

1 Summary

Untreated or insufficiently managed pain is the leading contributor to disability worldwide, and current therapeutic treatment options are inadequate. Significant research focussed on the identification of sensitizing mediators of peripheral neurons encompassing a variety of different molecule classes. However, far less is known about the impact of extracellular matrix (ECM) proteins on sensitization of peripheral neurons. Particularly sparse is our current knowledge about the direct influence of ECM proteins on intracellular signalling cascades underlying nociceptor sensitization.

This thesis aimed to identify ECM proteins which alter sensitization signalling of primary sensory neurons from rat dorsal root ganglia. Subsequently, ECM candidates were characterised for neuronal subgroup specificity and kinetic behaviour and an impact on pro-nociceptive cellular changes. Using a high-content screening (HCS) microscopy and automated image analysis approach, 17 ECM proteins were screened for a modulation of the activity of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Erk1/2) and protein kinase A (PKA) at baseline and after ligand-initiated signalling by nerve growth factor (NGF), serotonin and Oncostatin M in sensory neurons.

The analysis of 950,000 single cells in 420 tested conditions identified members of the collagen family to modulate NGF-mediated Erk1/2 phosphorylation amplitudes in sensory neurons. Subsequent analysis revealed subgroup specificity for the tropomyosin receptor kinase A (TrkA)-positive neuronal subgroup and demonstrated that structurally diverse collagen subtypes elevate NGF-mediated pErk1/2 signalling. The signalling changes were corroborated via extensive analysis of subgroup marker expression as well as a collaboratively developed mathematical modelling approach called hierarchical population model. Combining ordinary differential equation and mixture modelling approaches the hierarchical population model allowed to test hypotheses for possible mechanisms that underlie the observed pErk1/2 signalling changes. Cell-biological validation of the proposed mechanisms identified that the enhancement of NGF-induced pErk1/2 signalling by collagen type IV (Col IV) depends on an elevation of TrkA expression and simultaneous affection of degradation pathways. Furthermore, Col IV elevated baseline Erk1/2 activation and its modulation of NGF-mediated pErk1/2 signalling was additive to other sensitizing and depolarizing signalling. The effects of collagens were not only limited to the pro-nociceptive NGF/TrkA/pErk1/2 mechanism. Biochemical analysis revealed that collagens elevated the expression of the pro-nociceptive neuropeptide CGRP. This was identified as one of several mechanisms leading to an elevated release of CGRP from sensory neurons upon neuronal depolarization. Finally, Col IV-dependent increase of CGRP release was further enhanced by NGF treatment.

Thus, this thesis identified the group of collagens as novel modulators of multiple pro-nociceptive processes in the peptidergic TrkA-positive subgroup of sensory neurons. These include intracellular mechanisms such as transcriptional alterations indicating long-lasting modulations of nociceptive processes, and a potential intercellular mechanism by CGRP release bearing the capacity to further enhance nociceptive processes by interaction with surrounding cells. HCS-based microscopy in combination with hierarchical population model analysis emerged as novel tools to control heterogenous cell systems and perform this first screen on ECM proteins for mediators of sensitization signalling in sensory neurons.

Further research has to reveal if neuronal excitability is altered in addition to the observed changes in sensitization signalling, transcription and neuropeptide release. Moreover, the exact molecular mechanism by which the diverse collagens modulate nociceptive signalling and the responsible collagen receptors need to be identified. This will help to identify painful pathological settings *in vivo* and will allow to test for the therapeutic potential of interfering with collagen nerve interactions.

2 Zusammenfassung

Unbehandelte oder unzureichend behandelte Schmerzen tragen weltweit als größter Einzelfaktor zu körperlichen Beeinträchtigungen bei, auch weil die derzeitigen therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten unzureichend sind. Umfangreiche Forschungsarbeiten konzentrierten sich auf die Identifizierung von sensibilisierenden Mediatoren peripherer Neuronen, die eine Vielzahl von verschiedenen Molekülklassen umfassen. Über den Einfluss extrazellulärer Matrix (EZM)-Proteine auf die Sensibilisierung peripherer Neuronen ist jedoch viel weniger bekannt. Besonders gering ist unser aktuelles Wissen über den direkten Einfluss von EZM-Proteinen auf die intrazellulären Signalkaskaden der Nozizeptorsensibilisierung.

Ziel dieser Arbeit war es, EZM-Proteine zu identifizieren, die die Signaltransduktion der Sensibilisierung von primären sensorischen Neuronen aus Spinalganglien von Ratten verändern. Identifizierte Kandidaten wurden anschließend auf Spezifität der neuronalen Subgruppen und das kinetische Verhalten sowie auf einen Einfluss auf pro-nozizeptive zelluläre Veränderungen untersucht. Unter Verwendung eines High-Content Screening (HCS)-Mikroskopie- und automatisierter Bildanalyse-Ansatzes wurden 17 EZM-Proteine auf eine Modulation der basalen und Liganden-initiierten (Nervenwachstumsfaktor (NGF), Serotonin und Oncostatin M) Aktivität der extrazellulär Signalregulierten Kinasen 1/2 (Erk1/2) und Proteinkinase A (PKA) in sensorischen Nervenzellen untersucht.

Die Analyse von 950.000 Einzelzellen und 420 getesteten Bedingungen identifizierte Mitglieder der Kollagenfamilie als Modulatoren der NGF-vermittelten Erk1/2-Phosphorylierungsamplituden in sensorischen Neuronen. Anschließende Analysen zeigten Subgruppenspezifität für die Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA)-positive neuronale Subgruppe und zeigten, dass strukturell unterschiedliche Kollagensubtypen die NGF-vermittelte pErk1/2 Signaltransduktion erhöhen. Die Signalveränderungen wurden durch eine umfangreiche Analyse der Subgruppenmarkerexpression sowie einen in Kollaboration entwickelten mathematischen Modellierungsansatz, das hierarchische Populationsmodell, bestätigt. Durch die Kombination von Differentialgleichungen und Mixture-Modelling konnte das hierarchische Populationsmodell auf mechanistische Hypothesen testen, die den beobachteten pErk1/2-Signaländerungen zugrunde liegen könnten. Zellbiologische Überprüfung der vorgeschlagenen Mechanismen ergab, dass die Verstärkung der NGF-induzierten pErk1/2 Signaltransduktion durch Kollagen Typ IV (Col IV) von einer Erhöhung der TrkA-Expression und gleichzeitiger Beeinflussung von Degradationswegen abhängt. Darüber hinaus erhöhte Col IV die basale Erk1/2-Aktivierung und zeigte eine additive Wirkung der Modulation der NGF-vermittelten pErk1/2-Signaltransduktion zu der Aktivierung weiterer sensibilisierender und depolarisierender Signaltransduktionswege. Die Auswirkungen von Kollagenen waren nicht nur auf den pro-nozizeptiven

NGF/TrkA/pErk1/2-Mechanismus beschränkt. Eine biochemische Analyse ergab, dass Kollagene die Expression des pro-nozizeptiven Neuropeptids CGRP erhöhten. Dies wurde als einer von mehreren Mechanismen identifiziert, die zu einer erhöhten Freisetzung von CGRP aus sensorischen Neuronen bei neuronaler Depolarisation führten. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass der Col IV-abhängige Anstieg der CGRP-Freisetzung durch NGF-Behandlung weiter verstärkt wird.

Somit identifizierte diese Arbeit die Gruppe der Kollagene als neue Modulatoren von multiplen pro-nozizeptiven Prozessen in der peptidergen TrkA-positiven Subgruppe der sensorischen Neurone. Dazu gehören intrazelluläre Mechanismen wie transkriptionelle Veränderungen, die auf lang-anhaltende Modulationen nozizeptiver Prozesse hinweisen, und ein potenzieller interzellulärer Mechanismus, der der CGRP-Freisetzung, der die Möglichkeit aufweist, nozizeptive Prozesse durch die Interaktion mit umgebenden Zellen weiter zu verstärken. Die HCS-basierte Mikroskopie in Kombination mit der hierarchischen Populationsmodellanalyse erwies sich als neuartiges Tool zur Kontrolle heterogener Zellsysteme und führte somit zu diesem ersten Screen an EZM-Proteinen nach Mediatoren der Signaltransduktion, die sensibilisierenden Prozessen in sensorischen Neuronen zugrunde liegen.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob neben den beobachteten und Sensibilisierung zugrunde liegenden Veränderungen in den Bereichen Signaltransduktion, Transkription und Neuropeptid-Freisetzung auch die neuronale Erregbarkeit verändert ist. Weiterhin muss der genaue molekulare Mechanismus, mit dem die verschiedenen Kollagene nozizeptive zelluläre Prozesse modulieren, und die verantwortlichen Kollagenrezeptoren identifiziert werden. Dies wird dazu beitragen, schmerzhafte pathologische Zustände *in vivo* zu identifizieren und das therapeutische Potenzial einer Intervention der Kollagen-Nerven-Interaktion zu ergründen.