerzen unterstreicht.

Wichtig für die Schmerztherapie ist die Unterscheidung von akuten und chronischen Schmerzen. Schmerzen, die länger als drei Monate andauern, werden als chronisch bezeichnet, wobei Schmerzen, die kürzer als drei Monate andauern, als akut bezeichnet werden².

Während nahezu jeder Mensch in seinem Leben mit physischen, akuten Schmerzen konfrontiert wird, leiden 20 % der europäischen Bevölkerung unter chronischen Schmerzen³. Chronischer Schmerz kann weiter durch die Einteilung in chronischen primären und chronischen sekundären Schmerz differenziert werden. Chronischer primärer Schmerz kann hierbei als eigenständige Krankheit verstanden werden, wohingegen chronischer sekundärer Schmerz als Symptom einer anderen Erkrankung wie beispielsweise Krebs oder die diabetische Neuropathie aufgefasst werden kann². Im Mai 2019 wurde chronischer Schmerz daher als eigene Rubrik in die elfte Fassung der *International Classification of Diseases* (ICD) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgenommen².

Chronische Schmerzen stellen eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Einerseits erfahren Patienten einen großen Leidensdruck mit Einschränkungen im täglichen Leben, gefolgt von einer Reduzierung der Lebensqualität, was in Lebensjahren mit Einschränkungen (*Years lived with disability*, YLDs) ausgedrückt wird⁴. Nicht selten führen chronische Schmerzsyndrome auch zum Ausfall von Arbeitskraft, was wiederum ökonomisch von Bedeutung ist. Andererseits erfordert die Behandlung chronischer Schmerzen eine individuell angepasste Therapie, wobei viele momentan verfügbare Schmerzmittel nicht die gewünschte Wirkung erzielen^{5,6}. Aufgrund der unzureichenden Therapieerfolge ist es erforderlich, die zellulären und molekularen Mechanismen, die der Schmerzwahrnehmung zugrunde liegen, besser zu verstehen, um wirksamere Therapeutika zu entwickeln.

2.1 Die Reizaufnahme und Reizweiterleitung von Schmerzen erfolgt durch nozizeptive Neurone

Grundlage der Reizaufnahme und Reizweiterleitung bilden sogenannte Nozizeptoren. Nozizeptoren sind primäre Sinneszellen, die Schmerzerleben initiieren können. Die Zellkörper der Nozizeptoren liegen in den Spinalganglien, von wo aus Zellausläufer sowohl in die Peripherie als auch weiter in Richtung des Rückenmarks reichen ⁷ (Abb. 1).

Mit ihren freien Nervenendigungen nehmen die primären Sinneszellen periphere, noxische thermische, mechanische oder chemische Reize auf und leiten die Informationen an das zentrale Nervensystem weiter ⁷. Die Aktivierung nozizeptiver Neurone durch potenziell schädliche Reize und ihre zentralnervöse Weiterleitung wird als Nozizeption bezeichnet ⁸. Im Hinterhorn des Rückenmarks findet die Informationsübertragung von den primären sensorischen Neuronen an die sekundären Neurone als Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) statt. Die Ausläufer der Zellkörper, die sogenannten Axone, der sekundären Neurone kreuzen auf Segmentebene der Wirbelsäule auf die Gegenseite und verlaufen in der Vorderseitenstrangbahn in kranialer Richtung bis zum Thalamus ⁷. Vom Thalamus ausgehend, erfolgt die Informationsübertragung schließlich bis zur Großhirnrinde, der Cortex cerebri ⁹.

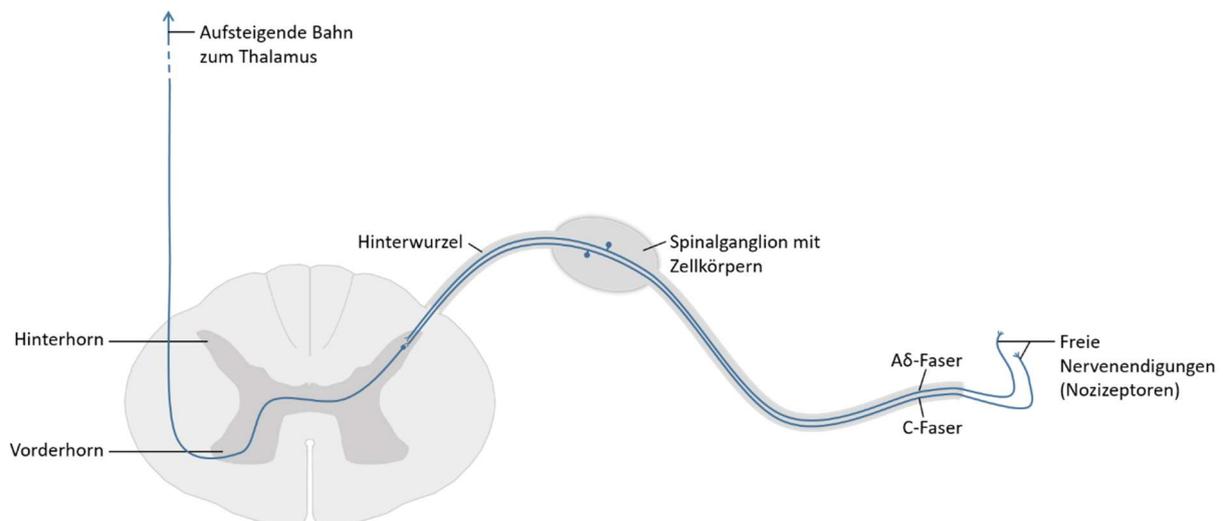


Abb. 1: Reizweiterleitung vom peripheren zum zentralen Nervensystem. Noxische Reize werden von Nozizeptoren mit ihren freien Nervenendigungen aufgenommen und im Hinterhorn des Rückenmarks zu sekundären Neuronen des ZNS weitergeleitet. Die sekundären Neurone kreuzen auf Segmentebene der Wirbelsäule im Rückenmark auf die Gegenseite und ziehen in der Vorderseitenstrangbahn nach kranial, wo sie die Information im Thalamus auf tertiäre Neurone übertragen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Abbildung B „Periphere somatische Schmerzleitung (nach Lorke)“ des Kapitels 12.4 Sensorisches System: Schmerz aus Prometheus LernAtlas der Anatomie erstellt ¹⁰.

2.1.1 Verschiedene Typen Nozizeptoren nehmen unterschiedliche Schmerzreize auf

Nozizeptive Neurone können je nach Funktion und anatomischem Aufbau in zwei Gruppen unterteilt werden⁸: A δ -Fasern und C-Fasern.

A δ -Fasern besitzen eine moderat dicke Myelinscheide, welche die Axone isoliert und somit eine relativ schnelle Informationsweiterleitung von 6-25 m/s ermöglicht.

C-Fasern sind dünner bzw. nicht myelinisiert. Daher leiten C-Fasern Informationen langsam mit circa 1 m/s zu den sekundären Neuronen im Rückenmark. Durch die unterschiedlich schnelle Reizweiterleitung ergibt sich, dass die durch A δ -Fasern aufgenommenen Reize als spitzer, schneller erster Schmerz und die durch C-Fasern aufgenommenen Reize als stumpfer, länger anhaltender zweiter Schmerz wahrgenommen werden. Innerhalb der A δ -Fasern werden wiederum zwei verschiedene Typen unterschieden: Typ I und Typ II A δ -Fasern. Während C-Fasern sowohl thermische, mechanische und chemische Reize wahrnehmen und daher als polymodal bezeichnet werden, detektieren Typ I A δ -Fasern insbesondere schädliche mechanische und chemische Reize und Typ II A δ -Fasern überwiegend schädliche thermische Reize. Dieser Spezialisierung auf unterschiedliche Reize liegt die Expression unterschiedlicher Rezeptoren zugrunde⁸. Die Reizschwelle für thermische Reize ist bei Typ I A δ -Fasern besonders hoch (> 50 °C), sodass sie schädliche Hitze schlechter, jedoch mechanische und chemische Reize besser wahrnehmen. Typ II A δ -Fasern hingegen haben eine besonders hohe Reizschwelle für mechanische und chemische Reize, sodass sie schädliche Hitze besser, jedoch mechanische und chemische Reize schlechter detektieren^{7,9}. Nozizeptive Neurone können auch mithilfe molekularer Marker in Subgruppen unterschieden werden. So kann zwischen peptidergen Neuronen und nicht-peptidergen Neuronen differenziert werden. Peptiderge Neurone besitzen im Gegensatz zu nicht-peptidergen Neuronen die Neuropeptide Substanz P und exprimieren die Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), auch als hoch affiner Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors (*Nerve growth factor*, NGF) bekannt. Außerdem zeichnen sie sich durch *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) aus¹¹. Nicht-peptiderge Neurone zeichnen sich hingegen durch die Expression der Rezeptortyrosinkinase Ret, die Bindung des Isolektins B4 (IB4) und die Expression des purinergen P2X3 Rezeptors aus¹¹. Eine Clusteranalyse von Usoskin *et al.* ergab die Unterscheidung von 10-11 Subgruppen sensorischer Neurone auf Basis von spezifischen Expressionsmustern¹². Es konnten Subpopulationen von Nozizeptoren identifiziert werden, welche die spannungsabhängigen Natriumkanäle Na_v1.7 und Na_v1.8 und die *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* (TRPA1) und *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) Kationenkanäle exprimieren, wobei diese Marker nicht spezifisch für eine Subgruppe sind, sondern überlappend vorkommen können¹³.

Die Reizweiterleitung von A δ - und C-Fasern an die sekundären Neurone im Hinterhorn im Rückenmark erfolgt in verschiedenen Ebenen in der grauen Substanz (Substantia grisea). A δ -Fasern übertragen die Information in den Rexed-Laminae I und V auf die sekundären Neurone, C-Fasern geben die Informationen in den Rexed-Laminae I und II an sekundäre Neurone weiter ⁷.

2.2 Zentrale Sensitivierung führt zur Hyperalgesie und Chronifizierung

Ein Schlüsselereignis bei der Entstehung von chronischem Schmerz ist die zentrale Sensitivierung (auch zentrale Sensibilisierung). Dieser Prozess beschreibt die erhöhte neuronale Aktivität in der zentralen Schmerzweiterleitung, die nach einem noxischen Reiz erfolgt, und die folglich zu einer Schmerzüberempfindlichkeit, der Hyperalgesie, führt ¹⁴. Eine besondere Rolle kommt hierbei der Signalübertragung an den Synapsen zu. Durch wiederholte Aktivierung von Neuronen kann die Signalübertragung an den Synapsen verstärkt werden – ein Prozess, der als Langzeitpotenzierung beschrieben wurde und ein zellulärer Schlüsselprozess neuronalen Lernen und Gedächtnisses ist ¹⁵. Auf molekularem Niveau führt die Ausschüttung von Glutamat, Substanz P und CGRP in den synaptischen Spalt zwischen den primären und sekundären Neuronen im Rückenmark als Folge der Aktivierung von Nozizeptoren zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran. Durch diese Depolarisation wird die spannungsabhängige Blockierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran durch Magnesiumionen aufgehoben, sodass Glutamat NMDA-Rezeptoren binden und aktivieren kann ¹⁶. Dadurch öffnet sich der NMDA-Rezeptor, wodurch es zu einem Calciumeinstrom in das postsynaptische Neuron kommt. Durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration werden wiederum intrazelluläre Signalwege aktiviert, die mittels akuter Signalvorgänge sowie durch langanhaltende Aktivierung von Transkription und Translation zur Entstehung zentraler Sensitivierung beitragen ¹⁴. Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ist also zentral für die Entstehung und Aufrechterhaltung der zentralen Sensitivierung ^{17,18}.

An Synapsen der Schmerzbahnen führt die Langzeitpotenzierung als Folge von langanhaltender Aktivierung durch z.B. Entzündungen oder Verletzungen zu erhöhter Schmerzwahrnehmung (Hyperalgesie) und Chronifizierung von Schmerz¹⁴.

2.3 Periphere Sensitivierung

Zu Chronifizierung von Schmerz tragen nicht nur Veränderungen im ZNS bei. Die zentralen Veränderungen können auch durch Überreaktivität von peripheren nozizeptiven Neuronen hervorgerufen werden, welche als Folge von Gewebeschäden oder Entzündungen und langanhaltenden plastischen Veränderungen sensibilisiert werden ^{13,19}.

Diese periphere Sensibilisierung äußert sich in einer Herabsetzung des Schwellenwertes für die Reizweiterleitung und in einer erhöhten Reaktion auf schädliche Reize ²⁰.

Verschiedenste Forschungsprojekte haben gezeigt, dass die periphere Sensibilisierung, welche unter anderem zu Schmerzchronifizierung führen kann, durch intrazelluläre Signalkaskaden erzeugt wird ^{8,19}.

2.4 Intrazelluläre Signalkaskaden in Nozizeptoren

Ausgangspunkt für die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden ist einerseits die Bindung von Liganden an ihre spezifischen Rezeptoren in der Zellmembran der Neurone ⁷. Andererseits können die Signalkaskaden in Nozizeptoren auch durch alleinige Depolarisation aktiviert werden ²¹.

2.4.1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase A wird rezeptorabhängig aktiviert

Bei der rezeptorabhängigen Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in Nozizeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) eine große Rezeptorgruppe. GPCRs sind 7-Transmembranhelix-Rezeptoren, die verschiedene Neurotransmitter und inflammatorische Substanzen binden. Sobald der spezifische Ligand an den GPCR bindet, wird das Guanosin triphosphat (GTP)-bindende Protein (G-Protein) aktiviert, das wiederum die Adenylylzyklase, ein membrangebundenes Enzym, aktiviert (Abb. 2). Die Adenylylzyklase bildet aus Adenosin triphosphat (ATP) den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ⁷. Die rezeptorabhängige Produktion von cAMP führt schließlich zur Aktivierung der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die sowohl rezeptorabhängig als auch über Depolarisation aktiviert werden kann ^{7,21}. Die depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA wird in Abschnitt 2.4.9 erläutert.

2.4.2 Die PKA besteht aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten

Die PKA besteht aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten ⁷. Basierend auf den Isoformen der regulatorischen Untereinheiten können zwei Typen PKAs unterschieden werden: Typ I PKA (PKA-I) und Typ II PKA (PKA-II) mit respektive den regulatorischen Untereinheiten RI α und RI β bzw. RII α und RII β . Während RI α und RI β eine inhibitorische Pseudosubstratbindungsstelle für die katalytische Untereinheit tragen, bilden RII α und RII β phosphorylierbare inhibitorische Substratbindungsstellen für die katalytische Untereinheit der PKA ^{22,23}.

Durch die allosterische Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA werden die katalytischen Untereinheiten der PKA durch eine Konformationsänderung frei und somit wird die PKA aktiviert ²⁴⁻²⁶.

2.4.3 Die PKA Isoform RII β dient als Marker für nozizeptive Neurone

Die Expression der PKA Isoformen variiert in verschiedenen Zelltypen ²⁷⁻²⁹. Die Quantifizierung der PKA Untereinheiten in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zeigte, dass die α -Untereinheiten der PKA auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden, während die β -Untereinheiten ausschließlich in neuronalen Zellen identifiziert wurden. Hierbei wurde gezeigt, dass die PKA Isoform RII β in nozizeptiven A δ - und C-Fasern exprimiert wird, welche ebenso TRPV1, Nav1.8, CGRP und IB4 exprimieren. Mithilfe dieser Marker werden nozizeptive Neurone identifiziert, sodass konkludiert werden kann, dass auch RII β als Marker für nozizeptive Neurone dienen kann ³⁰.

2.4.4 Die PKA vermittelt die Kopplung von Exzitation und Transkription

Als Kinase phosphoryliert die PKA mit ihrer katalytischen Untereinheit Serin- und Threonineinheiten verschiedener Zielproteine, die ebenfalls Teil der Signalkaskade sind ⁷. Am Ende der intrazellulären Signalkaskaden steht die Regulation von biologischen Prozessen wie beispielsweise der Transkription. Die PKA phosphoryliert den Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein* (CREB), der die Transkription der DNA im Zellkern reguliert ³¹. Durch diese Kopplung von Exzitation des Neurons und Transkription wird die Genexpression in Neuronen in Abhängigkeit der Aktivierung moduliert. Auf diese Weise kann eine erhöhte Aktivierung der Neurone über intrazelluläre Signalkaskaden und die Transkription bestimmter Gene zu einer Veränderung der Signalweiterleitung, beispielsweise durch eine veränderte Rezeptor- oder Kanalexpression, führen ³².

2.4.5 Die Proteinkinase C und der Mitogen-activated protein kinase Signalweg sind Teil der Signalkaskade in Nozizeptoren

Abhängig von der Art des Stimulus werden verschiedene Proteine innerhalb der intrazellulären Signalkaskaden aktiviert. So scheint die Proteinkinase C (PKC) vor allem in der Entstehung von Hyperalgesie aufgrund thermischer und mechanischer Reize involviert zu sein ³³. Auch die *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), insbesondere die *Extracellular-signal regulated kinases 1* und *2* (ERK1/2) werden als Teil der Signalkaskade im weiteren Verlauf aktiviert und scheinen vor allem in thermisch und mechanisch ausgelöster Hyperalgesie involviert zu sein ³⁴⁻³⁶.

Versuche mit kortikalen Neuronen der Ratte haben gezeigt, dass die Aktivierung des MAPK Signalweges durch die Bindung von Calcium an Calmodulin (CaM) am spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal erfolgt³⁷. Zu dem MAPK Signalweg zählt die Aktivierung des G-Proteins Ras, gefolgt von der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf. Raf aktiviert die MAP/ERK-Kinase (MEK) durch Phosphorylierung, welche schließlich ERK1/2 phosphoryliert und somit aktiviert³⁸.

Am Ende des MAPK Signalweges steht wiederum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB und die Regulation der Genexpression³⁷.

2.4.6 Die PKA moduliert die Aktivierung der Signalkaskaden

Neben Proteinen phosphoryliert die PKA auch membrangebundene Rezeptoren als Teil der Signalkaskade. Hierdurch wird die Aktivierung dieser Rezeptoren und folglich auch die Aktivierung der Signalkaskaden moduliert^{39,40}.

Durch die Phosphorylierung des Ionenkanals *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) an Serin 116 wird die Desensitivierung von TRPV1 reduziert. Durch diesen Mechanismus trägt die PKA direkt zur Sensitivierung von Neuronen bei⁴¹.

Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die PKA den spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal Ca_v1.2 in Neuronen reguliert. Experimente mit kardialen Muskelzellen, Neuronen des Hippocampus und thalamokortikalen Schaltneuronen haben gezeigt, dass die PKA den Calciumeinstrom über Ca_v1.2-Kanäle durch die Phosphorylierung von Serin 1928 am C-Terminus des Ca_v1.2-Kanals begünstigt^{40,42,43}. Diese Beobachtung konnte auch in nozizeptiven Neuronen gemacht werden. Isensee *et al.* zeigten, dass die Aktivität des Ca_v1.2-Kanals durch die Phosphorylierung von Serin 1928 durch PKA reguliert wird²¹. So führte die depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Serin 1928 des Ca_v1.2-Kanals, während dieser Effekt nach der Blockade der katalytischen Untereinheit der PKA nicht zu beobachten war²¹.

Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass PKA in Neuronen im Allgemeinen, aber vor allem auch in nozizeptiven Neuronen im Speziellen eine zentrale Funktion in der Regulation der intrazellulären Signalkaskaden einnimmt.

In nozizeptiven Neuronen konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität der PKA nach wiederholter Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren erhöht scheint⁴⁴.

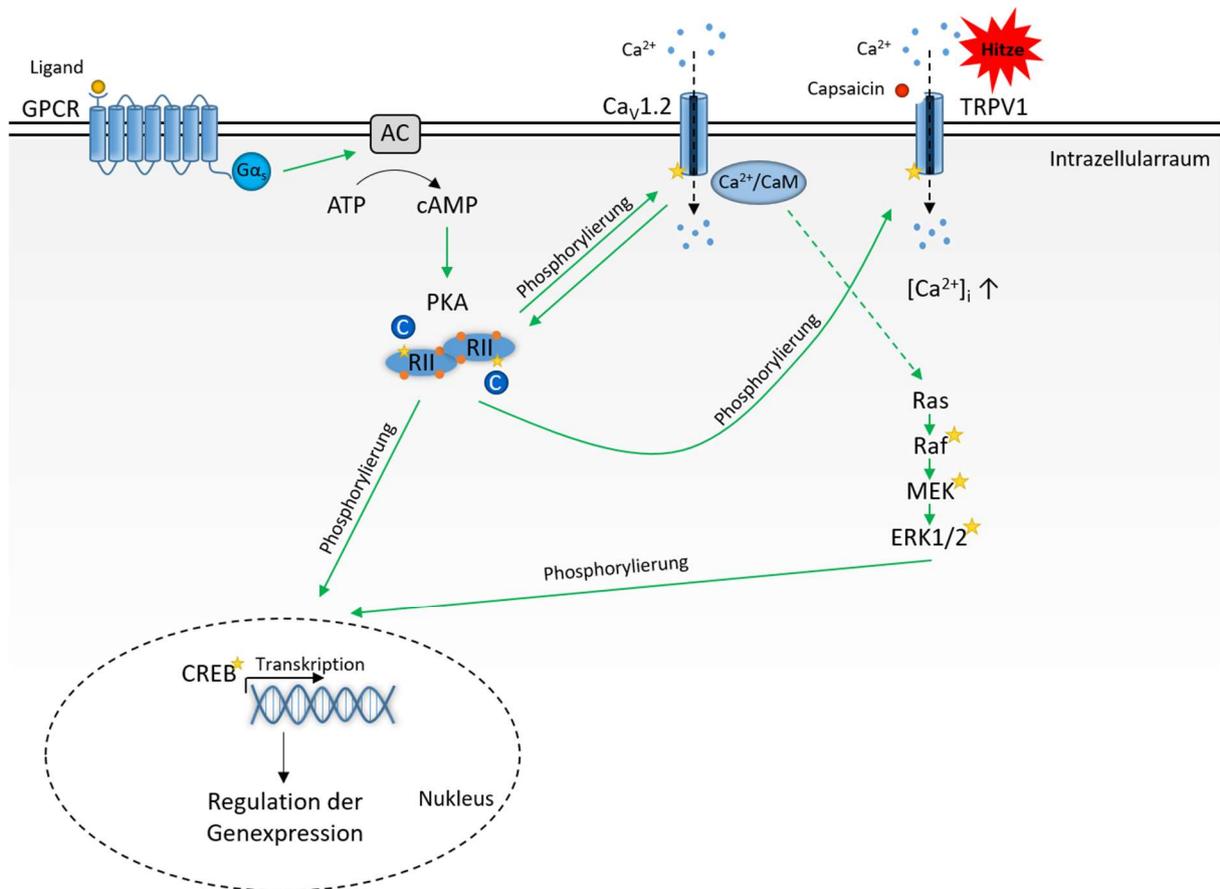


Abb. 2: Intrazelluläre Signalkaskaden in Neuronen. Sobald ein Ligand an den GPCR bindet, erfolgt die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden über die α -Untereinheit des G-Proteins. Die Adenylzyklase bildet im aktivierten Zustand den sekundären Botenstoff cAMP, der für die Aktivierung der PKA verantwortlich ist. Alternativ zur Aktivierung durch cAMP erfolgt die Aktivierung der PKA depolarisationsabhängig durch einen Calciumeinstrom durch die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle Cav1.2. PKA phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB und reguliert somit die Genexpression. Darüber hinaus reguliert PKA durch Phosphorylierung des Cav1.2- und des TRPV1-Kanals die Aktivität dieser Ionenkanäle. Der MAPK Signalweg wird durch calciumbindendes Calmodulin aktiviert, welches an den aktivierten Cav1.2-Kanal bindet. Aktiviertes Ras, aktiviert Raf, das wiederum MEK aktiviert. MEK aktiviert schließlich ERK1/2. Über die Aktivierung der ERK1/2 und die darauffolgende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB wird wiederum die Genexpression in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität reguliert. Die gelben Sternchen stellen die Phosphorylierung der Zielproteine dar. AC: Adenylzyklase, ATP: Adenosinriphosphat, Ca^{2+} : Calciumion, CaM: Calmodulin, cAMP: Zyklisches Adenosinmonophosphat, Cav1.2: Spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanal 1.2, CREB: cAMP response element-binding protein, ERK1/2: Extracellular-signal regulated kinases 1 und 2, Gas: α -Untereinheit des G-Proteins, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, MEK: Mitogen-activated protein kinase (MAP)-/ERK-Kinase, PKA: Proteinkinase A, TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloid-Kanal 1.

2.4.7 Spannungsabhängige Calciumkanäle als Zielstruktur der PKA

Spannungsabhängige Calciumkanäle sind Oligomere, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. Die $\alpha 1$ -Untereinheit formt die Kanalpore und besteht selbst aus vier Domänen aus je sechs transmembranen Segmenten (S1-S6) und einer einmündenden P-Schleife. Zum Kanal zählt weiterhin eine $\alpha 2$ -Untereinheit, die sich extrazellulär befindet und an eine transmembrane δ -Untereinheit gebunden ist. Intrazellulär ist die $\alpha 1$ -Untereinheit an eine β -Untereinheit gebunden^{45,46}. Innerhalb der Gruppe der spannungsabhängigen Calciumkanäle werden verschiedene Isoformen unterschieden: Cav1.1-Cav1.4-Kanäle, die auch als L-Typ

Kanäle bezeichnet werden, $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$ -Kanäle, die als P/Q-, N- und R-Typ Kanäle bezeichnet werden und Ca_v3 -Kanäle, auch bekannt als T-Typ Kanäle⁴⁷⁻⁵⁰.

Verschiedene Studien beschreiben die Regulation des Calciumeinstroms über die $Ca_v1.2$ -Kanäle durch PKA. So begünstigt die PKA den Calciumeinstrom über $Ca_v1.2$ -Kanäle durch die Phosphorylierung von Serin 1928 am C-Terminus des $Ca_v1.2$ -Kanals in kardialen Muskelzellen^{43,51}. Zudem wurde in Neuronen des Hippocampus beobachtet, dass die calciumabhängige Inaktivierung des Calciumkanals durch die Aktivierung der PKA und die daraus folgende Phosphorylierung des Calciumkanals reduziert wird⁴².

Während die Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals zur Aktivierung mit erhöhtem Calciumeinstrom führt, bewirkt die Dephosphorylierung des Kanals einen reduzierten Calciumeinstrom. Studien mit Neuronen aus dem Hippocampus und aus Spinalganglien der Ratte zeigten, dass die Dephosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals durch Calcineurin (CaN), einer Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-abhängigen Phosphatase, zu einer Reduzierung des Calciumeinstroms führt und maßgeblich an der calciuminduzierten Inaktivierung der $Ca_v1.2$ -Kanäle beteiligt ist^{52,53}.

Auch in nozizeptiven Neuronen erfolgt die Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals in Abhängigkeit der PKA²¹. Es wird zum ersten Mal eine mögliche Funktion des L-Typ Kanals $Ca_v1.2$ in der Regulation des Signalweges in nozizeptiven Neuronen beschrieben^{21,54}. Dieser Mechanismus scheint zudem zur Sensitivierung von nozizeptiven Neuronen beizutragen, da die wiederholte Depolarisation der Neurone eine Calcium- und PKA-abhängige Sensitivierung des $Ca_v1.2$ -Kanals bewirkt²¹.

Die Verteilung und Dichte von spannungsabhängigen Ionenkanälen auf der nozizeptiven Zellmembran, wozu auch spannungsabhängige Calciumkanäle zählen, beeinflussen unter anderem die Art und Dauer der neuronalen Aktivität¹³. Entzündungsmediatoren können Veränderungen in der Verteilung und Dichte dieser Ionenkanäle bewirken und somit die neuronale Aktivität in Folge von Gewebeschäden beeinflussen¹³.

Bisher wurden L-Typ Calciumkanäle allein mit der Regulation der Signalweiterleitung auf zentralem Niveau, beispielsweise in Spinalnerven, in Verbindung gebracht. So wurde eine erhöhte Expression von $Ca_v1.2$ -Kanälen in Spinalnerven von Ratten in einem Modell für Hyperalgesie beobachtet⁵⁵. Eine Funktion bei der Signalweiterleitung in nozizeptiven Neuronen wurde bisher nur für P/Q-, N-, T- und R-Typ Kanäle beschrieben⁵⁴. Mäuse, die keine $Ca_v2.1$ - oder $Ca_v2.3$ -Kanäle exprimieren, sind respektive weniger sensibel für inflammatorischen und neuropathischen Schmerz oder nur inflammatorischen Schmerz, was eine Funktion der P/Q- und R-Typ Kanäle in der peripheren Schmerzregulierung vermuten lässt^{56,57}. Für T-Typ Kanäle wird eine erhöhte Aktivität in nozizeptiven Neuronen in

verschiedenen Modellen für chronischen Schmerz beschrieben^{58,59}. Mäuse, die keine N-Typ Kanäle exprimieren, zeigen wiederum eine reduzierte Sensitivität für Schmerz⁶⁰.

2.4.8 TRP-Kanäle als Zielstruktur der PKA

Intrazelluläre Signalkaskaden werden durch verschiedenste Rezeptoren und Mediatoren aktiviert. Eine Rezeptorfamilie, die in Nozizeptoren exprimiert wird, stellen die *Transient Receptor Potential* (TRP)-Kanäle mit sechs Unterfamilien dar. Zu diesen sechs Unterfamilien zählen die *Transient Receptor Potential Ankyrin* (TRPA)-, *Transient Receptor Potential Canonical* (TRPC)-, *Transient Receptor Potential Melastatin* (TRPM)-, *Transient Receptor Potential Mucolipin* (TRPML)-, *Transient Receptor Potential Polycystin* (TRPP)- und die *Transient Receptor Potential Vanilloid* (TRPV)-Kanäle⁶¹. TRP-Kanäle bestehen aus sechs transmembranen Untereinheiten, die als Tetramer angeordnet sind und kationendurchlässige Poren formen⁶¹. TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, wobei insbesondere Natrium- und Calciumionen durch TRPV-Kanäle in das Zellinnere strömen.

2.4.8.1 Verschiedene TRP-Kanäle detektieren unterschiedliche Reize

TRPV1-Kanäle werden durch Hitze ab circa 43 °C, einen niedrigen pH und auch durch Capsaicin, das für die Schärfe der Chilisorte *Capsicum frutescens* verantwortlich ist, aktiviert⁶². Die Aktivierung der nicht-selektiven TRPV1-Ionenkanäle führt zu einem Calciumeinstrom in die Zelle, was wiederum zur Depolarisation der Zellmembran und der Ausschüttung von Neurotransmittern führt¹³. Inhibiert werden TRPV1-Kanäle durch intrazelluläres Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)⁶³. In Anwesenheit von Bradykinin und NGF ist der Ioneneinstrom über TRPV1-Kanäle erhöht, was sich in einer erhöhten thermischen Sensitivität widerspiegelt. Bradykinin und NGF haben eine stimulierende Wirkung auf die Phospholipase C (PLC), welche PIP₂ hydrolysiert und somit der Inhibition der TRPV1-Kanäle entgegenwirkt⁶³. TRPM8-Kanäle werden durch Kälte (8-28 °C) aktiviert. Ihre Aktivität kann des Weiteren durch Substanzen wie beispielsweise Menthol oder Icilin erhöht werden^{61,64}.

Auch TRPA1-Kanäle werden durch Kälte, Temperaturen unter 17 °C, aktiviert⁶⁵. Zusätzlich aktivieren chemische Substanzen, wie beispielsweise Senföl, TRPA1-Kanäle, sodass sie auch in der Reizaufnahme und -weiterleitung schädlicher chemischer Reize involviert sind⁶⁶.

Bhave *et al.* haben gezeigt, dass TRPV1-Kanäle einer Regulation durch PKA unterliegen. PKA phosphoryliert die TRPV1-Kanäle am Serin 116, was die Desensitivierung des TRPV1-Kanals reduziert. Hierdurch trägt PKA direkt zur Sensitivierung von Neuronen bei⁴¹. PKA könnte daher über die Regulation der TRPV1-Kanäle in nozizeptiven Neuronen eine wichtige Funktion in der Entstehung von chronischem Schmerz und Hyperalgesie einnehmen.

2.4.9 PKA wird auch durch Depolarisation aktiviert

Experimente der Arbeitsgruppe Hucho zeigten, dass PKA-II in primären sensorischen Neuronen auch durch neuronale Aktivität aktiviert werden kann ²¹.

Als Maß für die PKA-II Aktivität diene hierbei die Zugänglichkeit der phosphorylierten regulatorischen Untereinheit der PKA-II (pRII). Die pRII wird nur im aktiven Zustand durch eine Konformationsänderung frei, sodass sie mittels Immunzytochemie markiert werden kann. Hierzu wurde ein spezifischer primärer Antikörper gegen pRII wie auch ein für den primären Antikörper spezifischer, fluoreszierender, sekundärer Antikörper verwendet. Die Intensität des fluoreszierenden sekundären Antikörpers, welcher über den primären Antikörper an die pRII bindet, stellt somit ein Maß für die PKA-II Aktivität dar ⁶⁷.

Die Stimulation von Neuronen mit Kaliumchlorid (KCl) führt also auch zu einer Aktivierung der PKA-II, die vermutlich unabhängig vom cAMP Signalweg verläuft. Es wurde beobachtet, dass die depolarisationsabhängige Aktivierung der PKA-II durch einen Calciumeinstrom durch die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle Cav1.2 induziert wird. Bemerkenswert ist, dass der Calciumeinstrom durch z.B. calciumdurchlässige Ionophoren (Ionomycin) kaum zur Aktivierung der PKA-II führt ²¹. Aufgrund dieser Beobachtungen wird deutlich, dass nicht jeder Calciumeinstrom in nozizeptiven Neuronen zu einer Aktivierung der PKA-II führt.

Um die Bedeutung von intrazellulärem Calcium bei der depolarisationsinduzierten Aktivierung von PKA-II zu testen, wurden die Nozizeptoren vor der Depolarisation mit dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA-AM behandelt. Bei der Zugabe von BAPTA-AM konnte die PKA-II Aktivierung kurz nach der Depolarisation, jedoch nicht mehr nach 30 min beobachtet werden ²¹. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein lokal begrenzter Calciumeinstrom für die PKA-II Aktivierung notwendig ist und intrazelluläres Calcium keine, bzw. eine geringe Rolle bei der PKA-II Aktivierung spielt.

Es stellt sich also die Frage unter welchen Bedingungen der Calciumeinstrom in nozizeptiven Neuronen zu einer Aktivierung der PKA-II führt. Werden durch den Calciumeinstrom in nozizeptiven Neuronen möglicherweise neben aktivierenden Prozessen auch inaktivierende Prozesse angestoßen, die sogar überwiegen, wenn Calcium in einiger Entfernung der eigentlichen Aktivierungsstelle der PKA in die Zelle strömt?

Für diese inhibitorischen Prozesse kommen verschiedene Komponenten in Betracht. Inhibitoren der Adenylylzyklase (AC) und somit des cAMP Signalweges könnten einer PKA Aktivierung entgegenwirken.

In den vorausgegangenen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die PKA-II Aktivierung unabhängig von dem cAMP Signalweg verläuft ²¹.

Ein alternativer Mechanismus könnte die Regulation des Ca_v1.2-Kanals sein, bei dem Calcineurin eine wichtige Funktion einnimmt.

2.5 Calcineurin als möglicher Gegenspieler der PKA-II

Calcineurin ist eine Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-abhängige Serin/Threonin Proteinphosphatase, auch bekannt als Proteinphosphatase 2B (PP2B). Die Proteinphosphatase besteht aus einem Heterodimer aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit, respektive Calcineurin A und Calcineurin B ⁶⁸.

Als Folge eines Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration wird Calcineurin durch calciumgebundenes Calmodulin aktiviert. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert als Phosphatase verschiedene Zielproteine wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT). Durch die Dephosphorylierung von NFAT ist Calcineurin z.B. maßgeblich in der Regulation der Immunantwort involviert ⁶⁹.

Darüber hinaus zeigten Studien mit Neuronen aus dem Hippocampus und mit Spinalganglien von Ratten, dass der Calciumeinstrom über Ca_v1.2-Kanäle durch die Dephosphorylierung des Kanals durch Calcineurin reduziert wird ^{52,53}.

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass PKA-II nach Aktivierung den Ca_v1.2-Kanal am Serin 1928 phosphoryliert und den Kanal dadurch sensitiviert ^{21,40,42,43}, könnte Calcineurin eine Rolle als inaktivierender Gegenspieler der PKA durch Inaktivierung des Ca_v1.2-Kanals und folglich des lokalen Calciumeinstroms einnehmen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Calcineurin, PKA und *A kinase anchor protein 79* (AKAP79) in Neuronen aus dem Gehirn von Rindern einen gemeinsamen Komplex formen und, dass alle drei Proteine in Neuriten von Neuronen aus dem Hippocampus kolokalisiert sind. In der gleichen Arbeit wurde des Weiteren gezeigt, dass AKAP79 die Aktivität von Calcineurin inhibiert ⁷⁰. Andererseits konnte in Neuronen des Hippocampus gezeigt werden, dass die Bindung von AKAP79 an Calcineurin für die durch Calcineurin hervorgerufene Inaktivierung der Ca_v1.2-Kanäle notwendig ist ⁵². Die genaue Funktion von AKAP79/150 in der Regulation des Calciumeinstroms über Ca_v1.2-Kanäle ist daher noch nicht abschließend geklärt.

Ein weiterer Hinweis für die Interaktion von Calcineurin und dem Ca_v1.2-Kanal liefert die Stringdatenbank: Die katalytische Untereinheit der α -Isoform von Calcineurin (PPP3CA) wird in der Stringdatenbank als direkter Interaktionspartner der Untereinheit alpha-1C des Ca_v1.2-Kanals (CACNA1C) gelistet ⁷¹. Folglich könnte Calcineurin tatsächlich als regulatorisches Element des Ca_v1.2-Kanals in Betracht kommen.

Die Involvierung von AKAP79/150 bei der Regulation der Ca_v1.2-Kanäle in verschiedenen neuronalen Zellen lässt ebenso eine Funktion von AKAP79/150 in nozizeptiven Neuronen

vermuten. Möglicherweise scheint die Lokalisation von PKA und Calcineurin gegenüber dem $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal für den Regulationsmechanismus von Bedeutung zu sein, wobei AKAP79/150 als verbindendes Element gesehen werden könnte. So könnte PKA allein aktiviert werden, wenn eine direkte Nähe zum Calciumeinstrom besteht, beispielsweise durch die Bindung von AKAP79/150.

Wenn Calcium allerdings über einen alternativen Weg in die Zelle strömt und PKA nicht durch einen Komplex in der Nähe des Calciumeinstroms lokalisiert ist, könnte Calcineurin, welches nicht im Komplex mit PKA-II organisiert ist, die $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle inaktivieren bevor PKA aktiviert werden kann.

Verschiedene Studien legen nahe, dass ein Zusammenhang mit der Regulation der Phosphorylierung durch die PKA und Calcineurin in Neuronen bestehen könnte, der von der räumlichen Anordnung der Proteine untereinander und gegenüber der Zielstrukturen abhängig sein könnte^{52,70}.

Es kann also vermutet werden, dass Calcineurin auch in Nozizeptoren eine regulatorische Funktion als inaktivierender Gegenspieler der PKA durch Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals und folglich des lokalen Calciumeinstroms haben könnte.

2.5.1 Calcineurin wird in nozizeptiven Neuronen exprimiert

Abhängig von dem Gewebe, in dem Calcineurin exprimiert wird, liegen die Untereinheiten des Calcineurins in verschiedenen Isoformen vor. Für die katalytische Untereinheit, Calcineurin A, können drei verschiedene Isoformen unterschieden werden: α , β und γ . Die Isoformen α und β werden in humanen sowie murinen neuronalen Zellen exprimiert, wohingegen die Isoform γ in humanen und murinen Zellen des Testis exprimiert wird⁷²⁻⁷⁵. Diese Untereinheiten werden in Säugetieren respektive durch die Gene PPP3CA/Ppp3ca, PPP3CB/Ppp3cb und PPP3CC/Ppp3cc kodiert, wobei die durchgängig großgeschriebene Bezeichnung die humanen Gene und die andere Variante die murinen Gene repräsentiert⁷⁶⁻⁸¹. Calcineurin A ist unter eukaryotischen Organismen hoch konserviert, sodass Calcineurin A aus einer katalytischen Domäne, einer Calcineurin B-bindenden Domäne, einer Calmodulin-bindenden Domäne und einer autoinhibitorischen Domäne besteht, welche an das aktive Zentrum bindet, wenn Calcium und Calmodulin nicht gebunden sind und Calcineurin somit nicht aktiv ist⁸²⁻⁸⁷. Aus den jeweiligen Domänen von Calcineurin A können somit auch die verschiedenen Funktionen von Calcineurin A abgeleitet werden. Die Isoform γ von Calcineurin A scheint in der Motilität von Spermien involviert zu sein⁸⁸.

Auch die regulatorische Untereinheit des Calcineurins, Calcineurin B, liegt in zwei verschiedenen Isoformen vor: $\beta1$ und $\beta2$, welche wiederum durch die Gene PPP3R1/Ppp3r1 und PPP3R2/Ppp3r2 kodiert werden⁸⁹⁻⁹³. Die Isoform $\beta1$ wird in allen Zellen exprimiert, während die Isoform $\beta2$ nur in Zellen des Testis exprimiert wird⁹⁴.

Calcineurin B ist für die Bindung von Calcium und Calcineurin und damit für einen Teil der Aktivierung von Calcineurin verantwortlich und enthält vier Calciumbindungs-EF-Hand-Motive (Helix-Loop-Helix Motive) ⁹⁵.

Die Analyse der Calcineurinexpression in murinen nozizeptiven Neuronen bestätigt, dass Calcineurin in allen nozizeptiven Neuronen exprimiert wird. Hierbei scheinen vor allem die Untereinheiten Ppp3ca/b, also die Isoformen α und β der katalytischen Untereinheit, und Ppp3r1, die Isoform β 1 der regulatorischen Untereinheit, in murinen Nozizeptoren zu dominieren (Abb. 3) ⁹⁶⁻⁹⁸.

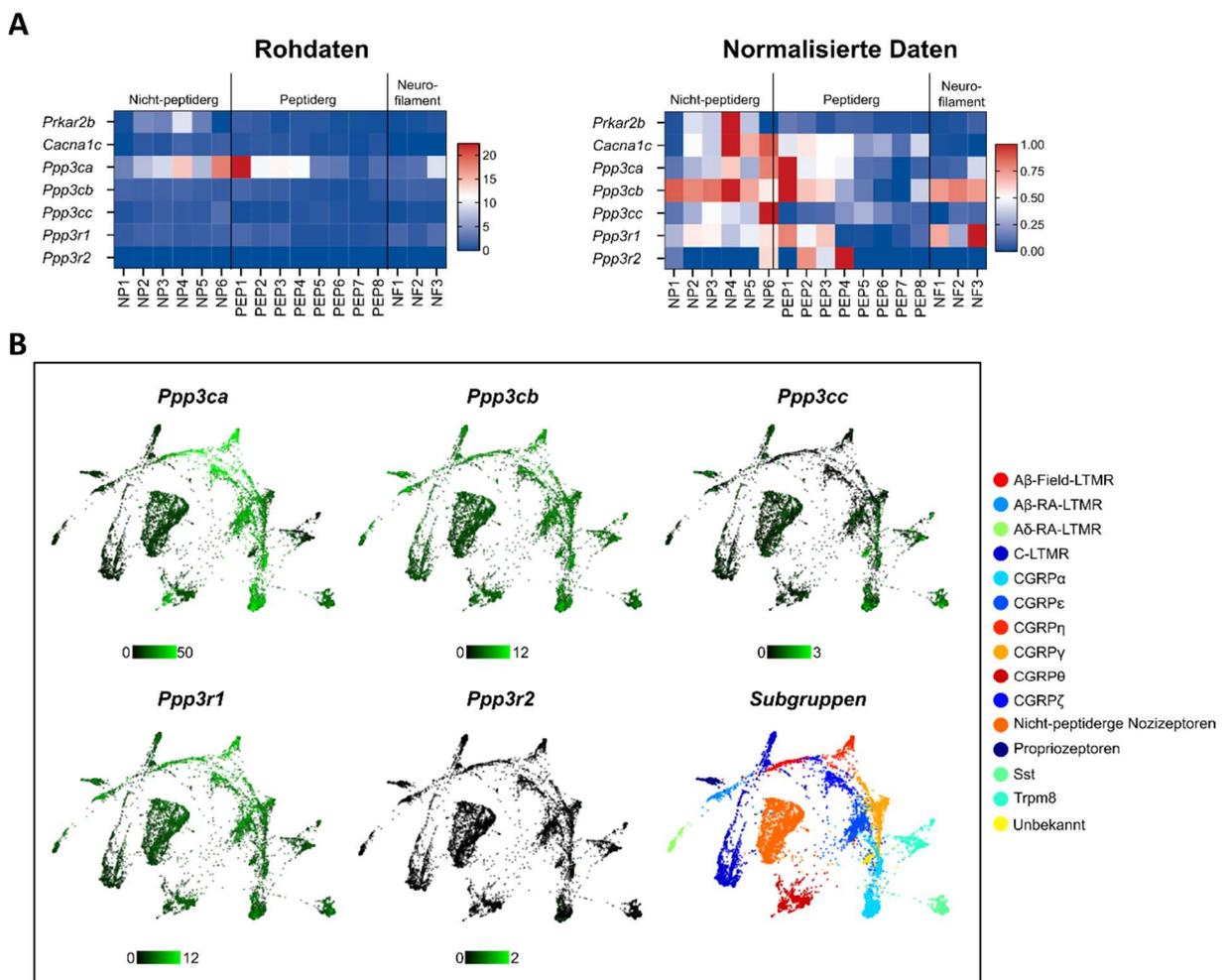


Abb. 3: Calcineurinexpression in primären sensorischen Neuronen. A: Heatmap der unnormalisierten (links) und normalisierten (rechts) mittleren Readcounts der PKA-II regulatorischen Untereinheit beta (*Prkar2b*), *Ca_v1.2* und Untereinheiten von Calcineurin aus Einzelzell-RNA-Sequenzierungen verschiedener Subpopulationen primärer sensorischer Neurone ^{21,96,97}. **B:** Verteilung der Expression der Calcineurinisoformen in den verschiedenen Subpopulationen primärer sensorischer Neurone ⁹⁸. Abbildung erstellt und zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Jörg Isensee.

2.6 Calcineurininhibitoren und Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome (CIPS)

Calcineurininhibitoren werden als Immunsuppressiva vielfach nach Organtransplantationen eingesetzt, um einer Abstoßungsreaktion des Körpers gegen das Transplantat vorzubeugen⁹⁶. Die in der Klinik geläufigen Calcineurininhibitoren sind Cyclosporin A und Tacrolimus, auch als FK506 bezeichnet, welche über unterschiedliche Mechanismen Calcineurin und somit die Aktivierung von T-Zellen inhibieren^{96,99}.

Cyclosporin A und Tacrolimus inhibieren Calcineurin durch sekundäre Proteine. Cyclosporin A bindet im Zytosol an Cyclophiline und Tacrolimus bindet ebenfalls im Zytosol an FK506-bindende Proteine (FKBPs). Die Komplexe aus Cyclosporin A und Cyclophilinen und Tacrolimus und FKBPs binden und inhibieren Calcineurin^{82,99}.

Durch die Inhibierung von Calcineurin wird der Transkriptionsfaktor NFAT nicht dephosphoryliert, wodurch die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern nicht erfolgt. Somit können für die Immunantwort essentielle Gene nicht transkribiert werden und die Immunantwort wird gehemmt^{69,100}.

Die Beschreibung eines Schmerzsyndroms bei Patienten, die mit Calcineurininhibitoren behandelt werden, unterstreicht die vermutete regulatorische Funktion von Calcineurin in der Reizaufnahme bzw. –weiterleitung auch von Schmerzen.

Bei bis zu 17 % der Patienten, die entweder mit Cyclosporin A oder Tacrolimus behandelt werden, werden symmetrische, bilaterale Schmerzen in den unteren Extremitäten beobachtet¹⁰¹⁻¹⁰³. Dieses Schmerzsyndrom, welches in Abhängigkeit von der Behandlung mit Calcineurininhibitoren auftritt, wird daher als *Calcineurin-inhibitor Induced Pain Syndrome* (CIPS) bezeichnet.

Die auftretenden Schmerzen sind neuropathischer Natur und gehen mit einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit und elektrischen Missempfindungen einher¹⁰⁴. CIPS entsteht innerhalb von ein bis drei Monaten nach Therapiestart mit Calcineurininhibitoren, wobei eine Besserung der Symptome bei Reduzierung der Dosis der Calcineurininhibitoren beobachtet wurde^{103,105}.

In Fallstudien wird der Einsatz von Dihydropyridin-Calciumkanalblockern als effiziente Therapie beschrieben, wodurch eine Rolle von L-Typ Calciumkanälen in der Schmerzentstehung vermutet werden kann^{96,106}.

2.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Chronischer Schmerz erzeugt einen hohen Leidensdruck für alle Betroffenen. Die momentan zur Verfügung stehenden Therapieansätze sind in ihrer Effektivität begrenzt^{5,6}. Während die Rolle der zentralen Sensitivierung bei der Entstehung von chronischem Schmerz beschrieben wurde, werfen die Mechanismen auf peripherer Ebene noch viele Fragen auf. Im Hinblick auf die Entwicklung von neuen Therapien, ist daher das Verständnis der molekularen Grundlagen von essentieller Bedeutung.

Die Arbeitsgruppe Hucho konnte zeigen, dass die Depolarisation nozizeptiver Neurone über einen Calciumeinstrom durch den L-Typ Kanal $Ca_v1.2$ zur Aktivierung der Kinase PKA-II führt. Diese depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA-II bewirkte wiederum eine Zunahme der Phosphorylierung von Serin 1928 des $Ca_v1.2$ -Kanals was unter anderem auch mit einer Sensitivierung des $Ca_v1.2$ -Kanals in Verbindung gebracht wird. *In vivo* führt dieser Mechanismus zur Entstehung von mechanischer Hyperalgesie²¹. Die durch den $Ca_v1.2$ -Kanal vermittelte, depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA-II könnte daher einen sich selbst verstärkenden Mechanismus darstellen, der ektopischer Aktivität der nozizeptiven Neuronen und damit einer Chronifizierung von Schmerzen zugrunde liegt.

Im Gegensatz zu dem durch den $Ca_v1.2$ -Kanal vermittelten Calciumeinstrom, führt der Calciumeinstrom über Ionomycin nicht zur Aktivierung der PKA-II²¹. Es stellt sich also die prinzipielle Frage, was den Calciumeinstrom über den $Ca_v1.2$ -Kanal von einem Calciumeinstrom durch Ionomycin unterscheidet.

Ferner ist nicht bekannt, ob Calciumeinstrom über alternative Wege wie beispielsweise über den TRPV1- oder den TRPA1-Kanal zur Aktivierung von PKA-II führt.

In anderen Zellmodellen vermittelt Calcineurin calciumabhängig die Dephosphorylierung von $Ca_v1.2$ an Serin 1928 und stellt somit den Gegenspieler der $Ca_v1.2$ -PKA-Phosphorylierung dar^{52,53}. Wir vermuten, dass Calcineurin in nozizeptiven Neuronen die Funktion eines negativen Regulators der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung einnimmt, der in Abhängigkeit der Lokalisation des Calciumeinstroms die PKA-II Aktivität reguliert. Wir vermuten also, dass ein zum $Ca_v1.2$ -Kanal alternativer Calciumeinstrom zur calciumabhängigen Aktivierung von Calcineurin führt, sodass die $Ca_v1.2$ -Kanäle möglicherweise durch Dephosphorylierung von Serin 1928 inaktiviert werden, bevor die PKA-II Aktivierung erfolgen kann (Abb. 4). Sobald Calcium durch Ionomycin oder TRP-Kanäle in die Zelle strömt, könnte Calcineurin bereits vor der Aktivierung der PKA-II den $Ca_v1.2$ -Kanal dephosphorylieren, sodass die Aktivierung der PKA-II nicht erfolgt.

Könnte Calcineurin als möglicher negativer Regulator der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung den Unterschied zwischen der über den $Ca_v1.2$ medierten depolarisationsinduzierten, also durch lokalen Calciumeinstrom vermittelten, und der

Ionomycin-depolarisationsinduzierten, also durch entfernten Calciumeinstrom vermittelten, PKA-II Aktivierung begründen?

Womöglich könnte die negativ-regulierende Funktion von Calcineurin auf die depolarisationsinduzierte PKA-II Aktivierung auch die schmerzinduzierende Wirkung der Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A auf molekularem Niveau erklären.

Ziel der Arbeit ist es daher, zu untersuchen,

- 1) ob Calcineurin den Unterschied zwischen der durch KCl induzierten und der durch Ionomycin nicht induzierten PKA-II Aktivierung begründen kann,
- 2) ob die TRP-Agonisten Capsaicin und Allylthiocyanat (AITC), auch bekannt als Senföl, zu Aktivierung von PKA-II führen und
- 3) ob Inhibitoren von Calcineurin die PKA-II Aktivierung modulieren.

Wenn Calcineurin den Unterschied zwischen dem Cav1.2-Kanal vermittelten und dem Ionomycin vermittelten Calciumeinstrom auf die PKA-II Aktivierung begründen kann, erwarten wir, dass die Behandlung von nozizeptiven Neuronen mit Calcineurininhibitoren zu PKA-II Aktivierung durch Ionomycin vermittelten Calciumeinstrom führt. Ebenso erwarten wir, dass TRP-Kanal induzierte Depolarisation zu PKA-II Aktivierung führt und, dass die Behandlung mit Calcineurininhibitoren die PKA-II Aktivität bei TRP-Kanal-induzierter Depolarisation modulieren könnte. Da wir vermuten, dass Calcineurin seine inhibitorische Wirkung durch die Dephosphorylierung von Serin 1928 ausübt, erwarten wir eine stärkere Phosphorylierung von Serin 1928 in nozizeptiven Neuronen, wenn diese vor einer Stimulation des Calciumeinstroms mit Calcineurininhibitoren behandelt wurden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Nährmedien, Zusätze und Reagenzien

Tabelle 1: Für die Zellkultur verwendete Nährmedien.

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

Tabelle 2: Zusätze für die verwendeten Nährmedien.

Zusätze	Verdünnung; Herstellung	Hersteller	Kat.-Nr.
B-27 Supplement	1:50	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#17504
L-Glutamat	1:270,3; gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#G8415
L-Glutamin	1:400; gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 200 nM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#G6392
Penicillin/Streptomycin	1:100	Lonza, Basel, Schweiz	#DE17-802E

Tabelle 3: Reagenzien für die Zellkultur und Immunzytochemie.

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

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

3.1.2 Calcineurininhibitoren

Tabelle 4: Für die Prästimulation verwendeten Calcineurininhibitoren.

Calcineurininhibitor	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
Cyclosporin A	50 mM (20 mg gelöst in 328,9 µl Dimethylsulfoxid (DMSO))	1,5625 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 10 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich	#1101
Tacrolimus (FK506)	50 mM (10 mg gelöst in 243,3 ml DMSO)	10 µM	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich	#3631

3.1.3 Stimulanzen

Tabelle 5: Für die Stimulation verwendeten Substanzen.

Stimulanz	Stimulierter Rezeptor/Kanal	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
Allylisothiocyanat (AITC), Senföl	TPRPA1	10 M	10 mM, 100 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#377430
Capsaicin (Cap)	TRPV1	10 mM (1 mg gelöst in 327,5 µl DMSO)	1 µM, 10 µM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#M2028
Ionomycin	-	1 mM in DMSO	1 µM, 3 µM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#I3909-1ml

Kaliumchlorid (KCl)	-	3 M	40 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#104936
------------------------	---	-----	-------	---	---------

3.1.4 Primäre Antikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie.

Antikörper	Spezies	Epitop	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
ch-PGP	Huhn	UCLH- 1/PGP 9.5	Polyklonal	1:2000	Novus, Cambridge, UK	#NB110- 58872
mo-CGRP	Maus	GCRP, clone 4901	Monoklonal	1:500	Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland	#orb319478
mo-pERK1/2	Maus	Phospho- p44/42 MAPK (Erk1/2), Thr202/T yr204 (E10)	Monoklonal	1:250	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	#9106L
rb-Cav1.2	Kaninchen	Phospho- Ser1928	Polyklonal	1:1000	Covalab, Villeurbanne, Frankreich	#pab0692
rb-pERK1/2	Kaninchen	Phospho- p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Ty204)	Monoklonal	1:500	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	#4370L
rb-pRII	Kaninchen	Phospho- RII α , Ser99, Clone 151	Monoklonal	1:1000	Abcam, Cambridge, UK	#ab32390

3.1.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie.

Antikörper	Spezies	Epitop	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
gt-A488-ch Plus	Ziege	Huhn IgY	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32931
gt-A555-rb Plus	Ziege	Kaninchen IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32732
gt-A647-mo Plus	Ziege	Maus IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#A32728
Hoechst 34580	-	-	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	#63493

3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial.

Gerät/Material	Hersteller	Kat.-Nr.
70 %-iges Ethanol	Fischar, Saarbrücken, Deutschland	#225183
8-Kanal Pipette, 5-100 µl, Eppendorf Xplorer®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	#4861000120
96-Kammer Platte	Greiner, Kremsmünster, Österreich	#655896
Aluminiumfolie	Corning, Corning, USA	#6569
CellInsight CX7 LZR Plattform (<i>High Content Screening</i> -Mikroskop)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#CX7A1110LZR
Chirurgische Schere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#91401-14
Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High-Performance, 0.2-2 µl	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5258
Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High-Performance, 100-1000 µl	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5265
Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High-Performance, 20-200 µl	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5263
Einkanalpipette, mechanisch, Ergonomic High-Performance, 2-20 µl	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#613-5260
Euthanasiekammer	BioMedical Instruments, Zöllnitz, Deutschland	
Falcon® Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Corning, Corning, USA	#352096

Falcon® Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Corning, Corning, USA	#352070
Feine, gerade Schere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#14040-10
Friedman-Pearson Rongeur	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#16021-14
Gebogene Pinzette	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#11297-10
Gerade Federschere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#91500-09
Gerade Pinzette	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#11295-51
Gewebspinzette	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#11022-14
Guillotine	Ugo Basile srl, Gemonio, Italien	#51330
HERACell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#50116047
Kleinlumige feuerpolierte, silikonbeschichtete Pasteurpipette	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	#747720
Littauer Knochenschere	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#16152-11
Normallumige feuerpolierte, silikonbeschichtete Pasteurpipette	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	#747720
Orbitor RS2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	#ORB2002
Petrischale, 4 cm Durchmesser	vwr™, Radnor, Pennsylvania, USA	#TPPA93040
Photometrics X1 CCD, 14- Bit Kamera	Teledyne Photometrics, Tucson, Arizona, USA	
Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland	#26300
Plan NeoFluar™ System Standard Olympus™ Objektiv (10x, 0,30 NA)	Olympus Corporation, Tokio, Japan	
Sicherheitsbunsenbrenner, Fireboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz	
Skalpellhalter	Fine Science Tools Incorporation, North Vancouver, B.C., Kanada	#10003-12
Skalpellklinge Feather Nr. 10	Pfm medical Institut eGmbH, Köln, Deutschland	#201000010
Stereomikroskop SMZ-171	Motic, Kowloon Bay, Hongkong	
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	

Tischzentrifuge Rotina 48 R, Rotor TX-500	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland	
V-förmige Mikrotestplatten	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland	#10-111-000

3.1.7 Software

Table 9: Verwendete Software.

Programm	Version	Entwickler
Cellomics, HCS Studio Cell Analysis Software	6.6.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fiji - ImageJ	1.53c	Wayne Rasband National Institutes of Health, USA ¹⁰⁷
GraphPad Prism	6	GraphPad Software, San Diego, California, USA
Inkscape	1.0.2	Inkscape-Projekt
R	4.0.2.	© The R Foundation (Team, 2018)

3.2 Methoden

Alle Experimente wurden mit Ausnahme einer Versuchsreihe vier Mal repliziert. Die betreffende Versuchsreihe (Absatz 4.1.5) wurde acht Mal repliziert, da die Negativkontrolle in den ersten vier Replikaten auch eine Intensitätssteigerung zeigte und daher nicht als Referenz dienen konnte. Schließlich wurde diese Versuchsreihe gänzlich wiederholt, da die Intensitätssteigerung der Negativkontrolle weiterhin zu beobachten war.

3.2.1 Versuchstiere

Die Haltung und Verwendung der Versuchstiere erfolgte konform zum geltenden Tierschutzgesetz (TierSchG) und der darauf basierenden Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) unter der Tierversuchsgenehmigungsnummer 84-02.05.20.13.045. Weibliche und männliche Wildtyp Mäuse der Linie C57BL/6N (18,60-27,64 g, 7-14 Wochen alt) und weibliche und männliche Wildtyp Sprague-Dawley Ratten (236-450 g) von Harlan (Rossdorf, Deutschland) wurden in temperatur- und luftfeuchtigkeitsregulierten Räumlichkeiten der Tierhaltung der Universität zu Köln gehalten. Die Ratten und Mäuse hatten einen 12-Stunden Tag/Nacht-Zyklus und wurden mit Wasser und Nahrung *ad libitum* versorgt.

3.2.1.1 Präparation von Mäusen

Die Mäuse wurden durch einen langsamen Kohlenstoffdioxid-(CO₂)-Anstieg anästhesiert und anschließend durch CO₂-Intoxikation getötet. Nach Feststellung des Todes wurden sie mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und mithilfe einer Guillotine enthauptet. Durch kleine Pumpbewegungen auf den Thorax der Maus wurde ein Ausbluten erzielt. Dorsal wurde die Cutis mithilfe einer chirurgischen Schere von kranial nach kaudal abgespalten. Nachfolgend wurden die Scapulae mit einer feinen, geraden Schere mit einem Schnitt vom Thorax gelöst, sodass sie nach außen geklappt und fixiert werden konnten. Der Spinalkanal wurde durch bilaterale Schnitte durch den jeweiligen Arcus vertebrae mithilfe der feinen, geraden Schere und einer Gewebspinzette V-förmig eröffnet. Anschließend wurde die Wirbelsäule mitsamt Rückenmark komplett entnommen und fixiert. Das Rückenmark wurde entfernt und alle zervikalen, thorakalen und lumbalen Spinalganglien wurden unter dem Mikroskop mit einer gebogenen Pinzette und einer geraden Federschere entnommen. Die Spinalganglien wurden innerhalb von 45-60 min entfernt, um sie schnellstmöglich in ideale Zellkulturbedingungen zu bringen.

3.2.1.2 Präparation von Ratten

Die Ratten wurden durch einen langsamen CO₂-Anstieg anästhesiert und anschließend durch CO₂-Intoxikation getötet. Nach Feststellung des Todes wurden sie mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und mithilfe einer Guillotine enthauptet. Durch Pumpbewegungen auf den Thorax der Ratte wurde ein Ausbluten erzielt. Die Cutis wurde dorsal oberhalb der Wirbelsäule mithilfe eines Skalpells von kranial nach kaudal eingeschnitten und seitlich von der Subcutis gelöst. Anschließend wurde das Muskelgewebe rechts und links paravertebral im gesamten Verlauf der Wirbelsäule eingeschnitten. Durch einen horizontalen Schnitt wurden die Muskeln oberhalb der Wirbelsäule durchtrennt. Die Faszie der Muskeln dorsal der Wirbelsäule wurde mithilfe des Friedman-Pearson Rongeurs entfernt. Daraufhin wurde die Wirbelsäule durch bilaterale Schnitte durch den jeweiligen Arcus vertebrae mithilfe einer Littauer Knochenschere eröffnet. Das Rückenmark wurde entfernt und alle zervikalen, thorakalen und lumbalen Spinalganglien wurden unter dem Mikroskop mit einer gebogenen Pinzette und einer geraden Federschere entnommen. Die Spinalganglien wurden innerhalb von 60-80 min entfernt, um sie schnellstmöglich in ideale Zellkulturbedingungen zu bringen.

3.2.2 Zellkultur primärer sensorischer Neurone

Alle murinen Spinalganglien wurden in einer 4 cm Petrischale mit 2,5 ml *Minimal Essential Medium* (MEM) gesammelt und in 2,5 ml Neurobasal A Medium angereicht mit B-27 Supplement (1:50), L-Glutamin (1:400 gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 200 mM), L-Glutamat (1:270,3 gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml) und Penicillin/Streptomycin (1:100) überführt.

Die Spinalganglien von Ratten wurden in zwei 4 cm Petrischalen mit je 2,5 ml *Minimal Essential Medium* (MEM) gesammelt. Überflüssige Gewebeshüllen rundum die Spinalganglien wurden mithilfe einer gebogenen und geraden Pinzette entfernt, wonach die Spinalganglien jeder Seite jeweils in 2,5 ml Neurobasal A Medium angereichert mit B-27 Supplement (1:50), L-Glutamin (1:400 gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 200 mM), L-Glutamat (1:270,3 gelöst in Zellkulturwasser mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml) und Penicillin/Streptomycin (1:100) überführt wurden.

Anschließend wurden die Spinalganglien für 60 min mit 100 µl Kollagenase (f.c. = 10 U/ml) bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Die Spinalganglien wurden mithilfe einer normallumigen feuerpolierten und silikonbeschichteten Pasteurpipette mitsamt 2,5 ml des angereicherten Mediums in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches bereits 2,5 ml angereichertes Medium enthielt. Nach dem Absinken der Spinalganglien auf den Boden des Zentrifugenröhrchens innerhalb von 30 s wurden die Spinalganglien mit 2,5 ml Medium in ein weiteres 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Spinalganglien wurden in zwei Schritten mit einer normallumigen und anschließend mit einer kleinlumigen feuerpolierten und

silikonbeschichteten Pasteurpipette dissoziiert. Im ersten Schritt wurden die Spinalganglien 10 Mal mit der normallumigen feuerpolierten und silikonbeschichteten Pasteurpipette auf- und abpipettiert. Nachdem das noch nicht dissoziierte Gewebe für 30 s auf den Boden sinken konnte, wurde das Supernatant in ein drittes 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Im zweiten Schritt wurden die restlichen Spinalganglien mit dem Rest des angereicherten Mediums aus dem ersten Zentrifugenröhrchen (insgesamt 5 ml) und der kleinumigen feuerpolierten und silikonbeschichteten Pasteurpipette 10 Mal auf- und abpipettiert. Die dissoziierten Spinalganglien wurden anschließend mit der kleinumigen Pasteurpipette in einem neuen, schräggehaltenen 15 ml Zentrifugenröhrchen auf einen 15 %-igen bovinen Serumalbumin (BSA)-Gradienten (750 µl 30 %-iges BSA (12 g BSA in 40 ml Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)) und 850 µl angereichertes Neurobasal A Medium) aufgetragen. Für die Dissoziation der Spinalganglien von Ratten wurden vier dieser Gradienten hergestellt, auf welche die in dem Medium gelösten Neuronen gleichmäßig aufgetragen wurden. Durch Zentrifugation (120 g, 8 min, Tischzentrifuge Rotina 48 R, Rotor TX-500, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) wurden Axone und Zellreste von den Spinalganglien getrennt und entfernt. Das Spinalganglien-Zellpellet wurde mit der kleinumigen Pasteurpipette in 1 ml angereichertem Neurobasal A Medium resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde erneut so viel angereichertes Neurobasal A Medium hinzugefügt, sodass für die gesamte Anzahl der zu besäenden Zellkulturkammern (maximal 64 Kammern mit einer finalen Zelldichte von 200-1100 Neuronen pro Kammer) ausreichend Zellsuspension vorhanden war (100 µl pro Kammer). Folglich wurden 100 µl der Zellsuspension in 0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin / 5 µg/ml Laminin beschichteten 96-Kammer Platten (Greiner, Kremsmünster, Österreich, #655896) mithilfe einer 8-Kanal Pipette ausgesät und über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

3.2.3 Stimulation primärer sensorischer Neurone

Die Stimulation und Fixierung der Neurone in den 96-Kammer Platten erfolgte auf vorgewärmten Wärmeblöcken (37 °C). Für die Prästimulation und Stimulation wurden jeweils 12,5 µl der Stimulanzen in V-förmige 96-Kammer Mikrotestplatten pipettiert. Hierbei betrug die Konzentration der Stimulanzen in den Kammern der V-förmigen Mikrotestplatten das 10-Fache der Endkonzentration der Stimulanzen. Für die Prästimulation und Stimulation wurden jeweils 50 µl des angereicherten Neurobasal A Mediums aus der 96-Kammer Platte mit den Zellen in die V-förmige Mikrotestplatte pipettiert. Durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren der 50 µl in der V-förmigen Mikrotestplatte wurde das Medium mit den Stimulanzen gemischt und 50 µl wurden zurück in die 96-Kammer Platte mit den Zellen pipettiert. Die genaue zeitliche Abfolge der Prästimulation und Stimulation erfolgte nach einem strikten Zeitplan. Zwischen der Prästimulation und Stimulation wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Negativkontrollen wurden nach dem gleichen Verfahren behandelt, allerdings nur mit Puffern und Lösungsmitteln ohne Zusatz der Stimulanzen.

3.2.3.1 Prästimulation mit Calcineurininhibitoren

Primäre sensorische Neurone wurden für Dosis-Antwort Experimente mit verschiedenen Konzentrationen (0-50 μM) der Calcineurininhibitoren Cyclosporin A oder Tacrolimus (FK506) für 30 min prästimuliert.

Für kinetische Experimente wurden die Zellen mit je 10 μM Cyclosporin A oder Tacrolimus für 30 min prästimuliert, bevor die Stimulanzen zu den Zellen hinzugefügt wurden.

Vorherige, teils noch unveröffentlichte Experimente der Arbeitsgruppe dienten als Grundlage für die verwendeten Konzentrationen der Calcineurininhibitoren ²¹.

3.2.3.2 Stimulation mit Calciueinstrom-induzierenden Substanzen

Um den Calciueinstrom in die nozizeptiven Neurone zu induzieren, wurden die nozizeptiven Neurone mit verschiedenen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen für 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min nach der Prästimulation stimuliert.

Für die Induzierung des Calciueinstroms über den TRPV1-Kanal wurden die nozizeptiven Neurone mit 1 oder 10 μM Capsaicin für die angegebene Zeitspanne behandelt. Basis für die Auswahl der geeigneten Capsaicinkonzentration waren vorherige, teils unveröffentlichte Experimente der Arbeitsgruppe mit Capsaicin und primären sensorischen Neuronen von Ratten ³⁰.

Für die Induzierung des Calciueinstroms über den TRPA1-Kanal wurden die Zellen mit 10 oder 100 mM Allylisothiocyanat (AITC) für die angegebene Zeitspanne behandelt. Zuvor wurden primäre sensorische Neurone von Ratten in einem Dosis-Antwort Experiment nach 30-minütiger Prästimulation für 15 min mit 0, 0,001, 0,01, 1, 10 und 100 mM AITC stimuliert. Da AITC flüchtig ist, wurden die jeweiligen Zellkulturkammern sofort nach der Zugabe von AITC mit undurchlässiger Aluminiumfolie versiegelt, sodass gasförmiges AITC keinen Einfluss auf noch unbehandelte Zellkulturkammern ausüben konnte.

Für die Induzierung des Calciueinstroms über Ionomycin wurden die sensorischen Neurone nach 30-minütiger Prästimulation mit den Calcineurininhibitoren auf Basis früherer Studien für 0-120 min mit 1 und 3 μM Ionomycin stimuliert ²¹.

Als Negativkontrolle wurde jeweils DPBS mit der entsprechenden Dimethylsulfoxid (DMSO) Konzentration verwendet, welche auch bei den Prästimulanzen bzw. den Stimulanzen vorlag. So wurde 0,1 %-iges DMSO in DPBS als Negativkontrolle für die Prästimulation verwendet.

Für die Positivkontrolle wurden die nozizeptiven Neurone für 30 min mit 40 mM KCl stimuliert.

3.2.4 Fixierung der primären sensorischen Neurone

Nach der Stimulation wurden die Zellen fixiert, indem 100 µl 8 %-iges Paraformaldehyd (PFA) in jede Zellkulturkammer pipettiert und mit dem Medium durchmischt wurden, sodass die Endkonzentration in jeder Kammer 4 % PFA betrug. Nach 5 min wurde das Medium mit dem PFA erneut durchmischt und 100 µl der Medium/PFA-Lösung wurden entfernt. Nach weiteren 5 min wurden die restlichen 100 µl der Medium/PFA-Lösung durch 100 µl DPBS ersetzt und nach 10 min wurden die Zellen mit 100 µl DPBS für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen.

3.2.5 Immunzytochemie

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 50 µl der Blockierungslösung (2 % normales Ziegenserum (NGS), 1 % BSA (10 g BSA in 1000 ml DPBS), 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween 20 in DPBS) für 60 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Blockierungslösung wurde aspiriert und die Zellen pro Kammer mit 30 µl der primären Antikörper gelöst in 1 %-igen BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Identifikation von primären sensorischen Neuronen wurden die Zellen mit einem primären Antikörper spezifisch für Ubiquitin-Carboxy-Terminal-Hydrolase L1 (UCHL1) behandelt. Als Marker für die PKA-II Aktivierung wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch an die phosphorylierte regulatorische Untereinheit der PKA-II bindet und nur dann binden kann, wenn die PKA-II im phosphorylierten, also aktivierten Zustand vorliegt⁶⁷. ERK1/2, welche im Anschluss einer PKA-II Aktivierung phosphoryliert werden³⁶, sowie phosphoryliertes Serin 1928 wurden ebenso mit spezifischen primären Antikörpern gebunden. Für die Visualisierung der Zellkerne wurde der DNA-bindende Farbstoff Hoechst 34580 verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 100 µl DPBS für jeweils 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 50 µl der sekundären Antikörper gelöst in DPBS (1:1000) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum drei Mal mit 100 µl DPBS für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gewaschen. Bei dem letzten Waschschrift wurden nochmals 100 µl DPBS pro Kammer hinzugefügt, sodass sich schließlich 200 µl DPBS in jeder Kammer befanden. Nach dem Waschen wurden die 96-Kammer Platten mit einer selbstklebenden, lichtundurchlässigen Aluminiumfolie verschlossen und bis zum Scannen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.5.1 Primäre Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurden für die Experimente verwendet: Huhn polyklonal anti-UCHL1 (1:2000, Novus, Cambridge, UK, #NB110-58872), Kaninchen monoklonal anti-phosphoRilα (Ser99) (1:1000, clone 151, Abcam, Cambridge, UK, #ab32390), Maus monoklonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:250, New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, #9106L), Maus

monoklonal IgG2a anti-CGRP (1:500, clone 4901, Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland, #orb319478),

Kaninchen monoklonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Ty204) (1:500, New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, #4370L) und

Kaninchen polyklonal anti-Cav1.2 (1:1000, Phospho-Ser1928, Covalab, Villeurbanne, Frankreich, #pab0692).

3.2.5.2 Sekundäre Antikörper

Folgende sekundäre Antikörper wurden für die Experimente verwendet: Alexa plus 488 Ziege anti-Huhn IgY (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #A32931), Alexa plus 555 Ziege anti-Kaninchen IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #A32732), Alexa plus 647 Ziege anti-Maus IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #A32728) und Hoechst 34580 (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #63493).

3.2.6 High content screening (HCS)-Mikroskopie

Um die PKA-II Aktivierung in primären sensorischen Neuronen zu quantifizieren, wurde die *High Content Screening (HCS)*-Mikroskopie eingesetzt. Die in den 96-Kammer Platten kultivierten primären sensorischen Neurone wurden innerhalb von drei Tagen nach der immunzytochemischen Färbung mithilfe der *High Content Screening (HCS)*-Plattform CellInsight CX7 LZR, des Roboters Orbitor RS2 und der zugehörigen HCS-Software HCS Studio 6.6.2 Cell Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gescannt.

Pro Zellkulturkammer wurden 49 Bildareale mit 10-facher Vergrößerung und einer Auflösung von 1104 x 1104 Pixeln (2 x 2 Binning) mit dem Plan NeoFluar™ System Standard Olympus™ Objektiv (10x, 0,30 NA, Olympus Corporation, Tokio, Japan) aufgenommen.

Hierfür wurde die in der CellInsight CX7 LZR Plattform enthaltene Photometrics X1 CCD, 14-Bit Kamera (Teledyne Photometrics, Tucson, Arizona, USA) und die integrierte Laserbeleuchtung verwendet.

Die einzelnen Objekte, primäre sensorische Neurone, wurden, wie von Isensee *et al.* beschrieben, identifiziert und quantifiziert. In Kürze: Für die Identifizierung der primären sensorischen Neurone wurden die Bilder der UCHL1 Färbung bezüglich des Hintergrundes durch einen Tiefpassfilter korrigiert, zu binären Bildmasken konvertiert (festgesetzter Schwellenwert), geometrisch segmentiert und schließlich wurden die Neurone auf Basis ihrer Größe (Mäuse: 80-7500 μm^2 , Ratten: 164-7500 μm^2), der Form (Mäuse und Ratten: $1-3 \text{ Perimeter}^2/4\pi$), des Längen-Breiten-Verhältnisses (Mäuse und Ratten: 1-2), der Durchschnittsintensität (Mäuse und Ratten: 800-12000) und der gesamten Intensität (Mäuse

und Ratten: 2×10^5 - 5×10^7) ausgewählt. Auf Basis dieser Selektionsparameter wurden die weiteren Kanäle quantifiziert ²¹.

Für jedes identifizierte Objekt wurde die Intensität des fluoreszierenden Signals der sekundären Antikörper quantifiziert. Die Längenwellen, mit denen die sekundären Antikörper angeregt wurden, betragen 405, 488, 561 und 647 nm.

Da Überlappungseffekte der Signale zwischen den Fluoreszenzkanälen auftreten können, wurden Kontrollen für jeden verwendeten Fluoreszenzkanal/primären und sekundären Antikörper verwendet, um die Übertragung des Signals zwischen den Fluoreszenzkanälen zu bestimmen und somit für falsch-positive Signale korrigieren zu können: UCHL1, UCHL1 + Antikörper 1 und UCHL1 + Antikörper 2 ²¹.

Mithilfe dieser Kontrollen konnten die Übertragungskoeffizienten der Signale für jeden Kanal bestimmt werden, sodass mittels linearer Regression die jeweilige Trendlinie ermittelt werden konnte, welche im Folgenden verwendet wurde, um die Signalübertragung zwischen den Fluoreszenzkanälen zu kompensieren ¹⁰⁸. Um die Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten und Scanvorgängen zu berücksichtigen, folgte nach der Kompensation die Normalisation der Rohdaten auf den Wert 1 (oder 1000) für nicht-stimulierte Zellen ⁶⁷.

3.2.7 Statistische Analyse

Die Einzelbilder wurden zunächst mit der HCS-verknüpften Software analysiert, die Ergebnisdaten exportiert und schließlich mit der Software R (Version 4.0.2) ¹⁰⁹ kompensiert und normalisiert.

Alle Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Die Zellzahl der Neurone pro Kammer betrug 200-1100 Neurone. Innerhalb einer Experimentdurchführung wurden Kammern mit einer stark von der durchschnittlichen Zellzahl abweichenden Zellzahl für die Analyse exkludiert (< 500 Zellen pro Kammer). In dem Fall, dass die durchschnittliche Zellzahl einer gesamten Experimentdurchführung niedrig war (< 500 Zellen pro Kammer), wurden alle Kammern für die Analyse inkludiert ohne einzelne Zellkammern zu exkludieren. Diese Vorgehensweise wurde im Vorfeld der Durchführung der Experimente festgelegt.

Die Grafiken wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 6, Inkscape 1.0.2 und Fiji - ImageJ erstellt.

Um die Signifikanz sich unterscheidender Werte in kinetischen Experimenten zu bestimmen, wurde die mehrfaktorielle Varianzanalyse (Zwei-Wege-ANOVA) verwendet. Um zu prüfen, welche Faktoren der Varianzanalyse sich unterscheiden, wurde der Bonferroni Test als Post-hoc Test ausgewählt und angewendet.

Für die Bestimmung der Signifikanz von Werten, welche an einem einzelnen Zeitpunkt gemessen wurden, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (Ein-Wege-ANOVA) durchgeführt. Um zu prüfen, welche Faktoren der Varianzanalyse sich unterscheiden, wurde

der Bonferroni Test als Post-hoc Test verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde als $p < 0,05$ definiert. Signifikante Unterschiede der Signalantwort zwischen stimulierten Neuronen und der Negativkontrolle wurden mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben. Signifikante Unterschiede der Signalantwort zwischen den verschiedenen verwendeten Stimuli wurden mit \$ für $p < 0,05$, \$\$ für $p < 0,01$ und \$\$\$ für $p < 0,001$ angegeben. Für alle Analysen wurde für n die Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente gewählt.

4. Ergebnisse

In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Depolarisation nozizeptiver Neurone vermittelt durch den $Ca_v1.2$ -Kanal zur Aktivierung der PKA-II führt, dass diese depolarisationsinduzierte Aktivierung der PKA-II mit der Sensitivierung des $Ca_v1.2$ -Kanals einhergeht und *in vivo* zur Entstehung von mechanischer Hyperalgesie führt²¹. Ein Calciumeinstrom über Ionomycin hingegen führte nicht zur Aktivierung der PKA-II²¹. Ferner ist nicht bekannt, ob ein Calciumeinstrom induziert durch die Aktivierung des TRPV1- oder des TRPA1-Kanals zur Aktivierung von PKA-II führt.

In anderen Zellmodellen vermittelt Calcineurin die Dephosphorylierung von $Ca_v1.2$ an Serin 1928 und stellt somit den Gegenspieler der $Ca_v1.2$ -PKA-Phosphorylierung dar^{52,53}. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob Calcineurin den Unterschied zwischen der durch KCl und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung begründen kann, ob die TRP-Agonisten Capsaicin und AITC zu Aktivierung von PKA-II führen und ob Calcineurininhibitoren diese Antwort modulieren.

Die im folgenden beschriebenen Experimente können übersichtshalber in drei Gruppen eingeordnet werden:

- 1). Der Einfluss der Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A auf die Aktivität von PKA-II und ERK1/2 nach der Induktion eines Calciumeinstroms durch Aktivierung des TRPV1- oder TRPA1-Kanals oder Ionomycin in primären sensorischen Neuronen der Ratte (Abschnitt 4.1).
- 2). Der Einfluss der Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A auf die Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals und die Aktivität von ERK1/2 nach der Induktion eines Calciumeinstroms durch Aktivierung des TRPV1- oder TRPA1-Kanals oder Ionomycin in primären sensorischen Neuronen der Ratte (Abschnitt 4.2).
- 3). Der Einfluss der Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A auf die Aktivität von PKA-II und ERK1/2 nach der Induktion eines Calciumeinstroms durch Aktivierung des TRPV1-Kanals in primären sensorischen Neuronen der Maus (Abschnitt 4.3 und 4.4).

4.1 Calcineurininhibitoren erhöhen die Aktivität von PKA-II und ERK1/2 nach Depolarisation primärer sensorischer Neurone der Ratte

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe Hucho konnte gezeigt werden, dass die depolarisationsinduzierte PKA-II Aktivierung in primären sensorischen Neuronen durch den Calciumeinstrom über den spannungsabhängigen Calciumkanal $Ca_v1.2$ induziert wird. Im Gegensatz dazu wurde keine Aktivierung von PKA-II beobachtet, wenn der Calciumeinstrom

über Ionomycin erfolgte²¹. Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die beobachteten Unterschiede in der PKA-II Aktivierung möglicherweise durch eine entgegenwirkende Calcineurinaktivität begründet werden kann, die der PKA-II Aktivierung zuvorkommt, wenn der Calciumeinstrom nicht direkt durch den Cav1.2-Kanal hindurch, sondern in Entfernung vom Cav1.2-Kanal erfolgt. Wenn diese Hypothese richtig wäre, dann sollten Inhibitoren von Calcineurin eine deutliche Verstärkung der PKA-II Aktivierung auch bei z.B. Ionomycin oder TRP-Kanal vermittelten Calciumeinstrom zur Folge haben.

Um zu untersuchen, ob der negative Regulator Calcineurin einen differentiellen Einfluss auf die PKA-II Aktivierung in Abhängigkeit von dem Calciumeinstromweg hat, wurden für die folgenden Experimente primäre sensorische Neurone aus Spinalganglien von Ratten isoliert, für 30 min mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A (jeweils 10 µM) prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit verschiedenen Substanzen behandelt, die einen Calciumeinstrom in die Zellen induzieren.

4.1.1 Der TRPV1-Kanalagonist Capsaicin bewirkt nicht die Aktivierung von PKA-II aber von ERK1/2 in einer Konzentration von 1 und 10 µM

Der TRPV1-Agonist Capsaicin bewirkt einen starken Calciumeinstrom in TRPV1-positive Neurone, welche ca. 30-50 % der sensorischen Neurone der Spinalganglien ausmachen¹¹⁰⁻¹¹². Außerdem zeigten vorherige Experimente der Arbeitsgruppe Hucho, dass die Stimulation von primären sensorischen Neuronen von Ratten mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin zu PKA-II Aktivität führt²¹. Wir erwarten daher, dass eine Stimulation primärer sensorischer Neurone von Ratten mit Capsaicin und damit als Folge der Aktivierung des TRPV1-Kanals erfolgenden Calciumeinstroms zu PKA-II Aktivierung führt. Um die von der Arbeitsgruppe Hucho bisher gemachten Beobachtungen zu replizieren, wurden primäre sensorische Neurone zunächst mit 0,1, 1 und 10 µM Capsaicin für 0, 1, 5, 15, 30, 60, und 120 min behandelt. Die ausgewählten Konzentrationen für Capsaicin basierten auf verschiedenen Studien sowie auf den zuvor von der Arbeitsgruppe Hucho durchgeführten, noch unveröffentlichten Experimenten^{30,113,114}.

Nach Stimulation wurden die Zellen nach 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min fixiert und immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen UCHL1 gefärbt, um Neurone zu identifizieren¹¹⁵. Zusätzlich erfolgte die immunzytochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen pRII und pERK1/2, die als molekulares Korrelat für die PKA-II und ERK1/2 Aktivität dienen³⁰. Zellkerne wurden dabei mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 34580 visualisiert. Die gefärbten Kulturen wurden mittels HCS-Mikroskopie gescannt und die resultierenden Bilder automatisiert mithilfe der HCS-Software HCS Studio 6.6.2 Cell Analysis Software (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) analysiert. Die Aktivierung der PKA-II nach

15-minütiger Stimulation mit Capsaicin sowie der Positivkontrolle KCl konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 6 dargestellt beobachtet werden.

Die Stimulation mit 0,1 μM Capsaicin bewirkte im Vergleich zur Negativkontrolle keinen Anstieg der pRII Intensität, wobei die Stimulation mit 1 μM Capsaicin nach 1-30 min zu einer statistisch nicht signifikanten Intensitätssteigerung bis nahe zum 1,2-Fachen führte (30 min: 1,16-fach, SEM: \pm 0,07, $p > 0,1$). Die Stimulation mit 10 μM Capsaicin führte nach 1-30 min zu einer statistisch nicht signifikanten Intensitätssteigerung bis zum 1,2-Fachen (15 min: 1,19-fach, SEM: \pm 0,04, $p > 0,1$) und zu einer Reduzierung der Intensität nach 60-120-minütiger Stimulation (Abb. 5A), die jedoch mit zunehmendem Zellverlust einherging.

Für die pERK1/2 Intensität war Folgendes zu beobachten: Die Stimulation mit 0,1 μM Capsaicin bewirkte im Vergleich zur Negativkontrolle keinen Anstieg der pERK1/2 Intensität, wobei die Stimulation mit 1 μM Capsaicin nach 5-120 min zu einer Intensitätssteigerung führte, welche nach 60 min mit einer 2,3-fachen Steigerung ihr Maximum erreichte (60 min: 2,33-fach, SEM: \pm 0,14, $p < 0,001$) (Abb. 5B). Die Stimulation mit 10 μM Capsaicin bewirkte ebenso eine Steigerung der pERK1/2 Intensität, welche im Vergleich zur Negativkontrolle bereits nach 15 min mit einer 2,4-fachen Intensitätssteigerung ihr Maximum erreichte (15 min: 2,39-fach, SEM: \pm 0,23, $p < 0,001$).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde für alle folgenden Experimente mit Capsaicin eine Capsaicinkonzentration von 1 μM gewählt.

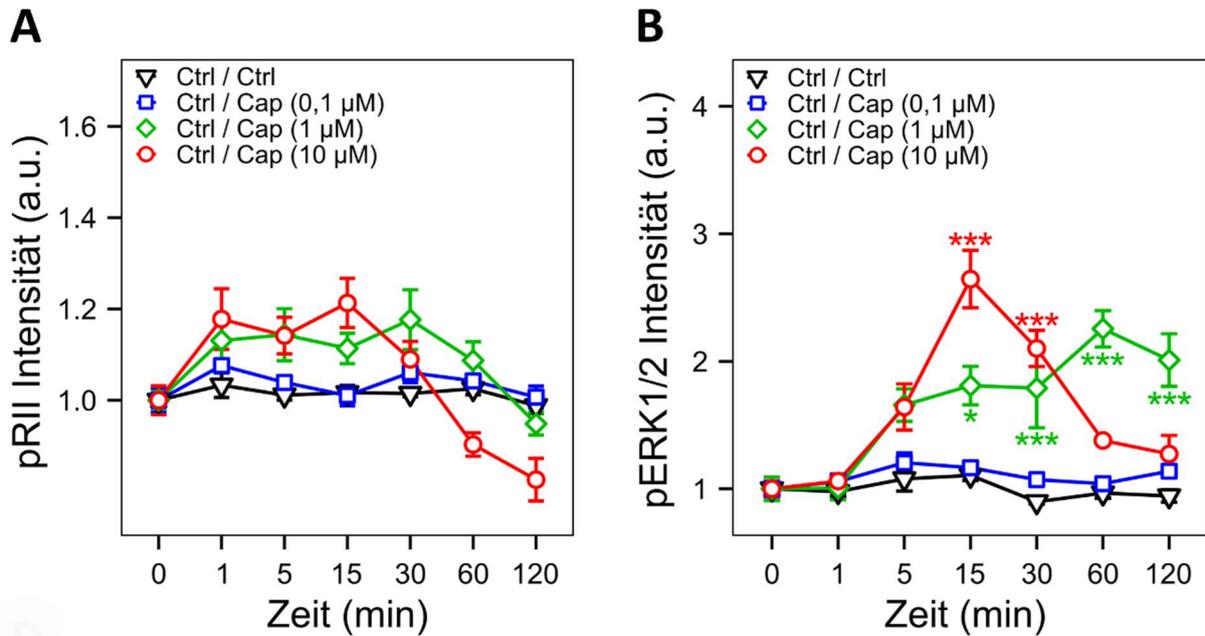


Abb. 5: Der TRPV1-Kanalagonist Capsaicin bewirkt nicht die Aktivierung von PKA-II aber von ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. **A:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 0,1, 1 oder 10 μM Capsaicin für 0-120 min. **B:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 0,1, 1 oder 10 μM Capsaicin für 0-120 min. **A und B:** Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 22000 Neurone/Kondition. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden durch Herrn Dr. Jörg Isensee zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die Capsaicin induzierte Aktivierung der PKA-II moduliert.

Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A ($10 \mu\text{M}$) vorinkubiert und ebenfalls für 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min mit Capsaicin ($1 \mu\text{M}$) behandelt. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird. Die ausgewählten Konzentrationen für Capsaicin und für die Calcineurininhibitoren basierten auf den zuvor von der Arbeitsgruppe Hucho durchgeführten, teils noch unveröffentlichten Experimenten²¹. Für die folgenden Experimente wurden zwei strukturell unterschiedliche Calcineurininhibitoren gewählt, welche beide durch die Bindung unterschiedlicher sekundärer Proteine Calcineurin inhibieren^{82,99}. Hierdurch können mögliche beobachtete Effekte mit höherer Wahrscheinlichkeit auf die Funktion von Calcineurin zurückgeführt werden, wenn die Prästimulation mit beiden Calcineurininhibitoren ähnliche Ergebnisse zeigt.

Die Aktivierung der PKA-II nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und der Stimulation mit Capsaicin konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 6 dargestellt beobachtet werden. Vereinzelt zeigte sich eine erhöhte ERK1/2 Aktivität nach der Prästimulation mit Cyclosporin A und anschließender Stimulation mit Capsaicin oder der Stimulation mit Capsaicin allein (Abb. 6).

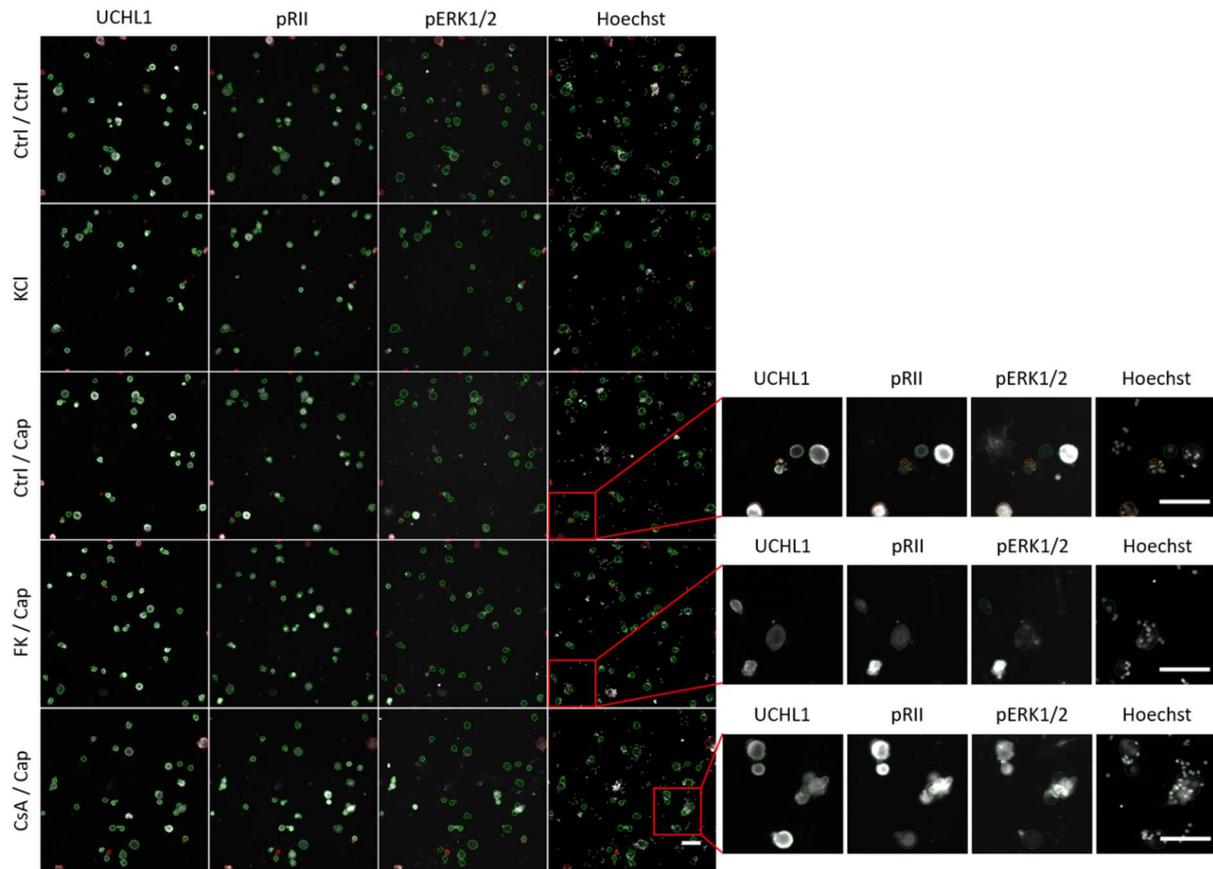


Abb. 6: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt die Induktion der PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 15-minütiger Stimulation. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle). Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden durch Herrn Dr. Jörg Isensee zur Verfügung gestellt.

4.1.2.1 Tacrolimus erhöht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin bis zum 1,27-Fachen

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus die Capsaicin induzierte Aktivierung der PKA-II moduliert.

Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit dem Calcineurininhibitoren Tacrolimus (10 μM) vorinkubiert und ebenfalls für 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min mit Capsaicin (1 μM) behandelt. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Tacrolimus im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Der Mittelwert der pRII-Intensität aller Neurone, die nach Vorinkubation mit Tacrolimus mit Capsaicin behandelt wurden, war bis zu 1,27-fach gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Maximale pRII Intensitäten wurden nach 5-15-minütiger Stimulation beobachtet (5 min: 1,27-fach, SEM: $\pm 0,03$, $p < 0,001$) (Abb. 7B). Im Vergleich zur Negativkontrolle war diese beobachtete Erhöhung nach 1, 5, 15 und 30 min signifikant. Die Stimulation mit Capsaicin alleine bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der pRII Intensität, wobei die maximale Erhöhung das 1,16-Fache betrug, jedoch nicht statistisch signifikant war (30 min: 1,16-fach, SEM: $\pm 0,07$, $p > 0,1$). Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pRII (F-Wert 25,026, $p < 0,001$). Dieser beobachtete Effekt wies nach dem Post-hoc Test keine statistische Signifikanz auf, was bedeutete, dass der Effekt keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Der Vergleich der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin mit einer alleinigen Behandlung mit Capsaicin zeigte, dass die Kombination eines Calcineurininhibitors mit Capsaicin zu einer zusätzlichen Steigerung der pRII Intensität führte, welche nach 15-minütiger Stimulation signifikant war ($p < 0,05$). Tacrolimus steigerte also die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin.

4.1.2.2 Cyclosporin A erhöht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin bis zum 1,26-Fachen

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Cyclosporin A die Capsaicin induzierte Aktivierung der PKA-II moduliert. Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A (10 μM) vorinkubiert und ebenfalls für 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min mit Capsaicin (1 μM) behandelt. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Cyclosporin A im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Die kombinierte Stimulation der sensorischen Neurone mit Cyclosporin A und Capsaicin verhielt sich analog zur kombinierten Stimulation der primären sensorischen Neurone mit

Tacrolimus und Capsaicin (Abb. 7C). Die kombinierte Stimulation der Neurone mit Cyclosporin A und Capsaicin führte nach 1-30-minütiger Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der pRII Intensität. Die maximale Intensitätssteigerung betrug das 1,26-Fache und wurde nach 15 min erreicht (15 min: 1,26-fach, SEM: +/- 0,09, $p < 0,001$). Nach 15-minütiger Stimulation mit Capsaicin zeigten Neurone, welche zuvor mit Cyclosporin A behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der pRII Intensität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin ($p < 0,01$). Cyclosporin A steigerte also die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin.

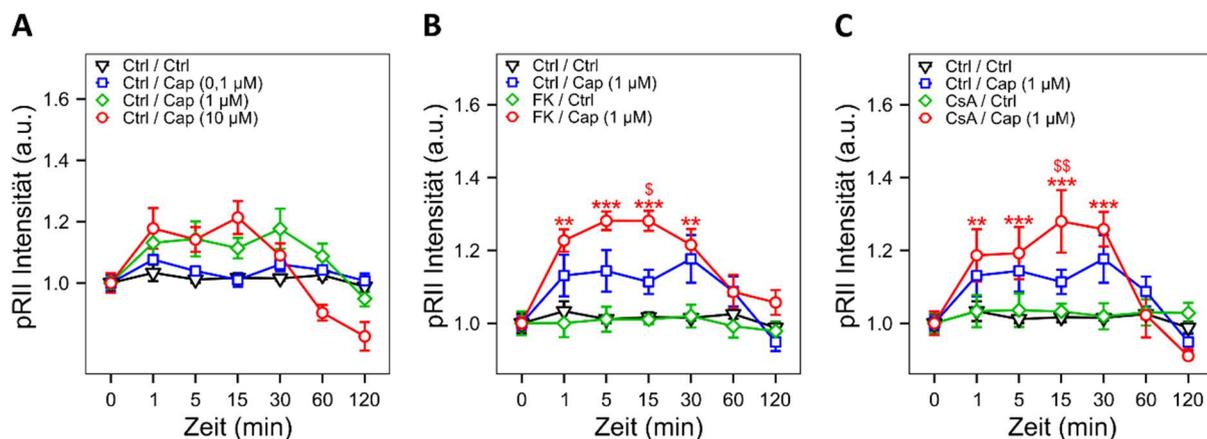


Abb. 7: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 0,1, 1 oder 10 μM Capsaicin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ stellen signifikante Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Capsaicin dar. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 22000 Neurone/Kondition. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden durch Herrn Dr. Jörg Isensee zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut für 30 min mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin induziert. Zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pRII wurde ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet, der spezifisch an aktivierte ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II bindet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit

Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird und wenn auch der PKA-II nachgelagerten Zielstrukturen einer Regulation durch Calcineurin unterliegen.

4.1.3.1 Tacrolimus erhöht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin bis zum 2,75-Fachen

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut für 30 min mit Tacrolimus (10 μ M) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal mittels Capsaicin induziert. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Tacrolimus im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird und wenn auch der PKA-II nachgelagerten Zielstrukturen einer Regulation durch Calcineurin unterliegen.

Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin führte zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle signifikanten bis nahezu 2,8-fachen Steigerung der pERK1/2 Intensität nach 15-minütiger Stimulation (15 min: 2,75-fach, SEM: +/- 0,15, $p < 0,001$) (Abb. 8B). Im gesamten Verlauf der Stimulation war die pERK1/2 Intensität nach 5-120 min signifikant erhöht. Auch die alleinige Stimulation mit Capsaicin führte zu einer bis zu 2,3-fachen signifikant gesteigerten pERK1/2 Intensität nach 15-120-minütiger Stimulation (60 min: 2,33-fach, SEM: +/- 0,14, $p < 0,001$). Nach 15-30-minütiger Stimulation mit Capsaicin war die pERK1/2 Intensität in primären sensorischen Neuronen, welche zuvor mit Tacrolimus behandelt wurden, im Vergleich zu Neuronen, welche nur mit Capsaicin stimuliert wurden, signifikant erhöht ($p < 0,001$).

Tacrolimus steigerte also auch die Signalantwort von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin.

4.1.3.2 Cyclosporin A erhöht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin bis zum 3,6-Fachen

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut für 30 min mit Cyclosporin A (10 μ M) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal mittels Capsaicin induziert. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Cyclosporin A im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu

einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird und wenn auch der PKA-II nachgelagerten Zielstrukturen einer Regulation durch Calcineurin unterliegen.

Die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A und Capsaicin erzielte nach 30-minütiger Stimulation eine maximale Steigerung der pERK1/2 Intensität bis nahe zum 3,6-Fachen (30 min: 3,55-fach, SEM: +/- 0,26, $p < 0,001$). Diese gegenüber der Negativkontrolle beobachtete Intensitätssteigerung war im Verlauf der 5-120-minütigen Stimulation signifikant. Nach 15-30-minütiger Stimulation mit Capsaicin war die pERK1/2 Intensität in sensorischen Neuronen, welche zuvor mit Cyclosporin A behandelt wurden, im Vergleich zu Neuronen, welche nur mit Capsaicin stimuliert wurden, signifikant erhöht (15 min: $p < 0,01$, 30 min: $p < 0,001$).

Wie auch Tacrolimus steigerte Cyclosporin A die Signalantwort von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin (Abb. 8C).

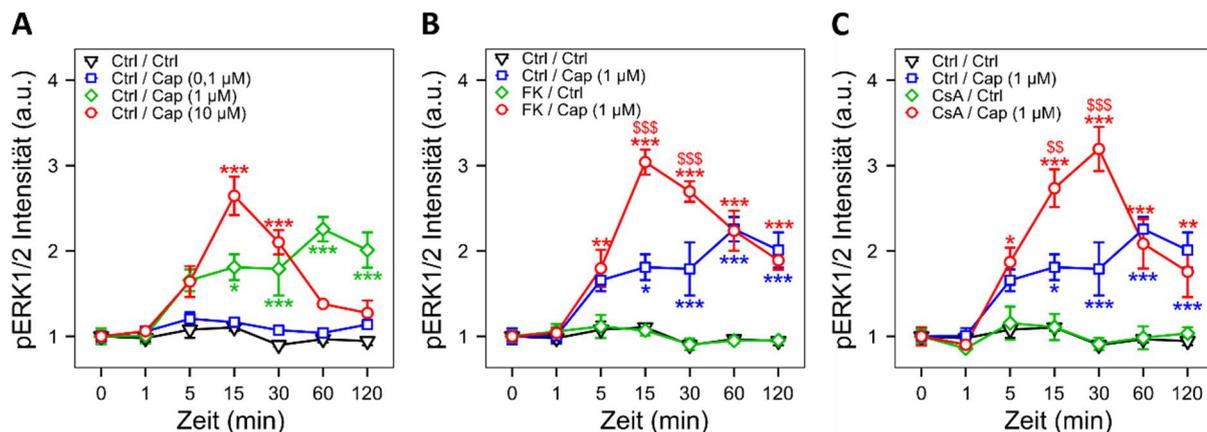


Abb. 8: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 µM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 0,1, 1 oder 10 µM Capsaicin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ stellen signifikante Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Capsaicin dar. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 22000 Neurone/Kondition. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden durch Herrn Dr. Jörg Isensee zur Verfügung gestellt.**

4.1.4 Der TRPA1-Agonist AITC bewirkt die Aktivierung der PKA-II in einer Konzentration von 10 und 100 mM

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die AITC induzierte Aktivierung der PKA-II moduliert. Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Calcineurininhibitoren behandelt und anschließend wurde der Calciumeinstrom mit AITC, einem TRPA1-Kanalagonisten, induziert. AITC bewirkt einen

Calciumstrom in TRPA1-positive Neurone¹¹⁶. Gehäuft werden TRPA1-Kanäle in peptidergen Nozizeptoren exprimiert, welche ebenso TRPV1-Kanäle koexprimieren⁶⁵. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals induziert wird.

Um die geeignete Konzentration für AITC zu ermitteln, wurden primäre sensorische Neurone von Ratten in einem Vorexperiment für 15 min mit 0, 0,001, 0,01, 1, 10 und 100 mM AITC stimuliert. Nach 15-minütiger Stimulation mit 10 und 100 mM AITC war eine deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante Steigerung der pRII sowie pERK1/2 Intensität zu beobachten. Die pRII Intensität war nach der Stimulation mit 10 und 100 mM AITC um respektive das 1,1- und nahezu das 1,13-Fache erhöht (10 mM: 1,1-fach, SEM: +/- 0,04, $p > 0,1$, 100 mM: 1,13-fach, SEM: +/- 0,11, $p > 0,1$). Die pERK1/2 Intensität war nach der Stimulation mit 10 und 100 mM AITC um respektive das 1,3- und nahezu das 1,8-Fache erhöht (10 mM: 1,31-fach, SEM: +/- 0,34, $p > 0,1$, 100 mM: 1,75-fach, SEM: +/- 0,49, $p > 0,1$).

Daher wurden für die folgenden Experimente mit AITC die Konzentrationen von 10 und 100 mM AITC ausgewählt.

4.1.5 Die Flüchtigkeit von AITC erfordert das Versiegeln der Zellkulturkammern direkt nach erfolgter Stimulation

Um den Einfluss von Calcineurin in der PKA-II Aktivierung bei einem durch die Aktivierung von TRPV1-Kanälen induzierten Calciumstrom zu untersuchen, wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit 10 oder 100 mM AITC behandelt. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals induziert wird.

In der ersten Versuchsreihe des Experimentes zeigte sich, dass AITC (10 und 100 mM,) wie schon im Vorexperiment beobachtet, alleine bereits in den Kontrollbedingungen eine Steigerung der pRII sowie pERK1/2 Intensität bewirkte (Abb. 9A und D). Die vorherige Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A führte zu einer im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AITC leicht erhöhten pRII Intensität, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 9B und C). Im Bezug auf die pERK1/2 Intensität konnte nach der vorherigen Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AITC keine Intensitätssteigerung festgestellt werden (Abb. 9E und F). Auffällig in dieser Versuchsdurchführung war, dass die negativen Kontrollen für die pRII und die pERK1/2 Intensität ebenso eine Intensitätssteigerung zeigten (Abb. 9). Wir vermuteten, dass dieser Effekt durch die Flüchtigkeit von AITC zu erklären ist, sodass für alle weiteren Versuche mit

AITC die jeweiligen Zellkulturkammern sofort nach der Zugabe von AITC mit undurchlässiger Aluminiumfolie versiegelt wurden. Auf diese Weise konnte keine Diffusion von AITC in andere Kammern stattfinden. In der Tat zeigten sich keine Veränderungen der Kontrollbedingungen mehr (Abb. 11). Da also die Negativkontrolle in dieser ersten Versuchsreihe auch eine Intensitätssteigerung zeigte und daher nicht als Referenz einer nicht erfolgten Stimulation dienen konnte, wurde das Experiment wiederholt.

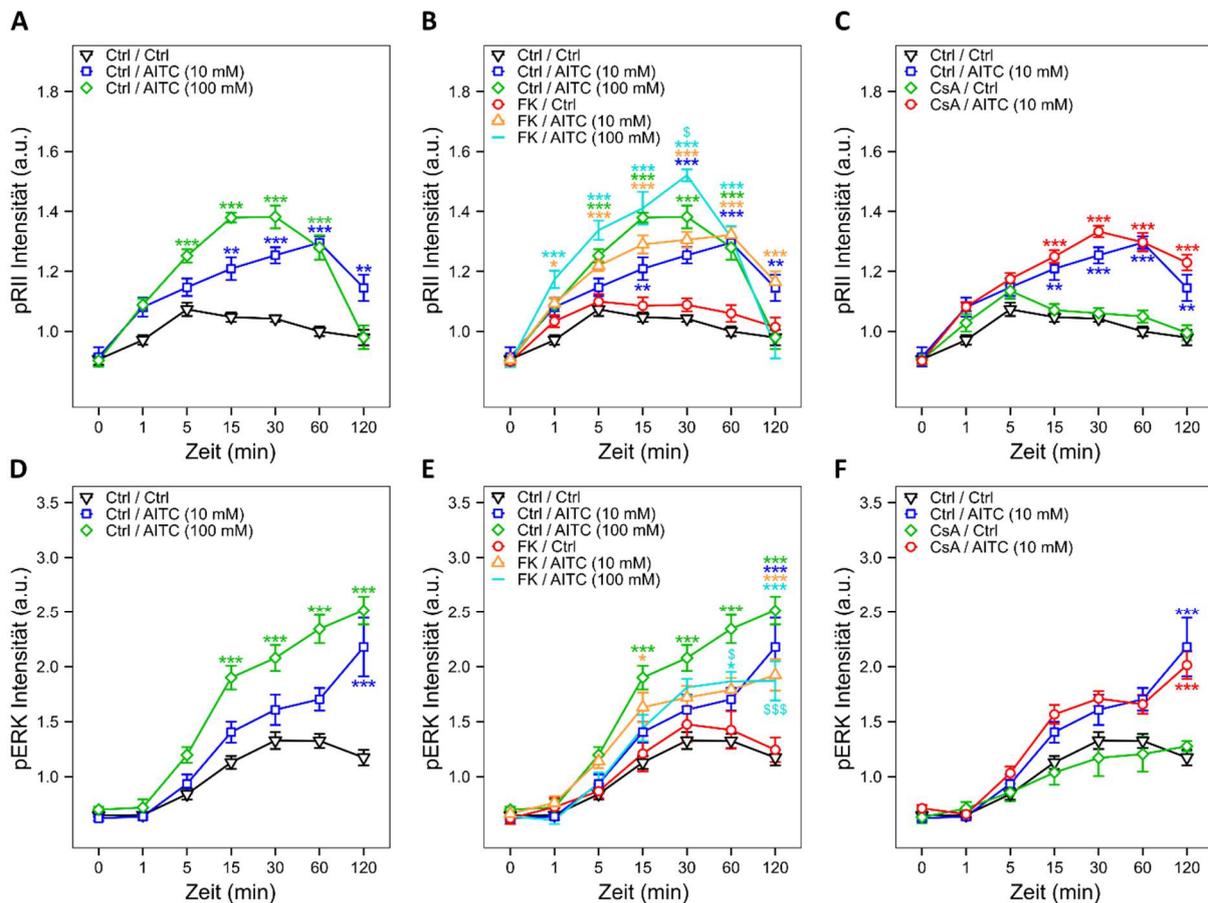


Abb. 9: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. D-F: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In D-F ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. A-F: Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ stellen einen signifikanten Unterschied zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus oder Cyclosporin A und AITC im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AITC dar. AITC: Allylthiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=8$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 34000 Neurone/Kondition.

4.1.6 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf AITC

Ziel der Versuchsreihe war es, die Funktion von Calcineurin in der PKA-II Aktivierung zu untersuchen, wenn der Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals induziert wird.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit 10 oder 100 mM AITC behandelt. Um die Diffusion von AITC in benachbarte Zellkulturkammern zu vermeiden, wurden die jeweiligen Kammern für alle weiteren Versuche mit AITC sofort nach der Zugabe von AITC mit undurchlässiger Aluminiumfolie versiegelt. Die Aktivierung der PKA-II nach Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und der Stimulation mit AITC, sowie AITC alleine konnte wie in den repräsentativen Zellbildern in Abb. 10 dargestellt beobachtet werden.

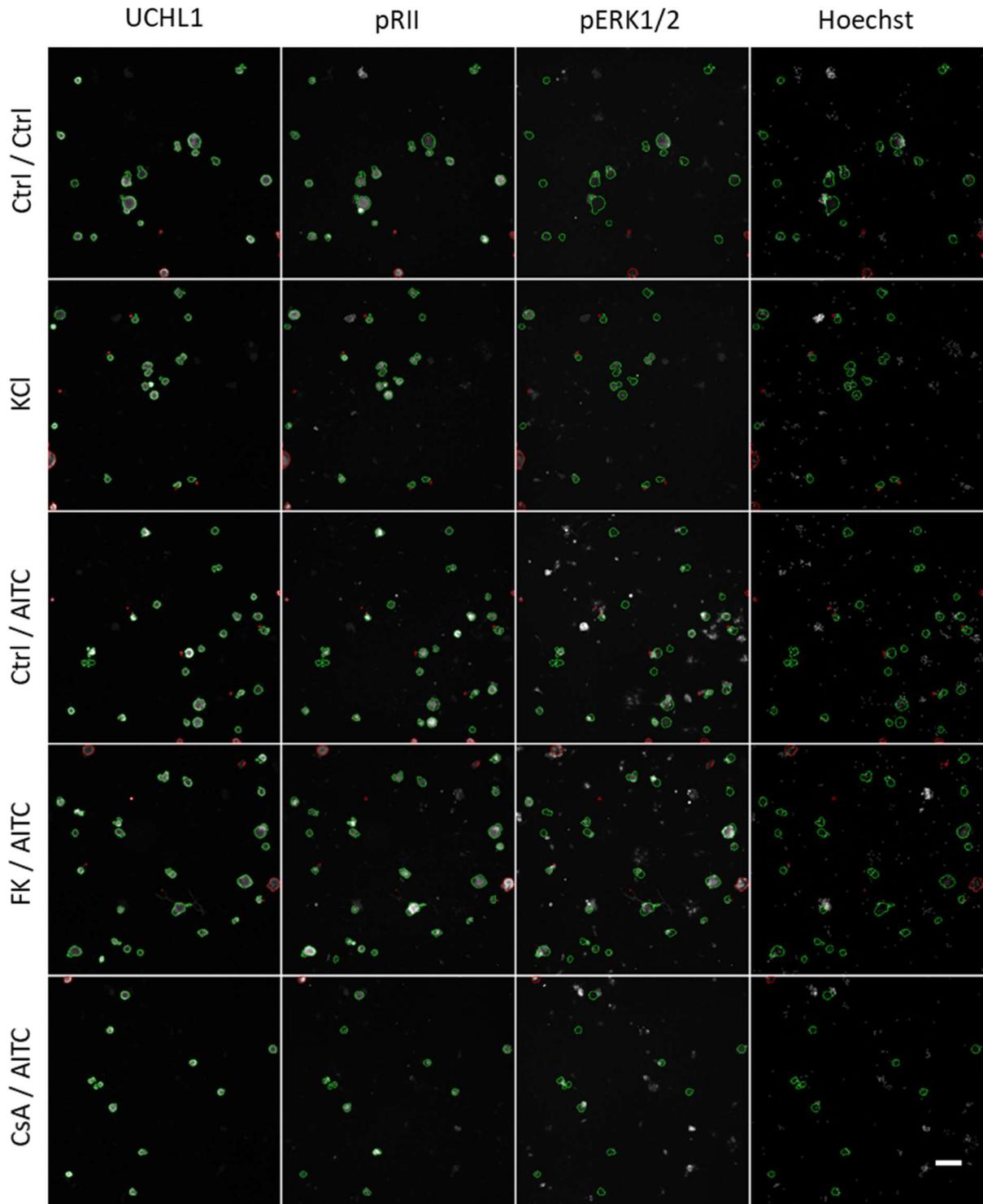


Abb. 10: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und AITC zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 10 mM AITC stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 30-minütiger Stimulation. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. AITC: Allylisothiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

4.1.6.1 Tacrolimus erhöht nicht die Signalantwort der PKA-II auf AITC

Ziel der Versuchsreihe war es, die Funktion von Calcineurin in der PKA-II Aktivierung zu untersuchen, wenn der Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Tacrolimus im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals induziert wird.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Tacrolimus (10 μ M) prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit 10 oder 100 mM AITC behandelt.

Wie schon in dem Vorexperiment beobachtet, zeigte die alleinige Behandlung der Neurone mit 10 oder 100 mM AITC eine im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhte pRII Intensität mit einem Maximum bei respektive 30 und 15 min (10 mM: 1,26-fach, SEM: +/- 0,06, $p < 0,001$, 100 mM: 1,42-fach, SEM: +/- 0,03, $p < 0,001$) (Abb. 11A). Im Gegensatz zu den Experimenten mit Capsaicin bewirkte die Vorbehandlung mit Tacrolimus jedoch keine Verstärkung der pRII Antwort nach Stimulation mit AITC. Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und 10 oder 100 mM AITC steigerte die pRII Intensität im gleichen Maße wie die alleinige Behandlung mit AITC (Abb. 11B). So war die pRII Intensität nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und 10 mM AITC nach 5-120-minütiger Stimulation mit AITC im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht (30 min: 1,27-fach, SEM: +/- 0,06, $p < 0,001$). Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der pRII Intensität zwischen der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und AITC und der alleinigen Behandlung mit AITC. Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und der höheren AITC-Konzentration von 100 mM führte zu einem vergleichbaren Anstieg der pRII Intensität wie jene, die nach der alleinigen Stimulation mit 100 mM AITC zu beobachten war. Auch wenn die pRII Intensität nach der kombinierten Behandlung der primären sensorischen Neurone mit Tacrolimus und 100 mM AITC leicht über der pRII Intensität lag, war dieser minimale Unterschied nach der Anwendung des Post-hoc Testes nicht signifikant. Dies bedeutete, dass der Unterschied keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab allerdings einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pRII (F-Wert 32,705, $p < 0,001$). Tacrolimus steigerte nicht die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit AITC.

4.1.6.2 Cyclosporin A erhöht nicht die Signalantwort der PKA-II auf AITC

Ziel der Versuchsreihe war es, die Funktion von Calcineurin in der PKA-II Aktivierung zu untersuchen, wenn der Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Cyclosporin A im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals induziert wird.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Cyclosporin A (10 μ M) prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit 10 oder 100 mM AITC behandelt.

Auch die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A und 10 mM AITC führte zu einer Erhöhung der pRII Intensität, welche auf ähnlichem Niveau verlief wie die pRII Intensitätserhöhung nach alleiniger Behandlung mit 10 mM AITC (Abb. 11C). Im Vergleich zur Negativkontrolle war diese beobachtete Erhöhung der pRII Intensität nach 5- und 30-120-minütiger Stimulation mit AITC signifikant (120 min: 1,25-fach, SEM: +/- 0,03, $p < 0,01$). Auch in diesem Fall konnte kein signifikanter Unterschied in der pRII Intensität zwischen der kombinierten Behandlung mit Cyclosporin A und AITC und der alleinigen Behandlung mit AITC festgestellt werden. Cyclosporin A steigerte nicht die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit AITC.

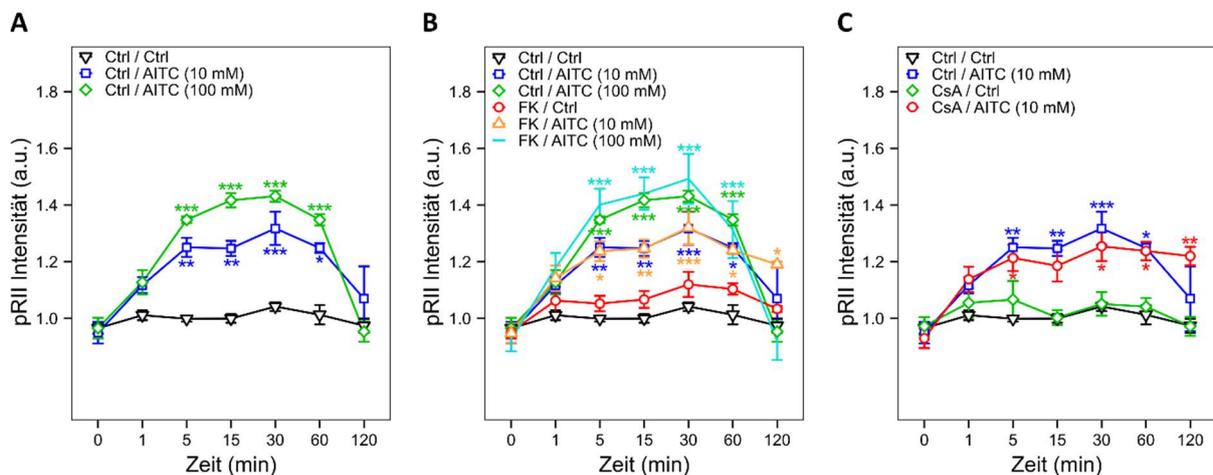


Abb. 11: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. AITC: Allylthiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 16000 Neurone/Kondition.

4.1.7 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC

Um zu untersuchen, ob nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II auch aktiviert werden, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, und einer Regulation durch Calcineurin unterliegen bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom

durch die Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC induziert. Erneut wurden immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 verwendet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit den Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPA1-Kanal durch AITC aktiviert wird.

Ebenso wie die alleinige Behandlung mit AITC und die kombinierte Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A zu einer erhöhten pRII Intensität und somit einer Steigerung der PKA-II Aktivität führte, bewirkte die Behandlung der Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung der ERK1/2 nach 0-120-minütiger Stimulation mit AITC alleine oder der Kombination aus Tacrolimus oder Cyclosporin A und AITC (Abb. 12A-C).

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich eine Erhöhung der pERK1/2 Intensität nach 5-120-minütiger Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC. Nach 120-minütiger Stimulation mit 10 mM AITC war diese beobachtete Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant (3,79-fach, SEM: +/- 0,92, $p < 0,01$). Die Behandlung mit einer höheren Konzentration AITC (100 mM) führte zu einer größeren Steigerung der pERK1/2 Intensität bis zu einer fast 4,2-fachen Erhöhung der pERK1/2 Intensität nach 60-minütiger Stimulation (4,18-fach, SEM: +/- 0,66, $p < 0,001$).

4.1.7.1 Tacrolimus erhöht nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC

Um zu untersuchen, ob nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II auch aktiviert werden, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, und einer Regulation durch Calcineurin unterliegen bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut für 30 min mit Tacrolimus (10 μ M) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom durch die Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC induziert. Erneut wurden immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 verwendet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Tacrolimus im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPA1-Kanal durch AITC aktiviert wird.

Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und 10 mM AITC führte zu einer ähnlich starken Erhöhung wie die, welche nach der alleinigen Stimulation mit 10 mM AITC beobachtet werden konnte (Abb. 12B). Im Vergleich zur Negativkontrolle war diese Erhöhung nach 120 min signifikant (4,02-fach, SEM: +/- 0,8, $p < 0,001$). Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und einer höheren Konzentration AITC (100 mM) zeigte ebenso, wie zuvor bei der pRII Intensität beobachtet, eine ähnlich starke Steigerung der pERK1/2 Intensität wie die, welche

durch die alleinige Stimulation mit 100 mM AITC erreicht wurde. Die Vorbehandlung mit Tacrolimus führte also nicht zu einem weiteren Anstieg der pERK1/2 Intensität. Auch wenn die Intensitätssteigerung nach der kombinierten Behandlung geringer auszufallen schien als jene, welche nach der alleinigen Stimulation mit AITC erzielt wurde, war dieser Unterschied nach der Anwendung des Post-hoc Testes nicht signifikant. Dies bedeutete, dass der Unterschied keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab allerdings einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pRII (F-Wert 25,86, $p < 0,001$). Des Weiteren waren die Fehlerbalken in diesem Assay größer als in den anderen Konditionen, was die Variabilität der Einzelexperimente darstellt.

4.1.7.2 Cyclosporin A erhöht nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC

Um zu untersuchen, ob nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II auch aktiviert werden, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, und einer Regulation durch Calcineurin unterliegen bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wenn ein Calciumeinstrom durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle induziert wird, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone erneut für 30 min mit Cyclosporin A (10 μ M) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom durch die Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC induziert. Erneut wurden immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 verwendet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Cyclosporin A im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPA1-Kanal durch AITC aktiviert wird.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen für die pRII Intensität war auch die pERK1/2 Intensität nach der kombinierten Behandlung mit Cyclosporin A und 10 mM AITC ähnlich stark erhöht wie nach der alleinigen Stimulation mit 10 mM AITC (Abb. 12C). Die Vorbehandlung mit Cyclosporin A führte also nicht zu einem weiteren Anstieg der pERK1/2 Intensität. Im Vergleich zur Negativkontrolle war die pERK1/2 Intensität nach 120-minütiger Stimulation bis nahe zum 4-Fachen erhöht (3,93-fach, SEM: $\pm 0,76$, $p < 0,01$). Auch für die pERK1/2 Intensität ergab die mehrfaktorielle Varianzanalyse einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität (F-Wert 25,86, $p < 0,001$), welcher nach der Anwendung des Post-hoc Testes keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte.

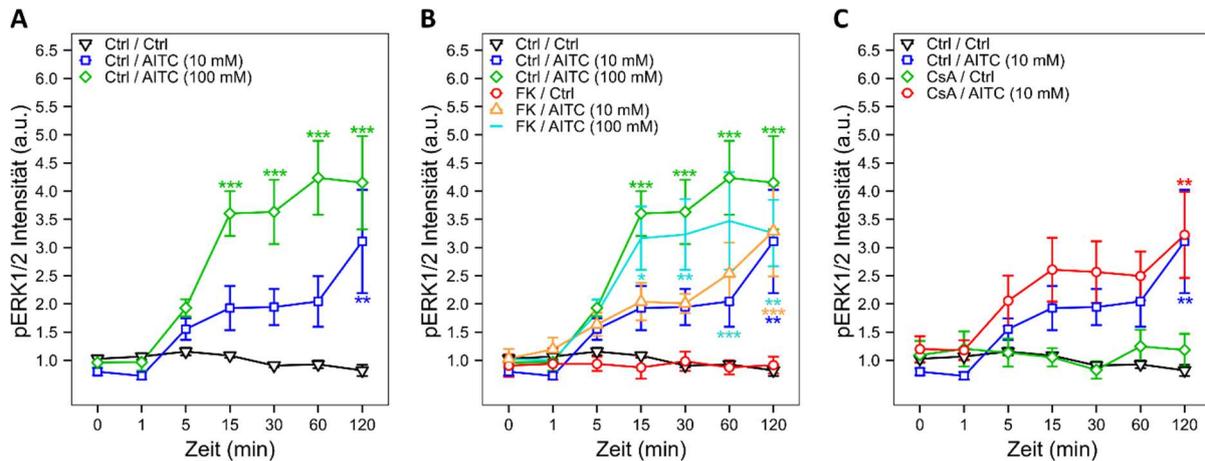


Abb. 12: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. AITC: Allylisothiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 16000 Neurone/Kondition.**

4.1.8 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf einen Calciumeinstrom durch Ionomycin

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob auch ein ungerichteter Calciumeinstrom über Ionomycin zu PKA-II Aktivierung führt und ob die Inhibition von Calcineurin diese womöglich moduliert.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone nach der Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A für 0-120 min mit Ionomycin (1 und 3 μ M), also calciumdurchlässigen Ionophoren, behandelt. Basis der ausgewählten Ionomycin-Konzentration waren wiederum Experimente der Arbeitsgruppe mit primären sensorischen Neuronen von Ratten, die mit Ionomycin stimuliert wurden ²¹. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ionomycin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Ionomycin stimuliert wird und einer Regulation durch Calcineurin unterliegt.

Die Aktivierung der PKA-II nach der Stimulation mit KCl als Positivkontrolle konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 13 dargestellt beobachtet werden. Neurone, welche mit Ionomycin alleine oder der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A mit Ionomycin stimuliert wurden, zeigten hingegen keine oder nur eine geringe Erhöhung der pRII-Antwort.

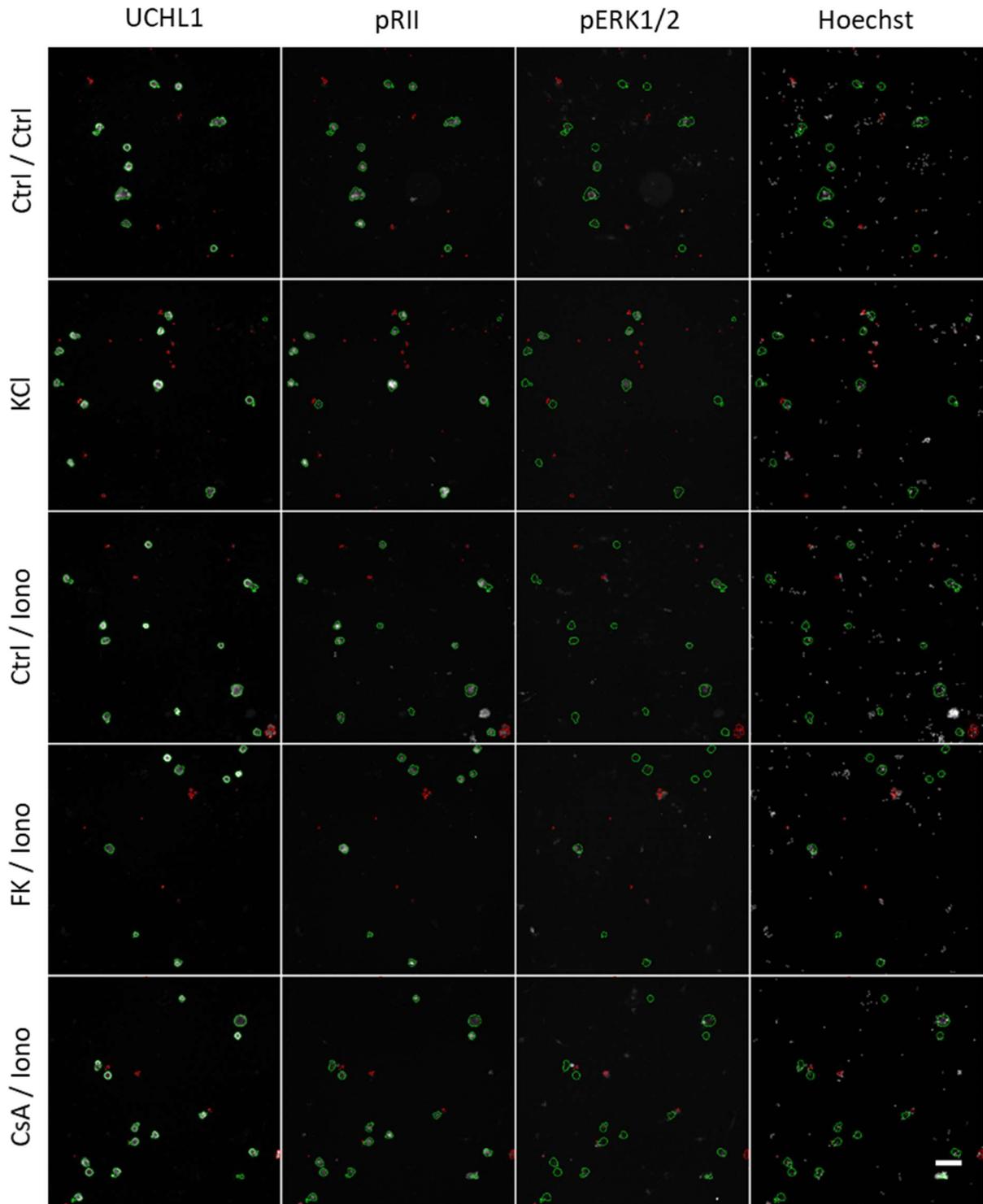


Abb. 13: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und die Induktion des Calciumeinstroms mittels Ionomycin erhöht nicht die PKA-II Aktivität. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Ionomycin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 oder 3 μ M Ionomycin stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 5-minütiger Stimulation mit 1 μ M Ionomycin. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin, KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

Die Stimulation des Calciumeinstroms mit Ionomycin nach der Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A führte in dem Zeitraum von 0-120 min nicht zu einem Anstieg der pRII Intensität (Abb. 14B und C). Auch eine höhere Ionomycinkonzentration (3 μM) konnte die pRII Intensität in Kombination mit Tacrolimus nach maximal 120 min nicht steigern (Abb. 14B).

Die alleinige Stimulation mit zwei verschiedenen Ionomycinkonzentrationen (1 und 3 μM) bewirkte im Verlauf von 0-120 min ebenso wenig eine Steigerung der pRII Intensität. Die pRII Intensität verlief für alle getesteten Kombinationen aus Vorbehandlung und Stimulation mit verschiedenen Ionomycinkonzentrationen auf ähnlich geringem Niveau wie die Negativkontrolle (Abb. 14A). Nichtsdestotrotz deutete die mehrfaktorielle Varianzanalyse einen Effekt der verwendeten Stimulanzien auf die pRII Intensität an (F-Wert 7,073, $p < 0,001$). Dieser Effekt könnte allerdings auch durch den Einschluss der Positivkontrolle (KCl) in die mehrfaktorielle Varianzanalyse zustande kommen. Dieser Effekt wies nach dem Post-hoc Test keine Signifikanz auf, sodass er keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Die Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A steigerten also nicht die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen, wenn der Calciumeinstrom durch Ionomycin induziert wird.

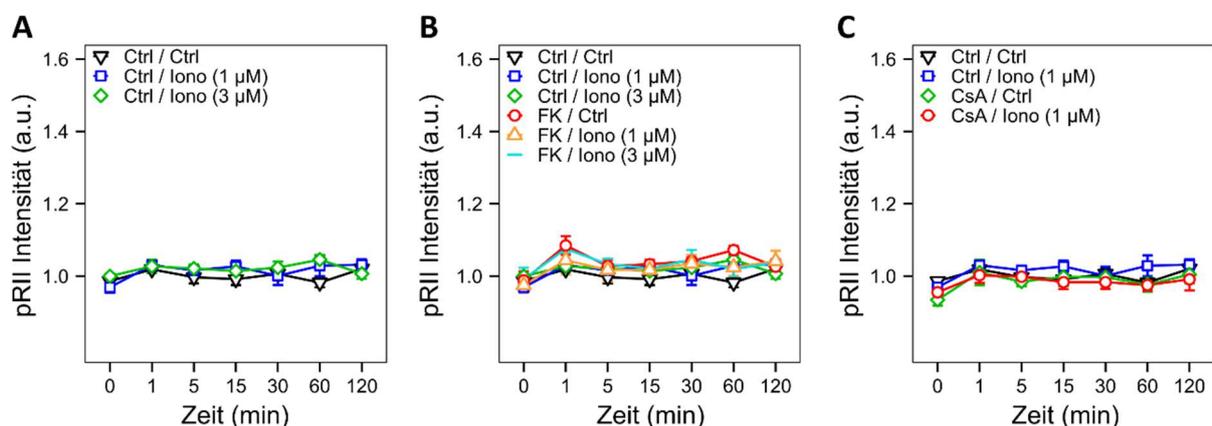


Abb. 14: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 3 μM Ionomycin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin. $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 18000 Neurone/Kondition.

4.1.9 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf einen Calciumeinstrom durch Ionomycin

Um zu untersuchen, ob nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II auch durch einen ungerichteten Calciumeinstrom über Ionomycin aktiviert werden und einer Regulation durch Calcineurin unterliegen bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wenn Calcium über Ionomycin in das Zellinnere strömt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone wiederum mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom mit Ionomycin (1 und 3 μM) induziert. Erneut wurden immunzytochemische Färbungen gegen UCHL1, pRII und pERK1/2 verwendet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ionomycin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Ionomycin induziert wird und einer Regulation durch Calcineurin unterliegt.

Die Intensität der pERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II war im Vergleich zur Negativkontrolle weder durch Ionomycin alleine noch durch die kombinierte Behandlung mit den Calcineurininhibitoren und Ionomycin erhöht (Abb. 15). Auch die Stimulation mit einer höheren Konzentration Ionomycin (3 μM) bewirkte keine Intensitätssteigerung der pERK1/2 innerhalb von 120 min (Abb. 15A).

Insgesamt war zu beachten, dass die Messwerte der Einzelexperimente variabel waren, sodass sich größere Standardfehler ergaben. Die Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A steigerten also nicht die Signalantwort von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Ionomycin.

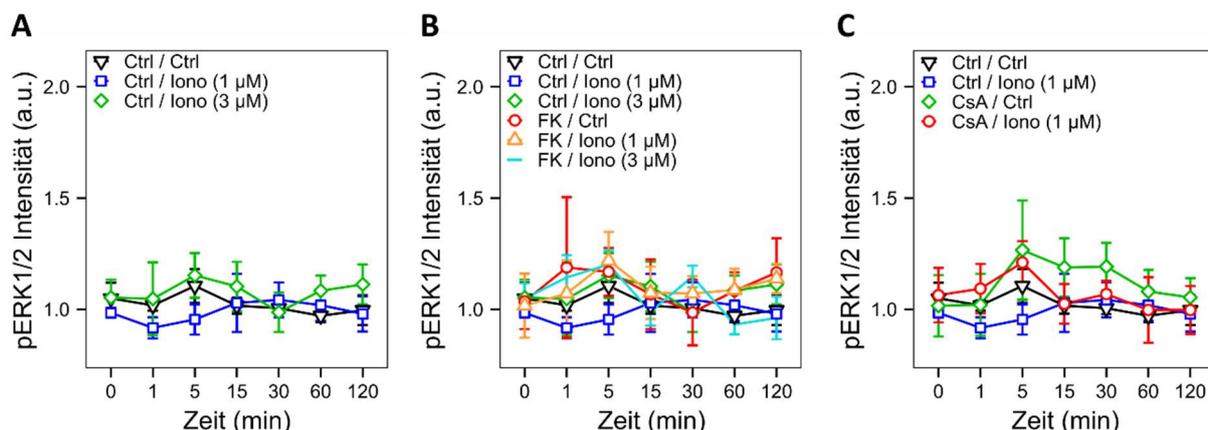


Abb. 15: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 3 μM Ionomycin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin. $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 18000 Neurone/Kondition.

4.2 Calcineurininhibitoren verstärken die Phosphorylierung des L-Typ Calciumkanals Cav1.2 nach Depolarisation primärer sensorischer Neuronen der Ratte

Da gezeigt wurde, dass die Aktivierung der PKA-II in nozizeptiven Neuronen die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals bewirkt und den Calciumeinstrom über den Cav1.2-Kanal verstärkt ²¹, sollte mit den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die Capsaicin induzierte Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals moduliert. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren vorbehandelt werden und anschließend der Calciumeinstrom in die Zelle durch Aktivierung der TRPV1- oder der TRPA1-Kanäle oder Ionomycin erfolgt. Für die folgenden Experimente wurden erneut primäre sensorische Neurone aus Spinalganglien von Ratten isoliert, für 30 min mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A (jeweils 10 µM) prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit dem TRPV1-Kanalagonisten Capsaicin (1 µM), dem TRPA1-Kanalagonisten AITC (10 und 100 mM) oder Ionomycin (1 und 3 µM) behandelt, um einen Calciumeinstrom in die Zellen zu induzieren.

4.2.1 Calcineurininhibitoren verstärken die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die Capsaicin induzierte Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals moduliert. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren vorbehandelt werden und anschließend der Calciumeinstrom in die Zelle durch Aktivierung der TRPV1- oder der TRPA1-Kanäle oder Ionomycin erfolgt.

Zur Induktion des Calciumeinstroms durch TRPV1-Kanäle wurden die Zellen erneut nach 30 min Vorinkubation mit den Calcineurininhibitoren (10 µM) für 0-120 min mit Capsaicin (1 µM) behandelt. Nach der Stimulation wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert, wobei anstelle der immunzytochemischen Färbung von pRII pCav1.2 bzw. pSer1928 des Cav1.2-Kanals mittels eines spezifischen Antikörpers gefärbt wurde. Die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und der Stimulation mit Capsaicin konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 16 dargestellt beobachtet werden.

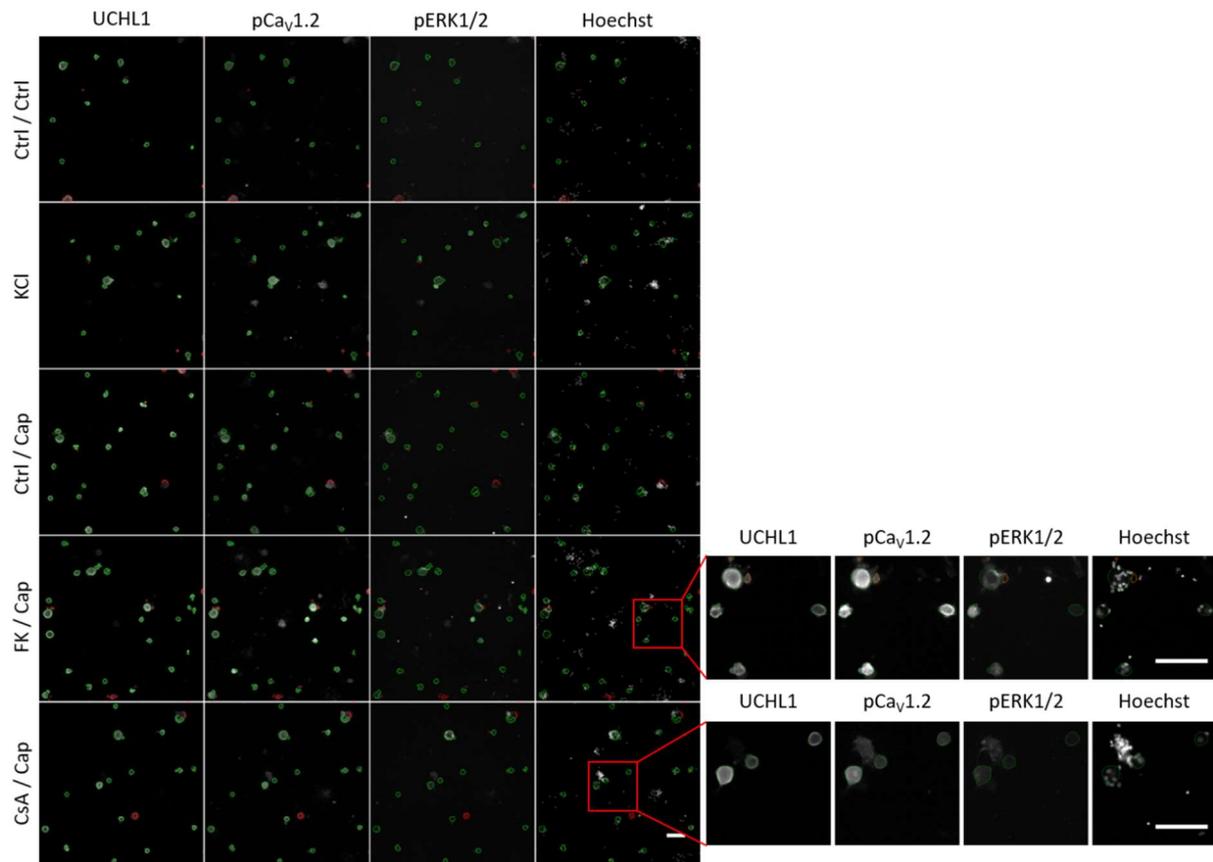


Abb. 16: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A führt zu einer Steigerung der Cav1.2 Phosphorylierung und der ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μM Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 μM Capsaicin stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 5-minütiger Stimulation. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pCav1.2, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm . Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

4.2.1.1 Tacrolimus verstärkt die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin bis nahezu um das 1,2-Fache

Um zu untersuchen, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus die Capsaicin induzierte Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals moduliert, wurden erneut primäre sensorische Neurone aus Spinalganglien von Ratten isoliert, mit dem Calcineurininhibitor Tacrolimus (10 μM) für 30 min prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit dem TRPV1-Kanalagonisten Capsaicin (1 μM) behandelt, um einen Calciumeinstrom in die Zellen zu induzieren. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Tacrolimus vorbehandelt werden und anschließend der Calciumeinstrom in die Zelle durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals mit Capsaicin induziert wird.

Die kombinierte Stimulation primärer sensorischer Neurone der Ratte mit Tacrolimus (10 μM) für 30 min und Capsaicin (1 μM) für 0-120 min führte im Vergleich zur Negativkontrolle nach 5-120 min zu einer Steigerung der pCa_v1.2 Intensität (Abb. 17B).

Die maximale Erhöhung der pCa_v1.2 Intensität betrug nahezu das 1,2-Fache und wurde nach 30-minütiger Stimulation erreicht (1,17-fach, SEM: +/- 0,05, $p < 0,01$). Für den Zeitraum von 5-60 min war diese beobachtete Intensitätssteigerung im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant. Darüber hinaus erhöhte die kombinierte Stimulation mit Tacrolimus und Capsaicin nach 30-minütiger Stimulation die pCa_v1.2 Intensität auch im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin signifikant ($p < 0,05$). Tacrolimus verstärkte die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin.

4.2.1.2 Cyclosporin A verstärkt die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin bis zum 1,24-Fachen

Um zu untersuchen, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Cyclosporin A die Capsaicin induzierte Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals moduliert, wurden erneut primäre sensorische Neurone aus Spinalganglien von Ratten isoliert, mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A (10 μM) für 30 min prästimuliert und anschließend für 0-120 min mit dem TRPV1-Kanalagonisten Capsaicin (1 μM) behandelt, um einen Calciumeinstrom in die Zellen zu induzieren. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Cyclosporin A vorbehandelt werden und anschließend der Calciumeinstrom in die Zelle durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals mit Capsaicin induziert wird.

Die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A (10 μM) für 30 min und Capsaicin (1 μM) für 0-120 min steigerte die pCa_v1.2 Intensität noch stärker als die Kombination aus Tacrolimus und Capsaicin (Abb. 17C). So konnte nach 1-60-minütiger Stimulation eine im Vergleich zur Negativkontrolle deutliche, signifikante Intensitätssteigerung bis zum 1,24-Fachen beobachtet werden (15 und 30 min: 1,24-fach, SEM: +/- 0,09 und 0,02, $p < 0,001$).

Auch die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A und Capsaicin bewirkte eine im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin signifikante Intensitätssteigerung von pCa_v1.2 (5 min: $p < 0,01$, 15 und 30 min: $p < 0,001$, 60 min: $p < 0,05$).

Nach der alleinigen Stimulation mit einer höheren Capsaicinkonzentration (10 μM) konnte nach 5 min eine gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhte pCa_v1.2 Intensität beobachtet werden (1,2-fach, SEM: +/- 0,05, $p < 0,001$) (Abb. 17A).

Die Stimulation mit der Positivkontrolle KCl zeigte eine nahezu 1,5-fache Steigerung der pCa_v1.2 Intensität. Dieser maximale Wert wurde bereits nach 1 min erreicht (1,46-fach, SEM: +/- 0,03, $p < 0,001$) (Abb. 17A). Im weiteren Verlauf flachte die Kurve langsam bis zu einer

etwas niedrigeren pCa_v1.2 Intensität ab (1,13-fache pCa_v1.2 Intensität, SEM: +/- 0,02, p > 0,1).

So fiel die Intensitätssteigerung nach der Stimulation mit KCl stärker aus als jene, welche nach der kombinierten Behandlung mit den Calcineurininhibitoren und Capsaicin beobachtet wurde. Cyclosporin A verstärkte die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Capsaicin.

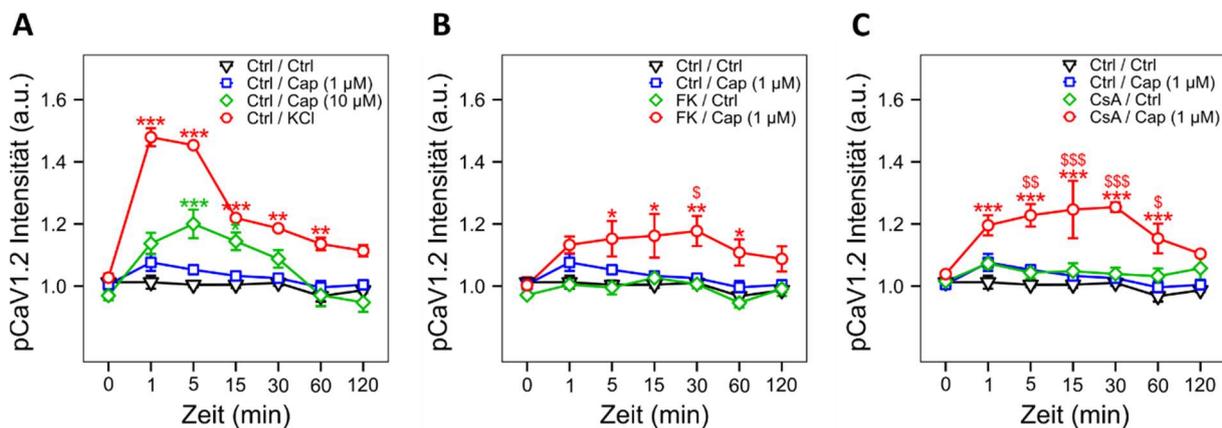


Abb. 17: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pCa_v1.2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 µM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 10 µM Capsaicin oder der Negativkontrolle oder KCl für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ p < 0,05, \$\$ p < 0,01 und \$\$\$ p < 0,001 stellen signifikante Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Capsaicin dar. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle). n=4. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 12000 Neurone/Kondition.

4.2.2 Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin

Um zu prüfen, ob nach der erfolgten Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals noch stets nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II aktiviert werden und möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK1/2 mit der PKA-II Aktivierung und der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals besteht, wurde nach der Vorbehandlung primärer sensorischer Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren und der Stimulation mit Capsaicin zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pCa_v1.2 ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin noch stets zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Ähnlich wie zuvor in der Versuchsreihe mit pRII (Abschnitt 4.1.3) führte die kombinierte Stimulation mit Tacrolimus und Capsaicin auch zu einer Steigerung der pERK1/2 Intensität

(Abb. 18B). Nach 30-60-minütiger Stimulation konnte eine im Vergleich zur Negativkontrolle signifikante Intensitätssteigerung mit bis zu 2,4-facher Erhöhung des Signals erreicht werden (60 min: 2,41-fach, SEM: +/- 0,21, $p < 0,001$). Für beide Zeitpunkte war die Intensität auch im Vergleich zur Stimulation mit Capsaicin alleine signifikant erhöht (30 min: $p < 0,01$, 60 min: $p < 0,001$).

Ebenso konnte ein Trend einer erhöhten pERK1/2 Intensität nach der kombinierten Behandlung mit Cyclosporin A und Capsaicin nach 0-120-minütiger Stimulation beobachtet werden (Abb. 18C). Auch wenn die Intensitätssteigerung nach dem Post-hoc Test für die spezifischen Stimulationsbedingungen nicht signifikant war und daher keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte, war die pERK1/2 Intensität nach 15-120-minütiger Stimulation um beinahe das 1,8-Fache erhöht (15 min: 1,79-fach, SEM: +/- 0,19, $p > 0,1$). Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pERK1/2 (F-Wert 17,386, $p < 0,001$).

Die alleinige Stimulation mit Capsaicin zeigte, dass nur die Stimulation mit einer höheren Capsaicinkonzentration (10 μM) zu einer signifikanten Steigerung der pERK1/2 Intensität führte (30 min: 2,22-fach, SEM: +/- 0,22, $p < 0,001$) (Abb. 18A).

Im Vergleich zur starken Steigerung der pCa_v1.2 Intensität nach der Stimulation mit KCl fiel die Steigerung der pERK1/2 Intensität nach der Stimulation mit KCl kleiner aus, als diejenige, welche nach der Stimulation mit 10 μM Capsaicin erreicht wurde (Abb. 18A). Das Maximum nach der Stimulation mit KCl wurde nach 5 min beobachtet und betrug ungefähr das 1,5-Fache (1,53-fach, SEM: +/- 0,21, $p > 0,1$). Diese Intensitätssteigerung war jedoch nach dem Post-hoc Test nicht signifikant, sodass nur von einem leichten Trend gesprochen werden kann.

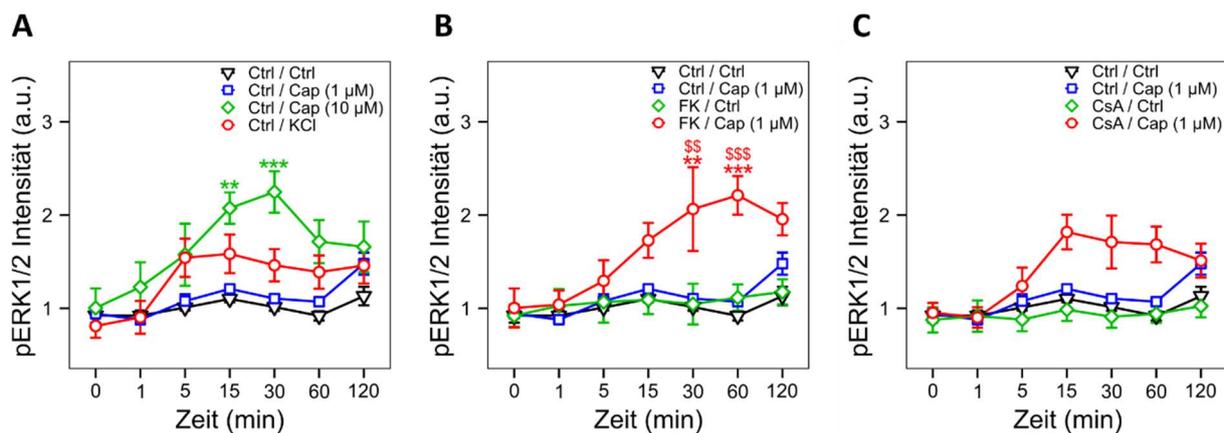


Abb. 18: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 10 μ M Capsaicin oder der Negativkontrolle oder KCl für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ stellen signifikante Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Capsaicin dar. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 12000 Neurone/Kondition.**

4.2.3 Calcineurininhibitoren verstärken nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die AITC induzierte Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals moduliert. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren vorbehandelt werden und anschließend der Calciumeinstrom in die Zellen durch Aktivierung des TRPA1-Kanals mit AITC induziert wird.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Calcineurininhibitoren (10 μ M) behandelt und anschließend wurde der Calciumeinstrom mit AITC (10 und 100 mM), einem TRPA1-Kanalagonisten, für 0-120 min induziert.

Die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und der Stimulation mit AITC, sowie nach der Stimulation mit KCl als Positivkontrolle konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 19 dargestellt beobachtet werden.

Die alleinige Stimulation mit AITC (10 oder 100 mM) bewirkte gegenüber der Negativkontrolle nach 5-minütiger Stimulation einen leichten Anstieg der pCav1.2 Intensität (bis ungefähr um das 1,1-Fache, Abb. 20A). Auch war die pCav1.2 Intensität nach 120-minütiger Stimulation mit der höheren Konzentration AITC (100 mM) im Vergleich zur Negativkontrolle leicht erhöht. Da sich allerdings die Fehlerbalken überlagerten und der Unterschied zur Negativkontrolle nach dem Post-hoc Test keine Signifikanz aufwies, also keiner spezifischen Stimulationsbedingung

zugeordnet werden konnte, ist diese beschriebene Intensitätssteigerung kritisch zu betrachten. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab allerdings einen globalen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die pCav1.2 Intensität (F-Wert 7,088, $p < 0,001$).

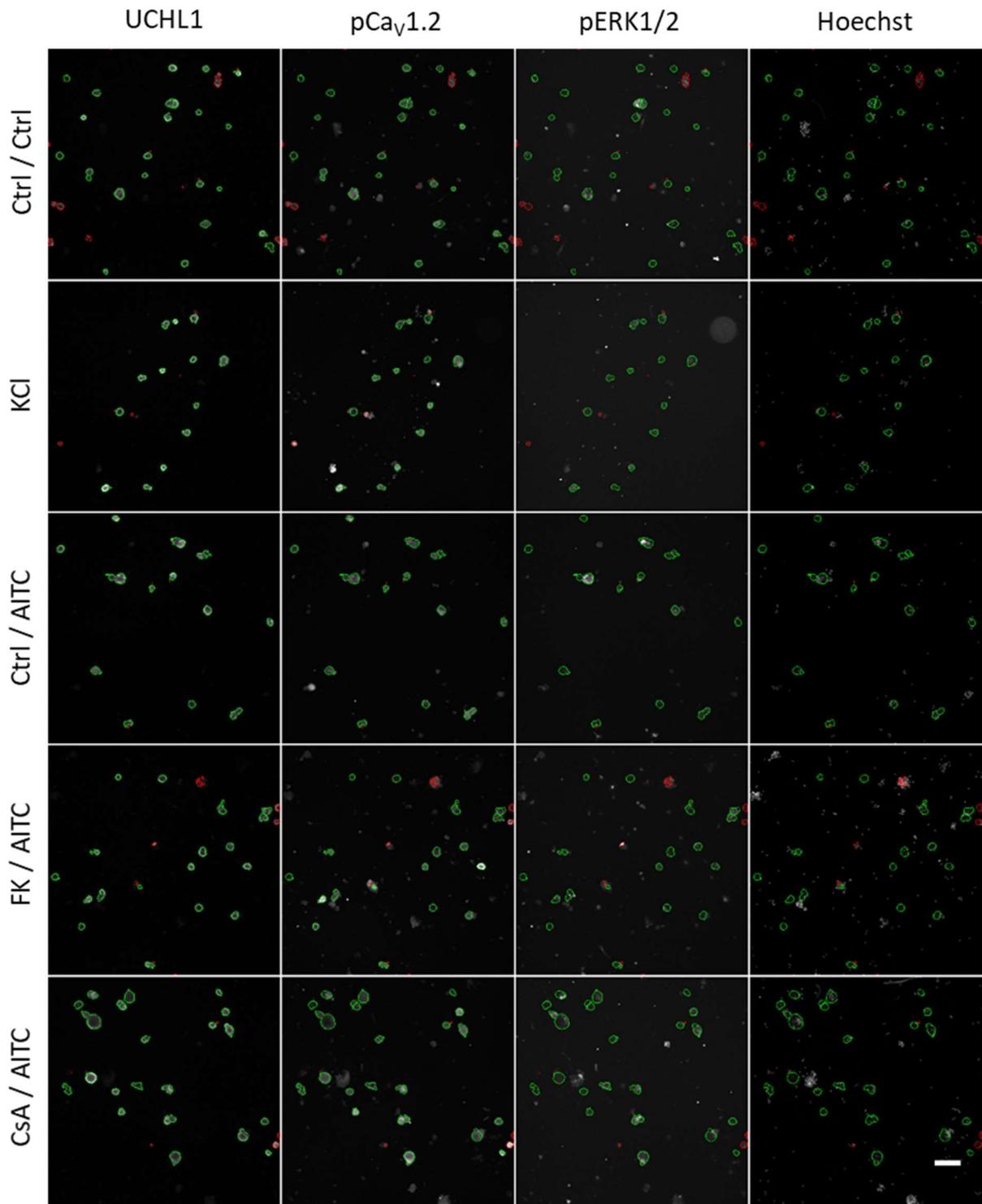


Abb. 19: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals und der ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und AITC zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 10 mM AITC stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 1-minütiger Stimulation. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pCav1.2, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. AITC: Allylisothiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

4.2.3.1 Tacrolimus verstärkt nicht die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus die AITC induzierte Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals moduliert. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Tacrolimus vorbehandelt werden und anschließend der Calciueinstrom in die Zellen durch Aktivierung des TRPA1-Kanals mit AITC induziert wird. Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Tacrolimus (10 µM) behandelt und anschließend wurde der Calciueinstrom mit AITC (10 und 100 mM), einem TRPA1-Kanalagonisten, für 0-120 min induziert.

Nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und 10 mM AITC war keine deutliche Steigerung der pCa_v1.2 Intensität wahrzunehmen (Abb. 20B).

Nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus für 30 min und der höheren AITC-Konzentration (100 mM) für 0-120 min war im Vergleich zur Negativkontrolle nach 1-5-minütiger Stimulation sowie nach 120-minütiger Stimulation eine Steigerung der pCa_v1.2 Intensität bis um das 1,2-Fache zu beobachten (120 min: 1,24-fach, SEM: +/- 0,05, p < 0,05) (Abb. 20B). Diese beobachtete Erhöhung der pCa_v1.2 Intensität war nicht nur gegenüber der Negativkontrolle, sondern auch gegenüber der alleinigen Stimulation mit der höheren AITC-Konzentration festzustellen, wenngleich die Erhöhung gegenüber der alleinigen Stimulation mit der höheren AITC-Konzentration keine statistische Signifikanz aufwies. Auch zeigte der Post-hoc Test keine statistische Signifikanz, sodass keine spezifische Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Tacrolimus verstärkte also nicht die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit AITC.

4.2.3.2 Cyclosporin A verstärkt nicht die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin mittels Cyclosporin A die AITC induzierte Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals moduliert. Wir vermuteten, dass eine stärkere Phosphorylierung des Ca_v1.2-Kanals erfolgt, wenn primäre sensorische Neurone von Ratten mit Cyclosporin A vorbehandelt werden und anschließend der Calciueinstrom in die Zellen durch Aktivierung des TRPA1-Kanals mit AITC induziert wird. Hierfür wurden primäre sensorische Neurone von Ratten für 30 min mit Cyclosporin A (10 µM) behandelt und anschließend wurde der Calciueinstrom mit AITC (10 mM), einem TRPA1-Kanalagonisten, für 0-120 min induziert.

Ebenso zeigte die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A für 30 min und AITC für 0-120 min eine Erhöhung der pCa_v1.2 Intensität nach 1-5-minütiger Stimulation bis nahezu um das 1,2-Fache (1 min: 1,18-fach, SEM: +/- 0,04, p > 0,1), welche nicht signifikant war. Auch nach

der Ausführung des Post-hoc Testes war diese Erhöhung nicht signifikant, sodass sie keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte (Abb. 20C).

Der Verlauf der Kurven zeigte interessanterweise jeweils eine leichte Erhöhung nach 1-5-minütiger Stimulation, also einem frühen Zeitpunkt, und nach 120-minütiger Stimulation, einem späten Zeitpunkt. Cyclosporin A verstärkte also nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit AITC.

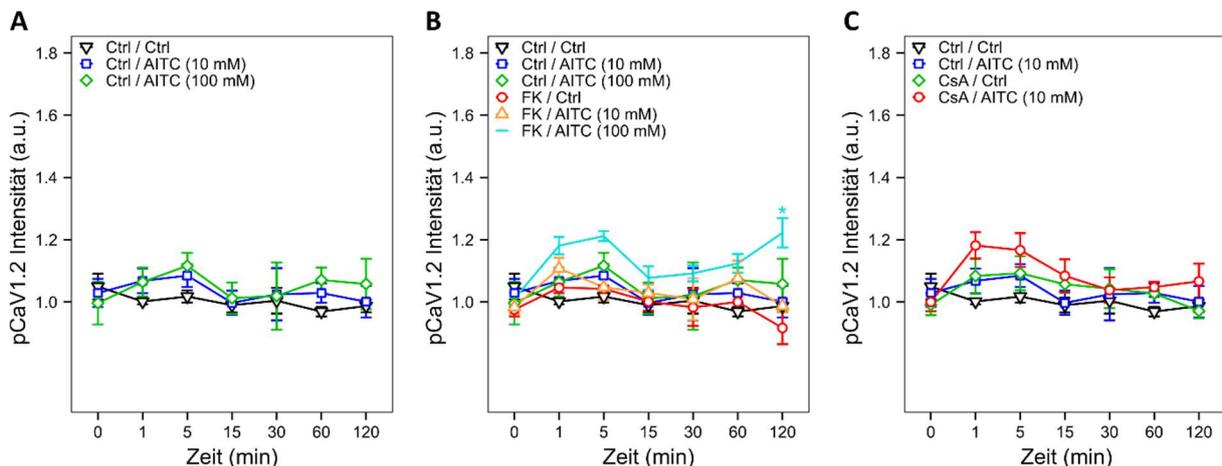


Abb. 20: Die Behandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pCaV1.2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. AITC: Allylisothiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 15000 Neurone/Kondition.

4.2.4 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf AITC

Um zu prüfen, ob bei der erfolgenden Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals noch stets nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II aktiviert werden und möglicherweise ein Zusammenhang mit der PKA-II Aktivierung und der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals besteht, wurde nach der Vorbehandlung primärer sensorischer Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren (10 μ M) und der Stimulation mit AITC (10 und 100 mM) zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pCav1.2 ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet. Wir vermuteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit AITC zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPA1-Kanal durch AITC aktiviert wird.

Während also die pCav1.2 Intensität nach der Stimulation mit AITC alleine und der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und der höheren AITC-Konzentration und Cyclosporin A und AITC eine leichte, statistisch nicht signifikante Intensitätssteigerung zu

bestimmten Zeitpunkten bewirkten, konnte eine deutliche Steigerung der pERK1/2 Intensität nach der genannten Stimulation innerhalb von 120 min beobachtet werden (Abb. 21A-C).

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich eine Erhöhung der pERK1/2 Intensität nach 5-120-minütiger Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC (Abb. 21A). Hierbei führte die Behandlung mit einer höheren Konzentration AITC (100 mM) zu einer größeren Steigerung der pERK1/2 Intensität deren Maximum nach 120-minütiger Stimulation erreicht wurde (6,16-fach, SEM: +/- 1,06, $p < 0,001$). Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und 10 mM AITC führte zu einer ähnlich starken Erhöhung wie die, welche nach der alleinigen Stimulation mit 10 mM AITC beobachtet werden konnte, wobei die Kurve für die kombinierte Behandlung leicht über derjenigen der alleinigen Behandlung mit AITC verlief (Abb. 21B). Nach 120-minütiger Stimulation war die pERK1/2 Intensität im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht ($p < 0,001$). Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und einer höheren Konzentration AITC (100 mM) zeigte beinahe exakt die gleiche Steigerung der pERK1/2 Intensität wie die, welche durch die alleinige Stimulation mit 100 mM AITC erreicht wurde.

Auch die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A und 10 mM AITC führte innerhalb von 120 min zu einer ähnlich starken Erhöhung der pERK1/2 Intensität wie diejenige, die nach der alleinigen Stimulation mit 10 mM AITC beobachtet werden konnte (Abb. 21C). Im Vergleich zur Negativkontrolle war die pERK1/2 Intensität nach der kombinierten Behandlung mit Cyclosporin A und AITC nach 30- und 120-minütiger Stimulation bis um das 3,5-Fache erhöht (120 min: 3,55-fach, SEM: +/- 0,67, $p < 0,05$). Calcineurininhibitoren steigerten also nicht die Signalantwort der ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit AITC.

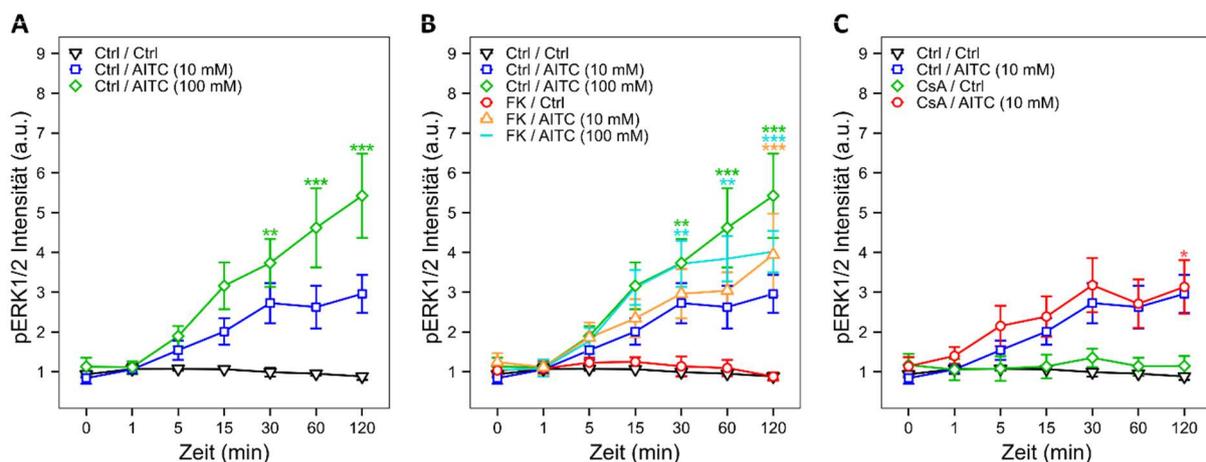


Abb. 21: Die Behandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 10 oder 100 mM AITC oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. AITC: Allylisothiocyanat, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,1 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 15000 Neurone/Kondition.**

4.2.5 Calcineurininhibitoren verstärken nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach Induktion des Calciumeinstroms über Ionomycin

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob auch ein ungerichteter Calciumeinstrom über Ionomycin zu Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals führt und ob die Inhibition von Calcineurin diese womöglich moduliert. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ionomycin zu einer stärkeren Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals führt, wenn der Calciumeinstrom durch Ionomycin induziert wird und einer Regulation durch Calcineurin unterliegt.

Hierfür wurden primäre sensorische Neurone nach der 30-minütigen Vorbehandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A (10 μM) für 0-120 min mit Ionomycin (1 und 3 μM) behandelt.

Nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und der Stimulation des Calciumeinstroms über Ionomycin konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 22 dargestellt keine Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals beobachtet werden.

Genau wie bei der pR11 Intensität beobachtet, führte die kombinierte Behandlung primärer sensorischer Neurone von Ratten mit den Calcineurininhibitoren und Ionomycin innerhalb von 0-120 min nicht zu einem Anstieg der pCav1.2 Intensität (Abb. 23B und C). Zwar war ein leichter Trend einer erhöhten pCav1.2 Intensität nach der Behandlung mit alleine Cyclosporin A nach 15 min erkennbar, allerdings handelte es sich hier um einen minimalen Effekt, der keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 23C). Auch eine höhere Ionomycinkonzentration (3 μM) führte innerhalb von 0-120 min nicht zu einer Erhöhung der pCav1.2 Intensität (Abb. 23A). Nichtsdestotrotz schien laut der mehrfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Effekt der Stimulanzen auf die pCav1.2 Intensität vorzuliegen (F-Wert-3,769, $p < 0,001$). Calcineurininhibitoren verstärkten also nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Ionomycin.

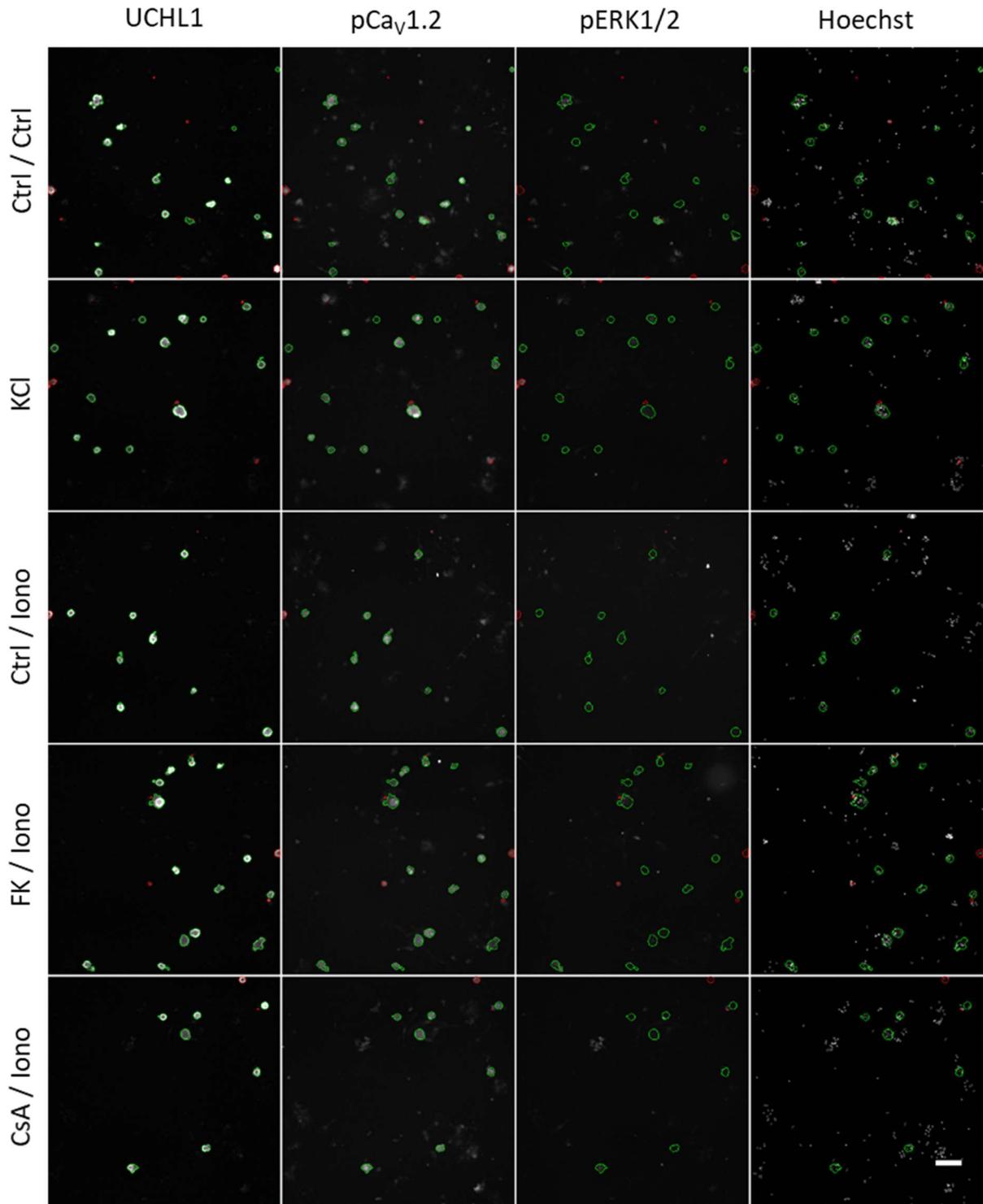


Abb. 22: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals und der ERK1/2 Aktivität nach dem Calciumeinstrom über Ionomycin. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Ratte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Ionomycin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 oder 3 μ M Ionomycin stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 5-minütiger Stimulation mit 1 μ M Ionomycin. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pCa_v1.2, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin, KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

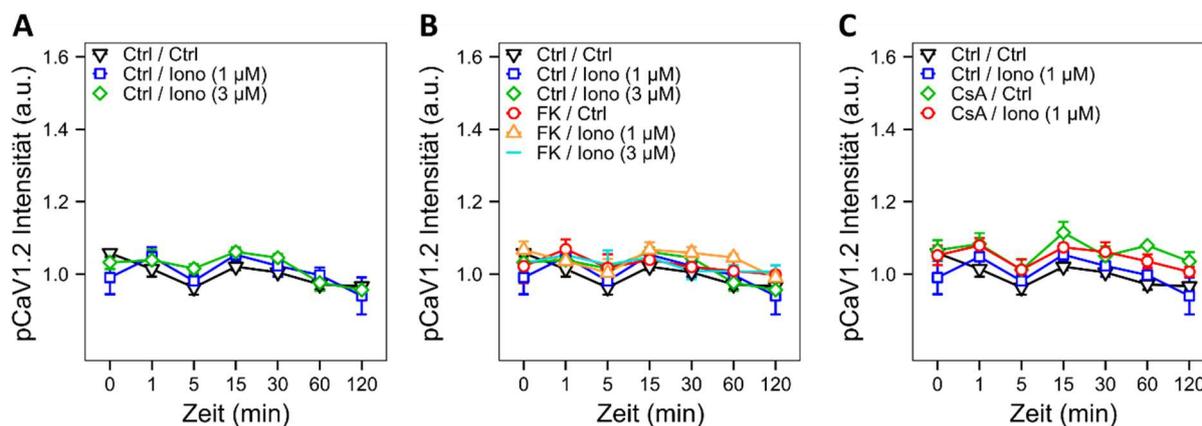


Abb. 23: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pCaV1.2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 3 μ M Ionomycin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin. n=4. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, Kammern mit < 500 Zellen wurden für die Analyse exkludiert (3 Kammern), > 18000 Neurone/Kondition.

4.2.6 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 nach Induktion des Calciumeinstroms über Ionomycin

Um zu prüfen, ob trotz nicht erfolgreicher Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals durch einen ungerichteten Calciumeinstrom durch Ionomycin nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II aktiviert werden und möglicherweise ein Zusammenhang mit der PKA-II Aktivierung und der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals besteht, wurde nach der Vorbehandlung primärer sensorischer Neurone von Ratten mit Calcineurininhibitoren (10 μ M) und der Stimulation mit Ionomycin (1 und 3 μ M) zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pCaV1.2 ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet. Wir vermuteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ionomycin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der Calciumeinstrom durch Ionomycin induziert wird und einer Regulation durch Calcineurin unterliegt.

Die Intensität der pERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II war allein durch die kombinierte Behandlung mit Cyclosporin A und Ionomycin nach 5 min im Vergleich zur Negativkontrolle mit einer Intensitätssteigerung um das 1,04-Fache minimal erhöht (1,04-fach, SEM: +/- 0,09, p > 0,1) (Abb. 24C). Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und der höheren Ionomycinkonzentration (3 μ M) führte im Vergleich zur Negativkontrolle nicht zu einer Intensitätssteigerung der pERK1/2 Intensität (Abb. 24B). Nach der alleinigen Stimulation mit Ionomycin (1 und 3 μ M) konnte ebenso keine Erhöhung der pERK1/2 Intensität im Vergleich zur Negativkontrolle im Zeitraum von 0-120 min beobachtet werden (Abb. 24A).

Insgesamt war zu beachten, dass die Messwerte der Einzelerperimente variabel waren, sodass sich größere Standardfehler ergaben. Auch wiesen die beobachteten Effekte keine

statistische Signifikanz auf. Calcineurininhibitoren steigerten also nicht die Signalantwort der ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen nach der Stimulation mit Ionomycin.

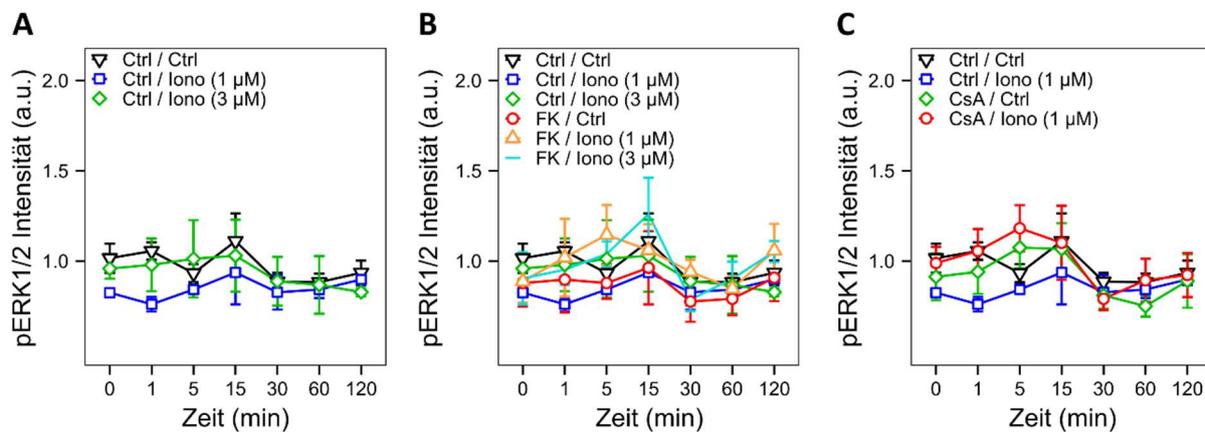


Abb. 24: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μ M) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 oder 3 μ M Ionomycin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,24 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), Iono: Ionomycin. n=4. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, Kammern mit < 500 Zellen wurden für die Analyse exkludiert (3 Kammern), > 18000 Neurone/Kondition.

4.3 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II und der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Nachdem für primäre sensorische Neurone von Ratten beobachtet wurde, dass die pRII Intensität nach vorheriger Behandlung mit den Calcineurininhibitoren und einer Stimulation des Calciumeinstroms durch die Aktivierung verschiedener Kanäle unter bestimmten Bedingungen erhöht war, sollten die Experimente mit primären sensorischen Neuronen von Mäusen wiederholt werden. Einerseits eignen sich Mäuse für das Einbringen genetischer Veränderungen mit dem Ziel bestimmte Gene herunterzuregulieren bzw. auszuschalten besser als Ratten. Andererseits kann untersucht werden, ob die in Ratten beobachteten Effekte auch in anderen Spezies beobachtet werden können und es sich womöglich um einen zwischen Spezies konservierten Effekt handelt, der gegebenenfalls auch auf humane Zellen übertragen werden könnte. Wir erwarteten, dass, wie für primäre sensorische Neuronen von Ratten, die Vorinkubation von primären sensorischen Neuronen der Maus mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II und ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird. Für die folgenden Versuche wurden primäre sensorische Neurone aus Spinalganglien von Mäusen isoliert. Die primären sensorischen Neurone wurden erneut für 30 min mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A prästimuliert und anschließend für 0-120

min zunächst nur mit Capsaicin (1 μM) stimuliert, um einen Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal in die Zellen zu induzieren.

4.3.1 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Inhibition von Calcineurin die Capsaicin induzierte Aktivierung der PKA-II auch in primären sensorischen Neuronen der Maus moduliert. Wir erwarteten, dass, wie für primäre sensorische Neuronen von Ratten, die Vorinkubation von primären sensorischen Neuronen der Maus mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Um die geeignete Konzentration der Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A für die Stimulation des Signalweges in murinen primären sensorischen Neuronen zu ermitteln, wurden die aus Spinalganglien von Mäusen isolierten primären sensorischen Neurone mit verschiedenen Konzentrationen Tacrolimus und Cyclosporin A (jeweils 0-50 μM) prästimuliert und anschließend für 5 min mit Capsaicin (1 μM) stimuliert.

Nach der immunzytochemischen Markierung der primären sensorischen Neuronen mittels UCHL1 und der Färbung für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 zeigte sich ein erhöhtes pRII Signal in primären sensorischen Neuronen, welche mit der Kombination von Tacrolimus und Capsaicin, alleine mit Capsaicin oder der Positivkontrolle (KCl) behandelt wurden (Abb. 25). Die beobachtete pRII Intensitätserhöhung wies allerdings weder für die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin noch für die Behandlung alleine mit Capsaicin eine statistische Signifikanz auf. Für primäre sensorische Neurone, welche mit einer Kombination von Cyclosporin A und Capsaicin behandelt wurden, zeigte sich ein gering erhöhtes pRII Signal, welches allerdings im Vergleich zur Negativkontrolle nicht statistisch signifikant war.

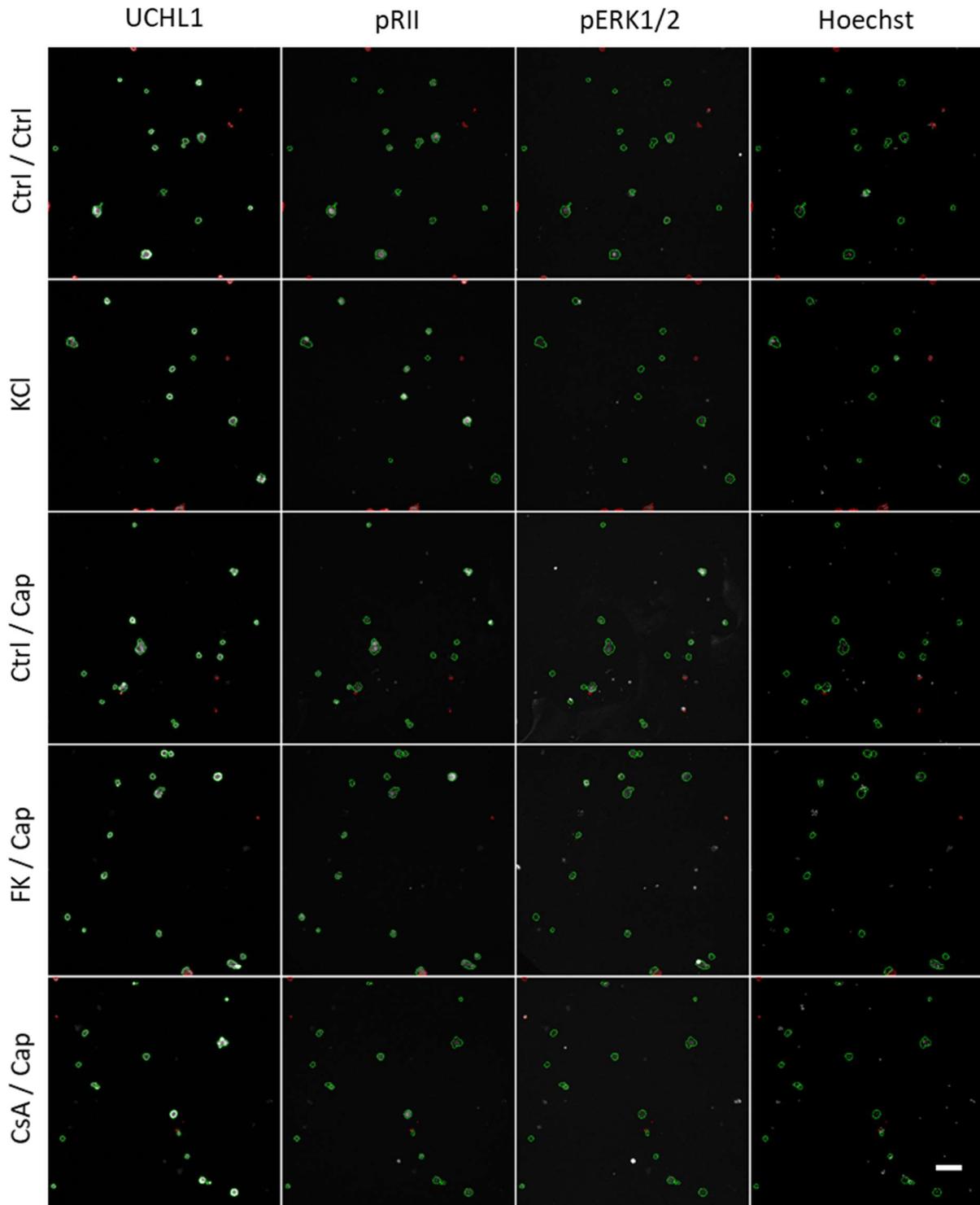


Abb. 25: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Maus nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 3,13 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 5 min mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

Im Vergleich zur Negativkontrolle war die pRII Intensität als Marker für die PKA-II Aktivität nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und anschließender Stimulation mit Capsaicin gering erhöht (Abb. 26A-C). Die maximale pRII Intensität wurde nach 30-minütiger Prästimulation mit 3,13 μM Tacrolimus und 1,56 μM Cyclosporin A gefolgt von einer 5-minütigen Stimulation mit 1 μM Capsaicin erzielt (respektive 1,13-fach, SEM: \pm 0,04, $p > 0,1$; 1,13-fach, SEM: \pm 0,03, $p > 0,1$), wies jedoch keine statistische Signifikanz auf. Calcineurininhibitoren steigerten also nicht die Signalantwort der PKA-II in primären sensorischen Neuronen der Maus nach der Stimulation mit Capsaicin.

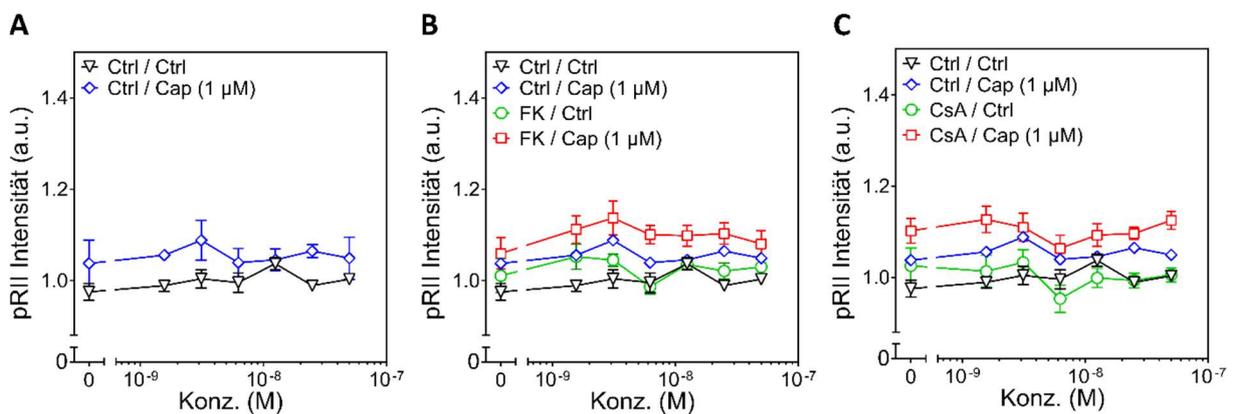


Abb. 26: Die Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen. A-C: Dosis-Antwort Kurven der pRII Intensität in murinen primären sensorischen Neuronen nach 30-minütiger Prästimulation mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus oder Cyclosporin A (0-50 μM) oder der Negativkontrolle, gefolgt von einer 5-minütigen Stimulation mit 1 μM Capsaicin oder der Negativkontrolle. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,2 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 20000 Neurone/Kondition.

4.3.2 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II in primären sensorischen Neuronen der Maus einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone von Mäusen wiederum mit den Calcineurininhibitoren (0-50 μM) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin (1 μM) induziert. Wir erwarteten, dass, wie für primäre sensorische Neuronen von Ratten, die Vorinkubation von primären sensorischen Neuronen der Maus mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pRII wurde ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet, der spezifisch an aktivierte ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II bindet.

Bezüglich der pERK1/2 Intensität bewirkte die Behandlung mit 3,13 μM Tacrolimus gefolgt von der 5-minütigen Stimulation mit Capsaicin eine 1,3-fache Zunahme der pERK1/2 Intensität (1,3-fach, SEM: \pm 0,06, $p > 0,1$). Ebenso führte die Behandlung mit 1,56 μM Cyclosporin A nach der Stimulation der Neurone zu einer geringen Steigerung der pERK1/2 Intensität (1,2-fach, SEM: \pm 0,07, $p > 0,1$). Beide Intensitätssteigerungen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle keine statistische Signifikanz. Bei allen anderen Kombinationen sowie der Positivkontrolle (KCI) konnte keine Zunahme der pERK1/2 Intensität beobachtet werden (Abb. 27A-C). Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab dennoch einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pRII und pERK1/2 (F-Wert 61,883, $p < 0,001$ und F-Wert 17,386, $p < 0,001$). Diese beobachteten Effekte wiesen nach dem Post-hoc Test allerdings keine Signifikanz auf, sodass der Effekt keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte. Calcineurininhibitoren steigerten also nicht die Signalantwort der ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen der Maus nach der Stimulation mit Capsaicin.

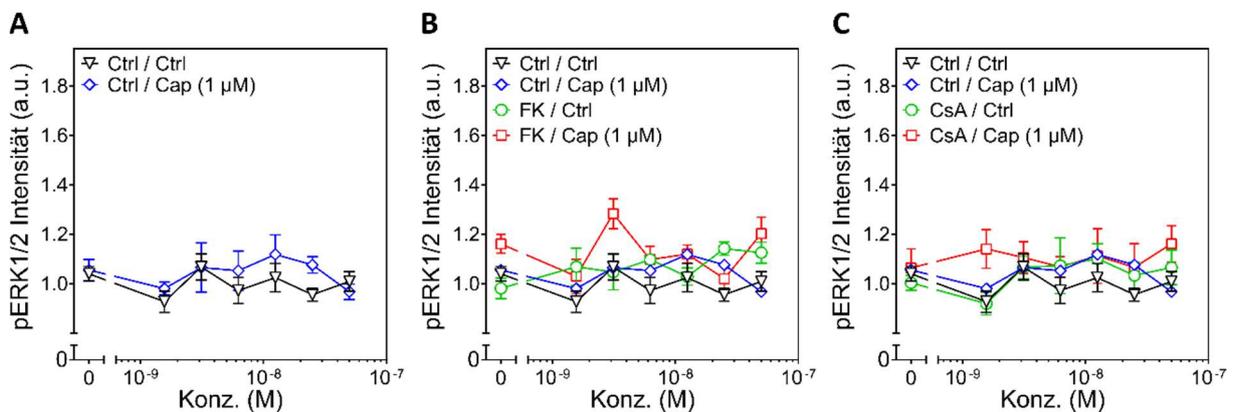


Abb. 27: Die Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen. A-C: Dosis-Antwort Kurven der pERK1/2 Intensität in murinen primären sensorischen Neuronen nach 30-minütiger Prästimulation mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus oder Cyclosporin A (0-50 μM) oder der Negativkontrolle, gefolgt von einer 5-minütigen Stimulation mit 1 μM Capsaicin oder der Negativkontrolle. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,2 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 20000 Neurone/Kondition.

4.3.3 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Obwohl in dem zuvor durchgeführten Experiment die am besten geeignete Konzentration der Calcineurininhibitoren nicht eindeutig ermittelt werden konnte, wurden die murinen primären sensorischen Neurone basierend auf Daten aus vorherigen Experimenten mit Spinalganglien aus Ratten in allen folgenden Experimenten mit 10 μM Tacrolimus oder 10 μM Cyclosporin A für 30 min prästimuliert, um den kinetischen Verlauf (0-120 Minuten) einer möglichen Aktivierung des Signalweges abbilden zu können.

Anschließend an die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren folgte die Stimulation mit 1 oder 10 μM Capsaicin, um den Effekt der Calcineurininhibition auf die Aktivierung der PKA-II über einen TRPV1 Kanal-vermittelten Calciumeinstrom im kinetischen Modell zu untersuchen. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Die Aktivierung der PKA-II nach der Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin, mit Capsaicin alleine oder mit KCl als Positivkontrolle konnte wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 28 dargestellt beobachtet werden.

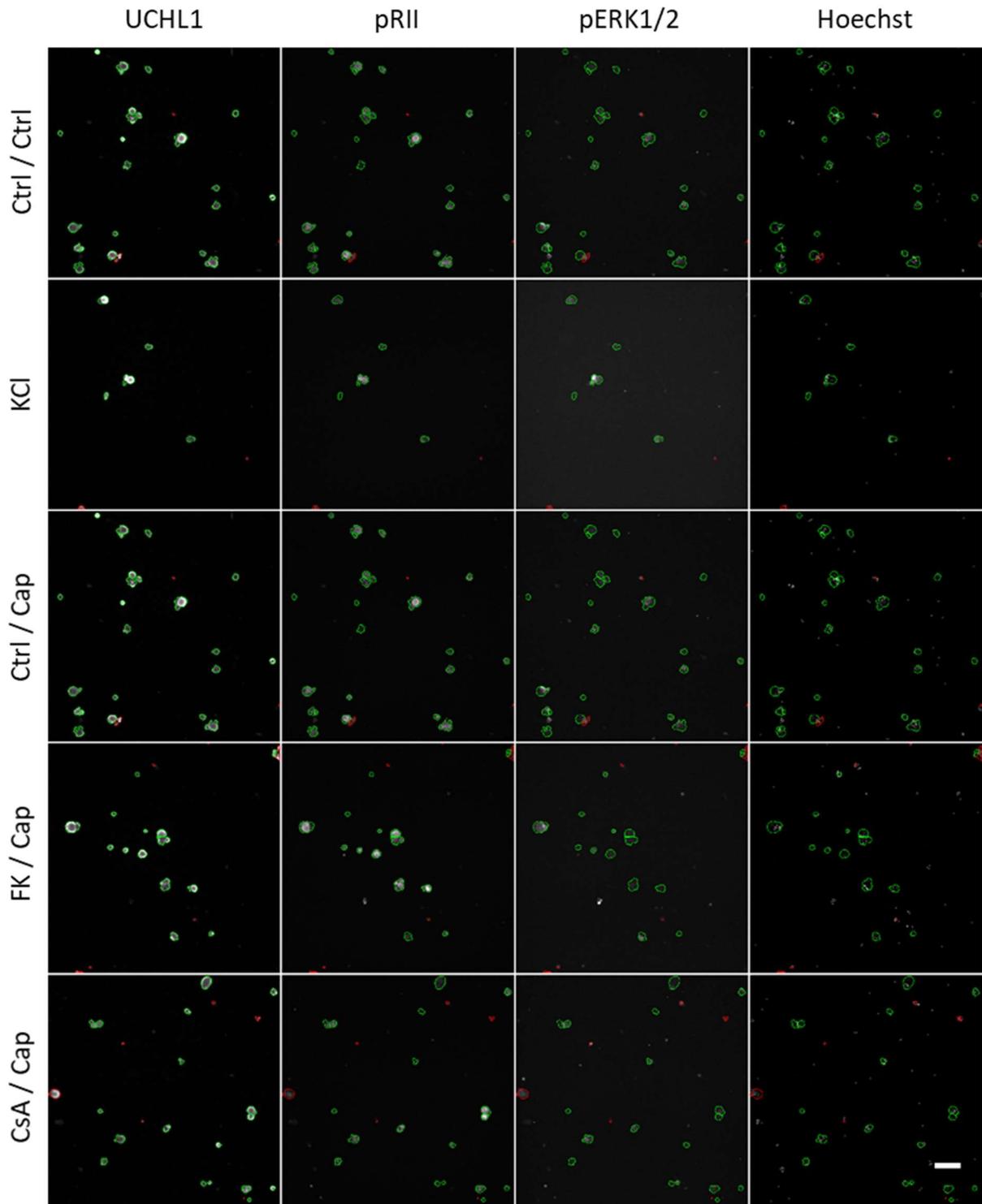


Abb. 28: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Maus nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Die Bilder zeigen die primären Kulturen nach 5-minütiger Stimulation mit Capsaicin. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

4.3.3.1 Tacrolimus und Cyclosporin A erhöhen nicht die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin

Obwohl in dem zuvor durchgeführten Experiment die am besten geeignete Konzentration der Calcineurininhibitoren nicht eindeutig ermittelt werden konnte, wurden die murinen primären sensorischen Neurone basierend auf Daten aus vorherigen Experimenten mit Spinalganglien aus Ratten in allen folgenden Experimenten mit 10 μM Tacrolimus oder 10 μM Cyclosporin A für 30 min prästimuliert, um den kinetischen Verlauf (0-120 Minuten) einer möglichen Aktivierung des Signalweges abbilden zu können.

Anschließend an die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren folgte die Stimulation mit 1 oder 10 μM Capsaicin, um den Effekt der Calcineurininhibition auf die Aktivierung der PKA-II über einen TRPV1 Kanal-vermittelten Calciumeinstrom im kinetischen Modell zu untersuchen. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Nach der kombinierten Behandlung der Neurone mit Tacrolimus und 1 μM Capsaicin konnte eine im Vergleich zur Negativkontrolle 1,1-fache Erhöhung der pRII Intensität beobachtet werden, welche nach 30-minütiger Stimulation erreicht wurde (1,1-fach, SEM: +/- 0,04, $p > 0,1$) (Abb. 29B). Eine Erhöhung der Capsaicinkonzentration auf 10 μM in Kombination mit Tacrolimus führte bereits nach 1-minütiger Stimulation zu einer um das 1,1-Fache gesteigerten pRII Intensität (1,1-fach, SEM: +/- 0,05, $p > 0,1$).

Auch die vorherige Behandlung mit Cyclosporin A gefolgt von der Stimulation mit 1 μM Capsaicin für 0-120 min konnte die pRII Intensität in murinen primären sensorischen Neuronen gering erhöhen. Die maximale Erhöhung der pRII Intensität zeigte eine 1,13-fache Steigerung und wurde nach 5-minütiger Stimulation mit Capsaicin erreicht (1,13-fach, SEM: +/- 0,04, $p > 0,1$) (Abb. 29C). Die beobachteten pRII Intensitätssteigerungen wiesen allerdings keine statistische Signifikanz auf.

Die Stimulation mit zwei verschiedenen Konzentrationen Capsaicin alleine führte im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer Erhöhung der pRII Intensität (Abb. 29A). Die Stimulation mit 1 μM Capsaicin konnte die pRII Intensität nach 1-30-minütiger Stimulation um das 1,1-Fache steigern (Maximum nach 15 min: 1,1-fach, SEM: +/- 0,02, $p > 0,1$). Bei einer höheren Capsaicinkonzentration (10 μM) konnte eine Erhöhung der pRII Intensität bereits nach 1-5-minütiger Stimulation beobachtet werden, wobei die maximale Erhöhung der Intensität bei der höheren Konzentration nicht zusätzlich erhöht war (Maximum nach 5 min: 1,1-fach, SEM: +/- 0,05, $p > 0,1$) (Abb. 29A). Auch diese beobachteten pRII Intensitätssteigerungen wiesen keine statistische Signifikanz auf.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Kombination von Calcineurininhibitoren und Capsaicin die pRII Intensität und damit die PKA-II Aktivität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit

Capsaicin nicht, im Falle von Tacrolimus, oder nur unwesentlich, im Falle von Cyclosporin A in murinen primären sensorischen Neuronen steigerten ohne jedoch eine statistische Signifikanz aufzuweisen. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt der verwendeten Stimulation auf die Signalintensität der pRII (F-Wert 4,124, $p < 0,001$). Dieser beobachtete Effekt wies nach dem Post-hoc Test allerdings keine Signifikanz auf, sodass der Effekt keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte.

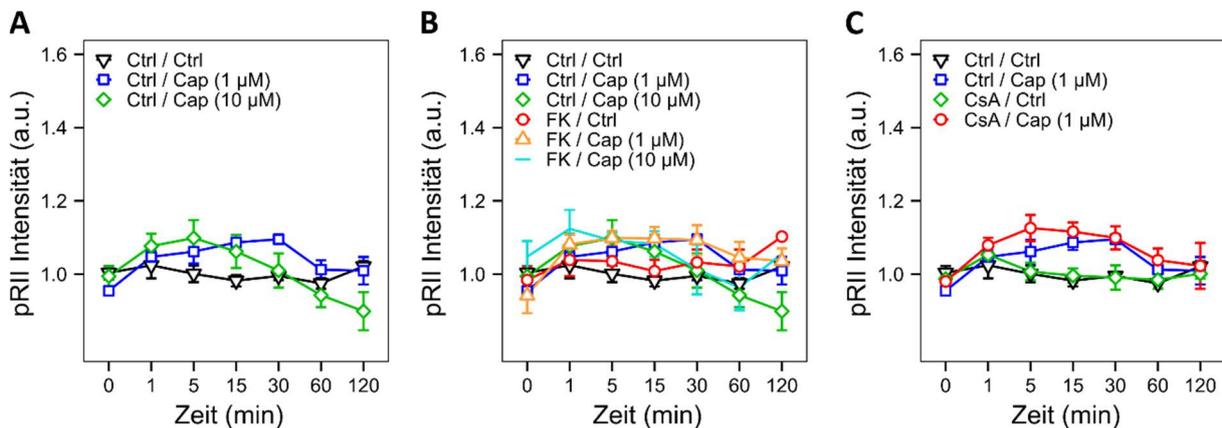


Abb. 29: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen nach 0-120 min. **A-C:** Zeitlicher Verlauf der pRII Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 und 10 μM Capsaicin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, Kammern mit < 500 Zellen wurden für die Analyse exkludiert (6 Kammern), > 12000 Neurone/Kondition.

4.3.4 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone von Mäusen wiederum für 30 min mit den Calcineurininhibitoren prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal mittels Capsaicin (1 und 10 μM) für 0-120 min induziert. Zusätzlich zu der immunzytochemischen Färbung gegen UCHL1 und pRII wurde ein Antikörper gegen pERK1/2 verwendet, der spezifisch an aktivierte ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II bindet. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird.

Bezüglich der Phosphorylierung der ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II führte die Stimulation mit 1 μM Capsaicin nach 15-60 min zu einer bis zu 1,2-fachen, statistisch nicht

signifikanten Erhöhung der pERK1/2 Intensität (Maximum nach 30 min: 1,26-fach, SEM: +/- 0,05, $p > 0,1$). Die Stimulation mit einer höheren Capsaicinkonzentration (10 μM) zeigte hierbei keine zusätzliche Erhöhung der pERK1/2 Intensität (Maximum nach 30 min: 1,22-fach, SEM: +/- 0,14, $p > 0,1$) (Abb. 30A).

Primäre sensorische Neurone, welche zuvor mit Tacrolimus behandelt wurden, zeigten keine gesteigerte pERK1/2 Intensität zusätzlich zu der bereits durch die Stimulation mit Capsaicin alleine bewirkten Erhöhung der pERK1/2 Intensität (Abb. 30B). Die Kombination aus Cyclosporin A und 1 μM Capsaicin erhöhte die pERK1/2 minimal stärker als die alleinige Stimulation mit Capsaicin, jedoch ohne statistische Signifikanz. So konnte eine maximale Erhöhung der pERK1/2 Intensität nach 15-minütiger Stimulation mit Capsaicin nach vorheriger Behandlung mit Cyclosporin A mit einer 1,3-fachen, statistisch nicht signifikanten Erhöhung beobachtet werden (1,38-fach, SEM: +/- 0,03, $p > 0,1$) (Abb. 30C).

Dieser Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen war nach der Anwendung des Post-hoc Testes jedoch nicht signifikant, sodass der Effekt keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte, obwohl die mehrfaktorielle Varianzanalyse einen Effekt der verwendeten Stimulanzien auf die pERK1/2 Intensität ergab (F-Wert 3,963, $p < 0,001$). Die Calcineurininhibitoren steigerten also nicht die Signalantwort der ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen der Maus nach der Stimulation mit Capsaicin.

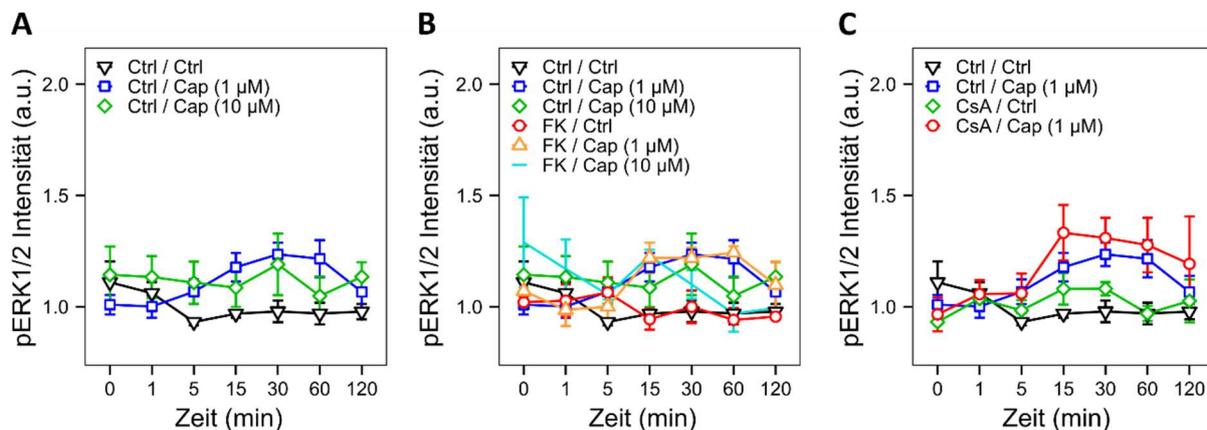


Abb. 30: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen nach 0-120 min. A-C: Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus oder Cyclosporin A (jeweils 10 μM) oder der Negativkontrolle gefolgt von einer Stimulation mit 1 und 10 μM Capsaicin oder der Negativkontrolle für 0-120 min. In A-C ist stets dieselbe Negativkontrolle dargestellt. Cap: Capsaicin, CsA: Cyclosporin A, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506). $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, Kammern mit < 500 Zellen wurden für die Analyse exkludiert (6 Kammern), > 12000 Neurone/Kondition.

4.4 Calcineurininhibitoren erhöhen die Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin stärker in CGRP-positiven Neuronen der Maus

Der in primären sensorischen Neuronen von Mäusen beobachtete Effekt der Calcineurininhibitoren auf die Erhöhung der Signalantwort der PKA-II auf Capsaicin fiel geringer aus als der, welcher zuvor in primären sensorischen Neuronen von Ratten beobachtet wurde. Zuvor zeigte die kombinierte Behandlung mit Calcineurininhibitoren und Capsaicin eine geringe Erhöhung der pRII Intensität, jedoch wies diese Intensitätserhöhung keine statistische Signifikanz auf. Da TRPV1-Kanäle in Mäusen vor allem in peptidergen CGRP-positiven Neuronen exprimiert werden ^{117,118}, wurden in dem folgenden Experiment gezielt CGRP-positive Neurone untersucht, um die Signalantwort muriner primärer sensorischer Neurone auf die Stimulation mit Capsaicin nach vorheriger Behandlung mit den Calcineurininhibitoren zu erhöhen. Wir erwarteten, dass die Vorinkubation mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren PKA-II Aktivierung in CGRP-positiven Neuronen der Maus führt.

Peptiderge Neurone wurden mithilfe eines Antikörpers gegen CGRP identifiziert, sodass die Signalantwort für diese Zellen separat analysiert werden konnte.

Wie in den repräsentativen Bildern in Abb. 31 dargestellt war nur ein Teil der identifizierten primären sensorischen Neurone CGRP-positiv. Von den CGRP-positiven Neuronen zeigten die auf den in Abb. 31 dargestellten Neurone nach 15-minütiger Stimulation mit Capsaicin alleine oder mit Tacrolimus und Capsaicin ein erhöhtes pRII Signal.

Nach 15-minütiger Stimulation mit ausschließlich Capsaicin zeigte sich eine gegenüber der Negativkontrolle geringe, aber signifikante, Steigerung der pRII Intensität in allen isolierten primären sensorischen Neuronen (1,09-fach, SEM: +/- 0,01, $p < 0,001$), während die pRII Intensität in CGRP-positiven Neuronen bis um das 1,25-Fache anstieg (1,25-fach, SEM: +/- 0,02, $p < 0,001$) (Abb. 32A und B). Der gleiche Effekt konnte nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und der 15-minütigen Stimulation mit Capsaicin beobachtet werden. Während die pRII Intensität in allen isolierten primären sensorischen Neuronen weniger als das 1,2-Fache (1,16-fach, SEM: +/- 0,01, $p < 0,001$) aber dennoch signifikant, gestiegen ist, stieg die pRII Intensität in CGRP-positiven Neuronen um mehr als das 1,25-Fache bis um das 1,4-Fache (1,42-fach, SEM: +/- 0,03, $p < 0,001$).

Sowohl in allen primären sensorischen Neuronen als auch in CGRP-positiven Neuronen führte die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin zu einer signifikanten Steigerung der pRII Intensität im Vergleich zu der Behandlung mit Capsaicin alleine.

Die Betrachtung der Dichteplots verdeutlichte diese beobachtete stärkere Erhöhung der pRII Intensität in CGRP-positiven Neuronen nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin (Abb. 32C). CGRP-positive Neurone zeigten nach der kombinierten Behandlung eine stärkere Signalantwort der pRII Intensität auf Capsaicin als CGRP-negative Neurone.

Der Vergleich mit der Positivkontrolle zeigte, dass eine Stimulation mit KCl bei der Betrachtung von sowohl allen isolierten primären sensorischen Neuronen als auch von allein GCRP-positiven Neuronen zu einer stärkeren Steigerung der pRII Intensität führte als die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin.

Es konnte also tatsächlich eine Erhöhung der Signalantwort nach der Behandlung mit dem Calcineurininhibitor Tacrolimus und Capsaicin in peptidergen Neuronen im Vergleich zu der gesamten Neuronenpopulation beobachtet werden.

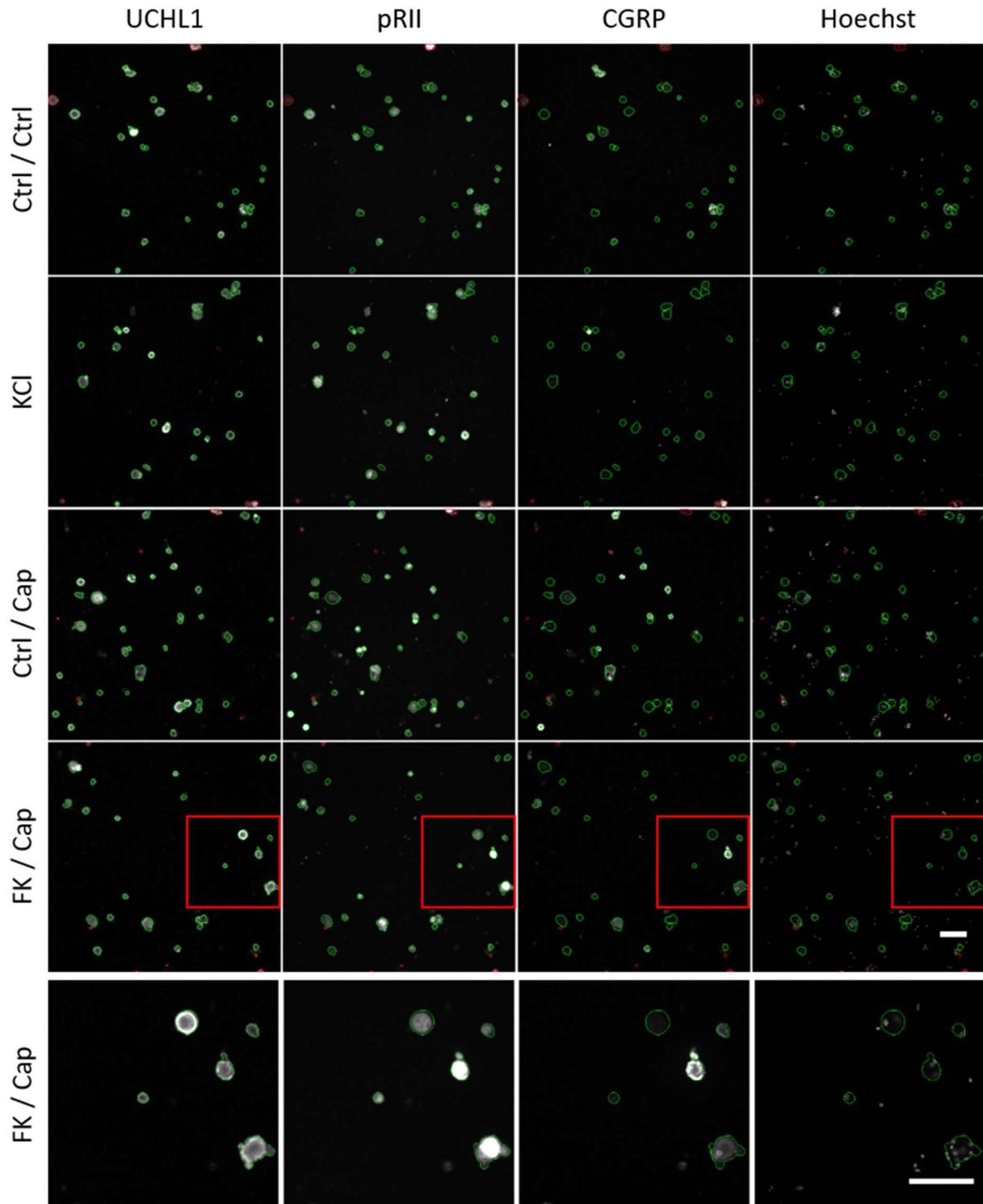


Abb. 31: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus verstärkt die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in CGRP-positiven primären sensorischen Neuronen der Maus. Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Maus nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μM Tacrolimus behandelt und anschließend für 15 min mit 1 μM Capsaicin stimuliert. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pRII, CGRP und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Der vergrößerte Ausschnitt der Bilder zeigt Zellen, welche mit Tacrolimus und Capsaicin stimuliert wurden. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm . Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

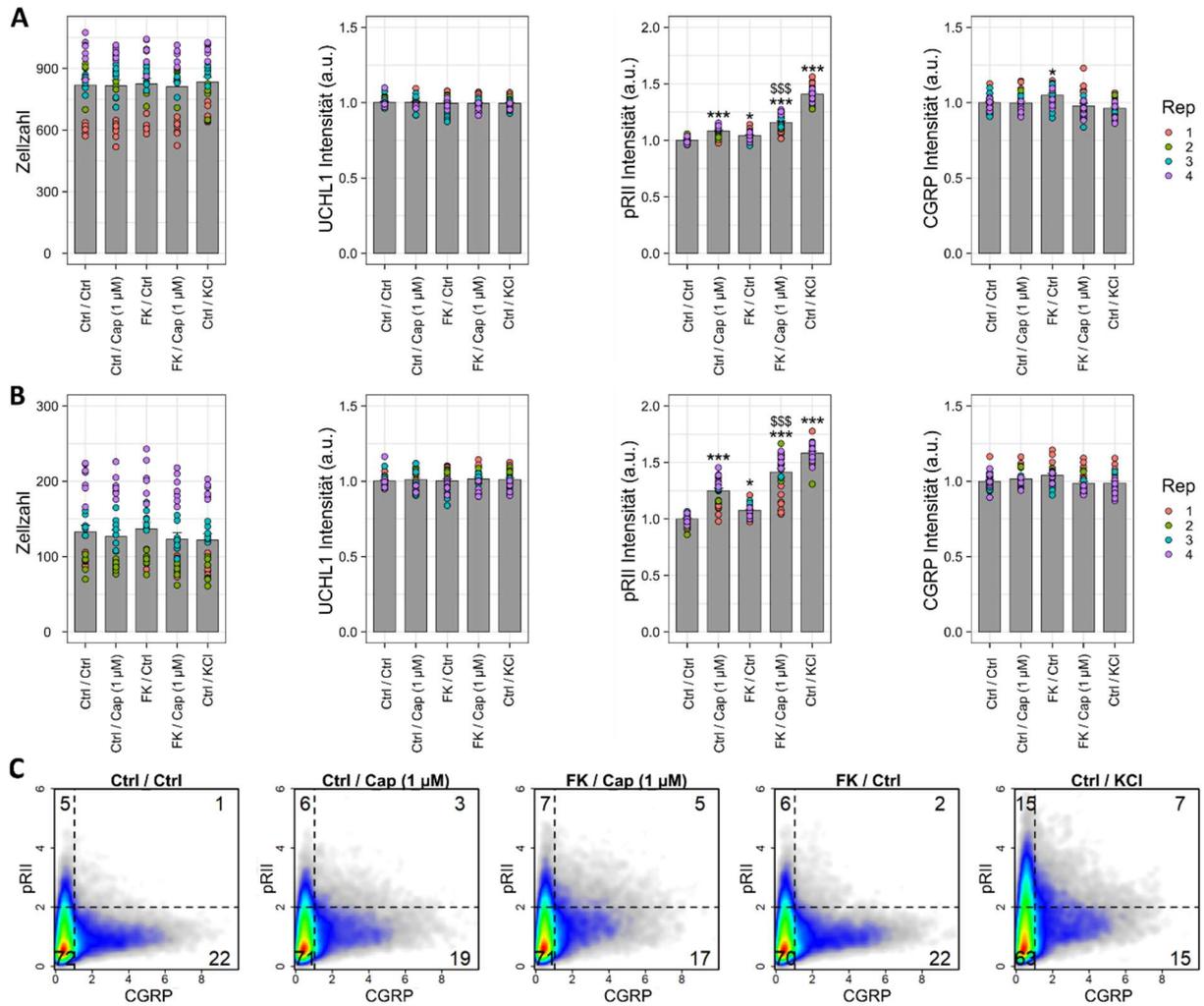


Abb. 32: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus verstärkt die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin stärker in murinen CGRP-positiven Neuronen. A: Die Balkendiagramme zeigen die Zellzahl, die UCHL1-, pRII- und CGRP Intensität von allen identifizierten murinen primären sensorischen Neuronen nach 30-minütiger Prästimulation mit 10 μ M Tacrolimus oder der Negativkontrolle gefolgt von einer 15-minütigen Stimulation mit 1 μ M Capsaicin oder der Negativkontrolle. **B:** Die Balkendiagramme zeigen die Zellzahl, die UCHL1-, pRII- und CGRP Intensität von CGRP-positiven murinen primären sensorischen Neuronen nach 30-minütiger Prästimulation mit 10 μ M Tacrolimus oder der Negativkontrolle gefolgt von einer 15-minütigen Stimulation mit 1 μ M Capsaicin oder der Negativkontrolle. **A und B:** Einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ und \$\$\$ $p < 0,001$ stellen signifikante Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung von Tacrolimus und Capsaicin im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Capsaicin dar. **C:** Die DichtepLOTS zeigen die Einzelzellendaten der pRII Intensität gegenüber der CGRP Intensität der murinen nozizeptiven Neuronen aus A. **A-C:** Cap: Capsaicin, CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle), FK: Tacrolimus (FK506), UCHL1: Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1, Rep: Replikate, $n=4$, > 3000 Neurone/Kondition.

4.5 Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die Signalantwort der ERK1/2 auf Capsaicin in primären sensorischen Neuronen der Maus

Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von nachgelagerten Zielstrukturen der PKA-II einer Regulation durch Calcineurin unterliegen könnte bzw. ob sich die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivierung durch Calcineurin auch auf weitere Niveaus in der intrazellulären Signalkaskade auswirkt, wurden die isolierten primären sensorischen Neurone von Mäusen wiederum für 30 min mit Tacrolimus (10 μ M) prästimuliert und anschließend wurde der Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal mittels Capsaicin (1 μ M) für 0-120 min induziert. Wir erwarteten, dass, wie für primäre sensorische Neuronen von Ratten, die Vorinkubation von primären sensorischen Neuronen der Maus mit Calcineurininhibitoren im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Capsaicin zu einer stärkeren ERK1/2 Aktivierung führt, wenn der TRPV1-Kanal durch Capsaicin aktiviert wird. Die isolierten Zellen wurden nach der beschriebenen Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte ERK1/2 inkubiert. Der in Abschnitt 4.3.2 und 4.3.4 verwendete Antikörper gegen pERK1/2 war als Maus-Antikörper suboptimal für primäre sensorische Neurone von Mäusen. Der in diesem Abschnitt verwendete Antikörper war ein Kaninchen-pERK1/2 Antikörper, der sich auch für die Verwendung in murinen Zellen eignete.

Im Vergleich zur Negativkontrolle war die pERK1/2 Intensität sowohl nach der alleinigen Stimulation mit Capsaicin als auch nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin signifikant nach 5-120-minütiger Stimulation mit Capsaicin erhöht (Abb. 33B). Die maximale Intensität wurde jeweils nach 30-minütiger Stimulation mit einer bis zu beinahe 1,6-fachen (Tacrolimus und Capsaicin, 1,55-fach, SEM: +/- 0,04, $p < 0,001$) und 1,4-fachen (Capsaicin, 1,43-fach, SEM: +/- 0,05, $p < 0,001$) Erhöhung der pERK1/2 Intensität für respektive Tacrolimus und Capsaicin und Capsaicin alleine erreicht. Beim Vergleich der pERK1/2 Intensität nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin und Capsaicin alleine, war auffällig, dass die Intensitätssteigerung nach der kombinierten Behandlung größer ausfiel. So erhöhte die kombinierte Behandlung die durch die alleinige Stimulation mit Capsaicin bewirkte Intensitätssteigerung noch einmal zusätzlich. Dieser beobachtete Effekt war nach dem Post-hoc Test jedoch nicht signifikant, sodass dieser keiner spezifischen Stimulationsbedingung zugeordnet werden konnte und als möglicher Trend einzustufen ist.

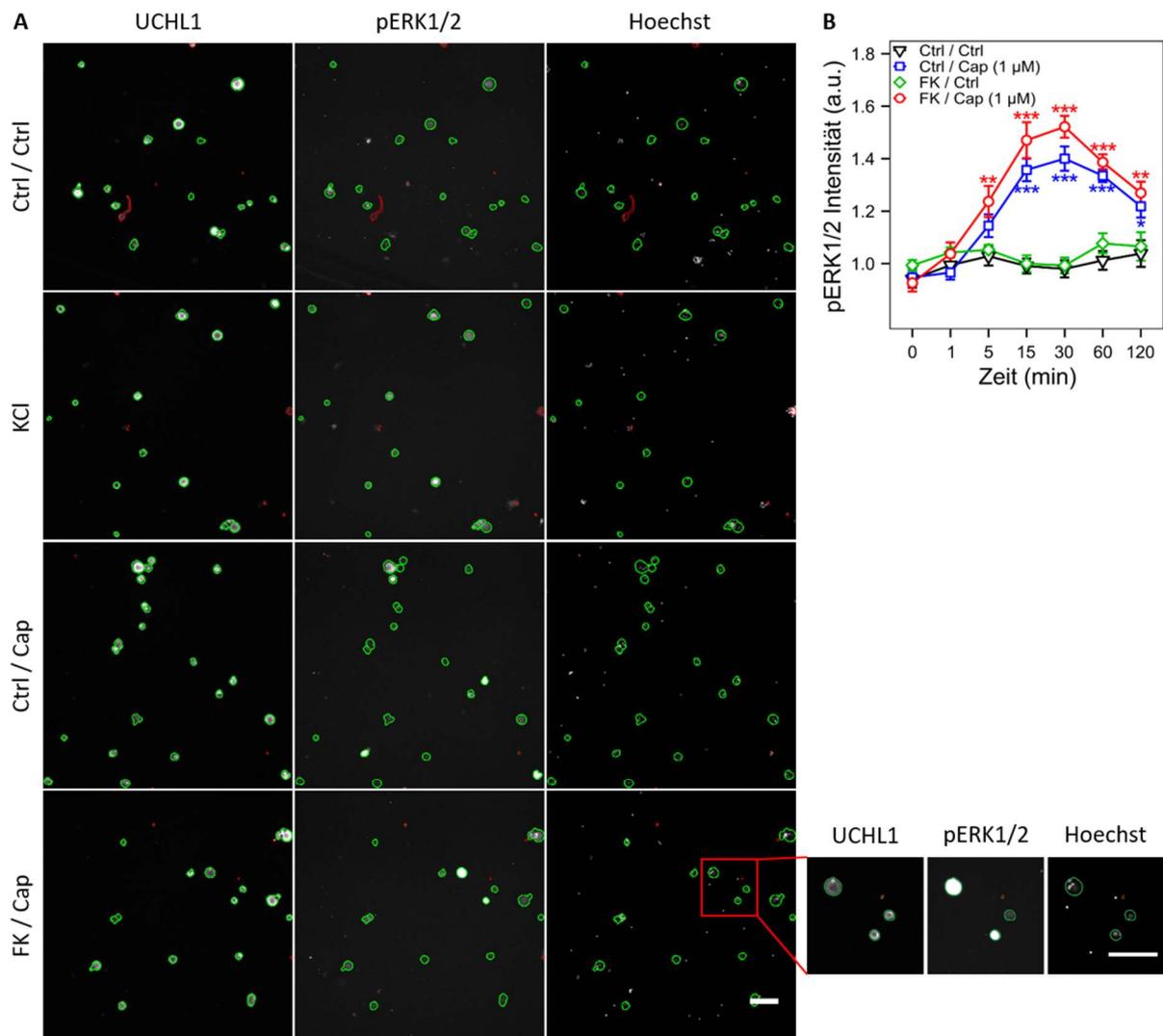


Abb. 33: Nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II werden in murinen primären sensorischen Neuronen nach der Vorbehandlung mit Tacrolimus und der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin aktiviert. A: Repräsentative Aufnahmen des HCS-Mikroskops, welche primäre Kulturen der Spinalganglien der Maus nach der kombinierten Behandlung mit Tacrolimus und Capsaicin zeigen. Die Neurone wurden für 30 min mit 10 μ M Tacrolimus behandelt und anschließend für 0-120 min mit 1 μ M Capsaicin stimuliert. Primäre sensorische Neurone wurden mittels UCHL1 identifiziert und für pERK1/2 und Hoechst 34580 immunzytochemisch markiert. Identifizierte Neurone sind mit einer grünen Umrandung markiert, nicht als primäre sensorische Neurone identifizierte Objekte sind mit einer roten Umrandung markiert. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. **B:** Zeitlicher Verlauf der pERK1/2 Intensität nach 30-minütiger Prästimulation mit Tacrolimus (10 μ M) oder der Negativkontrolle und anschließender Stimulation mit Capsaicin (1 μ M) oder der Negativkontrolle für 15 min. Multifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zeigen das Signifikanzniveau signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Stimulation an den jeweiligen Zeitpunkten. $n=4$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, > 30000 Neurone/Kondition. **A und B:** Cap: Capsaicin, Ctrl: Negativkontrolle (Prästimulation: 0,1 % DMSO in DPBS, Stimulation: 0,01 % DMSO in DPBS), FK: Tacrolimus (FK506), KCl: Kaliumchlorid (40 mM, Positivkontrolle).

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Calcineurin den Unterschied zwischen der durch KCl und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung begründen kann, ob die TRP-Agonisten Capsaicin und AITC zu Aktivierung von PKA-II führen und ob Inhibitoren von Calcineurin diese Antwort verstärken.

Hierfür wurden nozizeptive Neurone von Mäusen und Ratten isoliert, kultiviert, mit Calcineurininhibitoren behandelt und anschließend mit verschiedenen Substanzen stimuliert, die einen Calciumeinstrom in die Zelle bewirken.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Agonisten der TRPV1- und TRPA1-Kanäle zur Aktivierung von PKA-II und Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ führen. Die TRPV1-medierte Aktivierung der PKA-II sowie die Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ konnte durch Calcineurininhibitoren verstärkt werden, wobei diese Aktivitätssteigerung nicht bei TRPA1-medierter PKA-II Aktivierung beobachtet wurde. Ferner konnte der Unterschied zwischen der durch KCl und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung in primären sensorischen Neuronen nicht durch Calcineurin begründet werden.

Möglicherweise erfolgt die Regulation der Signalantwort auf einen Calciumeinstrom über TRPV1-Kanäle in primären sensorischen bzw. nozizeptiven Neuronen durch die Phosphorylierung von Serin 1928 der $Ca_v1.2$ -Kanäle. Die Regulation der Signalantwort auf einen durch die Aktivierung der TRPA1-Kanäle und Ionomycin induzierten Calciumeinstrom scheint allerdings unabhängig von Calcineurin zu erfolgen.

Die Ergebnisse der Arbeit mit primären sensorischen Neuronen von Mäusen zeigten, dass die Signalantwort auf einen Calciumeinstrom, welcher durch die Aktivierung von TRPV1-Kanälen induziert wurde, durch die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A stärker in peptidergen Neuronen, also CGRP-positiven Neuronen, erhöht wurde. Daher könnte die Stärke der Expression von Ionenkanälen in verschiedenen Subpopulationen von Neuronen auch für die Schmerzwahrnehmung von Bedeutung sein.

Die Behandlung mit Tacrolimus und der Stimulation des Calciumeinstroms durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin bewirkte die Aktivierung der ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II hingegen in allen murinen primären sensorischen Neuronen.

5.1 Die TRPV1-Kanal medierte PKA-II Aktivierung und Cav1.2 Phosphorylierung unterliegen der Regulation durch Calcineurin

Die Ergebnisse der Stimulation des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten zeigten, dass PKA-II in Neuronen, die mit Calcineurininhibitoren behandelt wurden, nicht nur aktiviert wird, sondern auch, dass die Aktivität der PKA-II durch die Behandlung mit Calcineurininhibitoren zusätzlich zu der durch die alleinige Stimulation mit Capsaicin bewirkten PKA-II Aktivität erhöht war (Abb. 34). Dem ersten Anschein nach könnte es sich hierbei um einen synergistischen Effekt der Behandlung von Calcineurininhibitoren und der Stimulation mit Capsaicin handeln, da die PKA-II Aktivität in der kombinierten Stimulation diejenige der Summe der einzelnen Behandlungen zu übersteigen schien.

Darüber hinaus zeigte die kombinierte Stimulation mit den Calcineurininhibitoren und Capsaicin eine Zunahme der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals, welche nicht nach alleiniger Stimulation mit Capsaicin zu beobachten war. Allein höhere Konzentrationen Capsaicin (10 μM) konnten die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals erhöhen.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Calcineurin, wie vermutet, eine regulatorische Funktion auf die PKA-II Aktivierung und die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals ausübt, wenn Calcium durch Aktivierung der TRPV1-Kanäle in das Zellinnere der Nozizeptoren strömt.

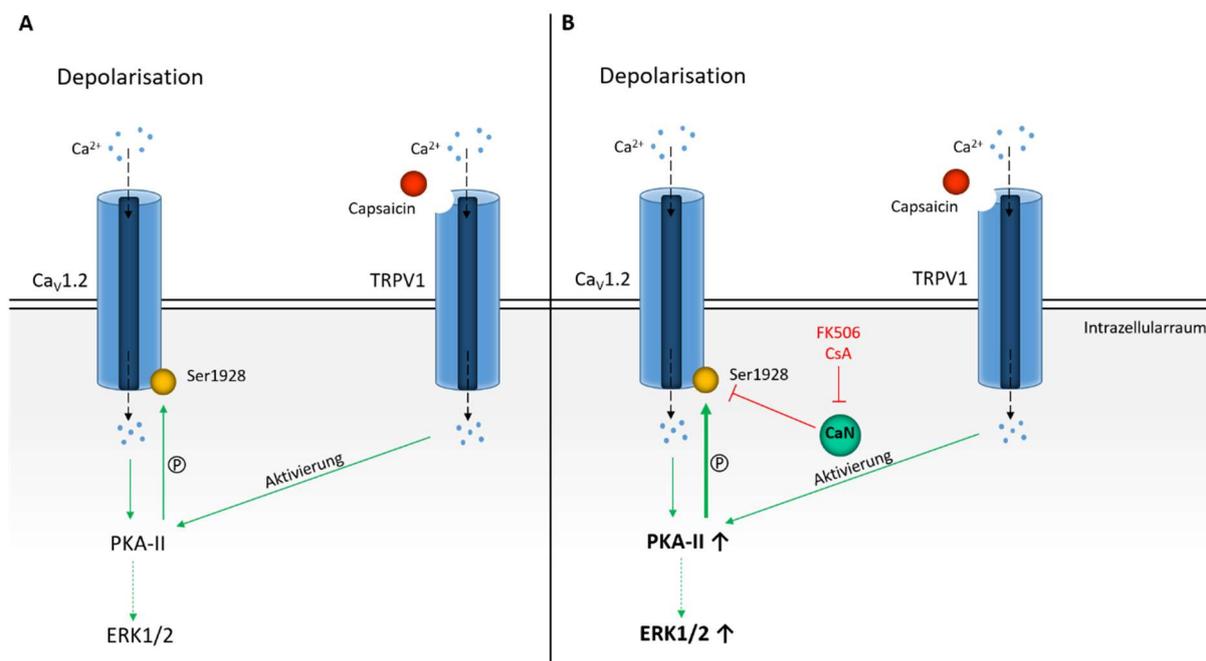


Abb. 34: Calcineurininhibitoren erhöhen die PKA-II Aktivität und Cav1.2 Phosphorylierung bei einem durch Aktivierung von TRPV1-Kanälen induzierten Calciumeinstrom. A: Alleinige Stimulation der TRPV1-Kanäle mittels Capsaicin. B: Stimulation der TRPV1-Kanäle nach vorheriger Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus oder Cyclosporin A. Ca²⁺: Calciumionen, CaN: Calcineurin, Cav1.2: Spannungsabhängige 1.2-Calciumkanäle, CsA: Cyclosporin A, ERK1/2: Extracellular-signal regulated kinases 1 und 2, FK506: Tacrolimus, P: Phosphorylierung, PKA-II: Typ II Proteinkinase A, TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Kanal, Ser1928: Serin1928.

Verschiedenste Studien mit primären sensorischen Neuronen von Ratten bestätigten die hier gemachten Beobachtungen. Wu *et al.* zeigten, dass die Stimulation des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten zu einem reduzierten Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle führte und, dass diesem Effekt durch die Inhibierung von Calcineurin entgegengewirkt werden konnte. Die Behandlung der Neurone mit Capsaicin führte zu einem beträchtlich reduzierten Calciumeinstrom verschiedenster spannungsabhängiger Calciumkanäle, worunter auch der L-Typ Calciumkanal $Ca_v1.2$. Die Autoren vermuten, dass die Reduzierung des Calciumeinstroms über die spannungsabhängigen Calciumkanäle durch Capsaicin durch eine Steigerung der basalen Inaktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle bewirkt wird, jedoch die spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle nicht durch Capsaicin beeinflusst wird. So könnte Capsaicin die Öffnungswahrscheinlichkeit der Calciumkanäle beeinflussen.

Als möglicher Mechanismus scheint eine direkte Funktion von Calcineurin auf die spannungsabhängigen Calciumkanäle wahrscheinlich, da Calcineurin direkt durch eine gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert wurde und die Inhibition von Calcineurin mit zwei verschiedenen Calcineurininhibitoren, Deltamethrin und Cyclosporin A, dem inhibitorischen Effekt von Capsaicin auf die spannungsabhängigen Calciumkanäle entgegenwirkte⁵³. Möglicherweise könnte die Regulation der spannungsabhängigen Calciumkanäle durch Calcineurin auf eine direkte Interaktion von Calcineurin und den spannungsabhängigen Calciumkanälen zurückzuführen sein, da die katalytische Untereinheit der α -Isoform von Calcineurin (PPP3CA) als direkter Interaktionspartner der Untereinheit alpha-1C des $Ca_v1.2$ -Kanals (CACNA1C) in der Stringdatenbank gelistet wird⁷¹. So könnten die Calcineurininhibitoren das Basallevel der Phosphorylierung der $Ca_v1.2$ -Kanäle erhöhen und folglich ebenso die Stromdichte durch die spannungsabhängigen Calciumkanäle.

Wu *et al.* beschrieben des Weiteren eine Internalisierung der $Ca_v2.2$ -Kanäle ausgelöst durch Capsaicin und spekulieren über die Internalisierung anderer Subtypen der spannungsabhängigen Calciumkanäle als Folge eines Calciumeinstroms über TRPV1-Kanäle⁵³. Somit könnte auch der in dieser Arbeit zentrale $Ca_v1.2$ -Kanal als Folge eines über Capsaicin ausgelösten Calciumeinstroms internalisiert werden, sodass der Calciumeinstrom über den $Ca_v1.2$ -Kanal folglich reduziert wird.

Bezüglich der direkten Interaktion von Calcineurin und $Ca_v1.2$ -Kanälen stellt sich zunehmend heraus, dass die Formung von Komplexen aus PKA, Calcineurin und $Ca_v1.2$ -Kanälen von Bedeutung ist. So wurde gezeigt, dass PKA und Calcineurin über *Protein kinase A anchoring protein 79/150* (AKAP79/150, 79: Human, 150: Nagetier) in COS7 Zellen miteinander in Verbindung stehen und, dass die Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals durch PKA in Neuronen aus dem Hippocampus eine Bindung zu AKAP79/150 erfordert^{119,120}. Außerdem scheint die Bindung von AKAP79/150 an Calcineurin für die über L-Typ Calciumkanäle

medierte calciumabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, *cytoplasmic 4* (NFATc4) erforderlich zu sein ¹²⁰.

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass AKAP79 die direkte Inaktivierung von PKA-II durch Calcineurin ermöglicht. AKAP79 ermöglicht die Kolokalisation von Calcineurin und pRII Untereinheiten der PKA-II, sodass Calcineurin die pRII Untereinheit dephosphoryliert und PKA-II inhibiert ¹²¹.

In primären sensorischen Neuronen von Ratten wird AKAP150 besonders in dünnen primären sensorischen Neuronen an der Plasmamembran des Somas, am Anfang des Axons und an dünnen neuronalen Fasern exprimiert. Brandao *et al.* bestätigten die Kolokalisierung von AKAP79/150 und Ca_v1.2 im Soma und am Anfang des Axons primärer sensorischer Neurone und beobachteten zusätzlich die Kolokalisierung von TRPV1-Kanälen ¹²². Die Kolokalisierung von AKAP150, TRPV1-Kanälen sowie Ca_v1.2-Kanälen wurde zudem mittels Superresolution in primären sensorischen Neuronen des Ganglion nodosum bestätigt ¹²³.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Kolokalisierung von Ca_v1.2 mit PKA, Calcineurin, AKAP79/150 und TRPV1 hin, die für die Regulation der Signalantwort auf nozizeptive Stimuli in primären sensorischen Neuronen notwendig sein könnte.

5.2 Die TRPA1-Kanal medierte PKA-II Aktivierung und Cav1.2 Phosphorylierung unterliegen nicht der Regulation durch Calcineurin

Die Ergebnisse der Stimulation des TRPA1-Kanals mittels AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten zeigten, dass PKA-II in Neuronen, die mit Calcineurininhibitoren behandelt wurden, zwar aktiviert wird, allerdings, dass die Aktivität der PKA-II durch die Behandlung mit Calcineurininhibitoren nicht zusätzlich zu der durch die alleinige Stimulation mit AITC bewirkten PKA-II Aktivität erhöht war (Abb. 35).

Die kombinierte Behandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und AITC ergab einen leichten Trend in Richtung einer Steigerung der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals am Serin 1928 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AITC. Allerdings wies diese Aktivitäts- bzw. Phosphorylierungssteigerung keinen statistisch signifikanten Effekt auf.

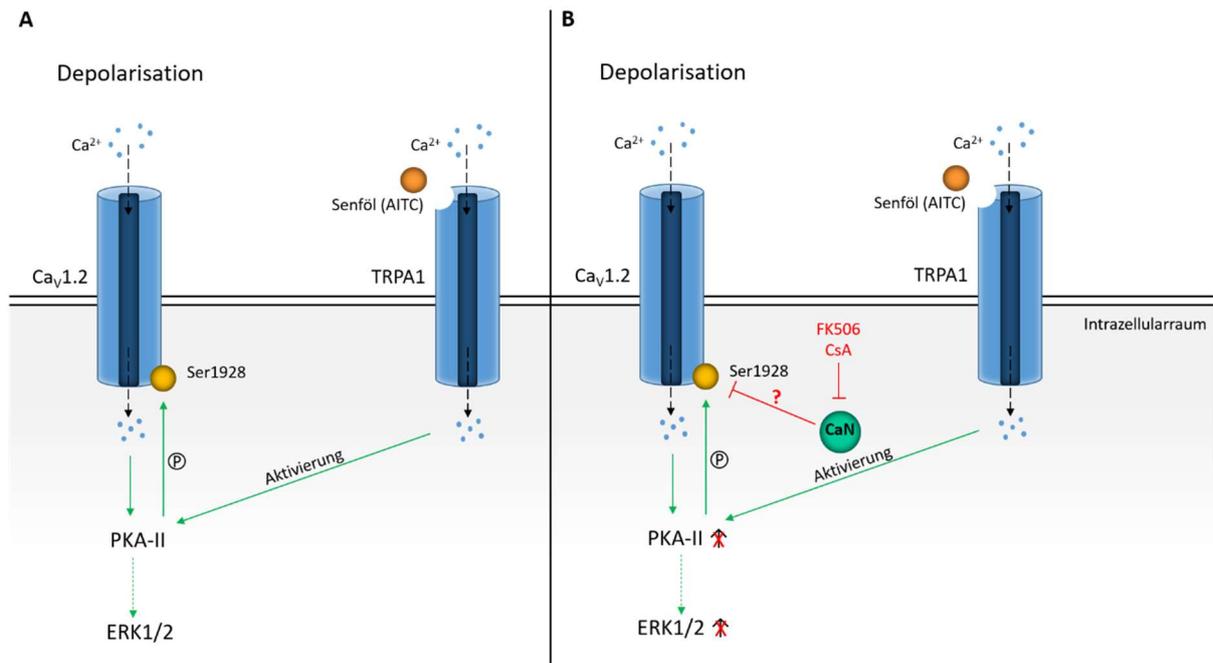


Abb. 35: Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die PKA-II Aktivität und Cav1.2 Phosphorylierung bei einem durch Aktivierung von TRPA1-Kanälen induzierten Calciumeinstrom. A: Alleinige Stimulation der TRPA1-Kanäle mittels AITC. B: Stimulation der TRPA1-Kanäle nach vorheriger Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus oder Cyclosporin A. AITC: Allylisoithiocyanat, Ca²⁺: Calciumionen, CaN: Calcineurin, Cav1.2: Spannungsabhängige 1.2-Calciumkanäle, CsA: Cyclosporin A, ERK1/2: Extracellular-signal regulated kinases 1 und 2, FK506: Tacrolimus, P: Phosphorylierung, PKA-II: Typ II Proteinkinase A, TRPA1: Transient Receptor Potential Ankyrin 1-Kanal, Ser1928: Serin1928.

Es zeigte sich also eine unterschiedliche Ausprägung des Effektes der Calcineurininhibitoren auf die Steigerung der Signalantwort zwischen der Stimulation des Calciumeinstroms durch Aktivierung des TRPV1- und TRPA1-Kanals. Da, wie zuvor beschrieben, die Anordnung in Proteinkomplexen für die Regulation der durch einen TRPV1-Kanal medierte Signalantwort von Bedeutung zu sein scheint, könnte die räumliche Anordnung der TRPA1-Kanäle in der Zellmembran und ihre Interaktion mit anderen Kanälen bzw. Proteinen auch hier von Bedeutung sein. Patil *et al.* zeigten, dass die Interaktion von TRPV1- und TRPA1-Kanälen in primären sensorischen Neuronen sowie deren Koexpression maßgeblich für die Sensitivierung von primären sensorischen Neuronen von Bedeutung sind. Sie beschrieben eine unterschiedlich starke Ausprägung der TRPV1 und TRPA1 Koexpression und Interaktion in den verschiedenen Subgruppen der primären sensorischen Neurone: Nur in einer Subgruppe nicht-peptiderger sensorischer Neurone, welche TRPV1- und TRPA1-Kanäle koexprimieren, konnten die Signalantworten auf AITC durch PKA und PKC sensitiviert werden. In einer Subgruppe peptiderger Neurone, welche beide TRP-Kanäle exprimieren, konnten die Signalantworten nicht durch PKA oder PKC sensitiviert werden, was die Autoren auf das Fehlen von AKAP in diesen Neuronen und somit auf eine fehlende Interaktion der Proteinkinasen mit den TRP-Kanälen zurückführen. Ebenso identifizierten sie eine Bindungsstelle für TRPV1- und TRPA1-Kanäle, deren Blockierung die TRPA1 medierte

Sensitivierung reduzierte ¹²⁴. So konnten Patil *et al.* einen Hinweis für eine Subgruppenspezifische Sensitivierung von TRPA1 durch Proteinkinasen liefern, welche zusätzlich durch die Koexpression von TRPV1 beeinflusst wird ¹²⁴.

Auch klinische Studien weisen auf eine Abhängigkeit einer TRPA1-Kanal medierten Signalantwort von TRPV1-Kanälen hin. Nach der Überstimulation von TRPV1-Kanälen mittels einer hohen Konzentration lokal auf die Haut aufgetragenem Capsaicin und dem damit einhergehenden Funktionsverlust der TRPV1-Kanäle war das Schmerzempfinden der Probanden auf sowohl Capsaicin als auch AITC reduziert ¹²⁵. So könnten TRPA1-Kanalabhängige Signalantworten tatsächlich von der Funktion und Interaktion mit TRPV1-Kanälen abhängig sein. Womöglich könnte die in unseren Experimenten beobachtete ausbleibende zusätzliche Steigerung der Behandlung von Calcineurininhibitoren auf die durch den TRPA1-Kanal medierte Signalantwort auf diese beschriebene unterschiedliche Koexpression in den Subgruppen der Neurone zurückzuführen sein. Durch die Betrachtung der gesamten Neuronenpopulation könnten Effekte in spezifischen Untergruppen durch nicht vorhandene Effekte in anderen Untergruppen überlagert bzw. abgeschwächt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste der Effekt von der Behandlung mit Calcineurininhibitoren auf die Signalantwort nach Aktivierung des TRPA1-Kanals in den verschiedenen Subgruppen der primären sensorischen Neurone untersucht werden.

Zusätzlich ist zu vermerken, dass in dieser Arbeit nur zwei verschiedene Konzentrationen AITC getestet wurden (10 und 100 mM). Es wäre auch annehmbar, dass die ideale Konzentration außerhalb der verwendeten Konzentrationen liegt. Allerdings wurden zuvor sechs verschiedene Konzentrationen AITC und ihr Effekt auf die PKA-II Aktivierung getestet (Abschnitt 4.1.4). In der Literatur sind Konzentrationen von 10 μ M bis 100 μ M AITC für elektrophysiologische Experimente beschrieben, welche 1000-fach niedriger sind als die in den oben beschriebenen Experimenten ^{124,126}. Die in den oben beschriebene 1000-fach höhere Konzentration ist durch einen Verdünnungsfehler zu Stande gekommen. Diese höhere AITC Konzentration hatte jedoch keinen Zelltod zur Folge, sodass vermutet werden kann, dass die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen trotzdem angemessen waren, um einen Calciumeinstrom durch Aktivierung des TRPA1-Kanals zu induzieren und um einen möglichen Effekt auf die PKA-Aktivität und die Phosphorylierung der Ca_v1.2-Kanäle detektieren zu können. Auf Basis der Ergebnisse könnte man also vermuten, dass die TRPA1-Kanal medierte PKA-II Aktivierung und Ca_v1.2 Phosphorylierung nicht der Regulation durch Calcineurin unterliegen, sondern noch weitere Regulationsmechanismen von Bedeutung sind.

5.3 Ungerichteter Calciumstrom in primäre sensorische Neurone führt nicht zur PKA-II Aktivierung und Cav1.2 Phosphorylierung

Die Ergebnisse zeigten, dass weder ein Calciumstrom über Ionomycin allein noch die kombinierte Behandlung primärer sensorischer Neurone von Ratten mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A und Ionomycin innerhalb von 120 min zu PKA-II Aktivierung oder Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals am Serin 1928 führte (Abb. 36).

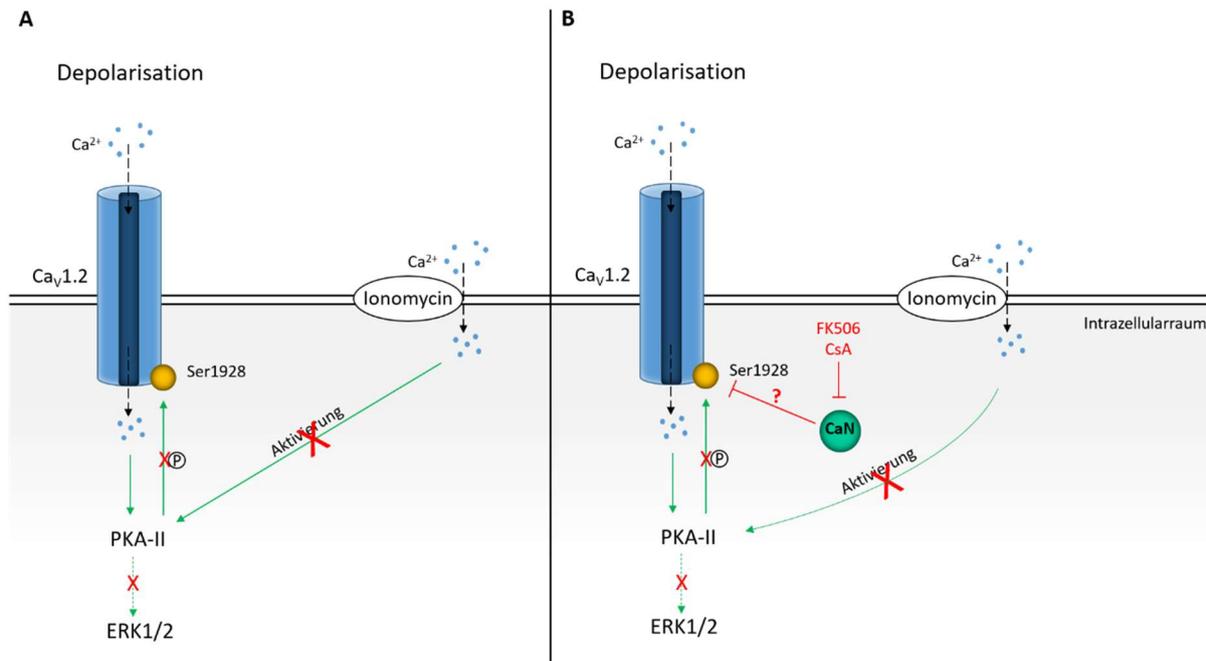


Abb. 36: Calcineurininhibitoren führen nicht zur PKA-II Aktivierung und Cav1.2 Phosphorylierung bei einem Calciumstrom über Ionomycin. **A:** Alleiniger Calciumstrom über Ionomycin. **B:** Calciumstrom über Ionomycin nach vorheriger Inhibition von Calcineurin mittels Tacrolimus oder Cyclosporin A. Ca²⁺: Calciumionen, CaN: Calcineurin, Cav1.2: Spannungsabhängige 1.2-Calciumkanäle, CsA: Cyclosporin A, ERK1/2: Extracellular-signal regulated kinases 1 und 2, FK506: Tacrolimus, P: Phosphorylierung, PKA-II: Typ II Proteinkinase A, Ser1928: Serin1928.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Lokalisation des Calciumstroms in die Zelle bei der Regulation der PKA-II Aktivität und Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals von Bedeutung ist.

Während bei der Stimulation des Calciumstroms über den TRPV1-Kanal, wie zuvor erläutert, die Regulation der PKA-II Aktivität und die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals über Calcineurin zu erfolgen scheint, scheint dies für einen ungerichteten Calciumstrom über Ionomycin nicht der Fall zu sein.

Die Bedeutung der Organisation von Ionenkanälen für die Regulation der PKA-II Aktivität und der Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals durch Calcineurin ist in den vorherigen Abschnitten deutlich geworden. Daher könnte die fehlende Organisation des Calciumstroms über Ionomycin in Komplexen eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt auf die PKA-II Aktivität und die Phosphorylierung der Cav1.2-Kanäle sein. Darüber hinaus könnte ebenso der

Zeitraum der Stimulation von Bedeutung sein. So wurde der Calciumeinstrom in dieser Arbeit durch eine Stimulation mit Ionomycin für 0-120 min induziert. Da Calcium über Ionomycin passiv in das Zellinnere diffundiert, könnte die Zeitspanne bis zur Aktivierung der PKA-II und einer Zunahme der Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals auch über der in dem Experiment verwendeten Stimulationszeit liegen.

Eine andere mögliche Ursache könnte die verwendete Ionomycinkonzentration sein. In dieser Arbeit wurden 1 und 3 μM Ionomycin für die Stimulation verwendet. Vorausgegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe Hucho zeigten jedoch auch bei der Stimulation mit bis zu 5 μM Ionomycin keinen Effekt auf die PKA-II Aktivität, obwohl ein deutlicher Calciumeinstrom in die Zelle zu messen war ²¹. Ebenso scheinen 5 μM Ionomycin in anderen Arbeiten eine gebräuchliche Konzentration für die Induzierung des Calciumeinstroms in primären sensorischen Neuronen zu sein ¹²⁷.

Während bei der Stimulation des Calciumeinstroms über den TRPV1-Kanal mittels Capsaicin sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres Calcium zu einer Reduzierung des Calciumstroms über den $Ca_v1.2$ -Kanal führte ⁵³, könnte eine einfache Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration über Ionomycin nicht für die PKA-II Aktivierung und Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals ausreichend sein. Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit, scheint Calcineurin die bei einem Calciumeinstrom über Ionomycin ausbleibende PKA-II Aktivierung und $Ca_v1.2$ Phosphorylierung nicht begründen zu können.

5.4 ERK1/2 wird durch einen Calciumeinstrom induziert durch Aktivierung von TRP-Kanälen aktiviert

Die Ergebnisse mit primären sensorischen Neuronen von Mäusen und Ratten zeigten, dass die Aktivität der ERK1/2 als nachgelagerte Zielstruktur der PKA-II durch einen durch die Aktivierung von TRPV1- und TRPA1-Kanälen induzierten Calciumeinstrom innerhalb von 0-120 min erhöht war.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der PKA-II Aktivierung und $Ca_v1.2$ Phosphorylierung führte die kombinierte Behandlung von Calcineurininhibitoren mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin zu einer weiteren Aktivitätssteigerung von ERK1/2, wobei die Aktivität der ERK1/2 nach der kombinierten Behandlung von Calcineurininhibitoren und dem TRPA1-Agonisten AITC nicht zusätzlich gesteigert wurde. Wie auch bei der PKA-II Aktivierung und Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals beobachtet, führte die kombinierte Behandlung mit Calcineurininhibitoren und Ionomycin oder die Stimulation mit Ionomycin alleine nicht zu einer gesteigerten ERK1/2 Aktivität.

Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass sich die über Calcineurin regulierte PKA-II Aktivität ebenso auf die Aktivierung der ERK1/2 auswirkt, welche sich wiederum in einer veränderten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren widerspiegeln könnte. Die Aktivierung der ERK1/2 als Teil der Signalkaskade in nozizeptiven Neuronen und ihre Funktion in thermisch und mechanisch ausgelöster Hyperalgesie ist ausführlich in der Literatur beschrieben^{34,35,38}. Die gemachten Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die Aktivierung der ERK1/2 in Abhängigkeit der PKA-II verläuft und somit über die Regulation von Transkriptionsfaktoren und Genexpression zu einer Modulation des Signalweges in primären sensorischen Neuronen führen könnte.

5.5 Die Effektgröße ist in primären sensorischen Neuronen von Mäusen kleiner als die in primären sensorischen Neuronen von Ratten

Die Daten aus murinen primären sensorischen Neuronen zeigten, dass die Signalantwort auf einen Calciumeinstrom induziert durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals durch die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A stärker in peptidergen Neuronen, also CGRP-positiven Neuronen, erhöht werden konnte. Die PKA-II Aktivität war nach 15-minütiger Stimulation mit Capsaicin in peptidergen Neuronen im Vergleich zu allen sensorischen Neuronen deutlich stärker erhöht (1,1-fache Erhöhung gegenüber beinahe 1,4-fache Erhöhung).

Während also alle primären sensorischen Neurone von Mäusen eine geringe Signalantwort auf den Calciumeinstrom über den TRPV1-Kanal zeigten, war diese in der Subpopulation der peptidergen Neurone verstärkt. Dies stimmt mit den Daten aus primären sensorischen Neuronen von Ratten überein. Diese Neurone zeigten im Vergleich zu den murinen Neuronen eine deutlich stärkere Signalantwort in Form einer erhöhten PKA-II Aktivität nach der Stimulation des Calciumeinstroms induziert durch Aktivierung des TRPV1-Kanals.

5.5.1 Die Expression von TRPV1-Kanälen unterscheidet sich in Mäusen und Ratten

Die beobachtete Diskrepanz der Effektgröße, also der pRII Intensität, in primären sensorischen Neuronen aus Spinalganglien von Mäusen und Ratten könnte auf Unterschiede in der Subpopulation von Neuronen in den Spinalganglien zwischen Mäusen und Ratten zurückzuführen sein. So zeigten verschiedene Studien mit primären sensorischen Neuronen von Mäusen und Ratten, dass sich die Expression der TRPV1-Kanäle in den Subpopulationen der Neuronen zwischen Mäusen und Ratten unterscheidet^{110,118,128}. Während TRPV1-Kanäle in Mäusen vor allem in peptidergen CGRP-positiven Neuronen exprimiert werden, sind

TRPV1-Kanäle in Ratten sowohl in peptidergen CGRP-positiven Neuronen als auch in nicht-peptidergen IB4-positiven Neuronen lokalisiert ^{110,118,128}.

Die vermehrte Expression von TRPV1-Kanälen in primären sensorischen Neuronen von Ratten könnte daher die stärkere Signalantwort auf eine Stimulation mit Capsaicin als Agonist der TRPV1-Kanäle im Vergleich zu der eher geringen Signalantwort in primären sensorischen Neuronen von Mäusen erklären. Die überwiegende Expression der TRPV1-Kanäle in peptidergen Neuronen erklärt gleichermaßen die beobachtete stärkere Aktivierung der PKA-II in CGRP-positiven murinen Neuronen als Folge des durch Aktivierung der TRPV1-Kanäle induzierten Calciumeinstroms.

Aufgrund bereits observierter Unterschiede zwischen vermeintlich stark verwandten Spezies der selben Ordnung der Nagetiere, nämlich Mäusen der Art *Mus musculus* und Ratten der Art *Rattus norvegicus*, stellt sich die Frage, inwiefern sich die Subpopulationen von primären sensorischen Neuronen und die Expression bestimmter Marker und Ionenkanäle von Nagetieren und Menschen unterscheiden. Da Experimente mit Nagetieren als Modell für menschliche Vorgänge dienen, ist diese Frage von großer Bedeutung.

Eine Studie, in der die unterschiedliche mRNA-Expression verschiedenster Ionenkanäle in den Subpopulationen von murinen und humanen Nozizeptoren untersucht wurde, zeigte, dass Neuronen humaner Spinalganglien prozentual mehr CGRP-positive Neurone enthalten als jene von Mäusen (59,3 % gegenüber 32,9 %). Des Weiteren zeigte die Transkriptomanalyse, dass die TRPV1-Kanäle zu einem größeren Anteil in humanen primären sensorischen Neuronen exprimiert werden als in Mäusen (74,7 % gegenüber 30,3 %) und, dass TRPV1-Kanäle in nahezu allen CGRP-positiven, also peptidergen Neuronen, exprimiert werden. TRPA1-Kanäle werden im Gegensatz in weniger humanen primären sensorischen Neuronen exprimiert als in Mäusen, wobei die Expression von TRPA1-Kanälen vor allem in nicht-peptidergen Neuronen erfolgt ¹¹². So scheint die Zusammensetzung der Subpopulation humaner Nozizeptoren der von Ratten womöglich mehr zu ähneln als der von Mäusen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der Neuronenpopulation in den Spinalganglien könnte eine unterschiedlich ausgeprägte Bedeutung der Regulation der Signalwege durch die verschiedenen Ionenkanäle in humanen und murinen Nozizeptoren zur Folge haben, sodass auch bei der Entstehung von Hyperalgesie im direkten Vergleich zwischen Mäusen und Menschen bestimmten Ionenkanälen mehr bzw. weniger Bedeutung beigemessen werden könnte. Nichtsdestotrotz sind die beschriebenen Subpopulationen in beiden Spezies vertreten, sodass die Untersuchung von Prozessen in Mäusen ein gebräuchliches Modell für Prozesse in humanen Zellen darstellt. Allerdings könnten Unterschiede zwischen murinen und humanen Nozizeptoren bei der Übertragung von Ergebnissen aus Studien mit murinen Nozizeptoren auf den Menschen von Bedeutung werden wie bereits verschiedene präklinische und klinische Studien gezeigt haben ¹²⁹.

5.6 Ausblick in die Zukunft

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Agonisten der TRPV1- und TRPA1-Kanäle zur Aktivierung von PKA-II und Phosphorylierung von Ca_v1.2 führen. Die TRPV1-medierte Aktivierung der PKA-II sowie die Phosphorylierung von Ca_v1.2 unterlag hierbei der Regulation durch Calcineurin, während die TRPA1-medierte PKA-II Aktivierung nicht der Regulation durch Calcineurin unterlag. Des Weiteren konnte der Unterschied zwischen der durch KCl und Ionomycin induzierten PKA-II Aktivierung in primären sensorischen Neuronen nicht durch Calcineurin begründet werden.

Möglicherweise erfolgt die Regulation der depolarisationsinduzierten PKA-II Aktivität in nozizeptiven Neuronen durch die Phosphorylierung von Serin 1928 des Ca_v1.2-Kanals. Hierbei scheint die Regulation durch Calcineurin durch Protein- bzw. Ionenkanalkomplexe organisiert zu sein, in denen Ca_v1.2, PKA, Calcineurin, AKAP79/150 und TRPV1 angeordnet sind. Es zeichnet sich also eine von der Zusammensetzung der Komplexe abhängige Regulation der PKA-II und Ca_v1.2 Aktivität durch Calcineurin ab.

Diese Regulation der Signalantwort durch Calcineurin könnte daher auch einen Einfluss auf die Sensitivierung von primären sensorischen Neuronen haben und möglicherweise der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von Hyperalgesie entgegenwirken.

Bezüglich des beschriebenen Schmerzsyndroms, das im Zusammenhang mit der Behandlung mit Calcineurininhibitoren auftritt, konnte gezeigt werden, dass Calcineurininhibitoren nicht nur, wie durch andere Autoren bereits vermutet, durch einen vaskulären Effekt zu den beschriebenen Schmerzen führen ⁹⁶, sondern direkt auf die Signalweiterleitung in primären sensorischen Neuronen wirken. Hierbei ist zu vermerken, dass CIPS ein bis drei Monate nach dem Therapiestart auftritt, also nach einer längeren Anwendung der Calcineurininhibitoren. Augenmerk dieser Arbeit war allerdings der direkte akute Einfluss von Calcineurin auf die Signalweiterleitung in primären sensorischen Neuronen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen sehr spezifischen Mechanismus depolarisationsinduzierter Hyperalgesie hin, welcher Schmerz bei CIPS auf molekularem Niveau begründen könnte.

Fragen, welche in dieser Arbeit noch unbeantwortet geblieben sind und daher für zukünftige Projekte von Bedeutung sein könnten, sind einerseits ob intrazelluläre Calciumquellen wie beispielsweise Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum oder ein Calciumeinstrom aus weiteren TRP-Kanälen, wie dem TRPM8-Kanal, der Regulation durch Calcineurin unterliegen bzw. die Zusammensetzung der Kanalkomplexe beeinflusst. Wu *et al.* scheinen bereits erste Hinweise zu liefern, dass auch ein intrazellulärer Anstieg der Calciumkonzentration durch Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum einer Regulation durch Calcineurin unterliegt und, dass möglicherweise ein genereller Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration

unabhängig von der Quelle zur Regulation des Calciumeinstroms über den $Ca_v1.2$ -Kanal durch Calcineurin führt⁵³. Dies stünde jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Ionomycin.

Andererseits kommt die Frage auf, ob sich die Regulation der Signalweiterleitung in primären sensorischen Neuronen durch Calcineurin auch direkt auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und eine veränderte Genexpression verbunden mit einer Sensitivierung der peripheren Nozizeptoren auswirkt.

Ebenso ist zu untersuchen, ob die in unseren Experimenten beobachtete ausbleibende Steigerung der Behandlung von Calcineurininhibitoren auf die durch den TRPA1-Kanal medierte Signalantwort auf eine unterschiedliche Koexpression in den Subgruppen der Neuronen zurückzuführen ist. Daher könnte der Effekt von der Behandlung mit Calcineurininhibitoren auf die Signalantwort nach Aktivierung des TRPA1-Kanals in den verschiedenen Subgruppen der primären sensorischen Neurone in anschließenden Studien detailliert untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020.
2. Treede RD, Rief W, Barke A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* 2019; **160**(1): 19-27.
3. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European journal of pain (London, England)* 2006; **10**(4): 287-333.
4. Rice ASC, Smith BH, Blyth FM. Pain and the global burden of disease. *Pain* 2016; **157**(4): 791-6.
5. Crofford LJ. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2015; **126**: 167-83.
6. Hylands-White N, Duarte RV, Raphael JH. An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology international* 2017; **37**(1): 29-42.
7. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A, White LE. Neuroscience. 5th edition ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.; 2012.
8. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; **413**(6852): 203-10.
9. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; **139**(2): 267-84.
10. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus LernAtlas der Anatomie. 2. Auflage ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag; 2009.
11. Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998; **20**(4): 629-32.
12. Usoskin D, Furlan A, Islam S, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature neuroscience* 2015; **18**(1): 145-53.
13. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature medicine* 2010; **16**(11): 1248-57.
14. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 2009; **10**(9): 895-926.
15. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; **361**(6407): 31-9.
16. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; **309**(5965): 261-3.
17. Ma QP, Woolf CJ. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain* 1995; **61**(3): 383-90.
18. Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; **44**(3): 293-9.
19. Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007; **55**(3): 365-76.
20. Bessou P, Perl ER. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of neurophysiology* 1969; **32**(6): 1025-43.
21. Isensee J, van Cann M, Despang P, et al. Depolarization induces nociceptor sensitization by CaV1.2-mediated PKA-II activation. *The Journal of cell biology* 2021; **220**(10).
22. Diskar M, Zenn HM, Kaupisch A, Prinz A, Herberg FW. Molecular basis for isoform-specific autoregulation of protein kinase A. *Cellular signalling* 2007; **19**(10): 2024-34.
23. Martin BR, Deerinck TJ, Ellisman MH, Taylor SS, Tsien RY. Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1alpha-mediated localization in living cells. *Chemistry & biology* 2007; **14**(9): 1031-42.
24. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. 1990; **59**(1): 971-1005.

25. Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012; **13**(10): 646-58.
26. Herberg FW, Taylor SS, Dostmann WRG. Active Site Mutations Define the Pathway for the Cooperative Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 1996; **35**(9): 2934-42.
27. Jackiw V, Hunzicker-Dunn M. The regulatory subunit of the type II cAMP-dependent protein kinase in rabbit ovaries is the RII beta isoform. *Biochemical and biophysical research communications* 1992; **184**(1): 43-9.
28. Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS. Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(11): 3703-7.
29. Cadd G, McKnight GS. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* 1989; **3**(1): 71-9.
30. Isensee J, Diskar M, Waldherr S, et al. Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. *Journal of cell science* 2014; **127**(Pt 1): 216-29.
31. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 1989; **59**(4): 675-80.
32. West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature reviews Neuroscience* 2002; **3**(12): 921-31.
33. Souza AL, Moreira FA, Almeida KR, Bertollo CM, Costa KA, Coelho MM. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *British journal of pharmacology* 2002; **135**(1): 239-47.
34. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nature neuroscience* 1999; **2**(12): 1114-9.
35. Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001; **21**(17): 6933-9.
36. Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJ. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**(5): 3722-8.
37. Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science (New York, NY)* 2001; **294**(5541): 333-9.
38. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. 2005; **118**(16): 3569-72.
39. Mohapatra D, Nau C. Desensitization of Capsaicin-activated Currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 Is Decreased by the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Pathway. *The Journal of biological chemistry* 2004; **278**: 50080-90.
40. Meuth S, Pape H, Budde T. Modulation of Ca²⁺ currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation. *European Journal of Neuroscience* 2002; **15**(10): 1603-14.
41. Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW. cAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation. *Neuron* 2002; **35**(4): 721-31.
42. Dittmer PJ, Dell'Acqua ML, Sather WA. Ca²⁺/calcineurin-dependent inactivation of neuronal L-type Ca²⁺ channels requires priming by AKAP-anchored protein kinase A. *Cell reports* 2014; **7**(5): 1410-6.
43. De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA. Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 1996; **35**(32): 10392-402.
44. Villarreal CF, Sachs D, Funez MI, Parada CA, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**(5): 867-77.

45. Witcher DR, De Waard M, Sakamoto J, et al. Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca²⁺ channel complex purified from brain. *Science (New York, NY)* 1993; **261**(5120): 486.
46. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BFX, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal-muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(15): 5478-82.
47. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; **316**(6027): 440-3.
48. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 1992; **9**(1): 85-95.
49. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, et al. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circulation research* 1998; **83**(1): 103-9.
50. Perez-Reyes E. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1998; **30**(4): 313-8.
51. Bean BP, Nowycky MC, Tsien RW. Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells. *Nature* 1984; **307**(5949): 371-5.
52. Oliveria SF, Dittmer PJ, Youn DH, Dell'Acqua ML, Sather WA. Localized calcineurin confers Ca²⁺-dependent inactivation on neuronal L-type Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012; **32**(44): 15328-37.
53. Wu Z-Z, Chen S-R, Pan H-L. Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Activation Down-regulates Voltage-gated Calcium Channels through Calcium-dependent Calcineurin in Sensory Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2005; **280**(18): 18142-51.
54. Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. 2014; **94**(1): 81-140.
55. Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzouz R, et al. Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *Embo j* 2011; **30**(18): 3830-41.
56. Luvisetto S, Marinelli S, Panasiti MS, et al. Pain sensitivity in mice lacking the Ca(v)2.1alpha1 subunit of P/Q-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 2006; **142**(3): 823-32.
57. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(11): 6132-7.
58. Yue J, Liu L, Liu Z, Shu B, Zhang Y. Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine* 2013; **38**(6): 463-70.
59. Cao XH, Byun HS, Chen SR, Pan HL. Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca²⁺ channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons. *Journal of neurochemistry* 2011; **119**(3): 594-603.
60. Kim C, Jun K, Lee T, et al. Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Molecular and cellular neurosciences* 2001; **18**(2): 235-45.
61. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; **426**(6966): 517-24.
62. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**(6653): 816-24.
63. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001; **411**(6840): 957-62.
64. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, et al. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 2002; **108**(5): 705-15.
65. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 2003; **112**(6): 819-29.
66. Bandell M, Story GM, Hwang SW, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004; **41**(6): 849-57.
67. Isensee J, Kaufholz M, Knape MJ, et al. PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination. *The Journal of cell biology* 2018; **217**(6): 2167-84.

68. Merat DL, Cheung WY. Calmodulin-dependent protein phosphatase: isolation of subunits and reconstitution to holoenzyme. *Methods in enzymology* 1987; **139**: 79-87.
69. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993; **365**(6444): 352-5.
70. Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, et al. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science (New York, NY)* 1995; **267**(5194): 108-11.
71. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research* 2019; **47**(D1): D607-d13.
72. Muramatsu T, Giri PR, Higuchi S, Kincaid RL. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(2): 529-33.
73. Muramatsu T, Kincaid RL. Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochemical and biophysical research communications* 1992; **188**(1): 265-71.
74. Guerini D, Klee CB. Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(23): 9183-7.
75. Kincaid RL, Giri PR, Higuchi S, et al. Cloning and characterization of molecular isoforms of the catalytic subunit of calcineurin using nonisotopic methods. *J Biol Chem* 1990; **265**(19): 11312-9.
76. UniProtKB - Q08209 (PP2BA_HUMAN). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
77. UniProtKB - P63328 (PP2BA_MOUSE). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
78. UniProtKB - P16298 (PPP2BB_HUMAN). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
79. UniProtKB - P48453 (PPP2BB_MOUSE). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
80. UniProtKB - P48454 (PPP2BC_HUMAN). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
81. UniProtKB - P48455 (PP2BC_MOUSE). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
82. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiological reviews* 2000; **80**(4): 1483-521.
83. Sikkink R, Haddy A, MacKelvie S, Mertz P, Litwiller R, Rusnak F. Calcineurin subunit interactions: mapping the calcineurin B binding domain on calcineurin A. *Biochemistry* 1995; **34**(26): 8348-56.
84. Watanabe Y, Perrino BA, Chang BH, Soderling TR. Identification in the calcineurin A subunit of the domain that binds the regulatory B subunit. *J Biol Chem* 1995; **270**(1): 456-60.
85. Kincaid RL, Nightingale MS, Martin BM. Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(23): 8983-7.
86. Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem* 1990; **265**(4): 1924-7.
87. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 1995; **378**(6557): 641-4.

88. Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology* 1988; **106**(5): 1625-33.
89. UniProtKB - P63098 (CANB1_HUMAN). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
90. UniProtKB - Q63810 (CANB1_MOUSE). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
91. UniProtKB -Q96LZ3 (CANB2_HUMAN). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
92. UniProtKB - Q63811 (CANB2_MOUSE). 02.02.2021 ed: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR); 2021.
93. Guerini D, Krinks MH, Sikela JM, Hahn WE, Klee CB. Isolation and sequence of a cDNA clone for human calcineurin B, the Ca²⁺-binding subunit of the Ca²⁺/calmodulin-stimulated protein phosphatase. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc)* 1989; **8**(9): 675-82.
94. Ueki K, Muramatsu T, Kincaid RL. Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical and biophysical research communications* 1992; **187**(1): 537-43.
95. Aitken A, Klee CB, Cohen P. The structure of the B subunit of calcineurin. *European journal of biochemistry* 1984; **139**(3): 663-71.
96. Prommer E. Calcineurin-inhibitor pain syndrome. *The Clinical journal of pain* 2012; **28**(6): 556-9.
97. Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, et al. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 2018; **174**(4): 999-1014.e22.
98. Sharma N, Flaherty K, Lezgiyeva K, Wagner DE, Klein AM, Ginty DD. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature* 2020; **577**(7790): 392-8.
99. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; **66**(4): 807-15.
100. Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, et al. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *The EMBO Journal* 1990; **9**(13): 4425-33.
101. Collini A, De Bartolomeis C, Barni R, Ruggieri G, Bernini M, Carmellini M. Calcineurin-inhibitor induced pain syndrome after organ transplantation. *Kidney International* 2006; **70**(7): 1367-70.
102. Elder GJ. From marrow oedema to osteonecrosis: common paths in the development of post-transplant bone pain. *Nephrology (Carlton, Vic)* 2006; **11**(6): 560-7.
103. Grotz WH, Breitenfeldt MK, Braune SW, et al. Calcineurin-inhibitor induced pain syndrome (CIPS): a severe disabling complication after organ transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2001; **14**(1): 16-23.
104. Noda Y, Kodama K, Yasuda T, Takahashi S. Calcineurin-inhibitor-induced pain syndrome after bone marrow transplantation. *Journal of anesthesia* 2008; **22**(1): 61-3.
105. Lucas VP, Ponge TD, Plougastel-Lucas ML, Glemain P, Hourmant M, Souillou JP. Musculoskeletal Pain in Renal-Transplant Recipients. 1991; **325**(20): 1449-50.
106. Gauthier VJ, Barbosa LM. Bone pain in transplant recipients responsive to calcium channel blockers. *Annals of internal medicine* 1994; **121**(11): 863-5.
107. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012; **9**(7): 676-82.
108. Roederer M. Compensation in flow cytometry. *Current protocols in cytometry* 2002; **Chapter 1**: Unit 1.14.
109. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2018.

110. Price TJ, Flores CM. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 2007; **8**(3): 263-72.
111. Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *The European journal of neuroscience* 1999; **11**(3): 946-58.
112. Shiers S, Klein RM, Price TJ. Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain* 2020; **161**(10): 2410-24.
113. Liang R, Liu X, Wei L, et al. The modulation of the excitability of primary sensory neurons by Ca²⁺-CaM-CaMKII pathway. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2012; **33**(5): 1083-93.
114. Li Y, Yin C, Li X, et al. Electroacupuncture Alleviates Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathic Pain in Rats via Suppressing TLR4 Signaling and TRPV1 Upregulation in Sensory Neurons. *International journal of molecular sciences* 2019; **20**(23).
115. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain research* 1983; **278**(1-2): 224-8.
116. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; **427**(6971): 260-5.
117. Dirajlal S, Pauers LE, Stucky CL. Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *Journal of neurophysiology* 2003; **89**(1): 513-24.
118. Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002; **22**(10): 4057-65.
119. Oliveria SF, Gomez LL, Dell'Acqua ML. Imaging kinase--AKAP79--phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy. *The Journal of cell biology* 2003; **160**(1): 101-12.
120. Oliveria SF, Dell'Acqua ML, Sather WA. AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 2007; **55**(2): 261-75.
121. Church TW, Tawatia P, Hannan S, et al. AKAP79 enables calcineurin to directly suppress protein kinase A activity. *eLife* 2021; **10**.
122. Brandao KE, Dell'Acqua ML, Levinson SR. A-kinase anchoring protein 150 expression in a specific subset of TRPV1- and CaV 1.2-positive nociceptive rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of comparative neurology* 2012; **520**(1): 81-99.
123. Zhang J, Carver CM, Choveau FS, Shapiro MS. Clustering and Functional Coupling of Diverse Ion Channels and Signaling Proteins Revealed by Super-resolution STORM Microscopy in Neurons. *Neuron* 2016; **92**(2): 461-78.
124. Patil MJ, Salas M, Bialuhin S, Boyd JT, Jeske NA, Akopian AN. Sensitization of small-diameter sensory neurons is controlled by TRPV1 and TRPA1 association. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2020; **34**(1): 287-302.
125. Nielsen TA, Eriksen MA, Gazerani P, Andersen HH. Psychophysical and vasomotor evidence for interdependency of TRPA1 and TRPV1-evoked nociceptive responses in human skin: an experimental study. *Pain* 2018; **159**(10): 1989-2001.
126. Brackley AD, Gomez R, Guerrero KA, et al. A-Kinase Anchoring Protein 79/150 Scaffolds Transient Receptor Potential A 1 Phosphorylation and Sensitization by Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Scientific reports* 2017; **7**(1): 1842.
127. Wang S, Wang S, Asgar J, et al. Ca(2+) and calpain mediate capsaicin-induced ablation of axonal terminals expressing transient receptor potential vanilloid 1. *J Biol Chem* 2017; **292**(20): 8291-303.

128. Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, et al. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; **24**(28): 6410-5.
129. Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, Trang T. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *Journal of neuroscience research* 2017; **95**(6): 1242-56.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reizweiterleitung vom peripheren zum zentralen Nervensystem.....	16
Abb. 2: Intrazelluläre Signalkaskaden in Neuronen	22
Abb. 3: Calcineurinexpression in primären sensorischen Neuronen	28
Abb. 4: Arbeitshypothese	32
Abb. 5: Der TRPV1-Kanalagonist Capsaicin bewirkt nicht die Aktivierung von PKA-II aber von ERK1/2 in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	50
Abb. 6: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt die Induktion der PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin	51
Abb. 7: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	53
Abb. 8: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	55
Abb. 9: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	57
Abb. 10: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC.....	59
Abb. 11: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	61
Abb. 12: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	64
Abb. 13: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und die Induktion des Calciumeinstroms mittels Ionomycin erhöht nicht die PKA-II Aktivität.....	65
Abb. 14: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	66
Abb. 15: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	67
Abb. 16: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A führt zu einer Steigerung der Cav1.2 Phosphorylierung und der ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin	69
Abb. 17: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	71
Abb. 18: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Capsaicin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	73
Abb. 19: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals und der ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPA1-Kanals mittels AITC	75
Abb. 20: Die Behandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	77
Abb. 21: Die Behandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit AITC in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min	78
Abb. 22: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals und der ERK1/2 Aktivität nach dem Calciumeinstrom über Ionomycin.....	80
Abb. 23: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren verstärkt nicht die Phosphorylierung des Cav1.2-Kanals nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	81
Abb. 24: Die Vorbehandlung mit Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Stimulation mit Ionomycin in primären sensorischen Neuronen von Ratten nach 0-120 min.....	82
Abb. 25: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin	84
Abb. 26: Die Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen Calcineurininhibitoren erhöht nicht die PKA-II Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen	85

Abb. 27: Die Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen Calcineurininhibitoren erhöht nicht die ERK1/2 Aktivität nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen	86
Abb. 28: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II und ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen	88
Abb. 29: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen nach 0-120 min	90
Abb. 30: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Cyclosporin A verstärkt nicht die Induktion der ERK1/2 nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in murinen primären sensorischen Neuronen nach 0-120 min	91
Abb. 31: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus verstärkt die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin in CGRP-positiven primären sensorischen Neuronen der Maus	94
Abb. 32: Die Vorbehandlung mit Tacrolimus verstärkt die Induktion der PKA-II nach der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin stärker in murinen CGRP-positiven Neuronen	95
Abb. 33: Nachgelagerte Zielstrukturen der PKA-II werden in murinen primären sensorischen Neuronen nach der Vorbehandlung mit Tacrolimus und der Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin aktiviert	97
Abb. 34: Calcineurininhibitoren erhöhen die PKA-II Aktivität und $Ca_v1.2$ Phosphorylierung bei einem durch Aktivierung von TRPV1-Kanälen induzierten Calciumeinstrom	99
Abb. 35: Calcineurininhibitoren erhöhen nicht die PKA-II Aktivität und $Ca_v1.2$ Phosphorylierung bei einem durch Aktivierung von TRPA1-Kanälen induzierten Calciumeinstrom	102
Abb. 36: Calcineurininhibitoren führen nicht zur PKA-II Aktivierung und $Ca_v1.2$ Phosphorylierung bei einem Calciumeinstrom über Ionomycin	104

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Zellkultur verwendete Nährmedien	33
Tabelle 2: Zusätze für die verwendeten Nährmedien	33
Tabelle 3: Reagenzien für die Zellkultur und Immunzytochemie	33
Tabelle 4: Für die Prästimulation verwendeten Calcineurininhibitoren	34
Tabelle 5: Für die Stimulation verwendeten Substanzen	34
Tabelle 6: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie	35
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie	36
Tabelle 8: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	36
Tabelle 9: Verwendete Software	38

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

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