

**Aus der neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Charakterisierung von Spinalganglienneuronen
im α Galaktosidase A-defizienten Maus-Modell des M. Fabry**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dorothea Anna Elisabeth Hose

aus Neuenstein, Obergeis

Würzburg, Juni 2017

Referentin: Prof. Dr. Claudia Sommer

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Wanner

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Morbus Fabry | 1 |
| 1.1.1. Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2. Vererbung | 2 |
| 1.1.3. Klinisches Bild | 3 |
| 1.1.3.1. Organmanifestationen | 4 |
| 1.1.3.2. Peripheres Nervensystem und Schmerzen bei M. Fabry | 5 |
| 1.1.4. Diagnostik | 7 |
| 1.1.5. Therapie | 8 |
| 1.2. Die Beeinflussung der Nozizeption bei M. Fabry | 10 |
| 1.2.1. Anatomische Grundlagen der Nozizeption | 12 |
| 1.2.1.1. Das Spinalganglion – Schaltstelle der Nozizeption | 13 |
| 1.2.1.2. Die Beeinflussung des Spinalganglions durch M. Fabry | 14 |
| 1.2.2. Mediatoren der Schmerzleitung | 15 |
| 1.2.2.1. TRPV1-Kanäle | 16 |
| 1.2.2.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle | 17 |
| 1.2.2.3. Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP) | 19 |
| 1.3. Globotriaosylceramid 3 (Gb3) | 20 |
| 1.3.1. Definition und Physiologie von Glykosphingolipiden | 20 |
| 1.3.2. Gb3-Akkumulation und seine Auswirkungen bei M. Fabry | 21 |
| 1.4. Maus-Modelle des M. Fabry | 22 |
| 1.4.1. α Galaktosidase A-knockout-Maus | 23 |
| 1.4.2. G3Stg/GLA-knockout-Maus | 25 |
| 1.5. Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit | 26 |
| 2. Methoden | 27 |
| 2.1. αGalaktosidase A Knock-out Mäuse und Tierhaltung | 27 |
| 2.2. Verhaltenstestungen | 28 |
| 2.2.1. Von-Frey Test zur Bestimmung der mechanischen Pfotenrückzugsschwellen | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2. Bestimmung der Pfotenrückzugslatenz auf Hitze..... | 29 |
| 2.2.3. Bestimmung der Kälterückzugslatenz | 29 |
| 2.3. Gewebeentnahme..... | 30 |
| 2.4. Gewebeasservierung..... | 31 |
| 2.5. Immunfluoreszenzfärbung mit PGP9.5 an Footpads | 31 |
| 2.5.1. Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)..... | 32 |
| 2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Spinalganglien | 32 |
| 2.6.1. Bestimmung der neuronalen Fläche..... | 33 |
| 2.7. Fluoreszenz-Doppelfärbungen an Spinalganglien..... | 33 |
| 2.7.1. Fluoreszenz-Doppelfärbung CD77 und Nav 1.8..... | 35 |
| 2.7.2. Fluoreszenz-Doppelfärbung CD77 und IB4..... | 36 |
| 2.7.3. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen mit Image J | 36 |
| 2.8. Molekulargenetische Untersuchungen zur Quantifizierung der Genexpression Schmerz-assoziiertes Rezeptoren und Mediatoren | 37 |
| 2.8.1. Allgemeines zur quantitativen real-time Polymerase-ketten-reaktion (qRT-PCR) | 37 |
| 2.8.2. RNA-Extraktion | 38 |
| 2.8.3. Messung der optischen Dichte | 39 |
| 2.8.4. Reverse Transkription | 39 |
| 2.8.5. qRT-PCR | 40 |
| 2.9. Kultivierung der Spinalganglienneurone..... | 42 |
| 2.9.1. Anlegen der Spinalganglien-Kultur | 42 |
| 2.9.2. Fixierung der Zellkulturen..... | 43 |
| 2.9.3. Fluoreszenz-Doppelfärbungen der Kulturen | 43 |
| 2.10. Statistische Auswertung | 45 |
| 3. Ergebnisse | 46 |
| 3.1. Ergebnisse Verhaltenstestungen | 46 |
| 3.1.1. Mechanische Hypersensibilität bei Fabry-ko-Mäusen..... | 46 |
| 3.1.2. Altersabhängige Hyper- und Hyposensibilität gegenüber Hitze in Fabry-ko-Mäusen..... | 47 |
| 3.1.3. Kälte-Hyposensibilität bei Fabry-ko-Mäusen..... | 49 |
| 3.2. Reduzierung der IENFD bei Fabry-ko-Mäusen | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Quantifizierbare Vergrößerung der neuronalen Fläche in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen..... | 53 |
| 3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Spinalganglien..... | 55 |
| 3.4.1. Vermehrte Gb3-Ablagerungen in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen | 55 |
| 3.4.2. Erhöhte Expression TRPV1-positiver Neurone bei Fabry-ko-Mäusen | 57 |
| 3.4.2.1. Kein Genotypunterschied in der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone | 58 |
| 3.4.3. Kein Unterschied bei der Expression Nav1.8-positiver Neurone zwischen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen sowie keine Genotyp-spezifische Korrelation Nav1.8- und CD77-positiver Neurone... | 61 |
| 3.4.4. Verminderte Anzahl CGRP-positiver Neurone bei alten Fabry-ko-Mäuse. Keine Genotyp-spezifische Korrelation zwischen CGRP und CD77 | 63 |
| 3.4.5. Reduzierung der NF200-Expression bei Fabry-ko-Mäusen, jedoch keine Genotyp-spezifische Korrelation zwischen NF200 und CD77 | 64 |
| 3.4.6. Erhöhte Anzahl IB4-positiver Neurone bei Spinalganglien von jungen Fabry-ko-Mäusen | 66 |
| 3.5. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen..... | 67 |
| 3.5.1. TRPV1-Genexpression bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen | 68 |
| 3.5.2. Na _v 1.8-Genexpression bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen | 69 |
| 3.6. Ergebnisse Neuronenkultur | 70 |
| 3.6.1. Erfolgreiche Etablierung einer Neuronenkultur aus Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen..... | 70 |
| 3.6.2. Keine aussagekräftigen Färbeversuche an Neuronenkulturen aus Spinalganglien | 71 |
| 4. Diskussion | 74 |
| 4.1. Charakterisierung von Fabry-ko-Mäusen hinsichtlich Schmerz-assoziiertem Verhalten gegenüber mechanischen und thermischen Stimuli | 74 |
| 4.2. Reduzierung der IENFD entsprechend einer SFN in Fabry-ko-Mäusen | 78 |
| 4.3. Charakterisierung der Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen | 82 |
| 4.3.1. Veränderungen der neuronalen Morphologie in Fabry-ko-Mäusen | 82 |
| 4.3.2. Veränderungen der neuronalen Rezeptorausstattung bei Fabry-ko-Mäusen..... | 86 |
| 4.3.2.1. Vermehrte Ablagerungen von Gb3 in Spinalganglienneuronen bei Fabry-ko-Mäusen ... | 86 |
| 4.3.2.2. Veränderungen schmerzassoziierter Ionenkanäle im Fabry-ko-Mausmodell..... | 88 |
| 4.3.2.2.1. Veränderungen der neuronalen TRPV1-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen..... | 88 |
| 4.3.2.2.2. Unterschiede der Nav1.8-Expression in Fabry-ko-Mäusen | 91 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.2.2.3. Verminderte CGRP-Expression in Spinalganglienneuronen von 12 Monate alten Fabry-ko-Mäusen | 95 |
| 4.3.2.3. Reduktion neuronaler NF200-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen | 98 |
| 4.3.3. Immunhistochemische Untersuchung der neuronalen IB4-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen..... | 99 |
| 4.4. Etablierung einer Kultur aus Spinalganglienneuronen zur Untersuchung Schmerz-assoziiertes Ionenkanäle <i>in vitro</i> | 100 |
| 4.5. Methodenkritik und Limitationen der vorliegenden Arbeit..... | 101 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 104 |
| 6. Literaturverzeichnis | 106 |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 116 |
| 8. Tabellenverzeichnis | 116 |
| 9. Materialienliste | 120 |
| 9.1. Geräte und Laborhilfen | 120 |
| 9.2. Verbrauchsmaterialien..... | 121 |
| 9.3. Antikörper, Lösungen und Puffer für die PGP9.5-Färbung..... | 122 |
| 9.4. Lösungen und Puffer für die H.E.-Färbung | 123 |
| 9.5. Antikörper und Reagenzien für die Fluoreszenz-färbung..... | 124 |
| 9.6. Enzyme, Primer-Puffer und Nukleinsäuren für reverse Transkription und Real-Time PCR | 124 |
| 9.7. Puffer, Medien und Enzyme für Neuronenkultur | 125 |
| 10. Anhang..... | 127 |
| Danksagung | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CDH | Ceramide-dihexosid |
| cDNA | copyDNA |
| CGRP | Calcitonin-Gen-Related Peptide |
| CSS | Complete Saline Solution |
| C _t | Threshold cycle |
| CTH | Ceramide-trihexosid |
| DEPC | Diethyl Pyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ERT | Enzymersatztherapie |
| Fabry-ko-Maus | α GalA-knockout-Maus |
| Gb3 | Globotriaosylceramid-3 |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| GDNF | Glial Derived Neurotrophic Factor |
| GSL | Glykosphingolipide |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| IASP | International Association for the Study of Pain |
| IB4 | Isolectin B4 |
| IENFD | Intraepidermale Nervenfaserdichte |
| litt-WT-Mäuse | Wildtyp-Wurfgeschwister |
| LSD | Lysosomale Speicherkrankheiten (engl. lysosomal storage disorders) |
| mRNA | Messenger-RNA |
| Na _v -Kanal | Spannungsgesteuerter Natrium-Kanal |
| NF | Neurofilament |
| NF200 | Neurofilament 200 |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| PBS | Phosphat-Buffer-Saline |
| PEPD | Paroxysmal Extreme Pain Disorder |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGP9.5 | Protein Gene Product 9.5 |
| qRT-PCR | Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion |
| QST | Quantitative sensorische Testung |
| ROI | Region of Interest |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis |
| SFN | Small Fiber Neuropathie |
| SHIRPA | SmithKlineBeecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, Phenotype assesement |
| SLS | Natriumlauryl-Sulfat (engl. Sodium-lauryl sulfate) |
| TL-Liberase | Thermolysin-low Liberase |
| TM-Liberase | Thermolysin-medium Liberase |
| trkA | Tropomyosin-receptor kinase A |
| TRP-Kanäle | Transient receptor potential-Channels |
| TRPV-Kanäle | TRP-Kanäle sensitiv für Vanilloid |
| TTX | Tetrodotoxin |
| WML | White matter lesions |
| α GalA | α Galaktosidase A |

1. Einleitung

1.1. Morbus Fabry

Morbus Fabry (M. Fabry) ist eine X-chromosomal vererbte, lysosomale Speicherkrankheit, die erstmals 1898 zeitgleich von William Anderson und Johannes Fabry beschrieben wurde (Anderson 1898; Fabry 1898; Üçeyler et al. 2012). Ausgehend von einem monogenetischen Defekt im für das Enzym α Galaktosidase A (α GalA)-kodierenden Gen *GLA* (Lokalisation: Chromosom Xq22.1 (Bishop et al. 1988)), kommt es zu einer vollständig fehlenden oder verminderten Expression von α GalA (Schiffmann 2009). Als Hydrolase katalysiert α GalA die Abspaltung von α Galaktosylbindungen am terminalen Ende von Glykosphingolipiden, einer Lipidgruppe, die am Aufbau von Zellmembranen beteiligt ist (s.1.3; Brady, Gal et al. 1967; Garman 2007; Üçeyler and Sommer 2012). Dabei wird Globotriaosylceramid-3 (Gb3; CD77 als Rezeptor) durch die α GalA und Abspaltung von Galaktose zu Laktosylceramid abgebaut (Garman, S. C. et al. 2004). Bei einem vollständigen oder teilweisen Funktionsverlust dieses Enzyms kommt es zu Akkumulation von Glykosphingolipiden, insbesondere Gb3 in Lysosomen (Germain 2010). Diese u.a. endotheliale, renale, kardiale und neuronale Ablagerung von Gb3 führt schließlich zu einer progressiven Multiorganerkrankung mit Funktionseinschränkung (Zarate et al. 2008; Germain 2010).

1.1.1. *Epidemiologie*

Nach dem M. Gaucher ist der M. Fabry die zweithäufigste lysosomale Speicherkrankheit (Mehta et al. 2010). Weltweit wird die Inzidenz mit 1:40.000-1:117.000 angegeben (Meikle et al. 1999; Üçeyler et al. 2012). Die Rate nicht erkannter Patienten wird jedoch höher geschätzt. So konnte unter männlichen Dialysepatienten eine Inzidenz des M. Fabry von 0,1-1%, bei Patienten mit vermeintlich idiopathischer Kardiomyopathie von 3-5% und unter Patienten mit kryptogenem Schlaganfall von 4,9% nachgewiesen werden (Wilcox et al. 2008). Für die Prävalenz gibt es lediglich uneinheitliche Daten. So wird in einem Screening auf verminderte α GalA-Aktivität bei

neugeborenen Jungen in Norditalien eine Prävalenz von 1:3.100, in Taiwan von 1:5.000 angegeben (Spada et al. 2006; Ellaway 2016).

1.1.2. **Vererbung**

Nachdem Brady et al. 1967 erstmals den zugrundeliegenden Enzymdefekt der α GalA beschrieben, folgte 1988 die Entdeckung des *GLA*-Gens auf Position X22q des langen Arms des X-Chromosoms durch Bishop et al. (Brady et al. 1967; Bishop et al. 1988). Das *GLA*-Gen besteht aus über 12.000 Basenpaaren und sieben Exons (Schiffmann 2009; Germain 2010). Seither wurden mittlerweile über 600 verschiedene Mutationen in diesem Gen festgestellt ((Saito et al. 2011) <http://fabry-database.org>, Stand: 29.02.2016). Eine Untersuchung der α GalA bei M. Fabry zeigte, dass die Genmutationen zu einer fehlerhaften Faltung des Proteins und damit zu einem „loss-of-function“ führen können (Garman 2007). Die häufigste Mutationsform ist die Punktmutation, die zu einem Missense- oder Nonsense-Codon und damit zu einem veränderten Peptid oder Kettenabbruch führt. Seltener sind Basendeletionen oder –insertionen oder sog. Splice-Mutationen (Germain 2010; Üçeyler et al. 2012). Viele dieser Mutationen sind sog. private Mutationen, d.h. sie kommen nur in bestimmten Familien vor; andere treten dagegen häufiger auf (Desnick et al. 2003; Mehta et al. 2010). Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Mutationen, der Beobachtung unterschiedlicher Phänotypen bei gleichem Genotyp und hoher Variabilität der klinischen Präsentation in einer Familie wird angenommen, dass neben dem Genotyp auch epigenetische Faktoren für den Schweregrad der Erkrankung mitverantwortlich sind (Zarate et al. 2008; Schiffmann 2009; Üçeyler et al. 2012).

Bei einem X-chromosomalen Erbgang treten außerdem verschiedene Besonderheiten der Vererbung auf. So gibt ein erkrankter Vater das kranke Allel an alle seine Töchter, nicht aber an seine Söhne weiter. Eine heterozygote Mutter dagegen vererbt die Erkrankung an 50% ihrer Kinder. Lange Zeit galten heterozygote Frauen nur als asymptotische Überträgerinnen des erkrankten Gens. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass Frauen ein heterogenes Spektrum von vollständig fehlender Symptomatik bis hin zum klinischen Vollbild des M. Fabry entwickeln können (Toyooka

2011; Echevarria et al. 2016). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist die X-Chromosom-Inaktivierung, die sog. Lyonisierung. Hierbei wird, zur Angleichung der männlichen und weiblichen Genanzahl in Körperzellen ein X-Chromosom zufällig inaktiviert (Harper 2011). Eine überwiegende Expression des Wildtyp-*GLA*-Allels in weiblichen Körperzellen führt somit zu einem milderem Phänotyp mit langsamerem Progress; häufigeres Auftreten des mutierten *GLA*-Allels dagegen zu einem frühen Auftreten, schnellerem Verlauf und einer schlechteren Prognose (Echevarria et al. 2016).

1.1.3. *Klinisches Bild*

Das klinische Bild des M. Fabry variiert vom schwerkranken Patienten bis zum asymptomatischen Mutationsträger und ist abhängig von der verbliebenen Enzymaktivität (Schiffmann 2009; Mehta et al. 2010; Üçeyler et al. 2012). Erste Symptome der Erkrankung treten gewöhnlich in der Kindheit auf; bei Jungen zwischen 3 bis 10 Jahren, bei Mädchen zwischen dem 6. und 15. Lebensjahr (Mehta et al. 2010). Trotz des weitgehend asymptomatischen Verlaufs in den ersten Lebensjahren konnten Ellaway et al. histopathologisch bereits im Fetus Gb3-Ablagerungen nachweisen (Ellaway 2016). Die erste klinische Manifestation bei 59% der Jungen und 41% der Mädchen sind episodische Schmerzen im Sinn von brennenden Schmerzen der Hände und Füße (Ellaway 2016). Weitere Frühsymptome sind gastrointestinale Beschwerden, Angiokeratome sowie Hypo- bzw. Anhidrose (Germain 2010). Manifestationen an Herz und Nieren treten zumeist erst im Erwachsenenalter auf und sind bedingt durch Gefäßdysfunktion und Vaskulopathie sowie Minderperfusion, ausgelöst durch Gb3-Ablagerungen in kleinen Gefäßen (Desnick et al. 2003; Zarate et al. 2008; Schiffmann 2009). Sie können zu schweren Komplikationen sowie Einschränkung der Lebensqualität führen und reduzieren die mittlere Lebenserwartung unbehandelter Männer auf ca. 50 Jahre, unbehandelter Frauen auf ca. 70 Jahre (Mehta et al. 2010). Der genaue Pathomechanismus ist allerdings weiterhin unklar.

1.1.3.1. **Organmanifestationen**

Eine Nierenbeteiligung tritt bei 50% der Fabry-Patienten auf und beginnt meist vor dem 30. Lebensjahr mit Mikroalbumin- und Proteinurie (Branton et al. 2002; Germain 2010; Mehta et al. 2010). Die Ablagerung von Gb3 in u.a. glomerulären Endothelzellen führt nach anfänglicher Hyperfiltration zu einer progredienten Einschränkung der Nierenfunktion bis hin zu einer chronischen Niereninsuffizienz mit reduzierter glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Dialysepflichtigkeit (Germain 2010; Üçeyler et al. 2012). Neben der Rolle als prognostischer Faktor beeinflusst die Nephropathie die Lebensqualität der Fabry-Patienten deutlich (Wagner et al. 2014). Bei vielen Patienten besteht bereits vor Diagnosestellung eine fortgeschrittene Nierenerkrankung (Ortiz et al. 2010).

40-60% der Fabry-Patienten weisen eine Kardiomyopathie, meist im Sinne einer konzentrischen linksventrikulären Hypertrophie auf (Germain 2010; Seydelmann et al. 2015). Ursache hierfür sind Gb3-Ablagerungen in Kardiomyozyten, die histologisch zu deren Hypertrophie und Vakuolisierung führen (MacDermot et al. 2001; Seydelmann et al. 2015). Jedoch ist Gb3 nur für 1-3% der Masse des vergrößerten Herzens verantwortlich, sodass u.a. ein Einfluss von Wachstumsfaktoren diskutiert wird (Weidemann et al. 2011). Im weiteren Verlauf entwickeln sich eine Herzwandfibrose und Herzinsuffizienz. Neben Myokardinfarkten treten häufig maligne Herzrhythmusstörungen auf, die zum plötzlichen Herztod führen können (Linhart et al. 2000; Shah et al. 2005; Schiffmann et al. 2009; Germain 2010; Üçeyler et al. 2012). In einer Untersuchung des Fabry-Registers stellten kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache bei Fabry-Patienten dar (Mehta et al. 2010).

Daneben werden häufig transitorisch ischämische Attacken (TIA), zum Teil bereits im Kindesalter sowie Schlaganfälle beschrieben (Mehta et al. 2004; Ramaswami et al. 2006; Mehta et al. 2010). Vier Prozent der weiblichen und sieben Prozent der männlichen Fabry-Patienten erleben im Laufe der Erkrankung einen Schlaganfall. 50% erlitten bereits vor Diagnosestellung oder anderen klinischen Manifestationen einen Schlaganfall; dabei sind Männer laut Studienlage im Mittel 39 Jahre, Frauen 43 Jahre alt (Sims et al. 2009; Mehta et al. 2010; Toyooka 2011). Neben Gb3-Ablagerungen, die

Mikroangiopathien kleiner intrakranieller Blutgefäße verursachen könnten, werden weitere Faktoren, wie z.B. ein veränderter Blutfluss oder eine vermehrte Produktion oxidativer Substanzen als Ursache vermutet. In radiologischen Untersuchungen fielen Fabry-Patienten durch einen vergrößerten Durchmesser der A. basilaris und sog. white matter lesions (WML) auf (Fellgiebel et al. 2011; Üçeyler et al. 2014). WML sind unspezifische Veränderungen der weißen Substanz, deren Pathophysiologie bisher nicht ausreichend geklärt ist. Ihr radiologisches Korrelat ist eine mittels MRT darstellbare Hyperintensität in der T2- oder FLAIR-Wichtung (Kolodny et al. 2015).

Weitere klinische Manifestationen sind erhabene, rötlich-livide Hautveränderungen, sog. Angiokeratome die z.B. typischerweise am Bauchnabel vorkommen (Germain 2010). Daneben finden sich korneale Veränderungen am Auge, die sog. Cornea verticillata, Tinnitus oder Hörstürze, abdominelle Beschwerden, Depressionen sowie Beschwerden des autonomen Nervensystems wie Anhidrose, orthostatische Dysregulation oder Hitzeintoleranz (Muller 2006; Germain 2010; Üçeyler et al. 2012; Pensabene et al. 2016).

1.1.3.2. *Peripheres Nervensystem und Schmerzen bei M. Fabry*

Die am häufigsten berichteten Symptome des M. Fabry sind neurologische Symptome (Mehta et al. 2010). Dabei ist das periphere Nervensystem v.a. in Form einer Small-fiber-Neuropathie (SFN) betroffen, bei der typischerweise intraepidermale myelinisierte A δ - und nicht-myelinisierte C-Fasern geschädigt sind. Histologisches Korrelat ist eine Verminderung oder sogar ein vollständiger Verlust intraepidermaler Nervenfasern (Burlina et al. 2011; Üçeyler 2016). Dabei tritt eine angehobene Kälteerkennungsschwelle auf, die mittels quantitativer sensorischer Testung (QST) nachgewiesen werden kann (Maag et al. 2008; Üçeyler et al. 2011). Das Hauptsymptom der SFN sind brennende akrale Schmerzen, die u.a. durch Druck oder Wärme ausgelöst werden können (Toyooka 2011; Üçeyler et al. 2012; Üçeyler 2016). Brennende, an den Akren auftretende Schmerzen sind auch das charakteristische Erstsymptom des M. Fabry (Üçeyler et al. 2012). Bereits 60-80% der erkrankten Kinder leiden unter starken Schmerzen (Germain 2010; Burlina et al. 2011). Dabei können verschiedene Formen und Schweregrade unterschieden werden (**Tabelle 1**).

Tabelle 1 Unterschiedliche Schmerzformen des M. Fabry nach (Üçeyler et al. 2013)

| Schmerzform | Lokalisation | Charakteristik |
|-----------------------------|---|--|
| Schmerzattacken | Akral | Brennend Triggerfaktoren (z.B. Stress, Fieber, Anstrengung, Hitze, Kälte) |
| Fabry-Krisen | Akral beginnend Nach proximal ausbreitend | Dauer: Minuten bis Tage Episodisch Kaum durch Analgetika beeinflussbar |
| Evozierte Schmerzen | Akral | Hyperalgesie, Allodynie |
| Permanente Schmerzen | | Brennende Kribbelparästhesien Erwachsenenalter |

Zum einen werden Schmerzattacken, in Form brennender akraler Schmerzen beschrieben, die durch endo- und exogene Faktoren, wie Stress, Anstrengungen, Fieber und Hitze oder Kälte ausgelöst werden können. Weiterhin können sog. Fabry-Krisen auftreten. Diese sind extreme, an den Akren (v.a. Fußsohlen und Handflächen) beginnende und nach proximal aufsteigende episodische Schmerzen, die Minuten bis Tage andauern können. Im Gegensatz zu Schmerzattacken sind sie kaum durch Analgetika beeinflussbar. Auch evozierte akrale Schmerzen in Form von Hyperalgesie und Allodynie werden von einigen Patienten beschrieben. Eine weitere Form sind permanente Schmerzen, die oft mit brennenden Kribbelparästhesien assoziiert sind und meist im Erwachsenenalter auftreten (Germain 2010; Burlina et al. 2011; Üçeyler et al. 2012). Schmerzattacken mit oder ohne Fabry-Krisen treten meist bereits im Kindesalter auf (Üçeyler et al. 2012). Mit zunehmendem Alter sinkt die Schmerzintensität in der Regel; jedoch können die Schmerzen auch persistieren oder erst im Erwachsenenalter beginnen (Zarate et al. 2008; Üçeyler et al. 2012). Die verschiedenen Fabry-assoziierten Schmerzen führen bei betroffenen Patienten zu einer stark reduzierten Lebensqualität (Germain 2010; Üçeyler et al. 2014).

1.1.4. Diagnostik

Trotz der o.g. Symptome erfolgt die Diagnosestellung meist verspätet und häufig erst im Erwachsenenalter (mittleres Alter bei Diagnose: 29 Jahre; (Desnick et al. 2003; Mehta et al. 2010)). Symptome, die in der Anamnese auf M. Fabry hindeuten können sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2 „Alarmzeichen“, die auf M. Fabry hinweisen nach (Üçeyler et al. 2012)

| Kindesalter | Erwachsenenalter | Familienanamnese |
|--|--|---|
| Brennende Schmerzen an Handflächen und Fußsohlen <i>Auslöser: Hitze, Kälte, Fieber, körperliche Anstrengungen</i> | | Gehäufte akrale Schmerzen |
| Fabry-Krisen | Rezidivierende Schlaganfälle im jungen Lebensalter | Familiär auftretende Nieren- und Herzerkrankungen |
| Rezidivierende fieberhafte Erkrankungen | Nieren- und/oder Herzinsuffizienz unklarer Genese | Frühe Todesfälle unklarer Ursache |
| Cornea verticillata | Herzrhythmusstörungen unklarer Genese | Hinweise auf X-chromosomalen Erbgang |

Die Sicherung der Diagnose bei bestehendem klinischem Verdacht erfolgt mittels biochemischer Methoden und genetischer Untersuchungen. Hierzu kann die α GalA-Enzymaktivität z.B. in Plasma, Leukozyten oder getrocknetem Blut oder die Gb3-Ausscheidung im Urin gemessen werden (Zarate et al. 2008; Germain 2010; Mehta et al. 2010). Da diese Untersuchungen bei betroffenen Frauen aufgrund der Lyonisierung jedoch häufig im Normalbereich liegen, gilt die Gensequenzierung als Goldstandard zur Diagnosesicherung bei Frauen (Zarate et al. 2008; Schiffmann 2009; Germain 2010). Auch bei Männern erfolgt zur weiteren Diagnosesicherung eine Gensequenzierung und Identifizierung ursächlicher Mutationen. Nach der Diagnosestellung sollten alle typischerweise betroffenen Organe wie Niere, Herz und Nervensystem untersucht sowie ein Familienscreening durchgeführt werden (Üçeyler et al. 2012).

Pränatal- oder Neugeborenen-Screening mittels α GalA-Aktivitätsmessung in Chorionzotten bzw. Blutstropfen von Neugeborenen sind ebenfalls möglich (Spada et al. 2006; Germain 2010; Verma et al. 2015).

1.1.5. *Therapie*

Für die Therapie des M. Fabry wurden interdisziplinärer Leitlinien erstellt. Ziel ist es, die Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten zu verbessern, indem Schmerzen reduziert und die weitere Progression von Organschädigungen verhindert werden (DGN-Leitlinie 2013, (Biegstraaten et al. 2015)). Die wichtigste Säule der Behandlung ist die intravenöse Enzyersatztherapie (ERT). Seit 2001 sind zwei rekombinante Enzyme auf dem europäischen Markt zugelassen (**Tabelle 3**).

Tabelle 3 Eigenschaften der zur intravenösen Enzyersatztherapie zugelassenen Medikamente. Nach (Germain 2010; Üçeyler et al. 2012)

| | Agalsidase α | Agalsidase β |
|--------------------------|---|--|
| Handelsname | Repagal [®] | Fabrazym [®] |
| Hersteller | Shire Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA | Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA |
| Herstellung aus | Humanen Hautfibroblasten | Ovarialzellen des chinesischen Goldhamsters |
| Dosis | 0,2 mg/kg KG | 0,1 mg/kg KG |
| Begleitmedikation | Nicht notwendig | Notwendig (antihistaminisch, antipyretische) |

Beide Präparate werden zweiwöchentlich appliziert und haben in Studien ihre Sicherheit und Effektivität belegt (Germain 2010). Ein direkter Vergleich beider Präparate liegt bisher nicht vor. Laut Studien reduziert ERT die kardiale Masse und die renale Gb3-Akkumulation, während Effekte auf das Nervensystem (inklusive Fabry-assoziiertes Schmerzen) und die renale Funktion noch nicht eindeutig bewiesen sind (Biegstraaten et al. 2015). Entscheidend für den Therapieerfolg ist der frühzeitige Beginn der ERT. So konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der ERT auf die Progression der Organschädigungen bei bereits fortgeschrittener Erkrankung zum

Zeitpunkt des Therapiebeginns sinkt (Weidemann et al. 2013). Hohe Kosten und mögliche Induktion einer Immunreaktion durch das rekombinante Enzym sind limitierende Faktoren (Üçeyler et al. 2012). Alternativen zur ERT sind u.a. die Chaperontherapie, die auf der Annahme einer fehlerhaften Faltung von α GalA beruht und seine korrekte Faltung vermittelt (Garman 2007; Warnock et al. 2015). 2016 wurde mit Migalastat (Galafold®) eine orale Chaperontherapie durch die Europäische Kommission zur Behandlung des M. Fabry zugelassen. Migalastat bindet selektiv und reversibel an bestimmte Mutationsformen des α GalA-Enzyms und führt dadurch zu einer Stabilisierung des Enzyms sowie zur Wiederherstellung der Enzymaktivität. Hierdurch kann das krankheitsverursachende Gb3 abgebaut und die Organfunktion stabilisiert bzw. verbessert werden. Die europäische Zulassung basiert auf den Ergebnissen zweier klinischer Phase-III-Studien bei unbehandelten Patienten (*FACETS*-Studie) und Patienten, die zuvor eine ERT erhalten hatten und nun auf Migalastat umgestellt wurden (*ATTRACT*-Studie) sowie noch laufenden Langzeitstudien. Migalastat konnte in diesen Studien die Nierenfunktion bis zu 18 Monate bei ERT-erfahrenen und bis zu 30 Monate bei ERT-naiven Patienten stabilisieren sowie die Herzfunktion nach 18-monatiger Therapie bei ERT-erfahrenen bzw. nach 30-monatiger Behandlung bei ERT-naiven Patienten verbessern. Mit Hilfe eines eigens entwickelten *in vitro*-Tests (*Galafold Amenability Assay*) wurden über 800 Mutationen als „sensitiv“ oder „nicht sensitiv“ für Migalastat klassifiziert. Die aktuelle Zulassung umfasst alle 269 Migalastat-sensitiven α GalA-Mutationen, die insgesamt 35-50% der derzeit diagnostizierten Mutationen umfassen (Benjamin et al. 2016; Germain et al. 2016; Hughes et al. 2016).

Weitere Säulen der Therapie stellen die kardiologische, nephrologische und neurologische Zusatztherapie dar (DGN-Leitlinien 2013). Zur Behandlung Fabry-assoziiierter Schmerzen ist die Studienlage beschränkt (Üçeyler et al. 2012). Als Mittel der ersten Wahl wird Carbamazepin, ggf. in Kombination mit Pregabalin empfohlen. Zweite Wahl sind Duloxetine oder Venlafaxin (Burlina et al. 2011). Schmerzkrisen können z.B. mit Phenytoin, in schweren Fällen mit Opioiden behandelt werden (Üçeyler et al. 2012). Häufig ist die Schmerztherapie jedoch unzureichend, was an dem

noch fehlenden Verständnis des Pathomechanismus des Fabry-assoziierten Schmerzes liegt.

1.2. Die Beeinflussung der Nozizeption bei M. Fabry

Schmerz ist eine der wichtigsten Wahrnehmungen unseres Körpers. Laut International Association for the Study of Pain (*IASP*) ist Schmerz „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“. Schmerz kann dabei in zwei große Kategorien - akut und chronisch - unterteilt werden. Zur Gruppe der chronischen Schmerzen gehören sowohl die neuropathischen als auch die nozizeptiven Schmerzen. Dabei resultiert der nozizeptive Schmerz aus schädlicher mechanischer, thermischer oder chemischer Stimulierung peripherer sensibler Nerven, sog. Nozizeptoren (Lee et al. 2005). Hierzu gehören u.a. postoperative Schmerzen, Gewebeverletzungen und Ischämieschmerzen. Im Gegensatz zum nozizeptiven Schmerz, bei dem neuronale Strukturen prinzipiell in Takt sind, entstehen neuropathische Schmerzen als direkte Folge einer Schädigung des zentralen und bzw. oder peripheren Nervensystems und resultieren in einer gestörten Schmerzverarbeitung. Typische Beispiele für neuropathische Schmerzen sind die Trigeminalneuralgie, Schmerzen bei Polyneuropathien oder zentrale Schmerzsyndrome.

Die ersten Symptome des M. Fabry, meist rückblickend durch die Patienten beschrieben, sind, wie unter 1.1.3.2 genannt, akrale neuropathische Schmerzen in der Kindheit (Üçeyler et al. 2014).

Die Fabry-assoziierten Schmerzen, die im Verlauf der Erkrankung in den in **Tabelle 1** genannten Formen auftreten können, sind auslösbar sowie brennend und deuten auf eine neuropathische Genese hin (Toyooka 2011; Üçeyler et al. 2012). Tatsächlich findet sich in Untersuchungen von Hautbiopsien betroffener Patienten eine Verminderung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) sowie eine erhöhte Kälteerkennungsschwelle in der QST (Maag et al. 2008; Üçeyler et al. 2011; Üçeyler et

al. 2012). Hierbei müssen jedoch verschiedene Qualitäten von Nervenfasern unterschieden werden (**Tabelle 4**).

Tabelle 4 Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser

| Faser-gruppe | Unter-Gruppe | Faser-durchmesser | Leitungs-geschwindigkeit | Funktion |
|--------------|--------------|---------------------------|--------------------------|---|
| A | α | 3 - 20 μm | 80 – 120 m/s | Motorische Impulse, afferente Impulse von Muskelspindeln und Sehnenorganen |
| | β | 3 - 20 μm | 60 m/s | Berührungsimpulse der Haut |
| | γ | 3 - 20 μm | 40 m/s | Efferente Impulse zu den kortikalen Abschnitten der infrafusalen Muskelfasern |
| | δ | 3 - 20 μm | 20 m/s | Impulse von Mechanorezeptoren, Kalt-, Warm- und Schmerzrezeptoren der Haut (rasche Schmerzfasern) |
| B | | 1 – 3 μm | 10 m/s | Präganglionäre vegetative Fasern |
| C | | 1 μm (marklos) | 1 m/s | Postganglionäre vegetative Fasern und afferente Fasern des Grenzstrangs, Impulse von Mechano-, Kalt- und Warmrezeptoren, langsame Schmerzfasern |

Die Afferenzen eines Nozizeptors können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es unmyelinisierte Fasern, sog C-Fasern (Leitungsgeschwindigkeit <2,5 m/s), die einen Großteil der Afferenzen ausmachen und v.a. bei polymodalen Nozizeptoren vorkommen. Sie adaptieren langsam und dienen der Wahrnehmung länger dauernder Schmerzen. Daneben gibt es myelinisierte Fasern, z.B. A δ -Fasern (Leitungsgeschwindigkeit 5-30 m/s), die v.a. bei mechanischen Nozizeptoren vorkommen und für die Auslösung von Schutzreflexen und dem sog. „ersten Schmerz“ verantwortlich sind (**Tabelle 4**). Färbungen von zur Diagnostik gewonnenen Hautbiopsien erfolgen jedoch mit einem Antikörper gegen den panaxonalen Marker protein gene product 9.5 (PGP9.5), der mit allen Axonen ohne Unterscheidung der

Nervenfasersubgruppen reagiert. Daher können mit dieser Färbung die Eigenschaften der verbliebenen Nervenfasern nicht beschrieben werden. So ist es möglich, dass die restlichen Nervenfasern hyperreagible und hochsensitive Fasern oder beeinflussbarer durch pro-inflammatorische und algetische Zytokine der Umgebung sind (Üçeyler 2016). Aufgrund der ebenfalls auftretenden Defizite in der Temperaturwahrnehmung, wird auch angenommen, dass Fabry-assoziierte Schmerzen durch Fehlfunktionen hitzeleitender C-Fasern oder durch ein Ungleichgewicht der Signalintegration aufgrund des Ausfalls kälteleitender A δ -Nervenfasern hervorgerufen wird (Üçeyler et al. 2011). Jedoch gibt es auch Hinweise, dass die ursächliche Pathologie der Schmerzen bei M. Fabry weiter proximal in der Schmerzleitungsbahn wie etwa in den Spinalganglien zu finden ist (Kahn 1973; Gadoth et al. 1983; Kaye et al. 1988; Üçeyler et al. 2012). Es wird vermutet, dass Gb3-Ablagerungen in Spinalganglienneuronen und im Rückenmark eine Minderperfusion peripherer Nerven und damit Fabry-assoziierte Schmerzen auslösen (Gadoth et al. 1983; Kaye et al. 1988; Schiffmann 2009; Üçeyler et al. 2012). Aufgrund der Gb3-Ablagerungen könnte es in den Neuronen der Spinalganglien zu pathologischen Veränderungen der Leitung nozizeptiver Signale kommen.

1.2.1. Anatomische Grundlagen der Nozizeption

Nozizeptoren, deren Perikarya sich in den Spinalganglien befinden, sind kleine, primär afferente, spezialisierte Neurone, die intensive Stimuli wahrnehmen und die erste Abwehr gegen potenziell schädliche Umwelteinflüsse darstellen (Woolf et al. 2007). Sie bestehen aus freien Nervenendigungen pseudounipolarer Neurone, die durch überschwellige chemische, thermische und mechanische Reize erregt werden und synaptisch das zentralnervöse nozizeptive System (Neurone des Rückenmarks, Trigeminuskern, thalamokortikalen Systems) aktivieren. Dabei findet in den Endigungen zunächst eine Transduktion noxischer Reize in elektrische Potentiale statt. Hierdurch wird die Erregbarkeit der Nozizeptoren durch unterschiedliche Ionenkanäle kontrolliert (Lee et al. 2005). Die meisten Nozizeptoren sind polymodal, d.h. sie sind durch thermische, chemische und mechanische Reize erregbar. Wird ein Nozizeptor stimuliert, kommt es zur Freisetzung von Neuropeptiden, u.a. Substanz P (SP),

Calcitonin gene related Peptide (CGRP) oder Neurokinin A aus Vesikeln, die im rezeptiven Feld eines Nozizeptors zu lokalen Änderungen der Perfusion und Gefäßpermeabilität führen. Im Extremfall kann hieraus eine sog. neurogene Entzündung resultieren. Die Afferenzen mehrerer Nozizeptoren (**Tabelle 4**) gelangen schließlich gemeinsam über das Spinalganglion und die Hinterwurzel zum Hinterhorn des Rückenmarks. Hier erfolgt die Umschaltung der C- und A δ -Fasern auf das zweite nozizeptive Neuron (C-Fasern: oberflächlich Rexed-Lamina I und II, Hals Rexed-Lamina I, IV-VI; A δ -Fasern: Rexed-Lamina I). Die Axone dieser Neurone kreuzen im selben oder nächst höheren Rückenmarkssegment auf die Gegenseite und steigen in der kontralateralen Vorderseitenstrangbahn zum Thalamus auf. Sie aktivieren schließlich das thalamokortikale System, was zur bewussten Schmerzwahrnehmung führt (Woolf et al. 2007; Lüllmann-Rauch 2009; Schmidh 2011; Aumüller 2014; Talbot et al. 2016).

1.2.1.1. ***Das Spinalganglion – Schaltstelle der Nozizeption***

Die in den Foramina intervertebralia befindlichen Spinalganglien enthalten die Perikarya primär afferenter, pseudounipolarer Neurone. Das Spinalganglion selbst ist von einer Bindegewebshülle und jedes Perikaryon von einer Hülle aus glialen Satellitenzellen umgeben, die ihrerseits von einer Basallamina umgeben werden (Lüllmann-Rauch 2009). Die darin enthaltenen Neurone können anhand ihrer Größe, ihrer physiologischen Eigenschaften, ihrem neurochemischen Phänotyp sowie ihren zentralen und peripheren Projektionen unterschieden werden (Snider et al. 1998; Chen et al. 2006). Anhand der Zellgröße können große Neurone (Proprio- und Mechanorezeptoren) und kleine Neurone mit dünn myelinisierten A δ - und unmyelinisierten C-Fasern unterschieden werden, die v.a. für die Nozizeption verantwortlich sind (Lüllmann-Rauch 2009). Diese kleinen Neurone können anhand ihrer Immunoreaktivität gegenüber Isolectin B4 (IB4), ihrer Rezeptorausstattung und ihres Neuropeptidgehalts weiter unterteilt werden. IB4-negative Neurone beinhalten Neuropeptide wie CGRP und SP und werden daher als peptiderg bezeichnet; sie exprimieren *Tropomyosin Rezeptor Kinase A* (trkA), einen Rezeptor für den Nerve Growth Factor (NGF). Im Gegensatz dazu exprimieren IB4-positive, nicht-peptiderge Neurone Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-sensitive *Ret*-Rezeptoren

(Silverman et al. 1990; Bennett et al. 1996; Molliver et al. 1997; Bennett, D. L. et al. 2000; Breese et al. 2005; Chen et al. 2006; Leclere et al. 2007). Die meisten Nozizeptoren sind IB4-positive nicht peptiderge Neurone (Plenderleith et al. 1993; Molliver et al. 1997). Die Unterschiede in Rezeptorausstattung und Affinität gegenüber neurotrophen Faktoren führen zu unterschiedlichem Ansprechen der Nozizeptoren auf veränderte Umweltbedingungen wie Entzündung oder Axonschädigung, die unterschiedliche Ausschüttungen neurotropher Faktoren bedingen (Stucky et al. 1999; Bennett 2001; Woolf et al. 2007). Neben der Differenzierung anhand ihrer IB4-Bindung, können Nozizeptoren durch ihr Rezeptormuster subklassifiziert werden (s. 1.2.2). Wie jede eukaryotische Zelle, besitzen Spinalganglien neben den o.g. Zellen ein Zytoskelett, bestehend aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (DePianto et al. 2004; Lüllmann-Rauch 2009). Die aus Proteinen bestehenden Intermediärfilamente werden in Neuronen als Neurofilamente (NF) bezeichnet. NF können anhand eines *SDS-PAGE* (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), einer Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen nach ihrer Molekülgröße, in leichte (68-70 kDa), mittlere (145-160 kDa) und schwere (200-220 kDa; NF200) Filamente unterteilt werden (Yuan et al. 2006). Die Intermediärfilamente dienen der Stabilisierung der strukturellen Integrität einer Zelle. So sind sie für die Reparatur geschädigten Gewebes, der Aufrechterhaltung der zellulären Struktur inklusive ihrer Ausläufer und für den Transport von Organellen und Proteinen innerhalb der Ausläufer verantwortlich (DePianto et al. 2004; Lüllmann-Rauch 2009). Weiter dienen NF der Bindung und somit der Regulation von Effektorproteinen, wie z.B. Rezeptoren (DePianto et al. 2004). Daneben kann die Immunoreaktivität von NF200 histologisch zur Identifizierung A-Faser exprimierender Neurone und damit zur Abgrenzung gegenüber bspw. C-Fasern genutzt werden; somit dient NF200 als Marker für myelinisierte Afferenzen bspw. A δ -Fasern (Ma 2002).

1.2.1.2. Die Beeinflussung des Spinalganglions durch M. Fabry

Aufgrund des Nachweises zentralnervöser Ablagerungen wurde eine mögliche Beteiligung der Spinalganglien bei M. Fabry früh diskutiert. Bereits 1951 berichteten Scriba et al. von Ablagerungen in Spinalganglien betroffener Patienten (Scriba 1950;

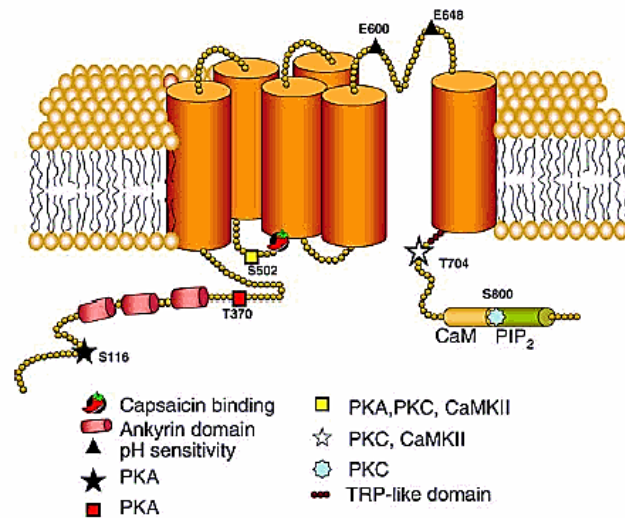
Miyatake et al. 1972). Es folgten zahlreiche weitere Fallberichte zu verstorbenen Fabry-Patienten, in deren Spinalganglien Ablagerungen gefunden werden konnten (Steward et al. 1968; Kahn 1973; Tabira et al. 1974; Gadoth et al. 1983; Kaye et al. 1988). In Autopsien betroffener Patienten wurden neben Gb3-Ablagerungen von einigen Autoren weitere Pathologien der Spinalganglienneurone beschrieben. So berichtete u.a. Kahn et al. 1973 von einer Zelldegeneration in Spinalganglien dreier verstorbener Fabry-Patienten (Kahn 1973). Gadoth et al. entdeckte 1982 in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Spinalganglien eines verstorbenen Fabry-Patienten neben „eosinophiler Granula“ eine deutliche Vergrößerung der Spinalganglienneurone (Gadoth et al. 1983). Auch Purpura et al. beschrieben 1976 Auswirkungen lysosomaler Speicherkrankheiten auf die neuronale und v.a. axonale Entwicklung. Sie schlussfolgerten daraus, dass neuronale Ablagerungen bei lysosomalen Speicherkrankheiten als Stimulus zur Ausbildung sog. Meganeurite betrachtet werden können (Purpura et al. 1976). Aufgrund ihrer Befunde vermuteten viele Autoren schon damals Auswirkungen des M. Fabry auf die Spinalganglien und sahen einen Zusammenhang zwischen einer möglichen neuronalen Beeinflussung und der Entstehung von Schmerzen (Kahn 1973; Gadoth et al. 1983).

1.2.2. *Mediatoren der Schmerzleitung*

Sensible Neurone übertragen durch verschiedene Ionenkanäle und Rezeptoren physische Stimuli in elektrische Potenziale (Talbot et al. 2016). Diese elektrischen Potenziale werden, wie unter 1.2.1 ausgeführt, an das thalamokortikale System weitergeleitet. Nachfolgend wird auf die, für die Schmerzwahrnehmung und für die vorgelegte Promotionsarbeit wichtigen Ionenkanäle und Rezeptoren eingegangen.

1.2.2.1. TRPV1-Kanäle

TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential Channels) sind eine Familie selektiver Ionenkanäle, die als polymodale Sensoren für verschiedene externe Stimuli dienen. Sie können in sieben Unterfamilien unterteilt werden, denen eine Grundstruktur aus sechs Transmembrandomänen



gemeinsam ist (Abb. 1; (Montell 2005; Venkatachalam et al. 2007; Satheesh et al. 2016)). Zu ihnen

Abb. 1 Modelldarstellung TRPV1 aus (Planells-Cases et al. 2005). *Legende: PKA = Proteinkinase A, PKC = Proteinkinase C, CaMKII = Ca²⁺ Calmodulin-abhängige Kinase II (License Number: 3878161326609)*

gehören auch die Transient Receptor Potential Channels, die sensitiv gegenüber Vanilloid sind (TRPV) und deren sechs Subtypen (TRPV1-6), die u.a. in definierten Temperaturbereichen aktiviert werden (Wang et al. 2005). Hierunter wird insbesondere TRPV1 eine große Rolle bei neuropathischem, entzündlichem und chronischem Schmerz zugeteilt. Dieser Ionenkanal ist ein polymodaler, unselektiver Kationenkanal, der v.a. für Ca²⁺-, aber auch Na⁺- und K⁺-Ionen permeabel ist und u.a. in kleinen und mittleren, meist C-Faser-exprimierenden Nozizeptoren von Spinalganglien vorkommt (Breese et al. 2005; Lee et al. 2005; Levine et al. 2007; Moriya et al. 2015). Er kann jedoch auch in Neuronen nachgewiesen werden, die ein Neurofilament (NF) exprimieren; einen Marker für Neurone mit myelinisierten A δ -Fasern (Ma 2002). TRPV1 kann durch zahlreiche Stimuli wie Hitze ($\geq 43^{\circ}\text{C}$), Azidose (pH <5,9), Capsaicin, mechanische Reize, Protonen, aber auch durch Entzündungsmediatoren (z.B. extrazelluläres ATP, NGF, SP, CGRP, Bradykinin) aktiviert werden (Caterina et al. 1997; Sidi et al. 2003; Tominaga et al. 2005; Wang et al. 2005; Levine et al. 2007). Seine Aktivierung ist sowohl komplex als auch durch zahlreiche zelluläre Wege reguliert und resultiert in einem Ca²⁺-(bzw. Na⁺-) Einstrom, der zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt und Einfluss auf Nozizeption und andere zelluläre Prozesse,

wie bspw. Exozytose hat (Caterina et al. 1997; Liapi et al. 2005). Weiterhin kann TRPV1 durch eine Calcium-abhängige Dephosphorylierung desensibilisiert werden (Caterina et al. 1997; Jung et al. 2004).

Caterina et al. entwickelten 2000 eine TRPV1-knockout-Maus, die bei Entzündung keine Hyperalgesie gegenüber Hitze zeigte, was auf eine wichtige Rolle von TRPV1 in der Hypersensibilität gegenüber Hitze hindeutet (Caterina et al. 2000; Breese et al. 2005). Seit der Entwicklung dieser Knockout-Maus und der Klonierung von TRPV1 durch Caterina et al. konnten weitere zahlreiche Studien die Bedeutung von TRPV1 für die Pathophysiologie des Schmerzes belegen (Caterina et al. 1997; Planells-Cases et al. 2005; Wang et al. 2005; Satheesh et al. 2016). So konnte bspw. in einer Studie nachgewiesen werden, dass die Anzahl TRPV1-positiver Neurone in Spinalganglien, bei gleichbleibender Gen-Expression nach einer peripheren Entzündung deutlich anstieg (Ji et al. 2002). Daneben konnten Garcia-Martinez et al. in einer weiteren Studie eine Abschwächung der entzündungsbedingten Hyperalgesie gegenüber Hitze nachweisen (Garcia-Martinez et al. 2002). Aufgrund der aktuellen Studienlage und der Aktivierung von TRPV1-Kanälen durch Hitze, wird angenommen, dass diese Kanäle ebenfalls an der Initiierung brennender, neuropathischer Schmerzen bei M. Fabry involviert sein könnten.

1.2.2.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_v -Kanäle) sind, aufgrund ihres depolarisierenden Na^+ -Einstroms für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen u.a. innerhalb des Nervensystems verantwortlich (Waxman et al. 1999; Lee et al. 2005; Benarroch 2007). Na_v -Kanäle sind heteromere Komplexe, die aus einer α -Untereinheit, bestehend aus je vier homologen Domänen mit je sechs Transmembransegmenten sowie einer oder mehrerer β -Untereinheiten aufgebaut sind (Bagal et al. 2015; de Lera Ruiz et al. 2015). Bis heute sind neun Untergruppen der Na_v -Kanäle ($\text{Na}_v1.1$ – 1.9) identifiziert, die durch die Gene SCN1A-5A und SCN8A-11A codiert werden (Brouwer et al. 2014). Diese können anhand ihrer Sensitivität gegenüber Tetrodotoxin (TTX) in TTX-sensitiv ($\text{Na}_v1.1$ - 1.4 , $\text{Na}_v1.6$, 1.7) und TTX-resistent ($\text{Na}_v1.5$, 1.8 , 1.9) unterteilt werden (Rush et al. 1998; Dib-Hajj et al. 2010; de Lera Ruiz et al.

2015). Dabei zeigen Na_v-Kanäle eine gewebspezifische Verteilung; so kommen drei Isoformen (Na_v1.7, 1.8 und 1.9) überwiegend im peripheren Nervensystem und hier v.a. in kleinen, nozizeptiven Neuronen vor (Fang et al. 2002; Catterall et al. 2005; Lee et al. 2005; Dib-Hajj et al. 2010; de Lera Ruiz et al. 2015). Da spannungsgesteuerte Na_v-Kanäle die neuronale Erregbarkeit regulieren, wird angenommen, dass eine Veränderung ihrer Expression oder Funktion eine Änderung neuronaler Aktivitätsmuster bewirkt. Die Übererregbarkeit wird mit verschiedenen Formen von Schmerz, u.a. neuropathischem Schmerz in Zusammenhang gebracht (Waxman et al. 1999; Lai et al. 2003; Brouwer et al. 2014). Weiterhin konnte anhand von Mutationen in Na_v1.7- und Na_v1.8-Kanälen ihre Rolle für die Schmerzwahrnehmung belegt werden. So verursacht eine „gain-of-function“-Mutation im SCN9A-Gen (Na_v1.7) die hereditäre Erythromelalgie und die „Paroxysmal Extreme Pain Disorder“ (PEPD); zwei schwere Schmerzsyndrome (**Tabelle 5**). Die Erythromelalgie, eine Differentialdiagnose des M. Fabry, führt u.a. zu brennenden Schmerzen und Rötung der Extremitäten, getriggert durch Wärme und Anstrengung (Yang et al. 2004; Fertleman et al. 2006; Brouwer et al. 2014). Pathogene Mutationen konnten auch bei Patienten mit idiopathischer SFN nachgewiesen werden (Faber et al. 2012). Im Gegensatz dazu verursacht eine sog. loss-of-function Na_v1.7-Mutation eine kongenitale Schmerzinsensitivität (Cox et al. 2006; Goldberg et al. 2007).

Na_v1.8-exprimierende Neurone sind für die Wahrnehmung von mechanischem und entzündlichem Schmerz sowie Kälteschmerz essentiell (Brouwer et al. 2014). Hier können „gain-of-function“ Mutationen ebenfalls zur idiopathischen SFN führen (**Tabelle 5**). Einige dieser Mutationen erhöhten die Antwort der Na_v1.8-Kanäle auf Depolarisation und produzierten eine Übererregbarkeit der Spinalganglienneurone mit erhöhter Feuerfrequenz und Spontanaktivität (Faber et al. 2012; Brouwer et al. 2014). In einer anderen Studie entwickelten Na_v1.8-knockout-Mäuse eine moderate Hypoalgesie gegenüber schädlichen thermischen und mechanischen Stimuli (Lai et al. 2003).

Durch die Ähnlichkeit der durch Na_v1.7- bzw. Na_v1.8-Mutationen ausgelösten Schmerzsyndrome mit Fabry-ähnlichen Schmerzsymptomen und die bisherigen

Hinweise aus vorausgegangenen Studien, wird vermutet, dass diese Kanäle eine wichtige Rolle bei M. Fabry einnehmen könnten.

Table 5 Lokalisation und Schmerzkrankungen ausgewählter Na_v-Kanäle im peripheren Nervensystem nach (Brouwer et al. 2014)

| Kanal | Gen | Lokalisation | Assoziierte Schmerzkrankungen |
|--------------------------|--------|---|---|
| Na_v1.7 | SCN9A | Spinalganglienneurone, sympathische Neurone | Vererbte Erythromelalgie (Yang et al. 2004), PEPD (Fertleman et al. 2006), kongenitale Schmerzinsensitivität (Cox et al. 2006), SFN (Faber et al. 2012) |
| Na_v1.8 | SCN10A | Spinalganglienneurone | SFN (Faber et al. 2012) |
| Na_v1.9 | SCN11A | Spinalganglienneurone | Verlust der Schmerzempfindung (Leipold et al. 2013), familiäre episodische Schmerzen (Zhang et al. 2013) |

1.2.2.3. *Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP)*

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zur Beleuchtung der Rolle von CGRP in der Schmerzentstehung und -weiterleitung durchgeführt. CGRP ist ein Neuropeptid (s. 1.2.1), das aus zwei Peptiden (CGRP α und CGRP β) besteht, die durch unterschiedliche Gene (*Calca*, *Cac1b*) codiert werden (Emeson et al. 1989). Es ist einer der potentesten peripheren Vasodilatoren des Körpers und kommt neben nicht-neuronalem Gewebe u.a. in Spinalganglienneuronen vor (Russell et al. 2014). Diese zumeist kleinen bis mittleren Neurone besitzen neben myelinisierten A δ -Fasern hauptsächlich unmyelinisierte C-Fasern (Yu et al. 2009). Ca. 50% dieser CGRP-positiven Neurone weisen eine Kollokalisation mit TRPV1 auf (McCoy et al. 2012). Die Aktivierung dieser Neurone und die Sekretion von CGRP kann durch chemische und thermische Stimuli, wie Entzündungen (s. neurogene Entzündung 1.2.1), aber auch durch Capsaicin und andere TRPV1-Agonisten und durch intensive mechanische Stimuli ausgelöst werden (Tsukagoshi et al. 2006; Gold et al. 2010). Diese Hinweise aus in den letzten Jahren durchgeführten Studien weisen darauf hin, dass CGRP und seine Rezeptoren an der Weiterleitung und Modulation schmerzassoziierter Informationen im peripheren und zentralen Nervensystem beteiligt sind. So konnten Zhang et al. 2001 nachweisen, dass CGRP-knockout-Mäuse bei akuter Inflammation, induziert durch eine Kaolin/Carageen-

Injektion in die Hinterpfote, einen Verlust der Schmerzantwort auf Hitze zeigen (Zhang et al. 2001). In anderen Studien inhibierte die Gabe eines CGRP-Antagonisten eine durch Capsaicin-induzierte Hyperalgesie bei Ratten und bewirkte eine Reduzierung von Schmerzen in verschiedenen neuropathischen Schmerzmodellen (Yu et al. 1994; Yu et al. 1996; Bennett, A. D. et al. 2000; Massaad et al. 2004). Da jedoch die alleinige Injektion von CGRP in die Hinterpfote von Ratten keine Hyperalgesie auslöst, wird vermutet, dass die Rolle von CGRP bei Schmerzen erst während pathologischer Schmerzkonditionen, wie sie bspw. bei entzündlichem oder neuropathischem Schmerz vorkommen, zum Tragen kommt (Saxen et al. 1993; Russell et al. 2014). So konnte in elektrophysiologischen Studien die Bedeutung von CGRP bei der Übererregbarkeit spinaler Neurone während Gelenkentzündungen nachgewiesen werden (Neugebauer et al. 1996). Trotz dieser Studienergebnisse und der Entdeckung seines Einflusses bei der Pathophysiologie der Migräne, bleibt die Rolle von CGRP in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerzen bisher noch weitestgehend ungeklärt.

1.3. Globotriaosylceramid 3 (Gb3)

1.3.1. *Definition und Physiologie von Glykosphingolipiden*

Die Akkumulation von Glykosphingolipiden (GSL), insbesondere Gb3 (früher Ceramidtrihexosid (CTH); CD77 als Rezeptor) in verschiedenen Organen führt bei M. Fabry zu einer Multiorganerkrankung. GSL sind, neben Cholesterol und Glycerophospholipiden, ubiquitär vorkommende Komponenten der Zellmembran aller eukaryotischer Zellen (Butters et al. 2000). Sie bestehen aus mindestens einem Monosaccharid (Glukose oder Galaktose), das mit einem hydrophilen Ceramidkern verbunden ist. Dabei verankert der Ceramid-Kern das GSL in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, während sich der Kohlenhydratanteil an der Zelloberfläche befindet. Das Vorkommen von GSL auf der Außenseite der Zellmembran schützt diese vor chemischer oder mechanischer Zerstörung. Daneben sind sie an zellspezifischen Adhäsionsprozessen sowie dem Wachstum und der Differenzierung von Zellen beteiligt. Die große Bedeutung der GSL für Zelldifferenzierung und -entwicklung, zeigt

sich anhand einer Knockout-Maus, der das erste Enzym der GSL-Synthese (Ceramid-Glukosyltransferase) fehlt; sie verstirbt bereits *in utero* (Butters et al. 2000; Jeyakumar et al. 2002).

Die Synthese der GSL erfolgt im Zytosol, endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat durch sequentielles Hinzufügen von Monosacchariden zum Ceramid-Kern. Ihr Abbau beginnt ebenfalls im Golgi-Apparat und endet in den Lysosomen, wo spezifische Glykohydrolasen ein optimales pH-Niveau vorfinden (Butters et al. 2000; Jeyakumar et al. 2002). Neben M. Fabry existieren weitere Lipidspeicherkrankheiten (LSD), die aus einem fehlerhaften Abbau von GSL resultieren (**Abb. 2**, Butters et al. 2000). Ein besseres Verständnis der genauen Pathologie dieser Erkrankungen, könnte zur weiteren Verbesserung von Therapiestrategien führen.

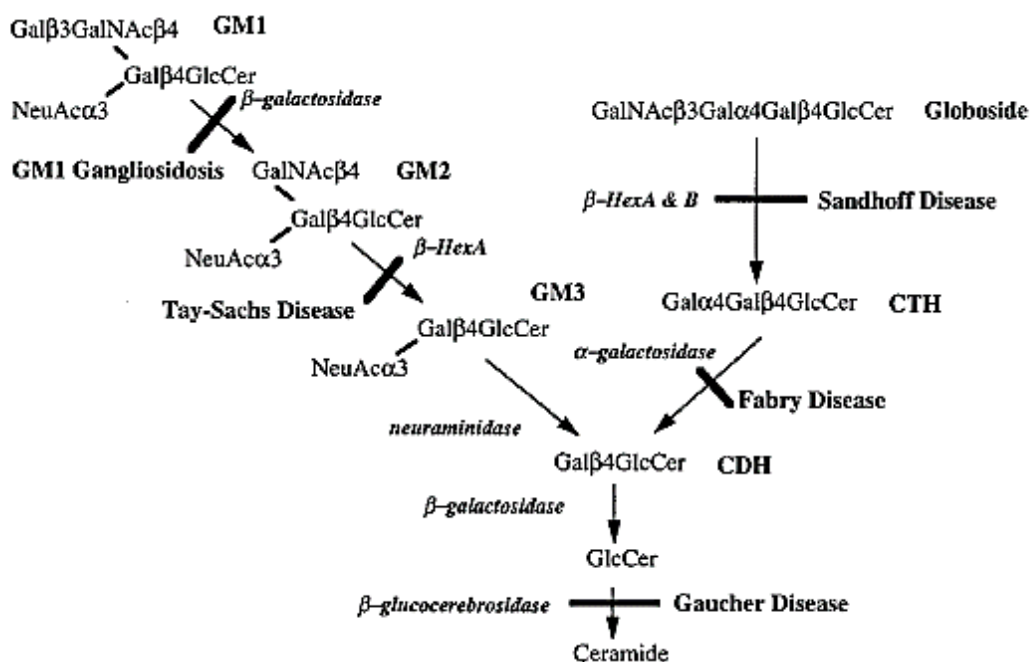


Abb. 2 Katabolismus der Glycosphingolipide und lysosomale Speicherkrankheiten. Modifiziert nach (Butters et al. 2000). CDH = Ceramide-dihexosid, CTH = Ceramide-trihexosid (Gb3).

1.3.2. Gb3-Akkumulation und seine Auswirkungen bei M. Fabry

Die Akkumulation von Gb3 bei M. Fabry ist lange bekannt; dennoch wird angenommen, dass Gb3 nicht allein für alle Manifestationen der Erkrankungen verantwortlich gemacht werden kann. Daher werden Gb3 und andere verwandte Moleküle eher als Mediatoren pathologischer Prozesse angesehen (Germain 2010; De

Francesco et al. 2013). So gibt es verschiedene Theorien, wie Gb3 zu den beobachteten Pathologien führt. Zum einen wird angenommen, dass Gb3 oder seine Metabolite direkt zelltoxisch sind, zum Anderen, dass Gb3-Ablagerungen zu pathologischen Zellprozessen oder -morphologien führen, die eine Zellapoptose induzieren. Eine Studie beschreibt bspw. einen veränderten Transport von GSL und Cholesterol in betroffenen Zellen. Cholesterol und GSL dienen u.a. als Mikrodomänen für oberflächliche Rezeptoren, wie GPI-verankerte Proteine und es wird vermutet, dass diese essentiellen Signalfunktionen durch Gb3-Ablagerungen gestört werden und zum Tod der betroffenen Zelle führen (Jeyakumar et al. 2002). 2008 konnte die Theorie, dass Gb3 ein Mediator pathologischer Prozesse ist durch Shen et al. weiter untermauert werden. Er konnte zeigen, dass Gb3 oxidativen Stress induziert und zu einer erhöhten Expression von Adhärenzmolekülen (IAM-1, VCAM-1, E-Selectin) in kultiviertem Gefäßendothel führt (Shen et al. 2008; Schiffmann 2009; De Francesco et al. 2013). Weitere Studien stützen diese Ergebnisse und untermauern die Vermutung, dass Gb3 bei M. Fabry einen pro-inflammatorischen Phänotyp induziert (Namdar et al. 2012; De Francesco et al. 2013). Ein weiterer Gegenstand aktueller Forschung ist die Beeinflussung des Immunsystems bei Fabry-Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass betroffene Patienten eine erhöhte Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α und IL-6 aufwiesen. Dies könnte auf einen autoimmunen Mechanismus der Erkrankung hinweisen, bei dem Gb3-Ablagerungen als Gefahr und Stresssignal interpretiert werden. Die genauen Mechanismen, wie Gb3-Ablagerungen zu erhöhter Zytokin-Expression führen sind noch unbekannt (De Francesco et al. 2013; Mauhin et al. 2015).

1.4. Maus-Modelle des M. Fabry

Die ersten Untersuchungen zur Pathogenese des M. Fabry erfolgten in Fallberichten anhand von Gewebe verstorbener Patienten. Um eine intensivere Erforschung der Auswirkungen von Gb3-Ablagerungen im Körper *in vivo* zu ermöglichen und die zugrundeliegenden Pathomechanismen dieser Erkrankung zu verstehen, wurden verschiedene Maus-Modelle entwickelt.

1.4.1. *α Galaktosidase A-knockout-Maus*

Die erste α GalA-knockout-Maus (Fabry-ko-Maus) wurde 1997 durch Ohshima et al. entwickelt (Ohshima et al. 1997). Die Autoren hatten zwischen dem menschlichen und murinen α GalA-Gen eine hohe Übereinstimmung in Größe, Genorganisation und Nukleotidsequenz der codierenden Region entdeckt (Ohshima et al. 1995). So konnten sie durch Genausschaltung in embryonalen Zellen und Übertragung in C57Bl/6-Mäuse ein Maus-Modell des M. Fabry generieren. Anschließend erfolgte die Bestätigung der vollständig fehlenden α GalA-Aktivität durch Enzymmessungen in unterschiedlichem Gewebe und kultivierten Fibroblasten (Ohshima et al. 1997). Weiterhin konnten Gb3-Akkumulationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben u.a. Plasma, Niere, Herz und Leber nachgewiesen werden (Ohshima et al. 1999; Aerts et al. 2008; Valbuena et al. 2011; Bangari et al. 2015). Es folgten Studien, in denen anhand der Fabry-ko-Maus u.a. die Effektivität und Sicherheit verschiedener Therapieverfahren, wie der ERT, der Substratreduktion, der Methotrexat-Therapie oder der Genterapien gezeigt werden konnte (Ziegler et al. 1999; Ioannou et al. 2001; Garman, R. D. et al. 2004; Murray et al. 2007; Choi et al. 2010; Marshall et al. 2010). Weiterhin konnten mit Hilfe der Fabry-ko-Maus Biomarker, wie bspw. Lyso-Gb3 überprüft und etabliert werden (Durant et al. 2011). Jedoch ist eines der wichtigsten Ziele des Mausmodells die Bestätigung von Theorien zur Pathogenese des M. Fabry. (Eitzman et al. 2003; Heare et al. 2007; Nelson et al. 2014).

Die ersten Untersuchungen hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit dem humanen Phänotyp erfolgten durch Ohshima et al., die bei 10 Wochen alten Mäusen jedoch keine klinischen Auffälligkeiten feststellen konnten. Diese Ergebnisse beruhten jedoch lediglich auf ophthalmologischen sowie Blut- und Urinuntersuchungen (Ohshima et al. 1997). Eine ausführlichere Studie zur Analyse des Schmerz-assoziierten Verhaltens der Fabry-ko-Maus sind die Untersuchungen von Rodrigues et al. an 24 und 48 Wochen alten Fabry-ko- und Kontroll-Mäusen (Rodrigues et al. 2009). Rodrigues und ihre Kollegen führten neben einem Hotplate-Test das sog. *SHIRPA* (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*)-Protokoll durch; eine standardisierte Reihe von Experimenten (u.a. Untersuchung von Reflexen,

motorischer Aktivität, sensorischer Funktionen) zur phänotypischen Charakterisierung genetisch veränderter Mäuse (Rogers et al. 1997). Rodrigues et al. führten die Untersuchungen an acht Mäusen pro Gruppe durch und konnten in Fabry-ko-Mäusen neben einer thermischen Hyposensitivität im Hotplate-Test u.a. eine verminderte Spontanaktivität, verminderte Vokalisierung und gesteigerte Reflexe nachweisen (Rodrigues et al. 2009). Eine thermische Hyposensitivität im Hotplate-Test konnte ebenfalls durch Bangari et al. in 3-17 Monate alten Fabry-ko-Mäusen und durch Marshall et al. in fünf Wochen bis drei Monate alten Fabry-ko-Mäusen gegenüber Kontrollmäusen bestätigt werden (Marshall et al. 2010; Bangari et al. 2015). 2014 erweiterte Lakoma et al. diese Untersuchungen durch schmerzassoziierte Verhaltenstestungen. Sie führten neben dem Hotplate-Test einen von Frey-Filament-Test und drei verschiedene Kälte-Untersuchungen mittels Azeton, Trockeneis und einer Kälteplatte zur Detektion der mechanischen und Kälte-assoziierten Reizschwelle durch. Aufgrund der stärkeren Beeinträchtigung von Männern mit M. Fabry, erfolgten die Untersuchungen ausschließlich an 8-12 Wochen alten männlichen Fabry-ko- und Kontroll-Mäusen. Es zeigte sich eine Hypersensitivität gegenüber mechanischen Stimuli und Hitze. Daneben präsentierten Fabry-ko-Mäuse in allen drei Untersuchungen eine Hyposensitivität gegenüber Kälte-Stimuli (Lakoma et al. 2014). Alle bisherigen Studien zu Schmerz-assoziiertem Verhalten der Fabry-ko-Maus erfolgten jedoch jeweils im Vergleich zu Nicht-Wurfgeschwistern, meist ohne Unterscheidung des Geschlechts und zumeist anhand junger Mäuse. Histologisch konnten neben Gb3-Ablagerungen im ZNS Ablagerungen in Spinalganglienneuronen von Fabry-ko-Mäusen nachgewiesen werden (Marshall et al. 2010; Bangari et al. 2015). Weiterhin konnten Marshall et al. in einer H.E.-Färbung von Spinalganglien 11 Monate alter Fabry-Rag-Mäuse (eine Kombination aus Fabry-ko- und immundefizienten Rag-Mäusen, mit vermehrter Gb3-Akkumulation) einen erhöhten prozentualen Anteil vergrößerter Neurone im Vergleich zu Kontrolltieren feststellen. Dieser Anteil zeigte sich unter ERT rückläufig. Diese Beobachtung eines erhöhten Anteils vergrößerter Neurone in Spinalganglien konnten Bangari et al. 2015 in 2-17 Monate alten Fabry-ko-Mäusen bestätigen. In einer weiteren Studie konnte eine Reduzierung der intraepidermalen Nervenfasern in der

Pfotenhaut junger Fabry-ko-Männchen festgestellt werden (Lakoma et al. 2014). Dieselbe Gruppe konnte sowohl in Färbungen als auch in Proteinmessungen eine erhöhte Expression der schmerzassoziierten Ionenkanäle $Na_v1.8$ und TRPV1 in der Pfotenhaut männlicher Fabry-ko-Mäusen nachweisen (Lakoma et al. 2014). All diese bisher erhobenen Befunde in Verhaltenstestungen sowie in laborchemischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Fabry-ko-Maus ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Pathomechanismen bei M. Fabry sein könnte.

1.4.2. *G3Stg/GLA-knockout-Maus*

Trotz Gb3-Akkumulation zeigt die Fabry-ko-Maus insgesamt einen milden Phänotyp und hat keine reduzierte Lebenserwartung (Ohshima et al. 1997; Marshall et al. 2010). So stieg bspw. die durch Lipidanalysen gemessene renale Gb3-Konzentration in Fabry-ko-Mäusen mit steigendem Alter zwar an, erreichte jedoch nur max. 25% der in Patienten gemessenen Konzentration (Ohshima et al. 1999). Daher wurde vermutet, dass die murine Gb3-Synthesekapazität deutlich geringer ist als die menschliche, weswegen Taguchi et al. ein neues Mausmodell des M. Fabry entwickelten (Shiozuka et al. 2011; Taguchi et al. 2013). Zunächst wurde eine transgene Maus entwickelt, in die eine humane Gb3-Synthase transferiert wurde (TgG3S-Maus). Dieses Mausmodell entwickelte zwar hohe Gb3-Konzentrationen in verschiedenen Organen, zeigte jedoch keine phänotypischen Manifestationen des M. Fabry (Shiozuka et al. 2011). Daher kreuzten Taguchi et al. die Fabry-ko- und die TgG3S-Maus miteinander. Diese sog. G3Stg/GLAko-Maus zeigte im Vergleich zur Fabry-ko-Maus insgesamt deutlich höhere Gb3-Konzentrationen in Serum und wichtigen Organen wie Herz, Niere und Gehirn. Ab der 15. Lebenswoche verloren G3Stg/GLAko-Mäuse rapide an Gewicht; mit 20 Wochen präsentierten sie einen spontanen Tremor, eine progressive Nierenbeteiligung sowie eine verminderte Nahrungsaufnahme und verstarben schließlich mit 36 Wochen (Taguchi et al. 2013).

1.5. Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit

Aufgrund der bisher geringen Datenlage zur Pathogenese von Schmerzen bei M. Fabry und den Hinweisen auf einen Zusammenhang mit pathologischen Befunden in Spinalganglien betroffener Patienten und Fabry-ko-Mäusen (Kaye et al. 1988; Marshall et al. 2010; Bangari et al. 2015) ergaben sich folgende Fragestellungen bzw. Zielsetzungen, die in der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurden:

- Charakterisierung der Fabry-ko-Maus hinsichtlich Schmerz-assoziierten Verhaltens gegenüber taktilen und thermischen Stimuli und Untersuchung auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede.
- Quantifizierung und Vergleich der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) in Fabry-ko-Mäusen und Wurfgeschwistern (litt-WT-Mäusen) sowie Untersuchung auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede.
- Histologische, immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchung der Spinalganglienneurone von Fabry-ko-Mäusen bezüglich morphologischer Veränderungen und Veränderungen des Expressionsmusters Schmerz-assoziiierter Kanäle.
- Etablierung einer Zellkultur aus Spinalganglienneuronen und deren immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich veränderter Expression schmerzassoziierter Kanäle *in vitro*.
- Herausstellung des Nutzens der Fabry-ko-Maus zur weiteren Untersuchung der Pathogenese des M. Fabry.

2. Methoden

2.1. α Galaktosidase A Knock-out Mäuse und Tierhaltung

Im Vergleich zu dem neu entwickelten Mausmodell von Taguchi et al. entspricht die alleinige Ausschaltung des α GalA-Gens in der Fabry-ko-Maus dem Genotyp des Fabry-Patienten, sodass sich in dieser Arbeit zur Klärung der o.g. Fragestellungen, trotz des verminderten Phänotyps in vorausgegangenen Verhaltenstestungen für dieses Mausmodell entschieden wurde (Ohshima et al. 1997; Taguchi et al. 2013).

Die Fabry-ko-Brutpaare erhielten wir dankenswerter Weise aus der Tierhaltung des Instituts für Virologie der Universität Würzburg mit Erlaubnis von Prof. A. Kulkarni (National Institute of Health, Bethesda, USA, (Ohshima et al. 1997)). Alle Versuche wurden durch die Regierung von Unterfranken (#54/12) genehmigt. Die Mäuse wurden in der Tierhaltung der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg bei einer Umgebungstemperatur von 22-24°C mit Wasser und Futter *ad libitum* und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. In einem kleinen Käfig (Typ II; Fläche 363 cm²) wurden max. 3 Tiere, in einem großen Käfig (Typ III, 825 cm²) wurden max. 8 Tiere gehalten. Der Käfigboden wurde mit Sägespähen ausgekleidet und diese regelmäßig gewechselt. Die Verhaltenstestungen wurden stets zur gleichen Tageszeit, innerhalb der Tagesrhythmik und von einem Untersucher durchgeführt, der hinsichtlich des Genotyps verblindet war.

Für die Verhaltenstestungen wurden α GalA-Knockout-Mäuse (Fabry-ko-Mäuse) mit gezielter Ausschaltung des α GalA-Gens in männlichen und weiblichen Tieren (Ohshima et al. 1997) und Wildtyp-Wurfgeschwister (litt-WT-Mäuse) vom C57Bl/6J-Hintergrund untersucht. Da vorangegangene Arbeiten von Ohshima et al. und Marshall et al. klinische Auffälligkeiten erst ab der 12. Lebenswoche beschrieben, wurden die Verhaltenstestungen in der vorliegenden Arbeit erst ab diesem Alter begonnen (Ohshima et al. 1997; Marshall et al. 2010). Insgesamt wurden die Verhaltenstestungen an 333 Tieren durchgeführt; davon 53 junge Fabry-ko-Mäuse (27 Männchen, 26 Weibchen) und 58 junge litt-WT-Mäuse (29 Männchen, 29 Weibchen) im Alter von

zwei bis drei Monaten sowie 106 alte Fabry-ko-Mäuse (54 Männchen, 52 Weibchen) und 116 alte litt-WT-Mäuse (58 Männchen, 58 Weibchen) im Alter von zwölf bis fünfzehn Monaten. Für histologische Untersuchungen wurden insgesamt 83 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse untersucht; davon 22 junge (12 Männliche, 10 Weibliche) und 21 alte (10 Männchen, 11 Weibchen) Fabry-ko-Mäuse sowie 20 junge (10 Männchen, 10 Weibchen) und 20 alte (11 Männchen, 9 Weibchen) litt-WT-Mäuse. Zur Langzeitcharakterisierung des Verhaltens wurden männliche und weibliche Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse ab dem zweiten Lebensmonat bis 27 Monate monatlich untersucht.

2.2. Verhaltenstestungen

2.2.1. *Von-Frey Test zur Bestimmung der mechanischen Pfotenrückzugsschwellen*

Der von Frey-Test, benannt nach dem Würzburger Physiologen Max von Frey (1852-1932) wird zur Testung der taktilen Sensitivität genutzt. Um eine Störung der taktilen Sensitivität, z.B. eine mechanische Hypersensitivität zu erfassen, werden Nylonfilamente (sog. *von Frey-Monofilamente*) in logarithmisch aufsteigender Stärke verwendet. Durch diese Nylonfilamente wird punktuell Kraft auf eine Oberfläche, hier die Sohle der Maushinterpfote, ausgeübt und registriert, bei welcher Filamentstärke die Maus ihre Pfote wegzieht (Chaplan et al. 1994). Die Versuchstiere wurden einzeln in Plexiglasboxen mit offenem Boden auf ein eisernes Drahtgitternetz gesetzt und adaptierten zunächst an die Versuchsumgebung. Um den Versuch zu beginnen, mussten sich alle vier Pfoten auf dem Gitter befinden. Für die anschließende Testung wurde ein von Frey-Filament (Stoelting, Kiel, WI, USA) in aufsteigender Stärke, beginnend mit 3,84 g mit leichtem Druck auf die Mitte der Hinterpfotensohle aufgesetzt und für drei Sekunden ein konstanter Druck ausgeübt, sodass sich das Filament leicht verbog. Das Wegziehen der Pfote wurde als positives Ergebnis gewertet. Beantwortete die Maus die Darbietung des Reizes mit Wegzug der Pfote, so wurde das nächst feinere Filament verwendet. Zeigte sie keine Reaktion, wurde die

nächste Testung mit einem stärkeren Filament durchgeführt. Jede Pfote wurde dreimal getestet. Zwischen den verschiedenen Reizdarbietungen wurde mindestens 5 s gewartet, um so eine Beeinflussung des folgenden Reizes durch den vorausgegangenen Stimulus zu vermeiden. Die Testergebnisse wurden nach der Methode von Chaplan ausgewertet (Chaplan et al. 1994).

2.2.2. Bestimmung der Pfotenrückzugslatenz auf Hitze

Die Testung der thermischen Wegzugslatenz auf Hitze wurde nach der Methode von Hargreaves durchgeführt (Hargreaves et al, 1988). Hierfür wurden die Versuchstiere einzeln in Plexiglaskäfige auf einen 2,2 mm dicken Glasboden gesetzt. Nach einer Gewöhnungszeit an die Umgebung, wurde eine Hitzequelle in Form eines Infrarotstrahlers (Plantar Test 7370®, Ugo Basile Inc., Comerio, Italien) unter der rechten bzw. linken Hinterpfote der Maus positioniert. Mit Beginn des Infrarotstrahls, startete gleichzeitig eine Zeitmessung, die bei Wegzug der Pfote automatisch stoppte. Durch diese Methode konnte die Wegzugslatenz auf einen Hitzestimulus mit einer Genauigkeit von 0,1 s bestimmt werden. Um die Maus vor einer Gewebeschädigung zu schützen, wurde die maximale Darbietungszeit auf 16 s begrenzt. Die Testung wurde dreimal an jeder Pfote wiederholt, wobei zwischen den Darbietungen 5 s abgewartet wurde. Aus den drei ermittelten Werten wurde anschließend der Mittelwert der Wegzugslatenz errechnet.

2.2.3. Bestimmung der Kälterückzugslatenz

Für die Testung der Kältesensitivität wurde die Methode nach Brenner et al. angewandt (Brenner et al. 2012). Hierbei wurden die Mäuse analog zur Hitze-Testung in Plexiglaskäfige auf einen 2,2 mm dicken Glasboden gesetzt. Nach einer Gewöhnungsphase wurde den Versuchstieren ein Kältestimulus in Form eines mit Trockeneispulver gefüllten Röhrchens, dargeboten. Der Kältereiz wurde unter der rechten bzw. linken Pfote der Maus platziert. Mit Beginn der Darbietung des Stimulus wurde eine Stoppuhr gestartet, die bei Wegzug der Pfote gestoppt wurde. Um die Maus vor Gewebeschädigungen zu schützen, wurde die maximale Zeit der

Stimulierung auf 4 s begrenzt. Jede Pfote wurde dreimal getestet, wobei jeweils 5 s Abstand zwischen den jeweiligen Messungen lagen. Aus den drei ermittelten Werten wurde anschließend der Mittelwert der Wegzugslatenz auf einen Kältereiz errechnet.

2.3. Gewebeentnahme

Nach Abschluss der Verhaltenstestungen erfolgte die Gewebeentnahme im Alter von zwei bis drei Monaten bzw. 12 bis 15 Monaten. Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Mit Hilfe eines Binokulars, Skalpell, einer feinen Schere und einer feinen Pinzette wurde zunächst der rechte N. ischiadicus dargestellt. Die rechten Spinalganglien L4 und L5 wurden durch Präparation des N. ischiadicus nach proximal mit Hilfe eines Skalpell und einer Knochenzange aufgesucht und nach vorsichtiger Eröffnung des Wirbelkanals entnommen; ebenso die linken Spinalganglien L3, L4 und L5. Nach Herauslösen des Wirbelkanals aus dem muskulären Halteapparat wurde die vertebrale Muskulatur mit Hilfe einer Schere entfernt und die Wirbelsäule mit einer scharfen Knochenschere vorsichtig entlang der Dornfortsätze eröffnet und halbiert. Beide Hälften der Wirbelsäule wurden anschließend in eine Petrischale überführt und mit einigen Tropfen Complete Saline Solution (CSS, s. 2.9.1) benetzt. Mit Hilfe einer feinen Schere und einer feinen Pinzette wurde das Rückenmark präpariert und die Spinalganglien freigelegt. Um die Ganglien leichter lösen zu können musste die Arachnoidea abgelöst werden. Hiernach konnten die Ganglien vorsichtig aus den Foramina intervertebralia präpariert werden. Dabei wurden die Ganglien mit Hilfe der feinen Pinzette herausgelöst und die anhängenden Wurzeln möglichst nahe am Körper des Ganglions abgeschnitten. Die so entnommenen Spinalganglien wurden in eine auf Eis stehende, mit CSS gefüllte Petrischale überführt und ohne Zeitverzögerung entsprechend 2.9.1 kultiviert. Zuletzt wurden an beiden Hinterpfoten je drei Proben der Pfotensohle (sog. Footpads) entnommen und die Schwanzspitze für die abschließende Genotypisierung abgetrennt.

2.4. Gewebeasservierung

Die für die immunhistologischen Untersuchungen entnommenen Spinalganglien L4 und L5 rechts wurden in Eppendorf Caps überführt, mit Tissue Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und anschließend in, mittels flüssigen Stickstoff gekühltem, 2-Methylbutan eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Gewebe bei -80°C gelagert. Die für die Genexpressionsanalysen mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) entnommenen Spinalganglien L3, L4 und L5 links wurden in Eppendorf-Caps in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zusammen mit dem anderen Gewebe bei -80°C aufbewahrt. Die Footpads wurden für 3 Stunden in 4% Paraformaldehyd (PFA) eingelegt und anschließend dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Nach einer mindestens zwölfstündigen Inkubation in 10%iger Saccharose bei 4°C wurden die Footpads in Tissue Tek® eingebettet und entsprechend des Gewebes für die immunhistologischen Untersuchungen in 2-Methylbutan eingefroren.

2.5. Immunfluoreszenzfärbung mit PGP9.5 an Footpads

Von den, wie unter **2.4** beschrieben, eingefrorenen Footpads wurden mittels eines gekühlten Cryostat (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -20°C je drei 40 µm dicke Schnitte pro Maus angefertigt, auf einen Objektträger (R. Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland) übertragen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Hiernach wurden die Gewebeschnitte mit 10% Bovinem Serumalbumin (BSA), gelöst in Phosphat-Buffer-Saline (PBS) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde rabbit anti-human PGP9.5 (UltraClone Limited, Isle of Wight, England) 1:500 in 1% BSA/PBS mit 0,3% Triton verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am zweiten Tag erfolgten die dreimalige Waschung mit PBS und eine anschließende Inkubation für zwei Stunden bei Dunkelheit und Raumtemperatur mit einem Cyanin 3,18 konjugierten (Cy3) IgG Zweit-Antikörper (goat anti-rabbit; 1:50 in 1% BSA/PBS, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA). Anschließend wurden die Footpads drei Mal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit Deckgläschen und

VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI (VECTOR Laboratories, Inc. Burlingame, California USA) eingedeckt und mit Deckglaslack versiegelt. Die fertigen Objektträger wurden bei 4°C gelagert. Die Auflistung der verwendeten Materialien findet sich in **Tabelle 18**.

2.5.1. Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)

Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) und die Auswertungen aller folgenden Färbungen wurden an einem Axiophot Mikroskop (Axiophot2, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe einer Meta-Vue Kamera (Diagnostic Instruments Zeiss, Göttingen, Deutschland) und dem Dokumentationsprogramm Spot 32 (Universal Imaging, Pennsylvania, USA) durchgeführt. Die IENFD sowie alle weiteren Auswertungen wurden durch eine bezüglich Genotyp und Geschlecht verblindeten Person durchgeführt. Die Auswertung der IENFD in der PGP9.5-Färbung bei 40facher Vergrößerung erfolgte gemäß den Richtlinien der European Federation of Neurological Societies für humane Proben (Lauria et al. 2005). Zur Bestimmung der IENFD wurde die Anzahl der intraepidermalen Nervenfasern pro Millimeter bestimmt. Pro Maus wurden drei Schnitte ausgewertet und der Mittelwert bestimmt.

2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Spinalganglien

Um mögliche Unterschiede in der Morphologie von Neuronen, wie bspw. eine Vergrößerung der neuronalen Fläche festzustellen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung der Spinalganglien durchgeführt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des oxidierten Hämatein saure bzw. basophile Strukturen, wie DNA, Zellkerne oder Ribosomen blau anfärbt. Dagegen färbt Eosin, ein synthetischer Farbstoff, basische bzw. acidophile Strukturen (z.B. Zytoplasma, Mitochondrien oder Kollagen) rot (Lüllmann-Rauch 2009). Im ersten Schritt wurden am Cryostat bei -20°C 10 µm dicke Schnitte der Spinalganglien angefertigt und je drei Schnitte pro Maus auf

einen Objektträger übertragen. Dieses Vorgehen wurde ebenfalls für alle folgenden Färbungen angewendet. Nach dem Schneiden bzw. nach dem Auftauen aus -20°C wurden die Schnitte für 10 min in Hämalaun nach Meyer inkubiert und danach für 10 min fließend gewässert. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 25 s mit Eosin 1% inkubiert. Hiernach folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (dreimal 70% und je zweimal 96% und 100%) worauf eine zwei Mal 10minütige Inkubation mit Xylol und abschließend das Eindecken mit Vitro Clud (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) folgte. Die gefärbten Schnitte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Auflistung aller verwendeten Materialien findet sich unter **Tabelle 19**.

2.6.1. Bestimmung der neuronalen Fläche

Die Bestimmung der Neuronenfläche erfolgte mit Hilfe der unter 2.5.1 genannten Soft- und Hardware. Alle drei Schnitte eines Objektträgers wurden bei 400facher Vergrößerung mikroskopiert und abschnittsweise fotografiert, um so alle Neurone des Spinalganglions zu erfassen. Anschließend wurde das Softwareprogramm Image J (<http://imagej.de.softonic.com/>) zur Messung der Neuronenfläche verwendet (Rasband 1997-2005; Abramoff 2004). Anhand der vorgegebenen Kalibrierung bei 40facher Vergrößerung wurde die Skalierung zur Ausmessung in Image J auf $5,5 \text{ Pixel}/\mu\text{m}$ eingestellt. Durch Umrandung eines Neurons in der H.E.-Färbung errechnete das Programm so die neuronale Fläche in μm^2 . Als nächstes wurde für jeden Abschnitt eines Ganglions der Mittelwert der Neuronenfläche berechnet. Dieses Vorgehen erfolgte bei allen Abschnitten der drei Gewebeschnitte einer Maus, sodass schließlich anhand der Mittelwerte pro Schnitt ein Gesamtmittelwert der neuronalen Fläche gebildet werden konnte. Aus diesen drei Mittelwerten konnte nun die mittlere neuronale Fläche pro Maus errechnet werden.

2.7. Fluoreszenz-Doppelfärbungen an Spinalganglien

Zur Charakterisierung der Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen wurden unterschiedliche Primär-Antikörper zur Darstellung von Rezeptoren genutzt (**Tabelle**

6). Alle Färbungen wurden zuvor durch Austitrierung des jeweiligen AK und seiner benötigten Konzentration etabliert. Zur Identifizierung der Gb3-Ablagerungen wurde ein purified mouse anti-human CD77-Antikörper verwendet. Um mögliche Gb3-Ablagerungen und Kollokalisierungen mit Rezeptoren bzw. Ionenkanälen untersuchen zu können, wurden alle Doppelfärbungen mit diesem Antikörper durchgeführt. Vor der eigentlichen Färbung wurden die entsprechend 2.6 vorbereiteten Schnitte für 30 min auf Raumtemperatur gebracht und anschließend für 10 min bei -20°C in 100% Aceton fixiert. Hiernach wurden die Gewebeschnitte auf einer Heizplatte für ca. 5 min bei max. 42°C getrocknet, mit einem PapPen® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) umrandet und zur Färbung in eine feuchte Kammer gelegt. Um unspezifische Bindungen des Primär-Antikörper im Gewebe zu vermeiden, wurden die Schnitte für 30 min mit 10% BSA/PBS inkubiert. Im Anschluss an diesen Schritt wurde BSA dekantiert und 50-100 µl der in 1% BSA/PBS verdünnten Primär-Antikörper pro Schnitt aufgetragen (**Tabelle 6**). Anschließend erfolgte die Inkubation der Erstantikörper bei 4°C über Nacht.

Tabelle 6 Primär-Antikörper für Fluoreszenzfärbungen an Spinalganglien

| Primär-AK | Firma | Host | Verdünnung |
|-----------------|--|--------------------------|------------|
| CD77 | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany | Mouse | 1:100 |
| TRPV1 | Santa Cruz, Heidelberg, Germany | Goat | 1:500 |
| Nav 1.8 | Chemicon, EMD Millipore Cooperation, Temecula, CA, USA | Rabbit | 1:100 |
| CGRP | Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA | Rabbit | 1:100 |
| NF200 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | Rabbit | 1:2000 |
| IB4-FITC | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA | Bandeireae simplicifolia | 1:1000 |

Am nächsten Tag erfolgte dreimaliges Waschen der Objektträger mit PBS. Hiernach wurden die ebenfalls in 1% BSA/PBS verdünnten Zweit-Antikörper aufgetragen. Da die Sekundär-Antikörper 1:1 mit Glycerol vorverdünnt wurden, erfolgte eine entsprechende Anpassung der Verdünnung (**Tabelle 7**). Nach zweistündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Für eine zusätzliche Kernfärbung und damit bessere Identifizierung

von Zellen sowie zum Schutz vor Ausbleichen der Fluoreszenzfärbung wurde abschließend VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI (VECTOR Laboratories, Inc. Burlingame, California USA) auf die Schnitte aufgetragen. Schließlich wurden die Deckgläser mit Deckglaslack versiegelt. Die fertigen Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C im Kühlschrank dunkel aufbewahrt.

Tabelle 7 Sekundäre Antikörper für Fluoreszenzfärbungen an Spinalganglien.

| Sekundär-AK | Firma | Host | Endverdünnung |
|-------------------------------------|---|--------------------|---------------|
| Cy3 (CD77) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-mouse | 1:100 |
| Alexa Fluor (TRPV1) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-goat | 1:200 |
| Alexa Fluor (NF200, Nav 1.8) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-rabbit | 1:200 |
| AMCA (CGRP) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-rabbit | 1:100 |

2.7.1. Fluoreszenz-Doppelfärbung CD77 und Nav, 1.8

Nach Trocknung auf der Heizplatte und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer speziellen Blocklösung, bestehend aus 0,3% Triton X100, 4% NGS, 4% FCS in PBS geblockt. Die Antikörper gegen Nav1.8 und CD77 wurden beide in der Blocklösung verdünnt (**Tabelle 6**) und nach Dekantieren der Blocklösung auf die Schnitte aufgetragen. Es folgte die Inkubation beider Primär-Antikörper bei Raumtemperatur über Nacht. Anschließend wurden die Gewebeschnitte drei Mal mit PBS gewaschen und die ebenfalls in der speziellen Blocklösung verdünnten Zweit-Antikörper (**Tabelle 7**) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgten entsprechend der vorherigen Färbungen die erneute dreimalige Waschung mit PBS und das Eindecken mit VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI sowie die Versiegelung mit Deckglaslack. Die fertigen Schnitte wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7.2. Fluoreszenz-Doppelfärbung CD77 und IB4

Für diese Färbung wurde eine spezielle PBS-Lösung bestehend aus PBS, Triton X100, CaCl₂ und MgCl₂ angesetzt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte entsprechend der vorhergehenden Protokolle vorbehandelt. Hiernach wurden die Präparate mit der speziellen PBS-Lösung für 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in der PBS-Lösung verdünnten IB4-FITC-Antikörper (**Tabelle 6**) über Nacht bei 4°C. Hiernach wurden die Objektträger dreimal mit der speziellen PBS-Lösung gewaschen. Die Inkubation des für die Doppelfärbung verwendeten CD77-Antikörpers erfolgte entsprechend 2.7 ebenfalls bei 4°C über Nacht (**Tabelle 6**). Am nächsten Tag erfolgte erneut dreimaliges Waschen der Objektträger mit der am Vortag angesetzten speziellen PBS-Lösung (SpezialPBS) und anschließend eine zweistündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für CD77 bei Raumtemperatur (**Tabelle 7**). Im nächsten Schritt wurden die Objektträger schließlich nochmals dreimal mit SpezialPBS und anschließend einmal mit normalem PBS gewaschen. Zuletzt erfolgte die Eindeckung mit VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI und die Versiegelung mit Deckglaslack. Die fertigen Objektträger wurden ebenfalls bei 4°C gelagert.

2.7.3. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen mit Image J

Alle Schnitte eines Objektträgers wurden bei 400facher Vergrößerung mikroskopiert und abschnittsweise fotografiert. Da CD77 als Glycosphingolipid ubiquitär (u.a. in Membranen und Lysosomen) vorkommt, konnte eine Auswertung der intrazellulären Ablagerungen mittels Intensitätsmessungen und -vergleichen nicht ausgeführt werden. Daher wurde eine manuelle Auswertung der Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit Hilfe der Software Image J gewählt. Hierbei wurde mit Hilfe des Region of Interest (ROI)-Managers zunächst die Gesamtzahl aller Neurone eines Spinalganglienabschnittes ermittelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung z.B. TRPV1-postiver Neurone eines Abschnittes, ebenfalls mittels ROI-Manager. Entsprechend wurde die Anzahl von Neuronen ermittelt, die intrazelluläre Gb3-Ablagerungen aufwiesen. Um die Genauigkeit der erhaltenen Neuronenzahlen zu erhöhen, wurden

alle Zählungen jeweils drei Mal durchgeführt und schließlich ein Mittelwert pro Spinalganglienabschnitt gebildet. Im nächsten Schritt wurde der prozentuale Anteil von CD77-positiven bzw. TRPV1-positiven Neuronen an der Neuronengesamtanzahl pro Spinalganglienabschnitt berechnet. Dieses Vorgehen wurde für alle Abschnitte eines Spinalganglions durchgeführt. Abschließend wurde aus den Mittelwerten aller Abschnitte eines Spinalganglions der Gesamtmittelwert pro Spinalganglion errechnet. Weiter wurde aus den Mittelwerten der zumeist drei Spinalganglien der Gesamtmittelwert für das Tier gebildet. Am Ende erhielt man auf diese Weise je einen Mittelwert für die Anzahl CD77- und einen Mittelwert für die Anzahl z.B. TRPV1-positiver Neurone.

2.8. Molekulargenetische Untersuchungen zur Quantifizierung der Genexpression Schmerz-assoziiierter Rezeptoren und Mediatoren

2.8.1. *Allgemeines zur quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)*

Zur Bestimmung der Genexpression Schmerz-assoziiierter Rezeptoren in asservierten Maus-Spinalganglien wurde die Methode der quantitativen real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) angewandt. Die qRT-PCR erlaubt eine Quantifizierung der messengerRNA (mRNA) durch eine Fluoreszenzmessung während oder nach des PCR-Zyklus in Echtzeit (Holzapfel 2007). Diese schnelle und automatisierte Quantifizierung ist auch bei geringer Genexpression möglich (Winer et al. 1999). Bei dieser Methode nimmt die Fluoreszenz einer Probe proportional zur Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht (Holzapfel 2007). Um die RNA-Menge einer Probe in der qRT-PCR zu bestimmen muss die zuvor gewonnene mRNA durch eine reverse Transkriptase in eine copy DNA (cDNA) überführt werden, welche dann als Amplifikations-Matrize genutzt wird.

2.8.2. *RNA-Extraktion*

Für die qRT-PCR wurden die, wie unter 2.4 fixierten Spinalganglien L3, L4 und L5 links verwendet. Zur RNA-Extraktion wurde das Gewebe zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend zu jeder Probe 600 µl TRIZOL-Reagenz (Life Technologies™, USA) hinzugegeben. Im dritten Schritt wurden die Gewebeproben für mindestens 30 s mittels eines Dispergierstabes (Micra D8, Micra, Müllheim, Deutschland) homogenisiert, welcher nach jeder Probe mit RNase-freiem Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)-Wasser gereinigt wurde. Nach diesem Schritt wurde das Homogenisat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben nach einer 10minütigen Inkubationszeit gründlich gevortext. Danach wurden die Eppendorf Caps mit dem enthaltenen Gewebe für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Hierdurch entstand eine Dreischichtung: Am Boden das rötliche TRIZOL, mittig die je nach Probe unterschiedlich breite proteinhaltige Interphase und die farblose RNA-haltige obere Phase. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cap überführt und 1,1 µl Glycogen sowie 600 µl Isopropylalkohol hinzugegeben. Das Gemisch wurde abzentrifugiert und anschließend bei -20°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dabei fällt die mRNA in Form von Pellets am Boden des Eppendorf-Caps aus. Der aus Isopropylalkohol bestehende Überstand wurde abgenommen, sodass nur noch das Pellet im Eppendorf-Cap verblieb. In einem weiteren Reinigungsschritt wurde 1 ml 75%iger Ethanol zu jeder Probe hinzugegeben und gevortext. Erneut wurden die Proben 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet bei 42°C für 15 min auf einem Heizblock getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 33 µl DEPC-H₂O gelöst und vermischt. Die Proben wurden anschließend bei 55°C für 10 min auf einem Thermomixer TS10 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) geschüttelt und über Nacht bei -20°C gelagert.

2.8.3. *Messung der optischen Dichte*

Zur Bestimmung der RNA-Ausbeute erfolgte bei jeder Probe eine photometrische Messung der optischen Dichte mittels NanoDrop 1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland). Nach Eichung mittels DEPC-Wasser und Ermittlung eines Leerwertes wurde je 1 µl der vorbereiteten Proben drei Mal gemessen. Aus dem Mittelwert der Messungen konnte anschließend die jeweilige RNA-Konzentration der Probe in ng/µl ermittelt werden.

2.8.4. *Reverse Transkription*

Herkömmliche Polymerasen, wie sie z.B. bei der PCR genutzt werden, können RNA-Fragmente nicht amplifizieren. Um dies für unsere Proben dennoch zu ermöglichen, wird eine reverse Transkriptase genutzt. Diese kann mRNA in cDNA umschreiben, benötigt dafür jedoch einen Primer in Form von random Hexamer. Anhand der zuvor durchgeführten OD-Messung wurde für jede Probe das Volumen berechnet, in dem sich 500 ng/µl mRNA befanden. Nach Auftauen der Probe auf Eis, wurde das errechnete Volumen in 0,2 ml Eppendorf-Caps pipettiert und mit 34,75 µl *Aqua destillata* aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden 65,25 µl Premix hinzugefügt, der sich wie in **Tabelle 8** beschrieben zusammensetzte. Das abschließende Gesamtvolumen jeder Probe betrug somit 100 µl. Alle Reagenzien wurden von demselben Hersteller (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 8 Premix für Reverse Transkription

| Komponente | Volumen |
|---|-----------------|
| 10x Buffer | 10,00 µl |
| 25 mM MgCl₂ | 22,00 µl |
| DesoxyNTPs (dNTP) Mixture 10mM | 20,00 µl |
| Random Hexamers | 5,00 µl |
| RNAse Inhibitor | 2,00 µl |
| MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl) | 6,25 µl |
| Gesamtvolumen | 65,25 µl |

Nach Durchmischung der Proben wurde die reverse Transkriptase in einem Thermocycler (Peqlab Primus Advance 96, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) unter in **Tabelle 9** genannten Bedingungen durchgeführt. Anschließend erfolgte entweder direkt die qRT-PCR oder die Lagerung der gewonnenen cDNA bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C.

Tabelle 9 Einstellungen Thermocycler für Reverse Transkription

| | Primer-Bindung | Reverse Transkription | RT-Inaktivierung |
|------------|----------------|-----------------------|------------------|
| Zeit | 10 min | 60 min | 5 min |
| Temperatur | 25 °C | 37 °C | 95 °C |

2.8.5. qRT-PCR

Für jeden Rezeptor sowie für die 18s-RNA, die als endogenen Kontrolle diente, wurde ein primerspezifischer Premix vorbereitet (Zusammensetzung **Tabelle 10**). Die endogene Kontrolle wird als Referenzgen eingesetzt um Variationen in der Ausgangsmenge der zu messenden RNA-Probe auszugleichen (Holzapfel 2007).

Tabelle 10 Premix für die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion

| | Rezeptor- Primer | 18s RNA- Primer |
|------------------------|---------------------|--------------------|
| Aqua destillata | 1,75 µl | 4,25 µl |
| Master Mix | 2,0 µl | 2,0 µl |
| Primer | 0,25 µl | 0,25 µl |
| cDNA-Probe | 5 µl | 2,5 µl |
| Gesamtvolumen | 9 µl | 9 µl |

Jede cDNA-Probe wurde als Triplet (je drei Wells pro Probe) mit dem Rezeptor-Primer-Premix und als Duplett (je zwei Wells pro Probe) mit dem 18S-RNA-Premix auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein Triplet aus DEPC-Wasser und Rezeptor-Primer-Premix und ein Duplett aus DEPC-Wasser und 18s-RNA-Primer-Premix jeweils ohne cDNA. Im Anschluss wurde die PCR-Platte mit Caps

verschlossen und die qRT-PCR im Step One Plus™ Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) durchgeführt. Zu Beginn erfolgte eine Inkubationsphase bei 50°C für 2 min und eine weitere bei 95°C für 10 min. Anschließend wurden 40 Amplifikationszyklen für 15 s bei 95°C, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen für 1 min bei 60°C durchgeführt. Die Target-spezifischen Primer wurden als TaqMan Gene Expression Assays von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen. In **Tabelle 11** sind die untersuchten Zielgene mit der jeweiligen Assay-ID zusammengestellt.

Tabelle 11 Untersuchte Primer mit Assay-Identifikator

| Murine Primer | Assay-ID |
|---------------|---------------|
| TRPV1 | Mm01246302_m1 |
| Nav1.8 | Mm00501467_m1 |

Die Ermittlung der relativen Genexpression in den verwendeten Proben erfolgte mittels der komparativen $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Winer et al. 1999; Fleige et al. 2006). Dabei wird der sogenannte C_t -Wert (threshold cycle) bestimmt. Dieser C_t -Wert einer Probe basiert auf der Anzahl der Amplifikationszyklen, bei denen das Fluoreszenzsignal der amplifizierten mRNA einen bestimmten Schwellenwert (beruhend auf dem Hintergrund-Fluoreszenzsignal) überschreitet. Hierbei gilt: Je mehr mRNA in einer Probe vorhanden ist, desto weniger Zyklen werden benötigt um diesen Schwellenwert zu überschreiten und desto niedriger ist der C_t -Wert (Winer et al. 1999). Die erhaltenen C_t -Werte der endogenen Kontrolle und des Rezeptor-Primers werden schließlich voneinander subtrahiert, wobei der Mittelwert des Kontroll-Dupletts vom Mittelwert des Rezeptor-Tripletts abgezogen wurde (Holzapfel 2007). Dieser Wert wird wiederum zu einem C_t -Wert eines für jedes Gewebe und Ziel-mRNA spezifischen Kalibrator in Relation gesetzt und in Gleichung n-fache Expression ($2^{-(\Delta\Delta C_t)}$) eingesetzt.

$$\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ Zielgen (unbekannte Probe)} - C_t \text{ (Endogene Kontrolle)}] - [C_t \text{ Zielgen (Kalibrator)} - C_t \text{ Endogene Kontrolle (Kalibrator)}]$$

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\Delta C_t)}$$

2.9. Kultivierung der Spinalganglienneurone

2.9.1. *Anlegen der Spinalganglien-Kultur*

Für die Kultur der entnommenen Spinalganglienneurone wurden einige Tage zuvor das Kulturmedium und die Complete Saline Solution (CSS) angelegt (s. **Tabelle 22**). Zu Beginn wurde eine Lösung, bestehend aus Bovine Serum Albumin (BSA), Trypsin-Inhibitor (TI) und Kulturmedium (BSA/TI-Lösung) gemischt, die zunächst gevortext und anschließend steril gefiltert wurde. Die BSA/TI-Lösung wurde anschließend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im zweiten Schritt wurde das zuvor angesetzte CSS 10 min oxygeniert und anschließend je 10 ml in zwei 15 ml Falcon-Tubes und eine kleine Petrischale umgefüllt. Zu den 10 ml CSS wurde jeweils EDTA hinzugefügt, um einer durch Schwermetalle verursachten Hemmung der Enzymaktivität vorzubeugen. Hiernach wurde in ein Falcon-Tube eine Thermolysin medium (TM) Liberase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), in ein anderes eine Thermolysin low (TL) Liberase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Die Liberasen ermöglichen durch Spaltung der extrazellulären Matrix eines Gewebes die Freisetzung einzelner Zellen. Zur TL Liberase-Lösung wurde schließlich Papain (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) hinzu pipettiert. Papain gehört zur Gruppe der Cysteinproteasen und zeigt eine breite eiweißspaltende Wirkung, die für die ebenfalls Zellisolierung ausgenutzt wurde. Anschließend wurden beide Lösungen gevortext, steril gefiltert und bis ca. 10-20 min vor Nutzung auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt folgte die Entnahme der Spinalganglien (s. 2.3). In der Zwischenzeit wurde die TM Liberase-Lösung für im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die entnommenen Spinalganglien wurden zunächst in die mit CSS-befüllte Petrischale überführt. Anschließend wurden sie in die TM Liberase-Lösung transferiert und für 20 min auf einer rotierenden Heizplatte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die in der Zwischenzeit erwärmte TL Liberase-Lösung hinzugefügt. Hiernach erfolgte erneut eine 10minütige Inkubation der Lösung auf der rotierenden Heizplatte. Währenddessen

wurde die anfangs angesetzte BSA/TI-Lösung erwärmt. Nach Zentrifugation der Probe und Absaugung des Überstandes wurden zunächst 200 µl BSA/TI-Lösung zu den Zellen zugefügt und vorsichtig auf- und abpipettiert. Anschließend wurden weitere 600 µl BSA/TI-Lösung hinzugegeben und erneut vorsichtig vermischt. Dieser Schritt diente der Beendigung der durch die Liberasen ausgelösten Reaktionen. Zuletzt wurden je 80 µl der Zellsuspension pro Well einer vier Well-Kulturplatte aufgetragen, in die zuvor PolyD-Lysine/Mouse Laminin beschichtete Coverslips (BD BioCoat™ Cellware, Bedford, MA, #354087) ausgelegt wurden. Hiernach erfolgte eine einstündige Inkubation der Kulturen im Brutschrank. Zuletzt wurden 920 µl Kulturmedium hinzugefügt. Insgesamt erhielten wir 12 Kulturen pro Maus. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte aufgrund der kurzen Kultivierungszeit nicht durchgeführt.

2.9.2. Fixierung der Zellkulturen

Nach 7 (+/- 2) Tagen war in allen Kulturen Neuronenwachstum erkennbar, sodass sie für die nachfolgenden Färbungen mit 100% Methanol fixiert werden konnten. Hierzu wurde zunächst das DRG Medium aus jedem Well abgesaugt und jedes Well mit 500 µl PBS gespült. Nach Absaugung der PBS-Lösung wurden zu jedem Well 500 µl 100% Methanol hinzugefügt und die Kulturen für 20 min bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte dreimaliges Waschen der Wells mit PBS. Abschließend wurden je 500 µl PBS pro Well hinzugefügt und die Kulturschalen mit Parafilm verschlossen. Die fixierten Kulturen wurden bei 4°C im Kühlschrank bis zum Tag der Färbung aufbewahrt.

2.9.3. Fluoreszenz-Doppelfärbungen der Kulturen

Um die Kulturen auf mögliche Gb3-Ablagerungen und Veränderungen von Rezeptoren bzw. Kanälen zu überprüfen, wurden dieselben Antikörper verwendet, die für die Fluoreszenzfärbung der Spinalganglienschnitte verwendet wurden (**Tabelle 6**). Für die Kulturfluoreszenzfärbungen wurden die bei 4°C gelagerten Cover slips aus den Wells entnommen und in eine zuvor präparierte feuchte Kammer übertragen. Anschließend wurden die Cover slips dreimal je 5 min mit PBS gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Hiernach erfolgte eine 20minütige Inkubation mit

10%iger BSA/PBS-Lösung, gefolgt von einer 5minütigen Inkubation mit 1%iger BSA/PBS-Lösung. In der Zwischenzeit wurden die Erstantikörper entsprechend der Verdünnung (**Tabelle 12**) in 2%iger BSA/PBS-Lösung verdünnt. Zur eindeutigen Identifizierung der Neurone in der Zellkultur wurden die Kulturfärbungen jeweils in Kombination mit einer PGP9.5-Färbung durchgeführt. Aufgrund der nur eingeschränkten Diffusionsfähigkeit von PGP9.5 durch Zellmembranen, erfolgte die Zugabe von 0,3% Triton X100 zum Erstantikörper. Triton X100 ist ein nichtionisches Tensid, welches Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus Membranen herauslöst ohne diese, im Gegensatz zu Natriumlaurylsulfat (*sodium lauryl sulfate*; SDS) zu denaturieren. Auf diesem Weg erreicht Triton X100 die Permeabilisierung für schwer durchgängige Antikörper wie z.B. PGP9.5. Nach Herstellung des Erstantikörpers und Entfernung der 1%igen BSA/PBS-Lösung wurden je 100 µl der Primärantikörper auf die Coverslips aufgetragen und die Färbung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tabelle 12 Verwendete Primärantikörper für Kultur-Fluoreszenzfärbungen

| Primär- AK | Firma | Host | Endverdünnung |
|----------------|--|--------|---------------|
| CD77 | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany | Mouse | 1:100 |
| TRPV1 | Santa Cruz, Heidelberg, Germany | Goat | 1:50 |
| CGRP | Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA | Rabbit | 1:125 |
| PGP 9.5 | UltraClone Limited, England | Rabbit | 1:500 |

Am zweiten Tag erfolgte die Entfernung des Primärantikörpers durch dreimalige Waschung mit PBS für je 5 min. Zuvor wurde die Zweitantikörper-Lösung vorbereitet indem die Sekundärantikörper in 2%iger BSA/PBS-Lösung entsprechend ihrer Verdünnung (**Tabelle 13**) gelöst wurden. Für die Verdünnung des Zweitantikörpers wurde aufgrund der Doppelfärbung und einer 1:1-Vorverdünnung mit *Aqua destillata* eine entsprechend höhere Verdünnungsstufe gewählt. Hiernach erfolgte eine einstündige Inkubation des SekundärAK bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Coverslips erneut drei Mal je 5 min mit PBS gewaschen und schließlich mit Moviol/Dapi auf Objekträgern fixiert.

Tabelle 13 *Verwendete Sekundärantikörper für Kultur-Fluoreszenzfärbungen*

| Sekundär-AK | Firma | Host | Verdünnung |
|------------------------------|--|-------------------|------------|
| Cy3 (PGP 9.5) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-mouse | 1:75 |
| Alexa Fluor (VR1) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-goat | 1:100 |
| Alexa Fluor (CD77) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA | Donkey-anti-mouse | 1:100 |

2.10. Statistische Auswertung

Die Verwaltung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft). Die statistische Auswertung aller Daten wurde mit IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung anhand des Shapiro-Wilk-Tests und Abgleich der Histogramme des Datensatzes mit der Normalverteilungskurve. Konnte die Normalverteilungshypothese angenommen werden, wurde zusätzlich eine Überprüfung der Varianzhomogenität und im Anschluss ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrisches Testverfahren für unabhängige Stichproben. Korrelationsuntersuchungen erfolgten bei normalverteilten Daten mittels Pearson-Test, bei nicht-normalverteilten Daten mittels Spearman-Test. Alle Graphen wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 23 erstellt. Die Darstellung der Daten aus den Verhaltenstestungen und Färbungen erfolgte durch Boxplots; die Korrelationsdarstellung mittels Scatterplots.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse Verhaltenstestungen

3.1.1. *Mechanische Hypersensibilität bei Fabry-ko-Mäusen*

Insgesamt wurden zur Feststellung der mechanischen Sensibilität 124 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse im Alter von zwei bis drei Monaten und 12 bis 15 Monaten getestet. Es konnte gezeigt werden, dass zwei bis drei Monate alte Fabry-ko-Mäuse verglichen mit ihren litt-WT-Altersgenossen eine deutliche mechanische Hypersensibilität aufweisen (**Abb. 3**; ** $p < 0,01$). Auch 12 bis 15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse zeigten eine deutlich erhöhte taktile Sensibilität gegenüber ihren 12 bis 15 Monate alten litt-WT-Mäusen (**Abb. 3**; *** $p < 0,001$). Die mechanische Hypersensibilität junger Fabry-ko-Mäuse nahm mit steigendem Alter weiter zu, sodass 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse gegenüber den jungen Mäusen eine nochmals deutlich herabgesetzte mechanische Reizschwelle aufwiesen (**Abb. 3**; *** $p < 0,001$), während zwischen jungen und alten litt-WT-Mäusen kein Unterschied bestand (**Abb. 3**; $p = 0,339$). Weiterhin konnte zwischen jungen Fabry-ko-Weibchen und -Männchen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber taktilen Reizen nachgewiesen werden (**Abb. 3**). So zeigten junge Fabry-ko-Weibchen eine verstärkte taktile Hypersensitivität verglichen mit gleichaltrigen Männchen (**Abb. 3**; * $p < 0,05$). Zwischen älteren Fabry-ko-Mäusen konnte jedoch kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden. Litt-WT-Weibchen dagegen zeigten mit steigendem Alter eine verminderte Rückzugslatenz gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Männchen (**Abb. 3**; * $p < 0,05$). In der Gruppe der jungen litt-WT-Mäuse zeigte sich kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen.

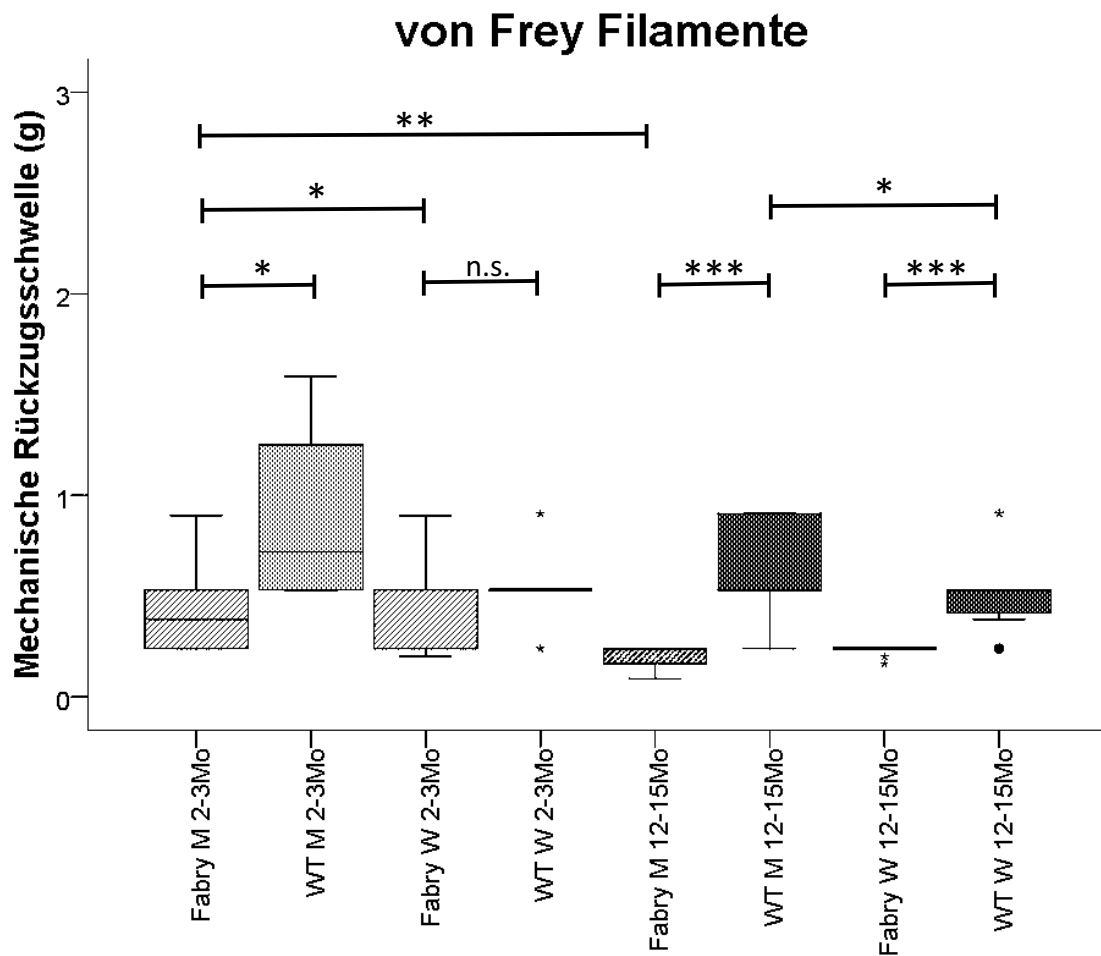


Abb. 3 Geschlechtsspezifische Unterschiede im von Frey Filament-Test. Männliche und weibliche Fabry-ko-Mäuse verglichen mit litt-WT-Mäusen eine mechanische Hypersensibilität (* $p < 0,05$ bis *** $p < 0,001$). Zwischen den Geschlechtern zeigten sich innerhalb eines Genotyps kein oder nur geringe Unterschiede (Fabry-ko-Mäuse 2-3 Monate $p = 0,583$, Fabry-ko-Mäuse 12-15 Monate * $p < 0,05$; litt-WT-Mäuse 2-3 Monaten $p = 0,257$, 12-15 Monate * $p < 0,05$).

3.1.2. Altersabhängige Hyper- und Hyposensibilität gegenüber Hitze in Fabry-ko-Mäusen

Zur Testung der Pfotenrückzuglatenz auf Hitze wurden insgesamt 123 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse im Alter von zwei bis drei Monaten und 12 bis 15 Monaten getestet. Hier zeigte sich ein Unterschied der Hitzeschwellen zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen (**Abb. 4**; *** $p < 0,001$). Während junge Fabry-ko-Mäuse gegenüber ihren litt-WT-Altersgenossen eine verminderte Pfotenrückzuglatenz auf Hitze aufwiesen (**Abb. 4**; ** $p < 0,01$), hatten alte Fabry-ko-Mäuse eine Hyposensibilität mit verzögerter Rückzuglatenz, die sich ebenfalls erhöht gegenüber alter litt-WT-Mäuse darstellte

(Abb. 4; * $p < 0,05$). Junge und alte litt-WT-Mäuse wiesen dagegen keinen Unterschied in ihrem Verhalten gegenüber Hitzestimuli auf (Abb. 4; $p = 0,693$). Bis auf eine erhöhte Rückzugsschwelle von 12 bis 15 Monate alten männlichen litt-WT-Mäusen gegenüber ihren weiblichen Artgenossinnen (* $p < 0,05$) zeigte sich in diesem Versuch zwischen den Geschlechtern kein Unterschied im Verhalten gegenüber einem thermischen Stimulus.

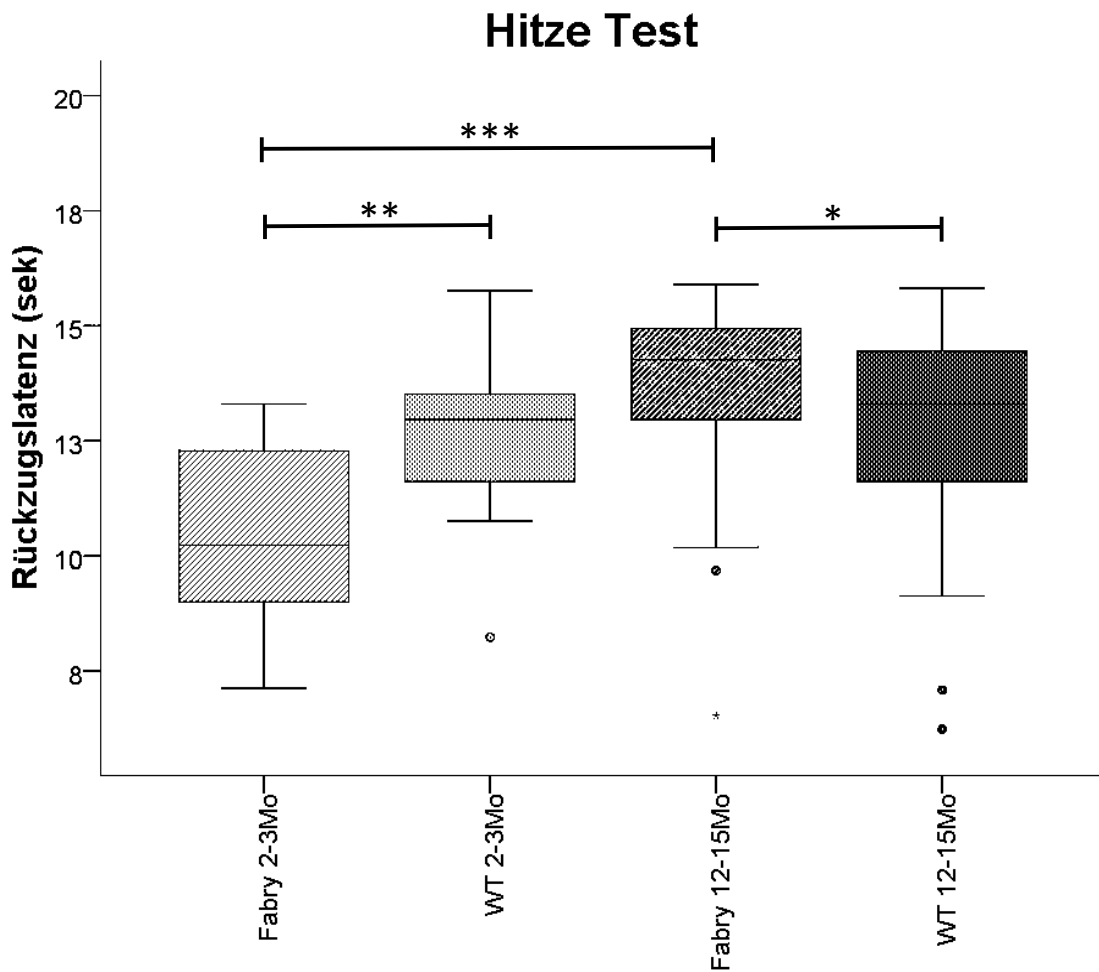


Abb. 4 Thermische Rückzugslatenz (Hitze-Test). 2-3 Monate alte Fabry-ko-Mäuse zeigten eine Hypersensibilität gegenüber Hitze (** $p < 0,01$). 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse wiesen dagegen eine deutlich verzögerte Rückzugslatenz auf (* $p < 0,05$). Zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen bestand ein signifikanter Unterschied der thermischen Reizschwelle (** $p < 0,001$).

3.1.3. *Kälte-Hyposensibilität bei Fabry-ko-Mäusen*

Für den Kälte-Test wurden insgesamt 119 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse im Alter von zwei bis drei Monaten und 12-15 Monaten getestet. Junge wie alte Fabry-ko-Mäuse wiesen eine Hyposensibilität mit erhöhter Rückzugslatenz gegenüber Kälte auf (**Abb. 5**; 2-3 Monate $p^{**}<0,01$; 12-15 Monate $p^{*}<0,05$). Innerhalb der Fabry-ko-Mäuse zeigte sich mit steigendem Alter eine Abnahme der Kälte-Hyposensibilität (**Abb. 5**; $***p<0,001$). Im Gegensatz dazu konnte zwischen jungen und alten litt-WT-Mäusen keine Veränderung der Pfotenrückzugslatenz gegenüber einem Kältereiz festgestellt werden (**Abb. 5**; $p=0,245$). Im Vergleich der Geschlechter zeigten lediglich weibliche alte Fabry-ko-Mäuse gegenüber ihren männlichen Artgenossen eine noch einmal verstärkte Kälte-Hyposensitivität (**Abb. 6**; $***p<0,001$). In der Gruppe der litt-WT-Mäuse präsentierten 2-3 Monate alte männliche litt-WT-Mäuse gegenüber weiblichen litt-WT-Mäusen eine verminderte Rückzugslatenz gegenüber einem Kälte-Stimulus (**Abb. 6**; $**p<0,01$).

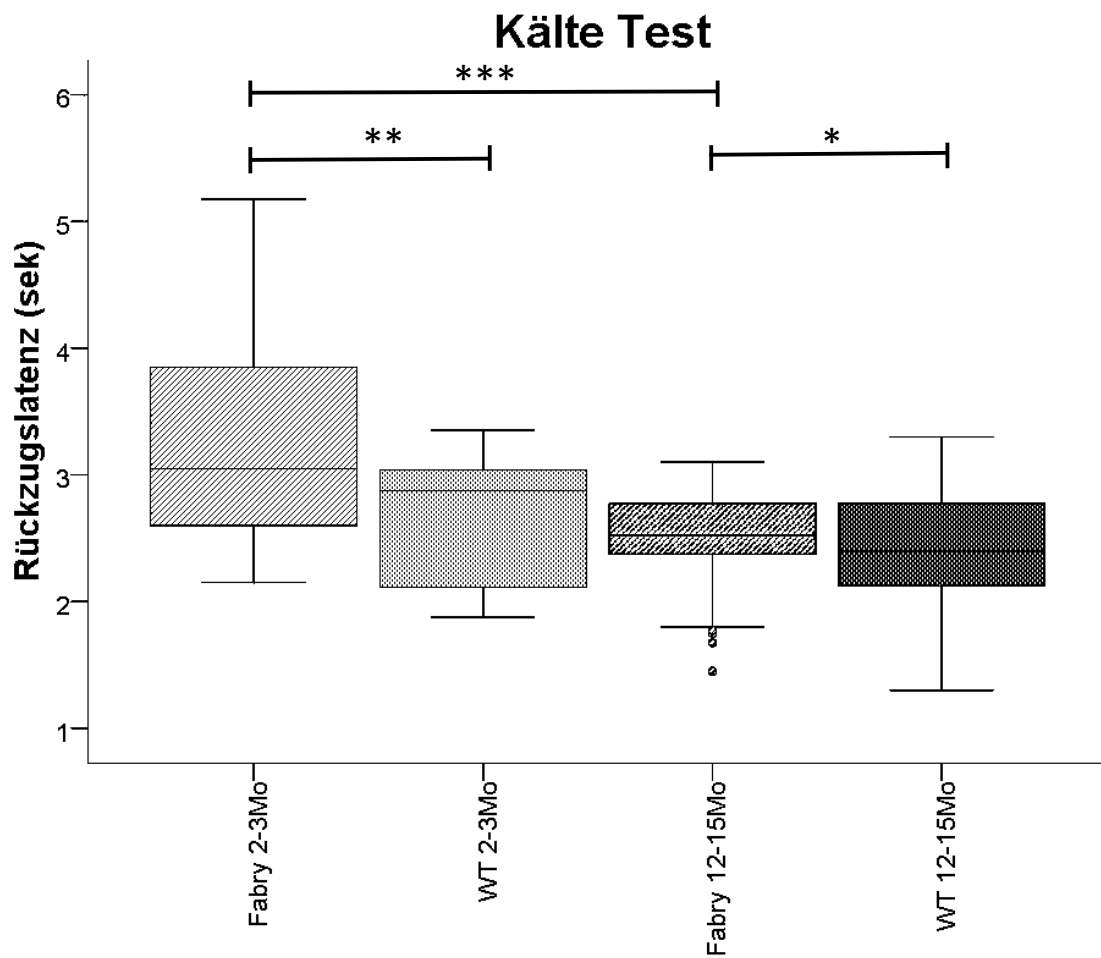


Abb. 5 Rückzugslatenz im Kälte-Test. Junge und alte Fabry-ko-Mäuse wiesen verglichen mit litt-WT-Mäusen im Kälte-Test eine erhöhte Rückzugslatenz auf (2-3 Monate $**p < 0,01$, 12-15 Monate $*p = 0,05$). Die Reizschwelle für Kälte sank zwischen jungen und alten α GalA-ko-Mäusen nochmals ab ($***p = 0,001$).

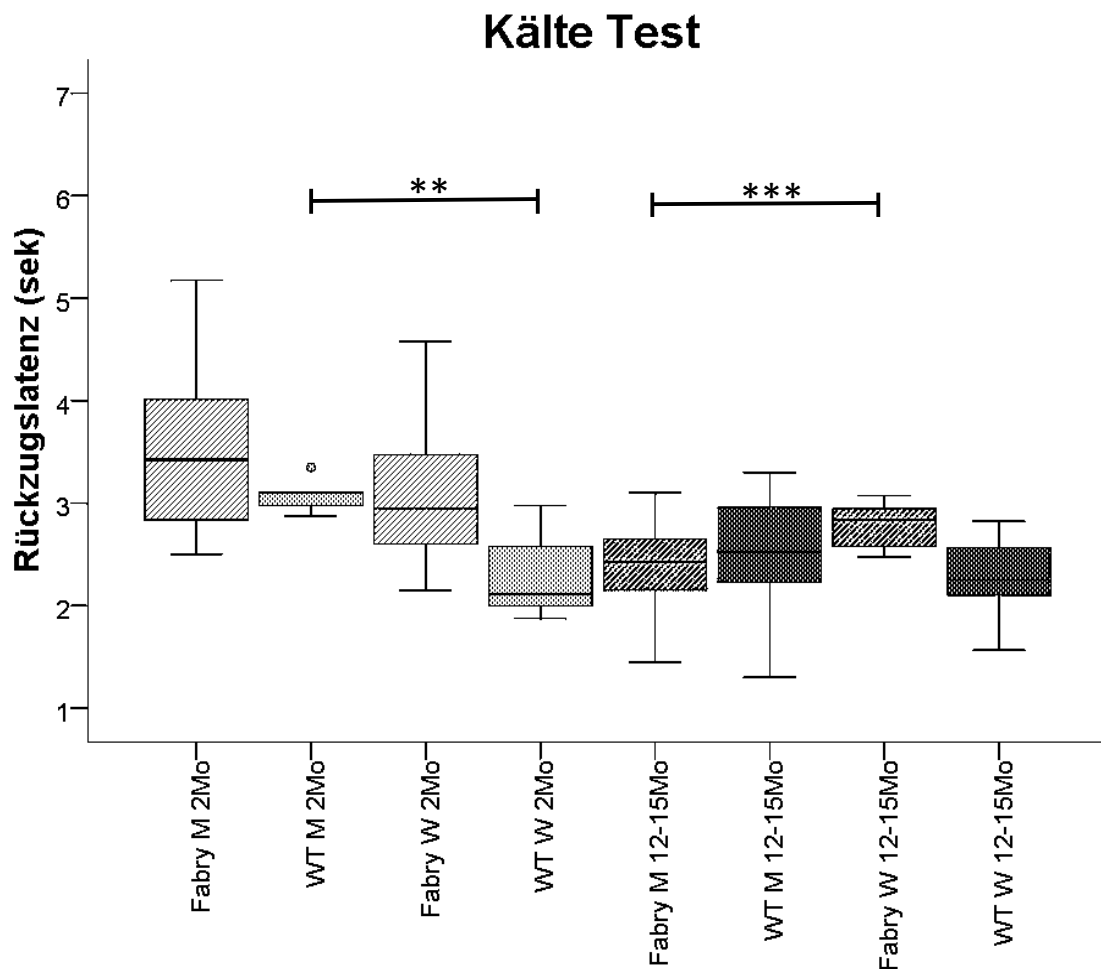


Abb. 6 Geschlechtsspezifischer Unterschied im Kälte-Test. Lediglich in alten Fabry-ko-Mäusen (** $p < 0,01$) und jungen litt-WT-Mäusen (** $p < 0,01$) zeigten sich Unterschiede im Verhalten der Geschlechter gegenüber einem Kälte-Stimulus.

3.2. Reduzierung der IENFD bei Fabry-ko-Mäusen

Insgesamt wurden Footpads von 79 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse untersucht. Es zeigte sich, dass Fabry-ko-Mäuse eine niedrigere IENFD aufwiesen als litt-WT-Mäuse (**Abb. 7, Abb. 8**). Bereits junge Fabry-ko-Mäuse besaßen gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen eine verminderte IENFD (**Abb. 7** *** $p < 0,001$, **Abb. 8a, b**). Diese verminderte Innervation der Epidermis reduzierte sich bei alten Fabry-ko-Mäusen verglichen mit jungen Fabry-ko-Mäusen nochmals deutlich (**Abb. 7**; *** $p < 0,001$, **Abb. 8 a, c**). Verglichen mit ihren Altersgenossen stellte sich in der Gruppe der 12 bis 15 Monate alten Fabry-ko-Mäusen eine signifikant verminderte IENFD dar (**Abb. 7**; *** $p < 0,001$, **Abb. 8 c, d**). In der Gruppe der litt-WT-Mäuse konnte ebenfalls eine altersabhängige

Rarefizierung der intraepidermalen Nervenfasern festgestellt werden (**Abb. 7**; $***p < 0,001$, **Abb. 8 b, d**). Bei einem Vergleich der Geschlechter zeigten lediglich weibliche 12 bis 15 Monate alte litt-WT-Mäuse gegenüber ihren männlichen Artgenossen eine verminderte IENFD ($**p < 0,01$); innerhalb der Fabry-ko-Gruppen konnte zwischen den Geschlechtern kein Unterschied nachgewiesen werden.

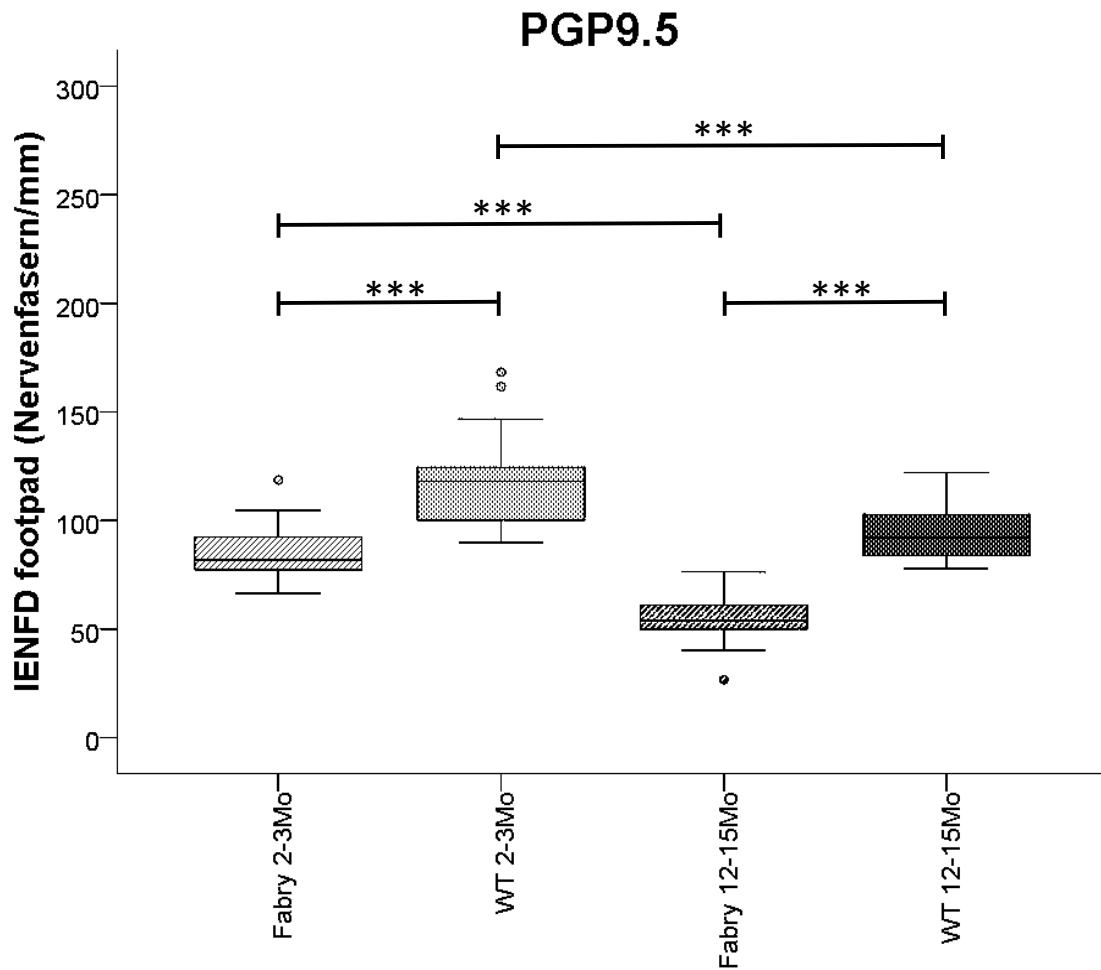


Abb. 7 Reduzierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) in Fabry-ko-Mäusen. Fabry-ko-Mäusen weisen eine Reduzierung der intraepidermalen Nervenfasern gegenüber litt-WT-Mäusen auf (2-3 Monate und 12-15 Monate $***p < 0,000$). Zusätzlich zeigte sich eine Verminderung der IENFD zwischen jungen und alten Mäusen (Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse $***p < 0,000$).

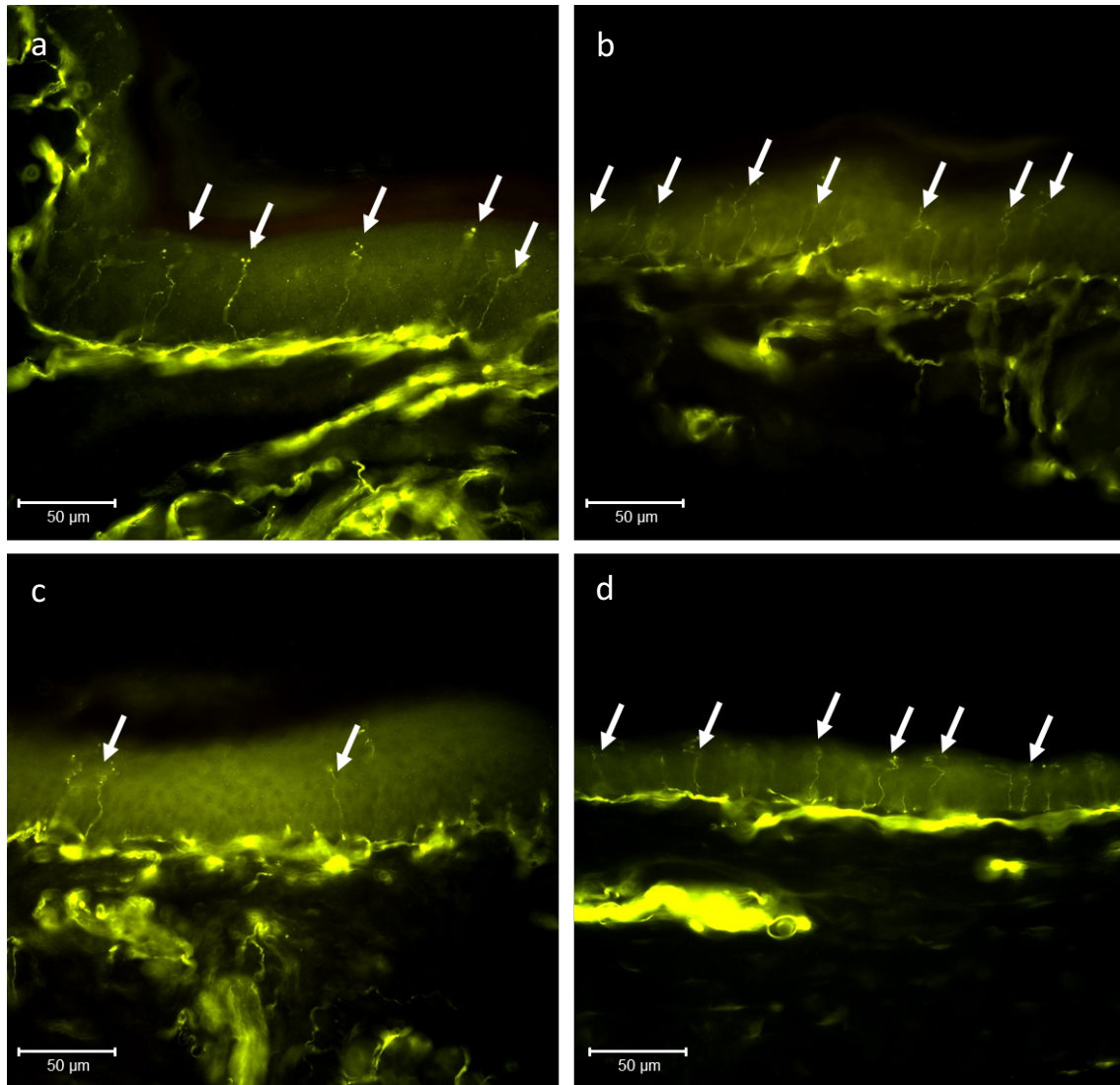


Abb. 8 Reduzierung der intraepidermalen Nervenfasern (IENFD) in Fabry-ko-Mäusen im Vergleich zu litt-WT-Mäusen: Darstellung der intraepidermalen Nervenfasern mittels PGP9.5 (gelb). Exemplarische Markierung der intraepidermalen Nervenfasern durch Pfeile. a) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, b) 3 Monate alte litt-WT-Maus, c) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, d) 12 Monate alte litt-WT-Maus.

3.3. Quantifizierbare Vergrößerung der neuronalen Fläche in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen

Zur Beurteilung der neuronalen Fläche wurden insgesamt 79 Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse untersucht (**Abb. 9**). Bereits junge Fabry-ko-Mäuse zeigten, im Gegensatz zu ihren altersadaptierten litt-WT-Mäusen vergrößerte Neurone (**Abb. 10**; ****p<0,01**). Diese Vergrößerung der neuronalen Fläche wies innerhalb der Fabry-ko-Mäuse eine altersabhängige Zunahme auf; so konnten bei 12-15 Monate alten Mäusen

gegenüber jungen Mäusen deutlich vergrößerte Neurone festgestellt werden (**Abb. 10**; *** $p=0,001$). Auch gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen zeigten 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse eine eindeutige Zunahme der Neuronenfläche (**Abb. 10**; *** $p<0,001$). Im Gegensatz zur Gruppe der Fabry-ko-Mäuse fand sich zwischen jungen und alten litt-WT-Mäusen kein Unterschied der neuronalen Fläche (**Abb. 10**; $p=0,258$). Im Vergleich der Geschlechter konnte ebenfalls kein Unterschied nachgewiesen werden.

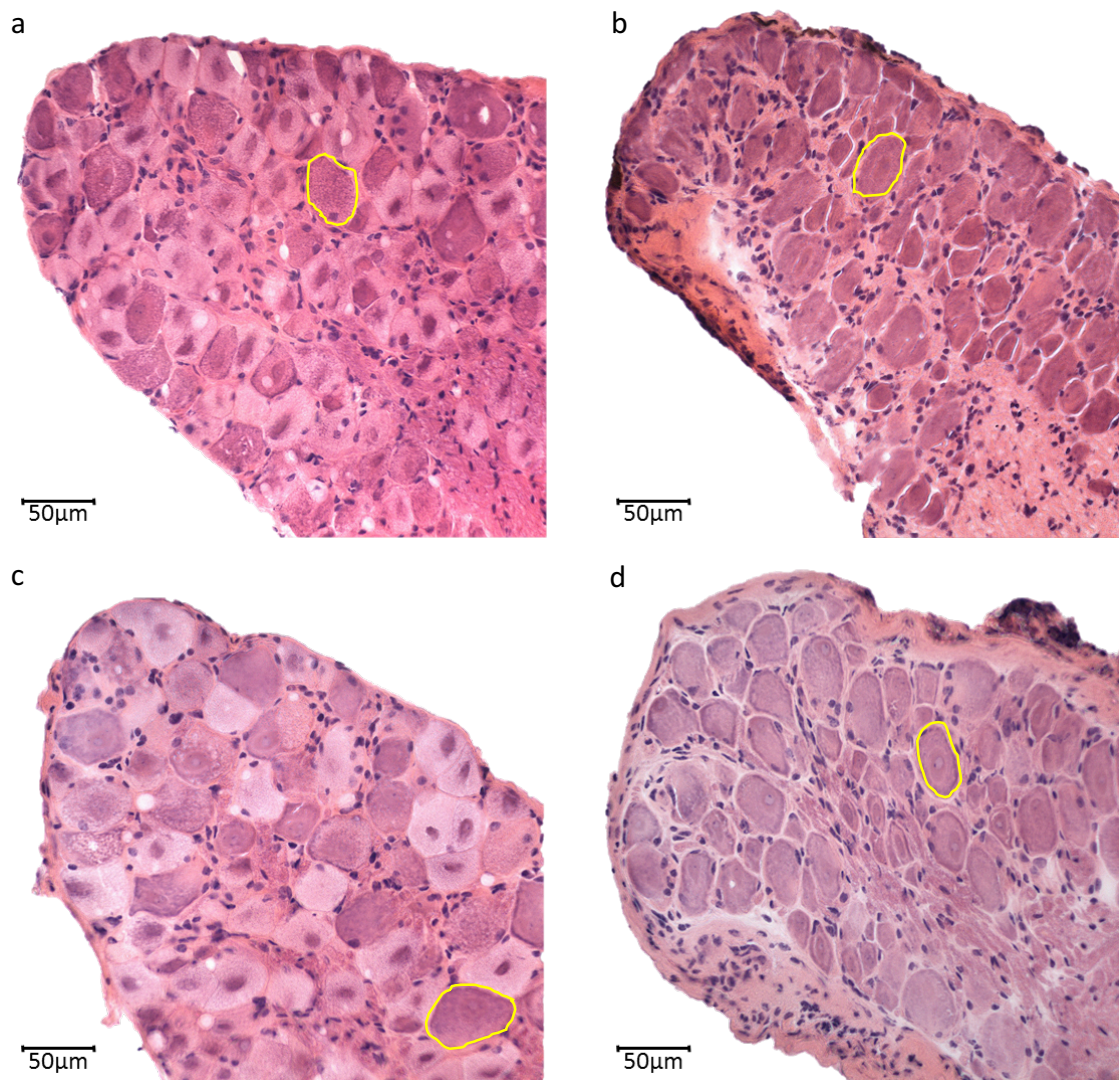


Abb. 9 Vergrößerte Neuronenfläche bei Fabry-ko-Mäusen im Vergleich zu litt-WT-Mäusen. Exemplarische Markierung der Neuronenfläche in gelb. a) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus; b) 3 Monate alte litt-WT-Maus, c) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus; d) 12 Monate alte litt-WT-Maus).

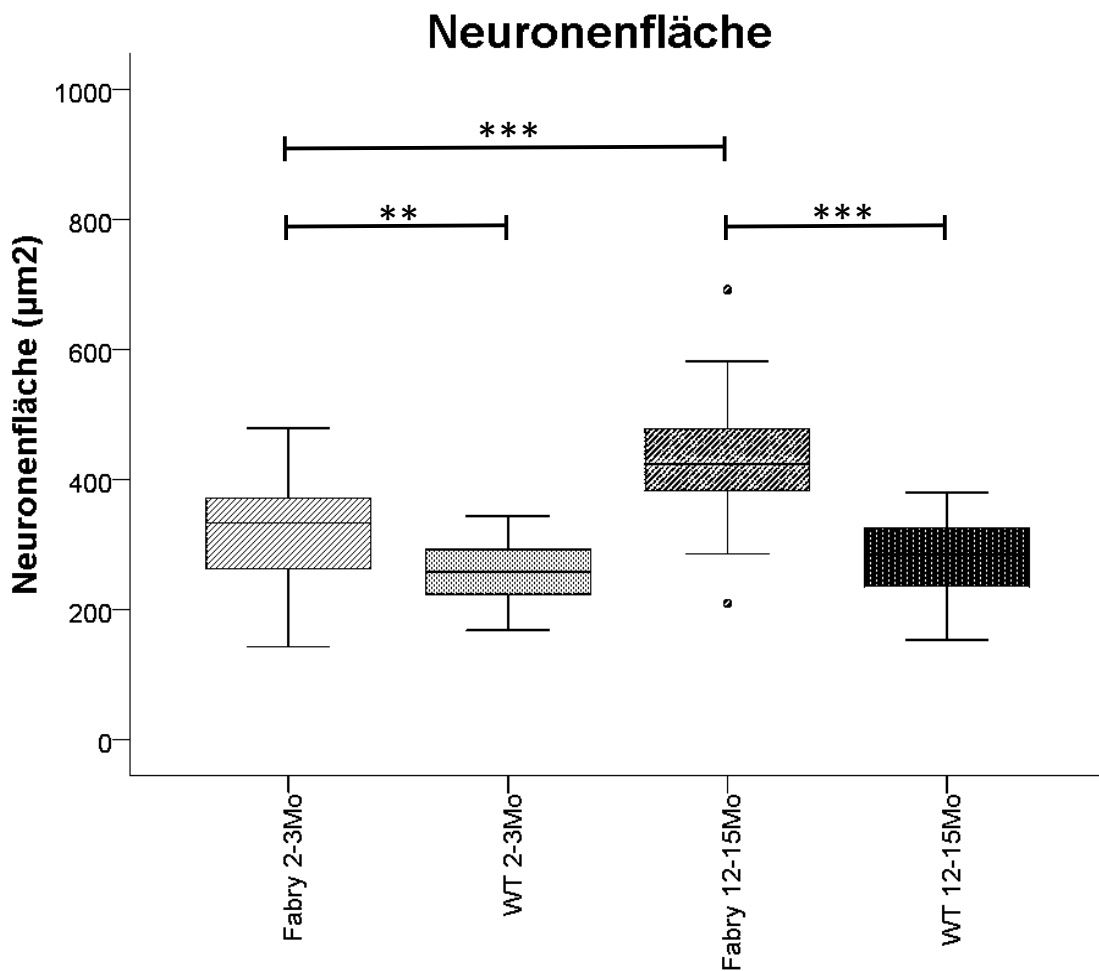


Abb. 10 Vergrößerung der neuronalen Fläche bei Fabry-ko-Mäusen. Es zeigte sich eine Vergrößerung der neuronalen Fläche sowohl zwischen jungen als auch alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen (2-3 Monate $**p < 0,05$; 12-15 Monate $***p < 0,001$). Zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen nahm die Neuronenfläche noch einmal zu ($***p < 0,001$).

3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Spinalganglien

3.4.1. Vermehrte Gb3-Ablagerungen in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen

Zur Quantifizierung von Gb3-Ablagerungen innerhalb der Spinalganglien erfolgten verschiedene CD77-Doppelfärbungen (**Abb. 11a-d**, s. Anhang **Abb. 25**, **Abb. 26**, **Abb. 27**, **Abb. 28**). Alle CD77-Fluoreszenzfärbungen zeigten eine Zunahme der CD77-

positiven Spinalganglienneurone bei Fabry-ko-Mäusen gegenüber altersgematchten litt-WT-Mäusen (**Abb. 11a-d**). Dabei zeigte sich, dass zwei bis drei Monate alte Fabry-ko-Mäuse gegenüber altersadaptierten litt-WT-Mäusen eine höhere Anzahl CD77-positiver Neurone innerhalb der Spinalganglien aufwiesen (**Abb. 11a** $***p<0,001$; **Abb. 11 b** $**p<0,01$; **Abb. 11c** $***p<0,001$; **Abb. 11d** $***p<0,001$). Diese erhöhte Anzahl bei Fabry-ko-Mäusen stieg in alten Fabry-ko-Mäusen, verglichen mit jungen Mäusen noch einmal eindeutig an (**Abb. 11a-d**; $***p<0,001$). Auch im Vergleich mit alten litt-WT-Mäusen zeigten 12 -15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse mehr CD77-immunreaktive Neurone in ihren Spinalganglien (**Abb. 11a-d**; $***p<0,001$). Auch alte litt-WT-Mäuse zeigten, verglichen mit jungen Mäusen eine Zunahme CD77-positiver Neurone (**Abb. 11a-d**; $***p<0,001$). Im Vergleich der CD77-Doppelfärbungen untereinander konnten Schwankungen der Deutlichkeit und somit der Anzahl der CD77-positiver Neurone festgestellt werden, was auf die Interaktion der verschiedenen Erstantikörper mit CD77 zurückzuführen ist. Dennoch zeigten sich in jeder Doppelfärbung eindeutige und gleichbleibende genotypische und altersabhängige Unterschiede (**Abb. 11**; $**p<0,01$ bis $***p<0,001$). Im Vergleich der Geschlechter konnte weder innerhalb der Fabry-ko- noch innerhalb der litt-WT-Mäuse ein Unterschied nachgewiesen werden.

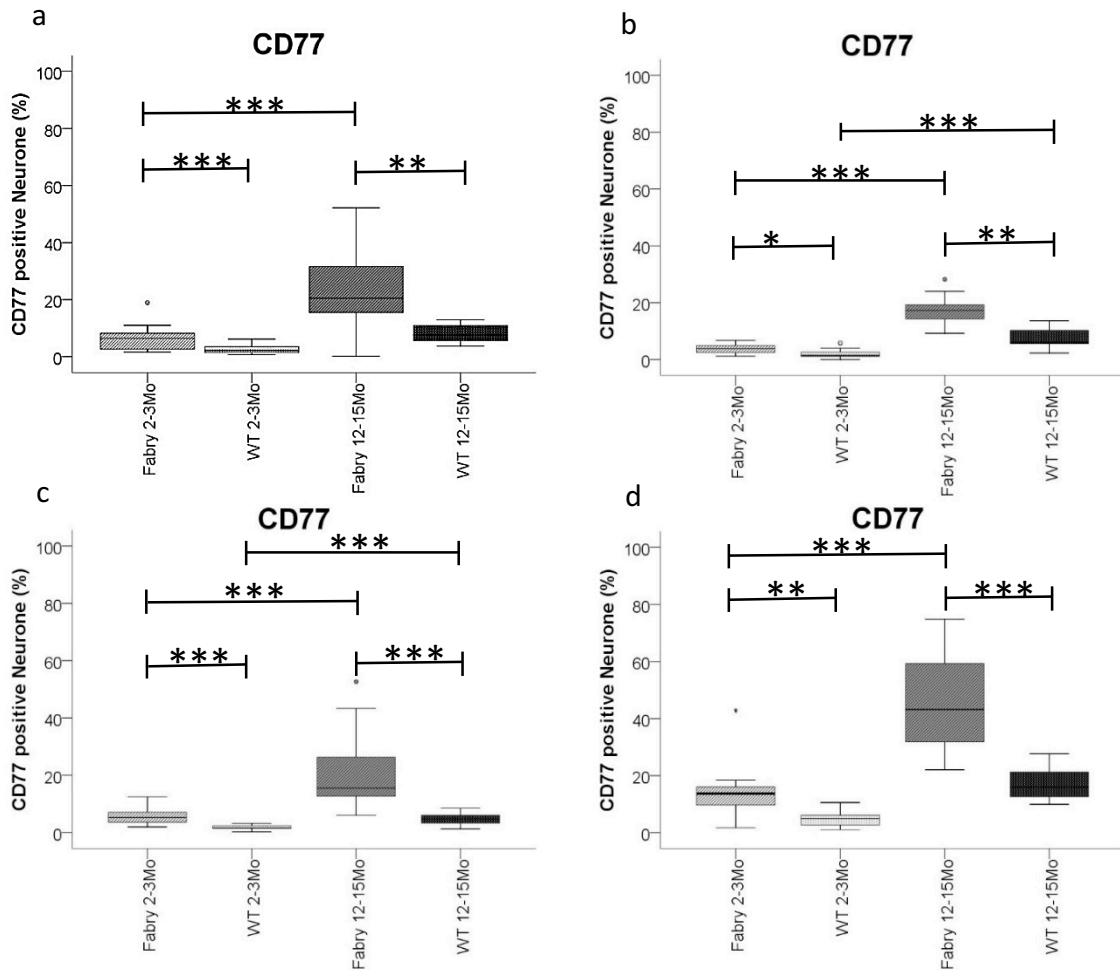


Abb. 11 Vermehrte Gb3-Ablagerungen bei Fabry-ko-Mäusen gegenüber litt-WT-Mäusen. In allen vier Doppelfärbungen konnten im Vergleich zu altersadaptierten litt-WT-Mäusen vermehrte Gb3-Ablagerungen in jungen und alten Fabry-ko-Mäusen nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine nochmalige Zunahme der Gb3-Ablagerungen zwischen jungen alten Fabry-ko-Mäusen gezeigt werden. Abb. 12a: TRPV1/CD77-Doppelfärbung ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$); Abb. 12b: Nav1.8/CD77-Doppelfärbung ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$); Abb. 12c: CGRP/CD77-Doppelfärbung ($***p < 0,001$); Abb. 12d: NF200/CD77-Doppelfärbung ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$).

3.4.2. Erhöhte Expression TRPV1-positiver Neurone bei Fabry-ko-Mäusen

Zum Vergleich der TRPV1-Expression zwischen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen wurden von insgesamt 75 Mäusen histologische Präparate der Spinalganglien verglichen (s. Anhang **Abb. 25**). Dabei konnte in der Gruppe der zwei bis drei Monate alten Fabry-ko-Mäuse eine vermehrte Expression TRPV1-positiver Neurone gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen festgestellt werden (**Abb. 12**; $***p < 0,001$). Diese vermehrte TRPV1-Expression bestand ebenso deutlich bei alten Fabry-ko-Mäusen verglichen mit ihren

litt-WT-Mäusen (**Abb. 12**; $***p < 0,001$). Es zeigte sich außerdem, dass mit steigendem Alter die Anzahl TRPV1-positiver Neurone in den Spinalganglien sowohl von Fabry-ko-Mäusen als auch von litt-WT-Mäusen signifikant anstieg (**Abb. 12**; Fabry-ko-Mäuse $***p < 0,001$; litt-WT-Mäuse $***p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte nicht festgestellt werden.

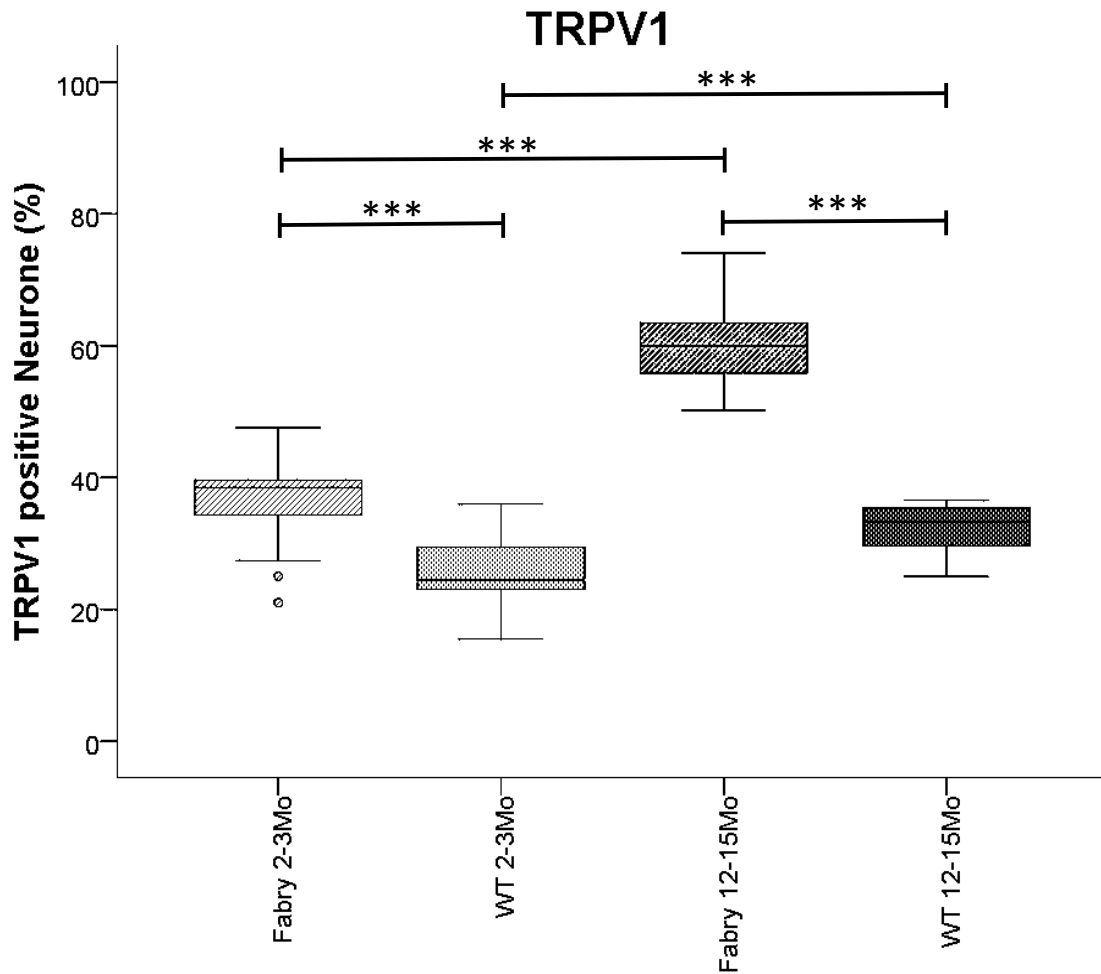


Abb. 12 Vermehrte Expression TRPV1-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen. Sowohl zwischen 2-3 Monate alten als auch 12-15 Monate alten Fabry-ko- und ihren litt-WT-Mäusen zeigte sich eine vermehrte TRPV1-Expression in den Spinalganglien ($***p < 0,001$). Ebenso bestand eine deutlich verstärkte TRPV1-Expression in alten Fabry-ko- bzw. litt-WT-Mäusen gegenüber ihren jungen Artgenossen ($***p < 0,001$).

3.4.2.1. Kein Genotypunterschied in der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone

Zur Feststellung eines Genotyp-spezifischen Zusammenhangs zwischen der Anzahl TRPV1- und CD77-positiver Neurone erfolgte eine Korrelationsuntersuchung. Hier

zeigte sich in der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone kein Genotypunterschied (**Abb. 13, Tabelle 14**). In beiden Gruppen konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl positiver TRPV1- und CD77-Neurone festgestellt werden. So zeigte sich bei der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen ein Spearman-Korrelationskoeffizient von 0,654 (**Abb. 14**) und in litt-WT-Mäusen ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,696 (**Tabelle 15**).

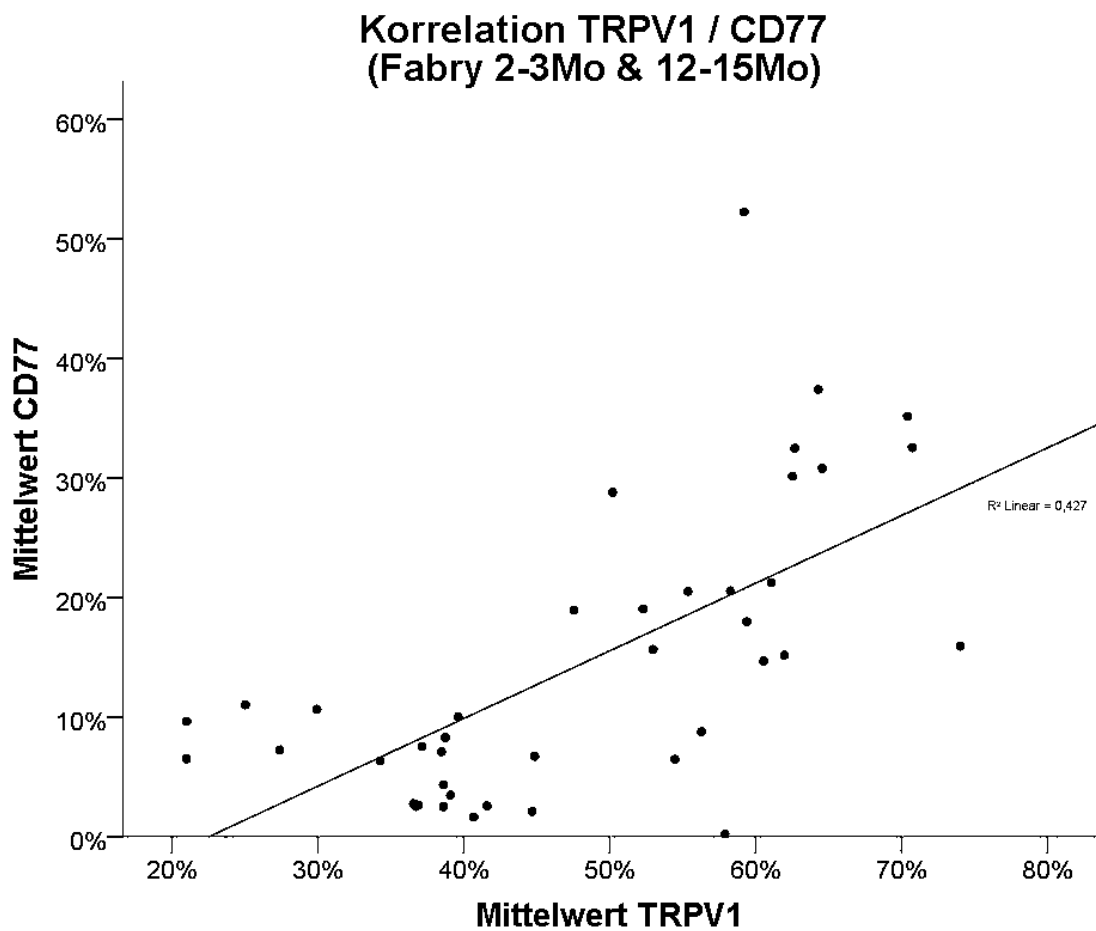


Abb. 13 Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen

Tabelle 14 Spearman-Korrelationskoeffizient der TRPV1- und CD77-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen

| Korrelationen | | | Mean TRPV1 | Mean CD77 |
|---------------|------------|-------------------------|------------|-----------|
| Spearman-Rho | Mean TRPV1 | Korrelationskoeffizient | 1,000 | ,654** |
| | | Sig. (2-seitig) | . | ,000 |
| | | N | 41 | 41 |
| | Mean CD77 | Korrelationskoeffizient | ,654** | 1,000 |
| | | Sig. (2-seitig) | ,000 | . |
| | | N | 41 | 41 |

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

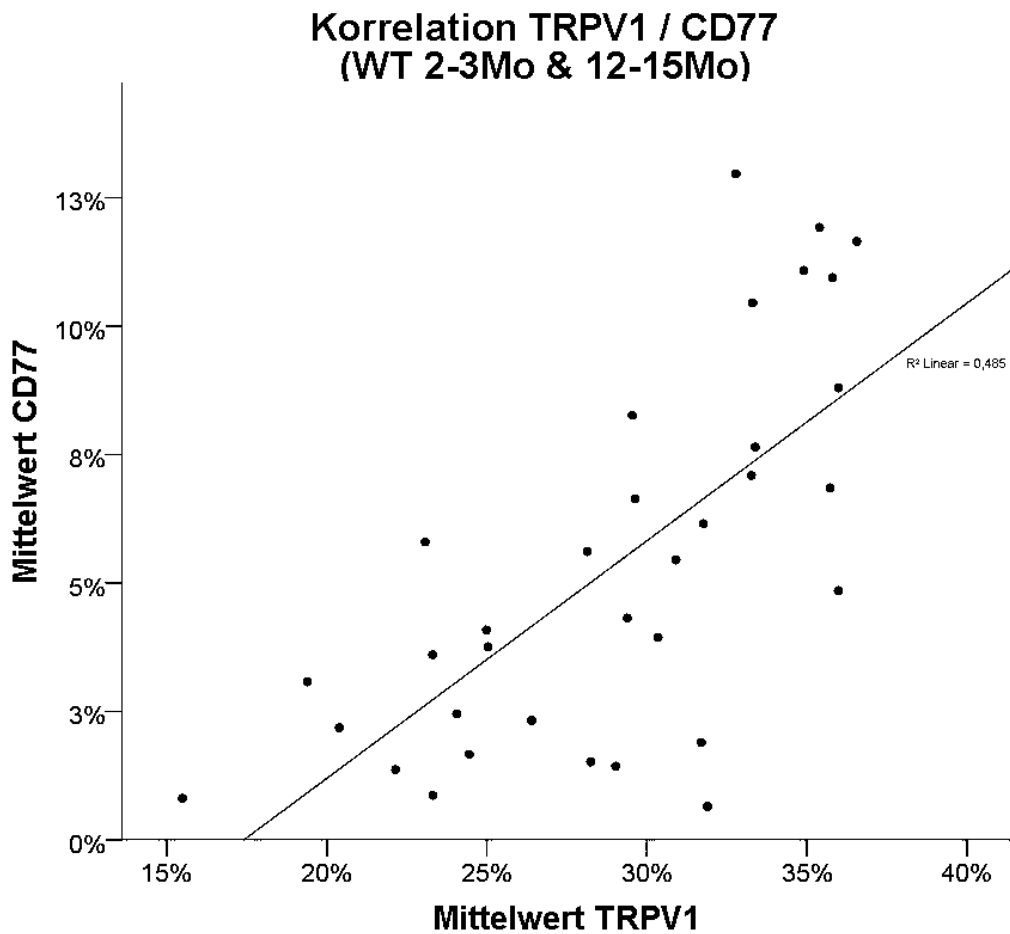


Abb. 14 Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in litt-WT-Mäusen

Table 15 Pearson-Korrelationskoeffizient der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in litt-WT-Mäusen

| | | Mean CD77 | Mean TRPV1 |
|------------|--------------------------|-----------|------------|
| Mean CD77 | Korrelation nach Pearson | 1 | ,696** |
| | Signifikanz (2-seitig) | | ,000 |
| | N | 34 | 34 |
| Mean TRPV1 | Korrelation nach Pearson | ,696** | 1 |
| | Signifikanz (2-seitig) | ,000 | |
| | N | 34 | 34 |

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

3.4.3. *Kein Unterschied bei der Expression Nav1.8-positiver Neurone zwischen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen sowie keine Genotyp-spezifische Korrelation Nav1.8- und CD77-positiver Neurone*

Für die Auswertung der Nav1.8-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen wurden insgesamt 62 Mäuse ausgewertet und verglichen (s. Anhang **Abb. 26**). In dieser Untersuchung zeigte sich weder zwischen jungen noch zwischen alten Fabry-ko-Mäusen und ihren litt-WT-Altersgenossen ein Unterschied in der Anzahl Nav1.8-positiver Neurone (**Abb. 15**; 2-3 Monate $p=0,816$; 12-15 Monate $p=0,185$). Im Vergleich der unterschiedlichen Altersgruppen der Genotypen konnte lediglich zwischen jungen und alten litt-WT-Mäusen eine Zunahme der Nav1.8-Expression festgestellt werden (**Abb. 15**; $*p<0,05$). Dagegen zeigte sich zwischen zwei bis drei Monate und 12-15 Monate alten Fabry-ko-Mäusen kein Unterschied (**Abb. 15**; $p=0,152$).

In einer Korrelationsuntersuchung zwischen der Anzahl Nav1.8- und CD77-positiver Neurone, konnte keine Genotyp-spezifische Korrelation nachgewiesen werden. Innerhalb der Fabry-ko-Mäuse zeigte sich ein Pearson-Korrelationskoeffizient von

0,249, welcher lediglich auf eine vernachlässigbare positive Korrelation beider AK hinwies. Im Vergleich dazu ergab die Korrelation innerhalb der litt-WT-Mäuse einen Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,003, was einer fehlenden Korrelation innerhalb dieser Genotyp- Gruppe entspricht.

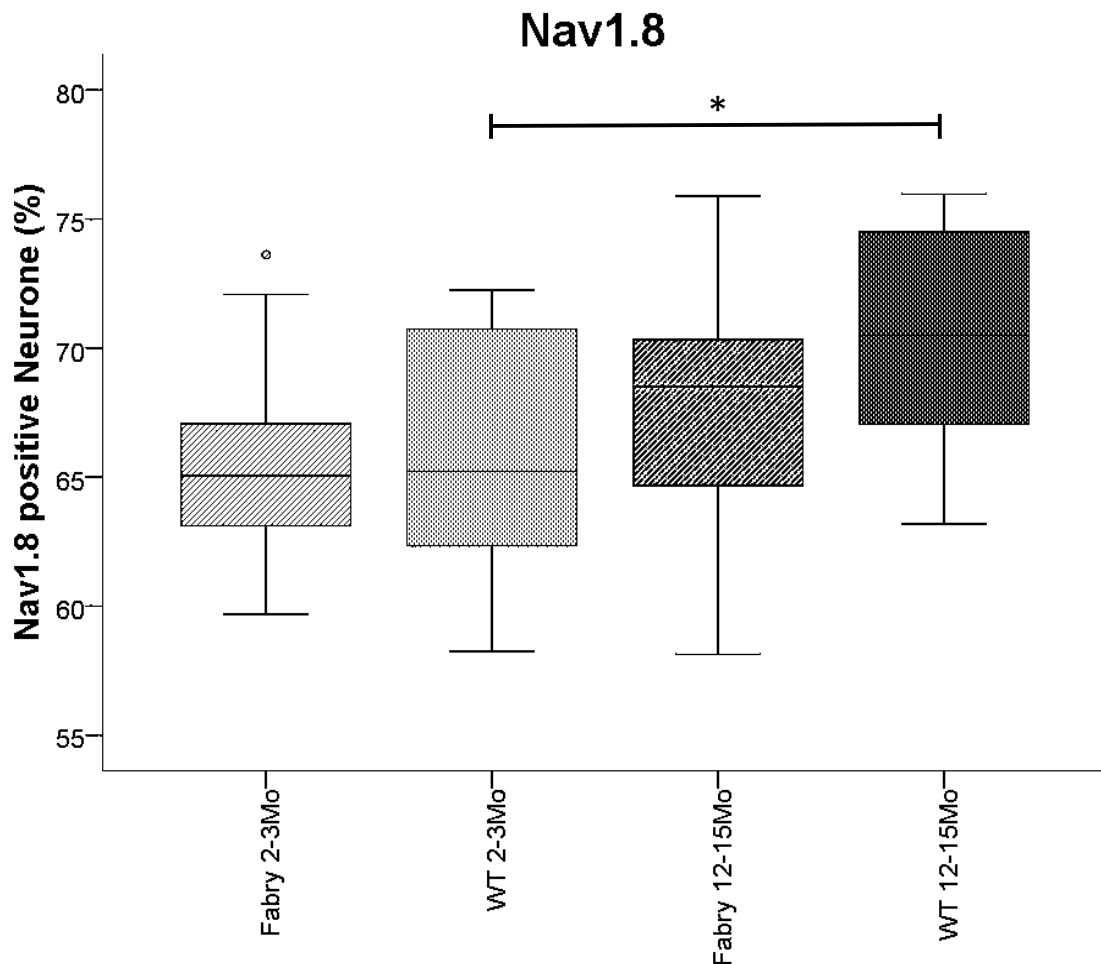


Abb. 15 Kein Unterschied in Expression Nav1.8-positiver Neurone bei Fabry-ko-Mäusen. Sowohl zwischen jungen als auch alten Fabry-ko-Mäusen und altersadaptierten litt-WT-Mäusen konnte kein Unterschied in der Expression $Na_v1.8$ -positiver Neurone festgestellt werden. Lediglich in der Gruppe der litt-WT-Mäuse zeigten alte Mäuse gegenüber jungen Artgenossen eine Zunahme der $Na_v1.8$ -Expression (* $p < 0,05$).

3.4.4. Verminderte Anzahl CGRP-positiver Neurone bei alten Fabry-ko-Mäuse. Keine Genotyp-spezifische Korrelation zwischen CGRP und CD77

79 Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse wurden hinsichtlich der CGRP-Expression ihrer Spinalganglien miteinander verglichen (s. Anhang **Abb. 27**). Dabei zeigte sich in der Gruppe der zwei bis drei Monate alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen kein Unterschied in der Anzahl CGRP-positiver Neurone (**Abb. 16**; $p=0,570$). Dagegen konnte in alten Fabry-ko-Mäusen gegenüber ihren litt-WT-Mäusen eine Reduzierung der CGRP-positiven Neurone festgestellt werden (**Abb. 16**; $*p<0,05$). Innerhalb der Genotypen zeigten alte Fabry-ko-Mäuse verglichen mit jungen Mäusen, eine Zunahme der CGRP-positiven Neurone (**Abb. 16**; $**p<0,01$); dieser altersspezifische Unterschied konnte ebenfalls in der Gruppe der litt-WT-Mäuse nachgewiesen werden (**Abb. 16**; $***p<0,001$.)

Bei der Untersuchung einer möglicherweise bestehenden Genotyp-spezifischen Korrelation zwischen CGRP- und CD77-positiven Neuronen, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Sowohl innerhalb der Fabry-ko-Mäuse (Spearman-Korrelationskoeffizient 0,322) als auch der litt-WT-Mäuse (Pearson-Koeffizient 0,380) konnte eine positive, jedoch nicht Genotyp-spezifische Korrelation zwischen CGRP und CD77-positiven Neuronen nachgewiesen werden.

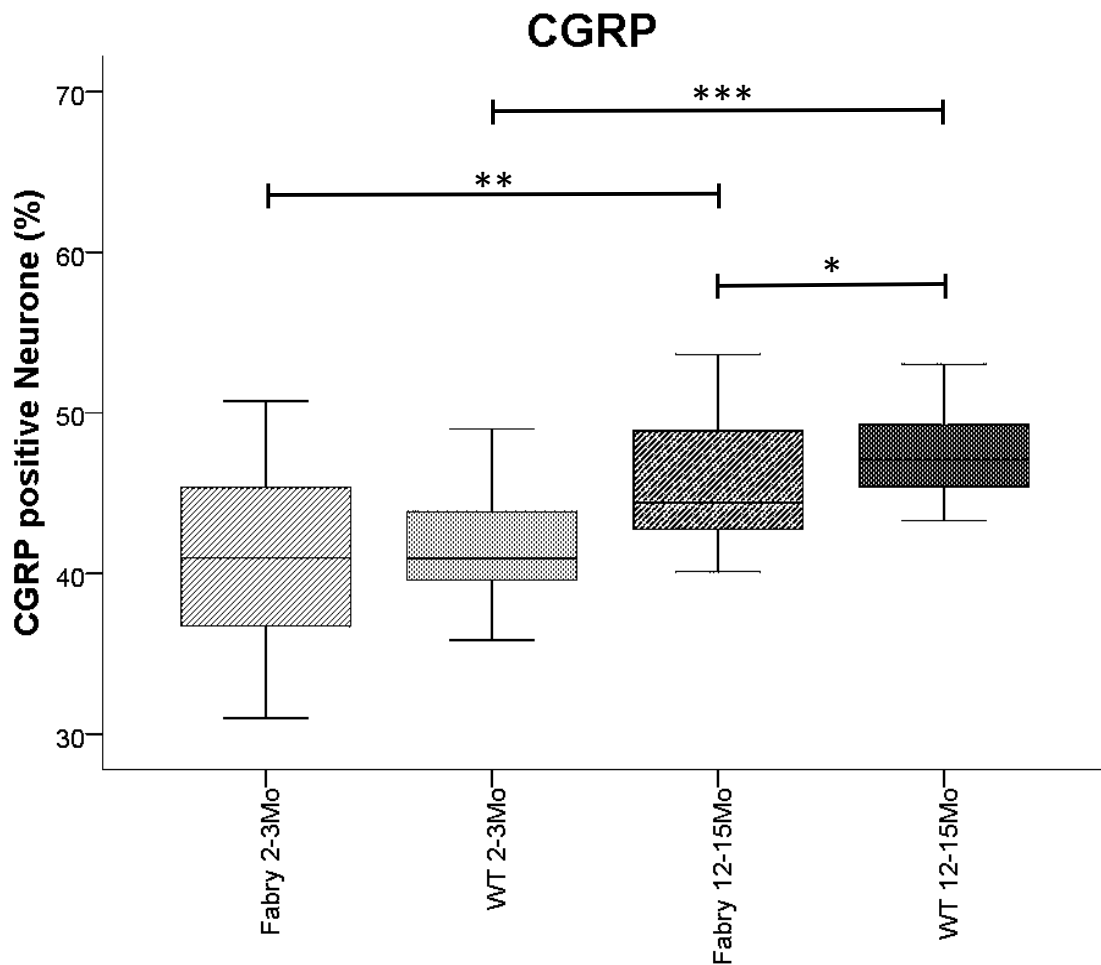


Abb. 16 Verminderte Anzahl CGRP-positiver Neurone in alten Fabry-ko-Mäusen. Alte Fabry-ko-Mäuse wiesen weniger CGRP-positiver Neurone auf als altersentsprechende litt-WT-Mäuse (* $p < 0,05$). Zwischen jungen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen zeigte sich kein Unterschied. Junge Mäuse zeigten in beiden Gruppen gegenüber ihren älteren Artgenossen eine Abnahme CGRP-positiver Neurone (Fabry-ko-Mäuse ** $p < 0,01$; litt-WT-Mäuse *** $p < 0,001$).

3.4.5. Reduzierung der NF200-Expression bei Fabry-ko-Mäusen, jedoch keine Genotyp-spezifische Korrelation zwischen NF200 und CD77

Bei insgesamt 70 Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen wurde die Anzahl NF200-positiver Neurone in Spinalganglien untersucht (s. Anhang **Abb. 28**). Hierbei zeigte sich, dass zwei bis drei Monate alte Fabry-ko-Mäuse weniger NF200-positiver Neurone besitzen als litt-WT-Mäuse in diesem Alter (**Abb. 17**; *** $p < 0,001$). Diese Verminderung der NF200-Expression zeigte innerhalb der Fabry-ko-Mäuse altersabhängig eine

zunehmende Reduzierung. So wiesen 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse eine niedrigere Anzahl NF200-positiver Neurone auf als junge Fabry-ko-Mäuse (**Abb. 17**; *** $p=0,001$). Auch im Vergleich zu altersadaptierten litt-WT-Mäusen zeigten 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse eine verminderte NF200-Expression (**Abb. 17**; *** $p<0,001$). Auch innerhalb der litt-WT-Mäuse wiesen 12-15 Monate alte gegenüber 2-3 Monate alte Mäuse eine Reduzierung NF200-positiver Neurone auf (**Abb. 17**; *** $p<0,001$).

Entsprechend der obigen Färbungen wurde auch hier eine Untersuchung auf eine eventuell bestehende Korrelation durchgeführt. Es zeigte sich, dass innerhalb beider Genotyp-Gruppen eine negative Korrelation zwischen NF200 und CD77 besteht (**Abb. 29, Abb. 30**). So wiesen Fabry-ko-Mäuse einen Spearman-Korrelationskoeffizienten von -0,472, litt-WT-Mäuse einen Pearson-Korrelationskoeffizienten von -0,624 auf (**Abb. 29, Abb. 30**). Diese Ergebnisse deuten auf eine bestehende negative, jedoch Genotypen-unabhängige Korrelation NF200- und CD77-positiver Neurone hin.

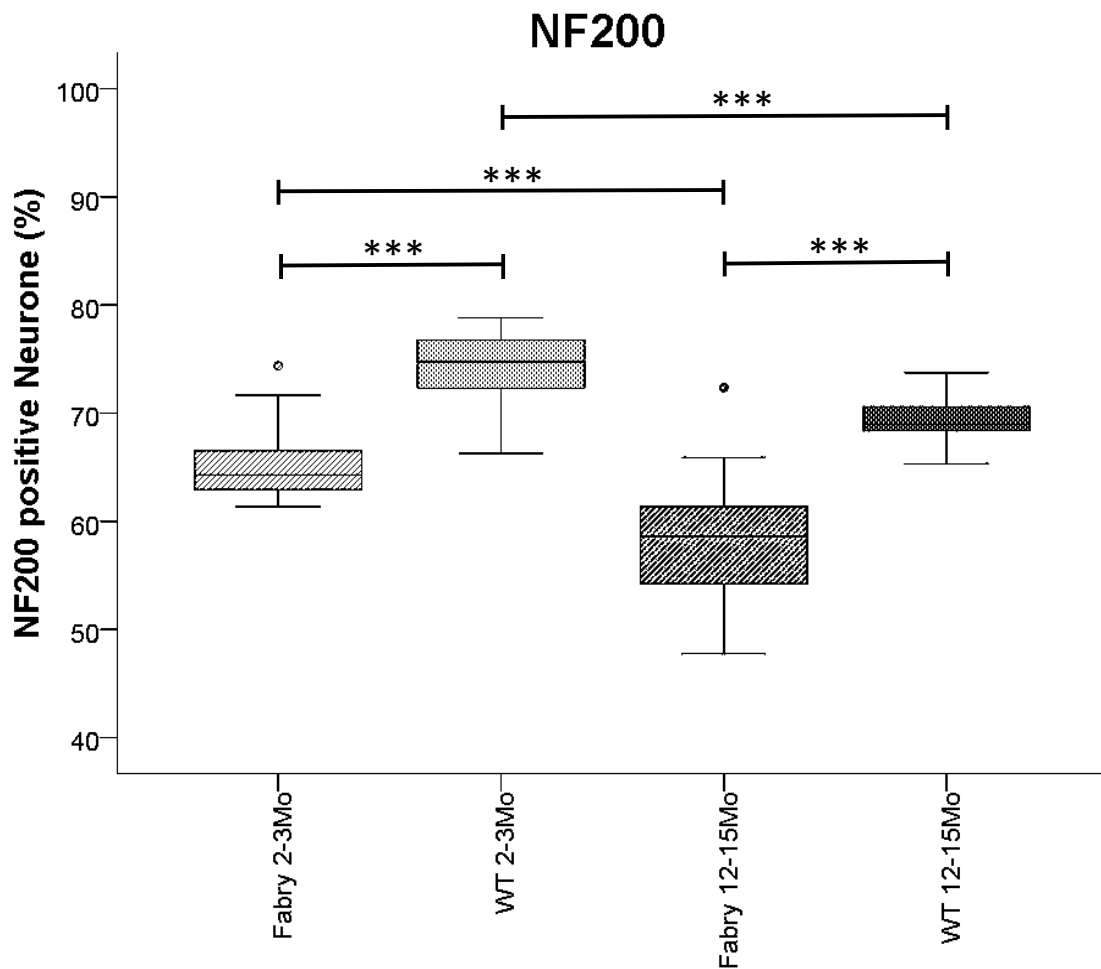


Abb. 17 Verminderung der NF200-positiven Neuronen bei Fabry-ko-Mäusen. Fabry-ko-Mäuse zeigten gegenüber litt-WT-Mäusen eine Reduzierung der NF200-Expression in Spinalganglien (** $p < 0,000$). Mit zunehmendem Alter bestand bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen eine weitere Verminderung NF200-positiver Neurone im Vergleich zu jungen Artgenossen (** $p < 0,000$).

3.4.6. Erhöhte Anzahl IB4-positiver Neurone bei Spinalganglien von jungen Fabry-ko-Mäusen

Die Untersuchung auf eine Veränderung der Anzahl IB4-positiver Neurone konnte nur an 15 2-3 Monate alten Fabry-ko- (6 Männchen, 3 Weibchen) und litt-WT-Mäusen (3 Männchen, 2 Weibchen) durchgeführt werden. Die Färbung an Gewebe älterer Mäuse war aus technischen Gründen nicht erfolgreich, weswegen hier nur die Ergebnisse der jungen Mäuse präsentiert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass junge Fabry-ko-Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen litt-WT-Mäusen deutlich mehr IB4-positiv Neurone aufwiesen (**Abb. 18**; ** $p < 0,001$).

Zwischen den Geschlechtern konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

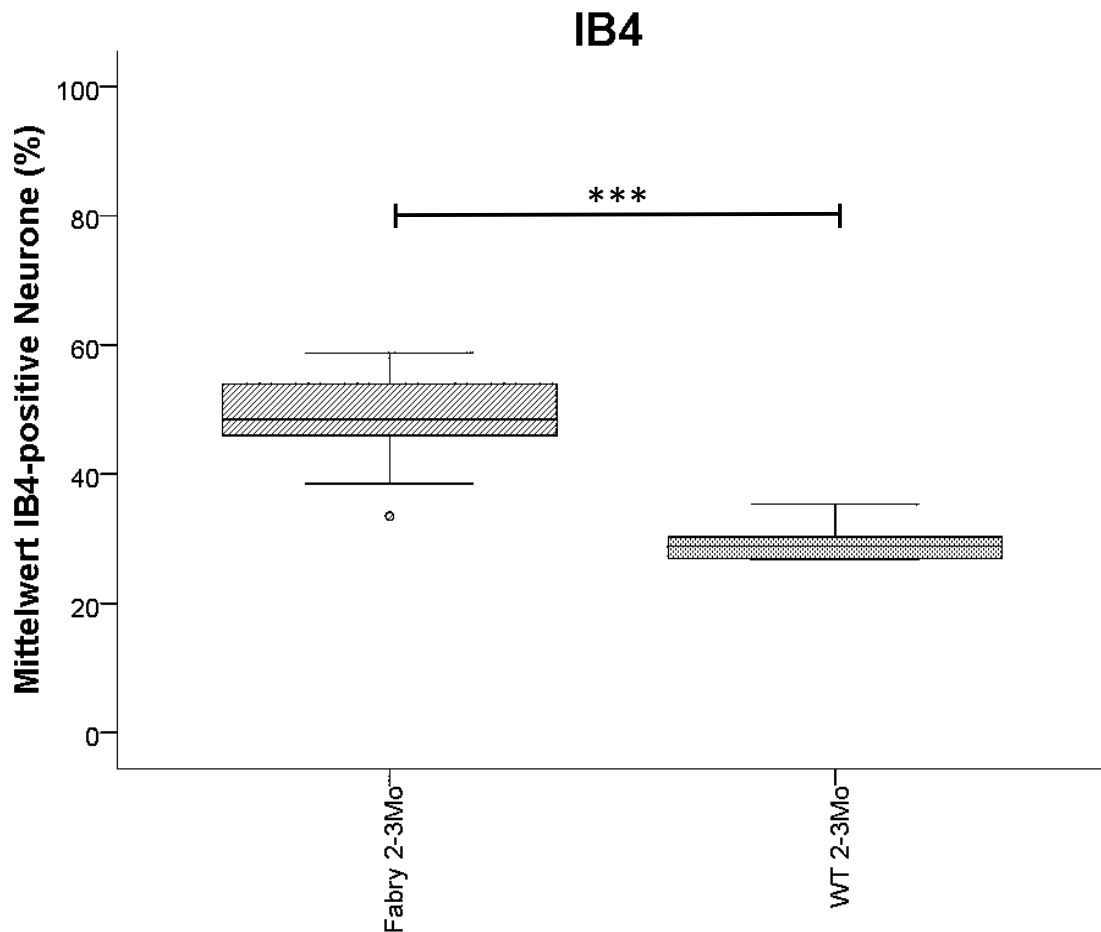


Abb. 18 Vermehrte Expression IB4-positiver Neurone in jungen Fabry-ko-Mäusen gegenüber altersadaptierten litt-WT-Mäusen. Junge Fabry-ko-Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl IB4-positiver Neurone gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen auf (** $p < 0,001$).

3.5. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

Aufgrund ihres Aktivierungsmusters und der durch sie ausgelösten Schmerzformen, wurde neben der immunhistochemischen Expression auch die Genexpression von TRPV1 und Nav1.8 untersucht.

3.5.1. TRPV1-Genexpression bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen

Zur Untersuchung der Genexpression von TRPV1 wurden je sieben 2-3 Monate und 12-13 Monate alte Fabry-ko-Mäuse sowie je sechs 2-3 Monate und 12-13 Monate alte litt-WT-Mäuse untersucht. In der Auswertung ergab sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen (**Abb. 19**). Weder zwischen jungen noch zwischen alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen konnte ein Unterschied in der Genexpression von TRPV1 nachgewiesen werden. Auch innerhalb der Gruppen zeigte sich keine altersabhängige Veränderung (**Abb. 19**).

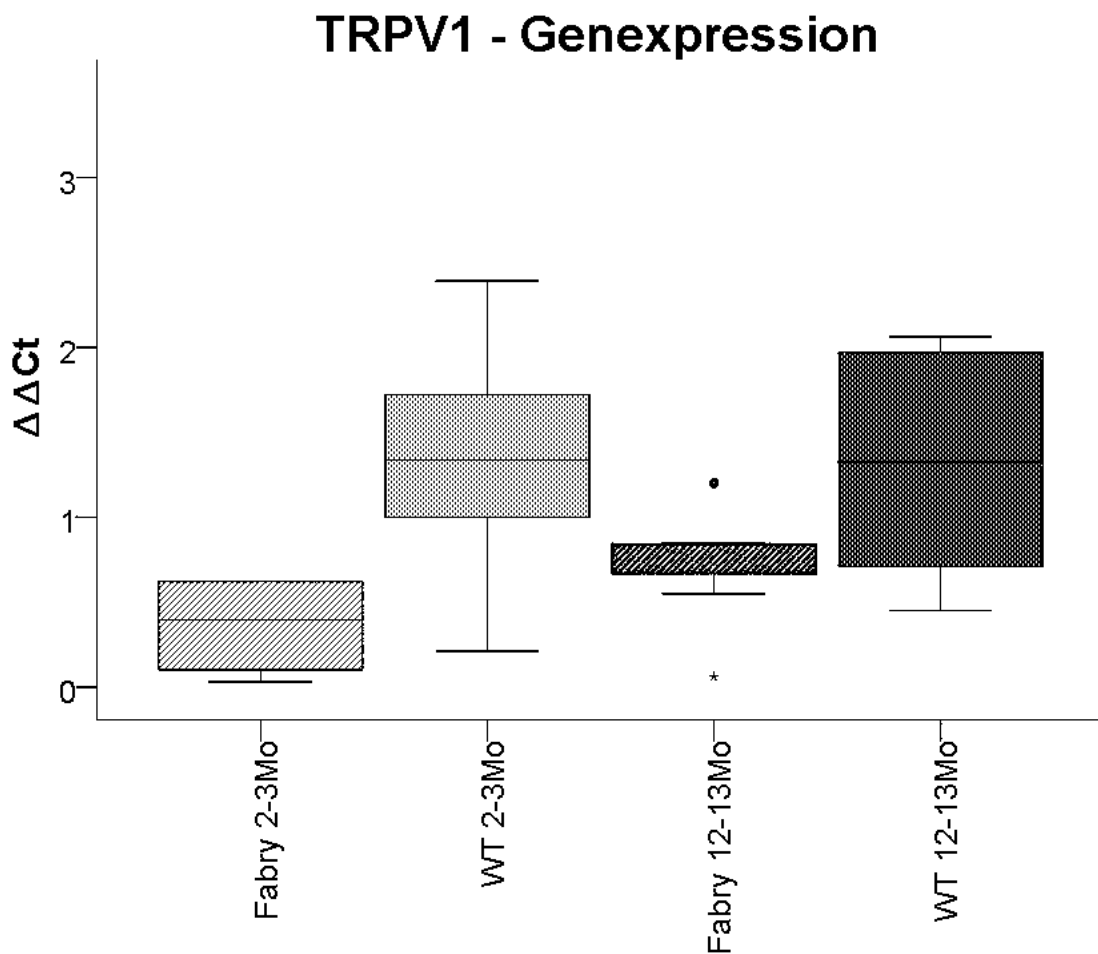


Abb. 19 TRPV1-Genexpression in Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen. Kein Unterschied der Genexpression von TRPV1 sowohl zwischen 2-3 Monate alte Fabry-ko—und altersentsprechenden litt-WT-Mäuse als auch zwischen 12-15 Monate alten Fabry-ko- und altersadaptierten litt-WT-Mäusen.

3.5.2. *Na_v 1.8-Genexpression bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen*

Die Genexpression von Na_v1.8 wurde an insgesamt 23 Mäusen gemessen. Es wurden sechs junge litt-WT- und fünf junge Fabry-ko-Mäuse sowie je sechs 12-13 Monate alte Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse untersucht. In der Gruppe der 2-3 Monate alten Mäuse zeigten Fabry-ko-Mäuse gegenüber altersadaptierten litt-WT-Mäusen eine verminderte Na_v1.8-Genexpression (**Abb. 20**, *p<0,05). Im Gegensatz dazu konnte zwischen 12-13 Monate alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen kein Unterschied in der Genexpression von Na_v1.8 festgestellt werden (**Abb. 20**). Auch konnte weder in der Gruppe der Fabry-ko- noch in der der litt-WT-Mäuse ein altersabhängiger Unterschied nachgewiesen werden (**Abb. 20**).

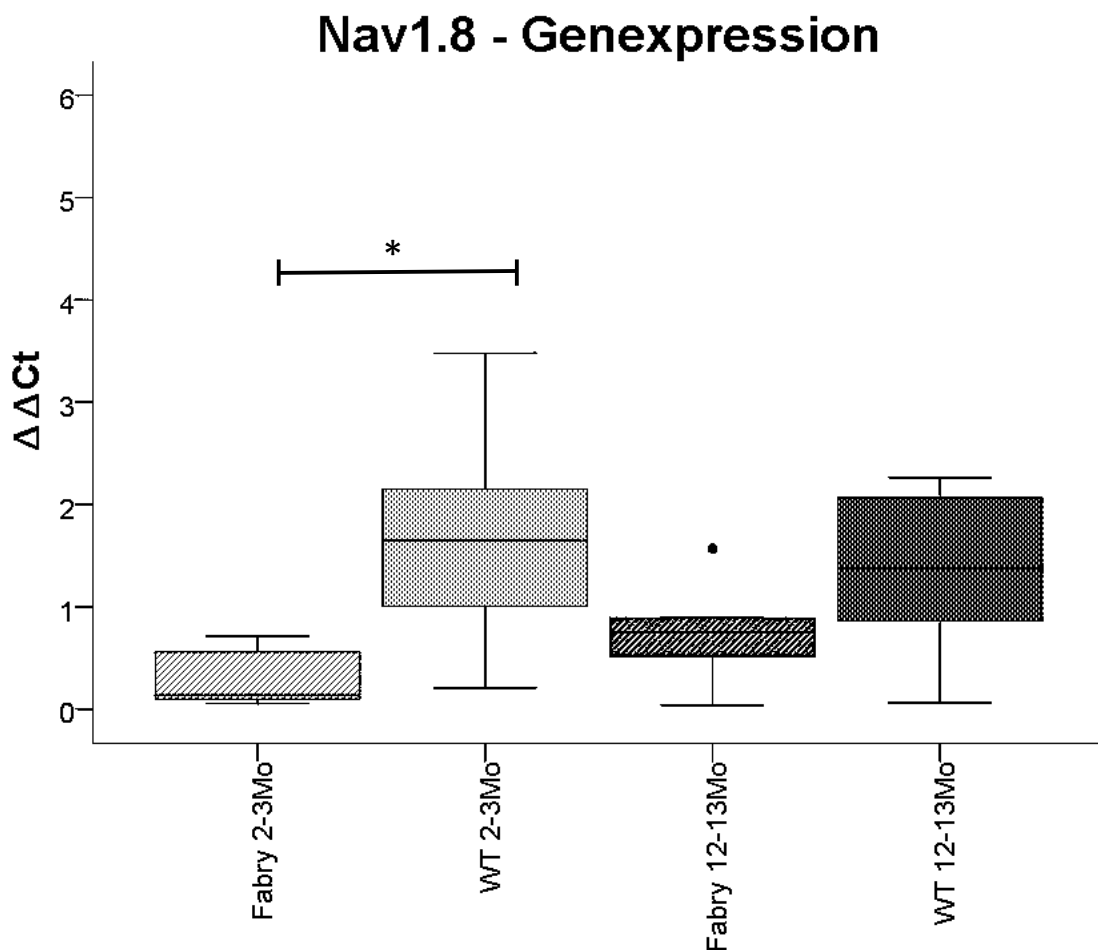


Abb. 20 Verminderte Na_v 1.8-Genexpression in jungen Fabry-ko-Mäusen. Junge Fabry-ko-Mäuse zeigen gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen eine verminderte Na_v 1.8-Genexpression. In der Gruppe der alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Weiterhin ergab sich

kein altersabhängiger Unterschied der Genexpression von $Na_v 1.8$ in der Gruppe der Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse.

3.6. Ergebnisse Neuronenkultur

3.6.1. Erfolgreiche Etablierung einer Neuronenkultur aus Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen

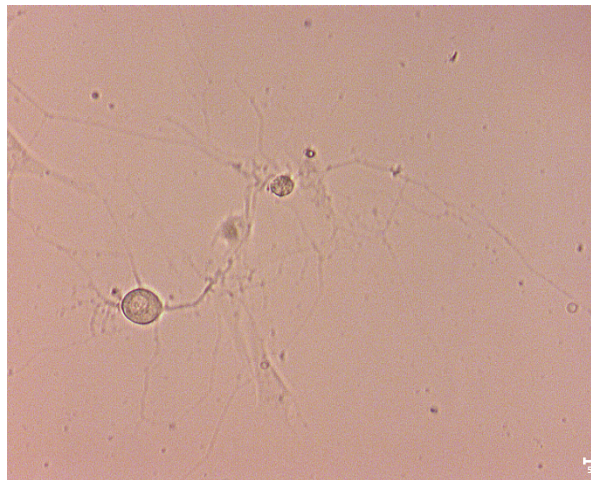


Abb. 21 Neuron in der Neuronenkultur einer Fabry-ko-Maus

Alle Kulturen wurden wie unter 2.9.1 beschrieben, nach einem Protokoll der Yale Universität (freundliche Überlassung durch Dr. S. Dib-Hajj) angelegt ((Dib-Hajj et al. 2009). Nach einigen Versuchen erwies sich eine Anzahl von ca. 15 Spinalganglien als ideal für die Neuronenkultur. Innerhalb weniger Tage zeigte sich neben dem Wachstum von Satellitenzellen auch ein deutliches Neuronen- und Axonenwachstum (**Abb. 21**). Eine Vitalitätsfärbung der Zellsuspension ergab 97% lebende Zellen. Aufgrund der kurzen Wachstumsdauer und der eventuellen Absaugung neuronaler Zellen, wurde entgegen anderer Protokolle auf das Wechseln des Mediums verzichtet. Insgesamt wurden pro Tier 12 Cover slips verwendet. Pro Cover slip konnten max. 5-10 Neurone nachgewiesen werden.

3.6.2. Keine aussagekräftigen Färbeversuche an Neuronenkulturen aus Spinalganglien

Um Aussagen der neuronalen Expression verschiedener u.a. Schmerz-assoziiertes Kanäle *in vitro* anhand von Neuronenkulturen treffen zu können, mussten diese Färbungen zunächst etabliert werden. Dazu erfolgte im ersten Schritt mit Hilfe von PGP9.5 eine Identifizierung bzw. Abgrenzung von Neuronen gegenüber glialen Satellitenzellen (**Abb. 22**).

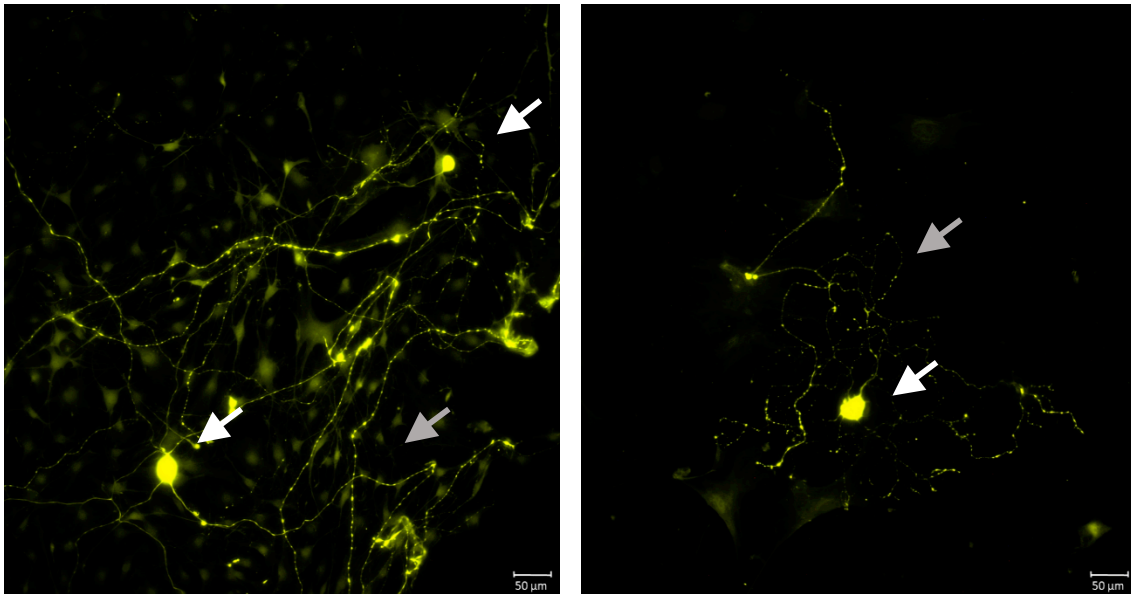


Abb. 22 Darstellung kultivierter Neurone mittels PGP 9.5-Färbung. a) litt-WT-Maus; b) Fabry-ko-Maus. Weißer Pfeil: Markierung der Neurone. Grauer Pfeil: Exemplarische Darstellung von Axonen.

Um diese neuronale Identifizierung während der Etablierungsphase beizubehalten, wurden alle weiteren Färbungen als Doppelfärbungen mit PGP9.5 durchgeführt. Es folgten Färbeversuche mit CD77, CGRP (**Abb. 23**), TRPV1 (**Abb. 24**) und Nav1.8. Für eine zusätzliche Kernfärbung und bessere Identifizierung von Zellen erfolgte zusätzlich die Färbung mit DAPI (s. 2.9.3).

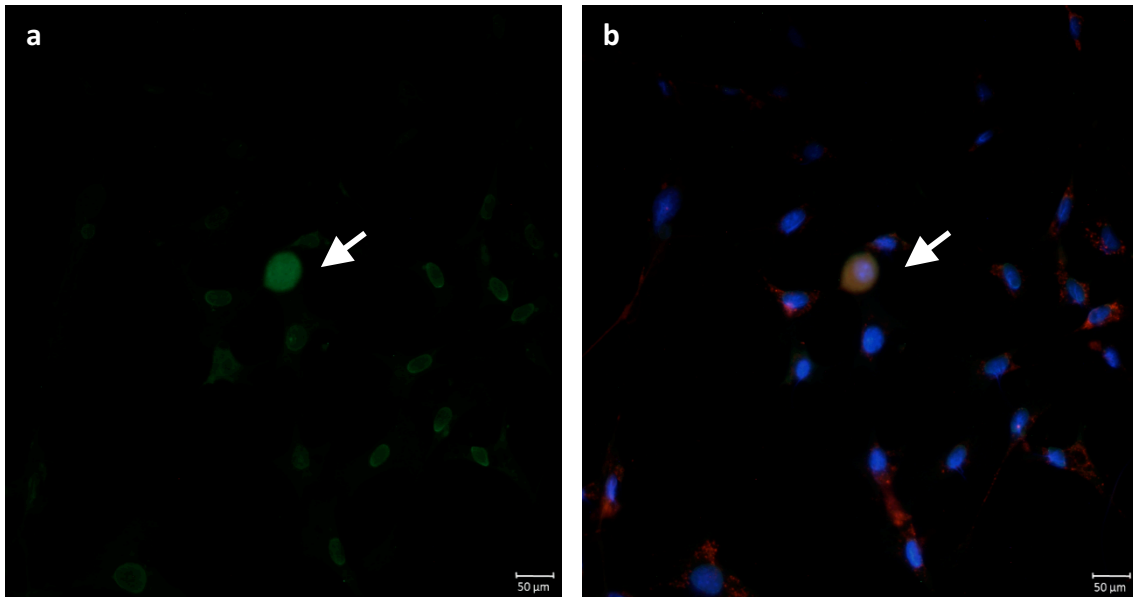


Abb. 23 CGRP/PGP9.5-Doppelfärbung kultivierter Neurone. a) CGRP-Färbung (grün), b) Merge-Aufnahme der CGRP/PGP9.5-Doppelfärbung (CGRP=grün, PGP9.5=rot, DAPI=blau). Weißer Pfeil: Markierung CGRP-positiver Neurone.

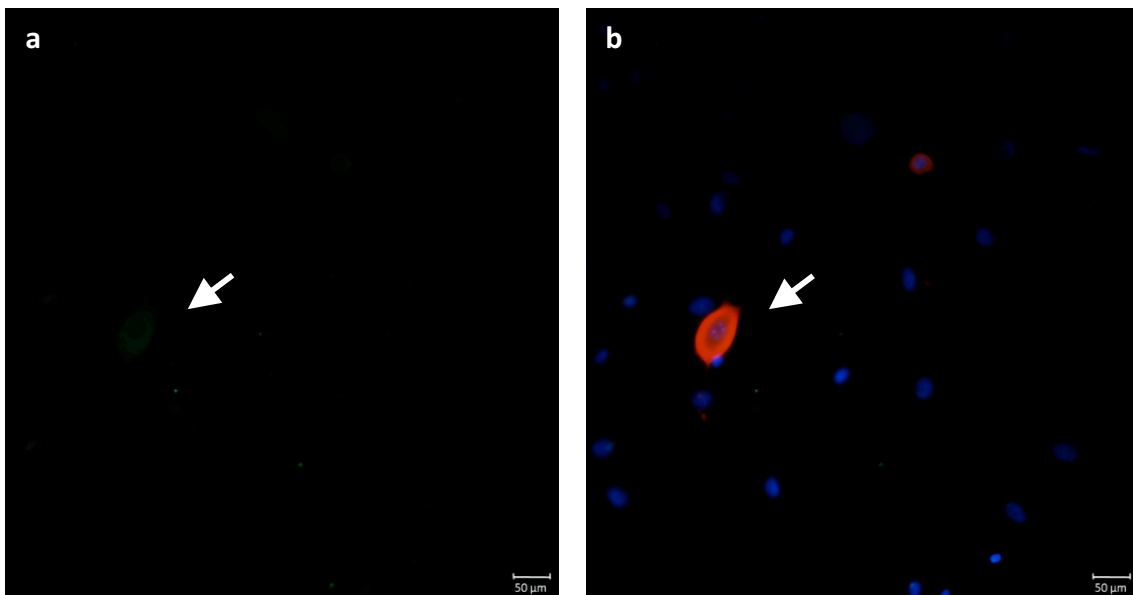


Abb. 24 TRPV1/PGP9.5-Doppelfärbung kultivierter Neurone. a) Darstellung eines TRPV1-positiven Neurons (grün), b) Merge-Aufnahme der TRPV1/PGP9.5-Doppelfärbung (TRPV1=grün, PGP9.5=rot, DAPI=blau). Weißer Pfeil: Markierung der Neurone.

Viele dieser Färbungen wiesen in den ersten Versuchen ein unspezifisches Färbeverhalten in Form von Kernfärbungen auf. Durch Variationen der Verdünnungen, Änderungen der Protokolle bzw. der beinhalteten Lösungskonzentrationen oder durch AK-Austausche wurde versucht eine höhere Spezifität der Färbungen zu erreichen.

Positive Färbeversuche wie bspw. in **Abb. 23** und **Abb. 24** dargestellt waren in Wiederholungen jedoch nicht reproduzierbar. Weiterhin wurde die Etablierung v.a. der CD77-Färbung an kultivierten Neuronen auch durch eine geringe Neuronenzahl pro Cover slip erschwert. So konnte die Etablierung von Färbungen kultivierter Neurone aufgrund unspezifischem Färbeverhalten, ungenügender Reproduzierbarkeit erfolgreicher Färbungen und geringer Neuronenzahl nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung von Fabry-ko-Mäusen hinsichtlich Schmerz-assoziiertem Verhalten gegenüber mechanischen und thermischen Stimuli

Um zu klären, ob die Fabry-ko-Maus ein suffizientes Tiermodell zur weiteren Erforschung des M. Fabry darstellt, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die systematische Charakterisierung des sensorischen Systems von männlichen und weiblichen Fabry-ko-Mäusen im Alter von 3 bis 12 Monaten in verschiedenen Schmerz-assoziierten Verhaltenstestungen. Vorangegangene Arbeiten beinhalteten zumeist eine kleine Anzahl von Versuchstieren und fokussierten sich insbesondere auf männliche; vorwiegend junge Mäuse (Ohshima et al. 1997; Rodrigues et al. 2009; Marshall et al. 2010; Lakoma et al. 2014). Weiterhin ist die vorliegende Arbeit eine der ersten, die Fabry-ko-Mäuse mit ihren Wurfgeschwistern (litt-WT-Tieren) vergleicht. In den meisten bisherigen Studien erfolgten Verhaltenstestungen im Vergleich mit Nicht-Wurfgeschwistern (non-litt-WT-Tieren), deren genetischer Hintergrund teilweise nicht bekannt war.

In der vorliegenden Arbeit konnte in jungen und alten Fabry-ko-Mäusen eine mechanische Hypersensibilität sowie eine Kälte-Hyposensibilität gegenüber litt-WT-Mäusen nachgewiesen werden (**Abb. 3**, **Abb. 5**). Weiterhin zeigten junge Fabry-ko-Mäuse eine Hyper-, 12 Monate alte Mäuse dagegen eine Hyposensibilität gegenüber Hitze (**Abb. 4**).

Die Gruppe um Rodrigues et al. nutzte 2009 dasselbe Maus-Modell von Ohshima et al. und konnte im „Hotplate“-Test eine Hyposensibilität gegenüber Hitze in 6 bis 12 Monate alten männlichen Fabry-ko-Mäusen verglichen mit non-litt-WT-Mäusen nachweisen (Ohshima et al. 1997; Rodrigues et al. 2009). Im Gegensatz dazu untersuchten Lakoma et al. zwei bis drei Monate alte männliche Fabry-ko-Mäuse und verglichen sie mit litt-WT-Mäusen mit C57Bl/6J-Hintergrund. Die Autoren fanden eine

mechanische Hypersensibilität im von Frey-Test, eine Hypersensibilität gegenüber Hitze im „Hotplate“-Test sowie eine Hyposensibilität gegenüber Kälte im Aceton- und „Coldplate“-Test (Lakoma et al. 2014). Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen in der Gruppe der drei Monate alten Mäuse überein. Paradoxerweise zeigte die Gruppe von Marshall et al. in 3 bis 11 Monate alten Fabry-ko-Mäusen eine Hyposensibilität gegenüber Hitze im „Hotplate“-Test verglichen mit non-litt-WT-Mäusen mit 129S6/SvEvTac-Hintergrund (Marshall et al. 2010). Dieselbe Gruppe untersuchte 2014 ein anderes Fabry-ko-Mausmodell im Alter von 3 bis 17 Monaten und verglich die Rückzuglatenz gegenüber einem Hitze-Stimulus mit non-litt-WT-Mäusen mit 129S6/SvEvTac-Hintergrund. Die Autoren berichteten ebenfalls von einer erhöhten Reizschwelle gegenüber Hitze in drei Monate alten Fabry-ko-Mäusen, welche mit steigendem Alter weiter zunahm (Bangari et al. 2015).

Zusätzlich zu den o.g. Ergebnissen in der Kohorte der jungen Mäuse, wurde in dieser Studie die weitere Entwicklung des Schmerz-assoziierten Verhaltens bis zum Alter von 12 Monaten beobachtet. So konnte neben der Persistenz einer mechanischen Hypersensibilität und Hyposensibilität gegenüber Kälte eine Änderung des Verhaltens gegenüber einem Hitze-Stimulus nachgewiesen werden (**Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6**). Zeigten drei Monate alte Fabry-ko-Mäuse noch eine Hypersensibilität gegenüber Hitze, so entwickelte sich mit zunehmendem Alter eine Hyposensibilität (**Abb. 4**). Auch wenn nicht direkt vergleichbar, so sind diese Ergebnisse kongruent mit Beobachtungen bei Fabry-Patienten. In mehreren Studien konnten in der Quantitativen Sensorischen Testung (QST) eine thermische Hyposensibilität sowie evozierte Schmerzen durch mechanische Hypersensibilität gezeigt werden (Maag et al. 2008; Torvin Moller et al. 2009; Toyooka 2011; Üçeyler et al. 2011).

Bei dem in dieser Arbeit genutztem Tiermodell erfolgte eine gezielte Ausschaltung des *GLA*-Gens in murinen embryonischen Zellen, sodass sowohl in männlichen als auch weiblichen Mäusen keine α GalA-Aktivität bestand (Ohshima et al. 1997). Diese Situation ist nicht vollständig vergleichbar mit der enzymatischen Situation bei Fabry-Patienten. Hier ermöglicht die X-chromosomale Inaktivierung eine variable α GalA-Expression in Frauen. Das hier genutzte Mausmodell schafft jedoch die Möglichkeit

eventuell vorhandene geschlechtsspezifische Unterschiede bzw. Einflüsse des Geschlechtes auf den Fabry-Phänotyp unabhängig von der vorhandenen α GalA-Aktivität zu untersuchen. Dieser Aspekt gewinnt insbesondere im Hinblick auf geschlechtsspezifische Unterschiede in Schmerz-assoziiertem Verhalten in Mausmodellen und die damit mögliche Erklärung für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Effizienz verschiedener Therapien an Bedeutung (Mogil et al. 2011; Sorge et al. 2011; Sorge et al. 2015). So induzierten Sorge et al. durch eine sog. spared nerve injury (SNI) in männlichen und weiblichen Mäusen eine mechanische Allodynie. Eine Woche später erfolgte die intrathekale Injektion glialer Inhibitoren. In anschließenden Testungen der mechanischen Rückzuglatenz, zeigten männliche Mäuse eine dosisabhängige Verbesserung der mechanischen Allodynie. Im Gegensatz dazu wiesen weibliche Mäuse keine Veränderung der mechanischen Rückzuglatenz auf (Sorge et al. 2015). Die Autoren konnten schließlich Signalwege in weiblichen Mäusen nachweisen, die zu einem verminderten Ansprechen auf die intrathekal injizierten Medikamente führten (Sorge et al. 2015). Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass das Geschlecht einen indirekten Einflussfaktor für das Therapieansprechen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine größeren Unterschiede in Schmerz-assoziiertem Verhalten von männlichen und weiblichen Fabry-ko-Mäusen festgestellt werden (**Abb. 3**, **Abb. 6**). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das weibliche Geschlecht keine zusätzlichen Veränderungen in Fabry-ko-Mäusen verursacht. In vorangegangenen Studien konnten diese Fragestellung bisher nicht beantwortet werden, da entweder die Ergebnisse nicht nach Geschlecht getrennt (Rodrigues et al. 2009; Lakoma et al. 2014) oder nur männliche Fabry-ko-Mäuse untersucht wurden (Marshall et al. 2010; Bangari et al. 2015).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von Fabry-ko-Mäusen und litt-WT-Mäusen desselben genetischen Hintergrunds. Die bisher veröffentlichten Arbeiten zu Schmerz-assoziiertem Verhalten von Fabry-ko-Mäusen nutzten Nicht-Wurfgeschwister (non-litt-WT-Mäuse). Ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund beider Kohorten führt jedoch meist trotz exakt gleicher Testung zu

unterschiedlichen Ergebnissen. Ein Beispiel hierfür ergibt sich aus dem Vergleich des „Hotplate“-Test von Lakoma et al. und Bangari et al. (Lakoma et al. 2014; Bangari et al. 2015). In beiden Arbeiten wurde die Wegzugslatenz gegenüber Hitze in 12 Wochen alten Fabry-ko-Mäusen im Vergleich zu non-litt-WT-Mäusen gemessen. In der Arbeit von Lakoma et al. wurden non-litt-WT-Mäuse mit C57Bl/6J-Hintergrund genutzt. Diese Tiere zeigten im „Hotplate“-Test eine Wegzugslatenz von 25 s auf; Fabry-ko-Mäuse reagierten dagegen schneller auf den Hitze-Stimulus, weswegen Fabry-ko-Mäuse im Vergleich zu den non-litt-WT-Mäusen eine Hypersensibilität gegenüber Hitze aufwiesen (Lakoma et al. 2014). Bangari et al. führten den „Hotplate“-Test ebenfalls bei 12 Wochen alten non-litt-WT-Mäusen mit 129S6/SvEvTac-Hintergrund im Vergleich mit gleichaltrigen Fabry-ko-Mäusen durch. Hier zeigten die non-litt-WT-Mäuse eine Wegzugslatenz von 15 s, was zu dem Ergebnis einer Hyposensibilität gegenüber Hitze in Fabry-ko-Mäusen führte (Bangari et al. 2015). Denn interessanterweise zeigten Fabry-ko-Mäuse in beiden Studien eine ähnliche Wegzugslatenz von ca. 20 s. Lediglich aufgrund des Vergleichs von Fabry-ko- mit non-litt-WT-Mäusen unterschiedlichen genetischen Backgrounds konnten so zwei gegensätzliche Aussagen über das Verhalten von Fabry-ko-Mäusen gegenüber einem Hitze-Stimulus entstehen. Dieses Beispiel verdeutlicht die erschwerte Vergleichbarkeit gewonnener Daten durch die Nutzung verschiedener non-litt-WT-Stämme.

Die vorliegende Arbeit konnte anhand von Schmerz-assoziierten Verhaltenstestungen die phänotypische Vergleichbarkeit von Fabry-ko-Mäusen und Fabry-Patienten nachweisen. Da das hier verwendete Fabry-ko-Mausmodell jedoch im Gegensatz zu Fabry-Patienten einen milden Krankheitsverlauf ohne Einschränkung der Lebenserwartung aufweist, wurde das Fabry-ko-Mausmodell durch Taguchi et al. um eine zusätzliche Gb3-Überproduktion weiterentwickelt (Ohshima et al. 1997; Taguchi et al. 2013). In neuen Studien konnten in diesem neuen Mausmodell schnellere und höhere Gb3-Konzentrationen im Gewebe nachgewiesen werden (Taguchi et al. 2013). Ferner zeigt dieses Modell eine frühere und stärkere Krankheitsaktivität mit deutlich reduzierter Lebenserwartung. Dieses neue Mausmodell eröffnet weitere

Möglichkeiten zur Erforschung der Pathophysiologie des M. Fabry zum Preis einer weniger physiologischen Entwicklung.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist die teilweise Veränderung der sensorischen Funktion mit zunehmendem Alter, die in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden muss. Zusätzlich konnte durch die erstmalig getrennte Untersuchung von Männchen und Weibchen eine Beeinflussung der Krankheitsaktivität durch das Geschlecht ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Phänotyp des M. Fabry ausschließlich durch den ursächlichen Gendefekt und die X-chromosomale Inaktivierung bestimmt wird; nicht jedoch speziell durch das weibliche Geschlecht.

4.2. Reduzierung der IENFD entsprechend einer SFN in Fabry-ko-Mäusen

Zur weiteren Charakterisierung des Fabry-ko-Mausmodells sowie zur weiteren Bestätigung der phänotypischen Vergleichbarkeit der Fabry-ko-Maus mit Fabry-Patienten, erfolgte die Quantifizierung der IENFD in Footpads von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen.

Als histologisches Korrelat einer SFN findet sich in Hautbiopsien von Fabry-Patienten eine Verminderung oder sogar ein vollständiger Verlust intraepidermaler Nervenfasern (Üçeyler et al. 2011; Üçeyler 2016). Hierbei sind insbesondere myelinisierte A δ -Fasern und nicht-myelinisierte C-Fasern betroffen (Üçeyler 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits in drei Monate alten Fabry-ko-Mäusen eine reduzierte IENFD gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen nachgewiesen werden (**Abb. 7, Abb. 8**). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Lakoma et al. überein. Die Gruppe hatte ebenfalls einen Verlust intraepidermaler Nervenfasern in 12 Wochen alten männlichen Fabry-ko-Mäusen festgestellt. Weiterhin hatten die Autoren morphologische Veränderungen, wie bspw. Schwellungen oder Fragmentationen von Nervenfasern beobachtet (Lakoma et al. 2014). Im Gegensatz zu Lakoma et al., die die Quantifizierung der IENFD lediglich an je drei 12 Wochen alten Fabry-ko- und

Kontrolltieren vornahmen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die systematische Untersuchung der Footpads von insgesamt 83 Mäusen (22 junge und 21 alte Fabry-ko-Tiere; je 20 junge und alte litt-WT-Mäuse). Durch diese hohe Anzahl an Versuchstieren gelang neben dem Nachweis einer reduzierten IENFD in jungen Fabry-ko-Mäusen zusätzlich der Nachweis des progredienten Verlusts intraepidermaler Nervenfasern mit zunehmendem Alter der Mäuse. So konnte gezeigt werden, dass 12 Monate alte Fabry-ko-Mäuse nicht nur gegenüber ihren gleichaltrigen litt-WT-Artgenossen eine verminderte IENFD aufwiesen, sondern auch im Vergleich zu jungen Fabry-ko-Mäusen eine nochmals deutliche Reduktion der intraepidermalen Nervenfasern zeigten (**Abb. 7, Abb. 8**). Diese Ergebnisse stimmen mit der in Fabry-Patienten gefundenen reduzierten Anzahl intraepidermaler Nervenfasern überein (Üçeyler et al. 2013).

Die Färbung der intraepidermalen Nervenfasern erfolgte in dieser Arbeit, ebenso wie bei Lakoma et al. mit PGP9.5. Dieser Antikörper erlaubt keine Unterscheidung der Nervenfasersubtypen. Daher sagt die Reduzierung der PGP9.5-positiven Nervenfasern nichts über die zurückgebliebenen Nervenfasern und deren Eigenschaften aus. So könnten die wenigen noch vorhandenen Nervenfasern hyperaktiv oder sensibler gegenüber Umwelteinflüssen wie bspw. proinflammatorischen oder algetischen Zytokinen sein (Üçeyler 2016). Trotz der fehlenden Aussagekraft der vorliegenden Färbung über die noch vorhandenen Nervenfasern, lassen sich in Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit Vermutungen über die Eigenschaften der verbliebenen Nervenfasern aufstellen. So zeigten drei Monate alte Fabry-ko-Mäuse neben einer reduzierten IENFD eine mechanische Hypersensibilität sowie eine thermische Hypersensibilität gegenüber Hitze, jedoch eine Hyposensibilität im Kälte-Test (**Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5**). Dies lässt vermuten, dass bereits bei jungen Fabry-ko-Mäusen die Anzahl der insbesondere kälteleitenden myelinisierten A δ -Fasern reduziert sein könnte. Auch könnte eine Überaktivierung der zurückbleibenden C-Fasern zu einer mechanischen und thermischen Hypersensibilität gegenüber Hitze-Stimuli führen.

1995 entdeckte die Gruppe um Schmidt et al. neben den bisher bekannten Mechano-Hitze-respondierenden C-Fasern (CMH) weitere Untergruppen afferenter C-Fasern (Schmidt et al. 1995). Die Autoren beschrieben in ihrer Arbeit zwei Hauptgruppen:

Mechano-sensitive und Mechano-insensitive C-Fasern. Die Untergruppe der Mechano-sensitiven C-Fasern konnten in Untersuchungen durch *von Frey-Filamente* stimuliert werden. Die Mehrheit dieser Fasern reagierte zusätzlich auf Hitze-Stimuli (mechano-heat responsive C-fibers; CMH; polymodale Nozizeptoren); die restlichen Fasern waren durch Hitze nicht stimulierbar und wurden lediglich als mechano-sensitive C-Fasern (CM) bezeichnet. Teile der Mechano-insensitiven afferenten C-Fasern waren dagegen ausschließlich durch Hitze stimulierbar (CH), andere Fasern zeigten weder eine mechanische noch eine thermische Erregbarkeit (CM₁H₁). Die Autoren zeigten in weiteren Versuchen, dass die Mechano-insensitiven C-Fasern durch u.a. Capsaicin erregbar waren und nach Sensibilisierung sowohl auf mechanische als auch auf thermische Stimuli reagierten. Diese Fasersubgruppe wurde daher als „stille Nozizeptoren“ bezeichnet (Schmidt et al. 1995; Schmelz et al. 2000). Diese Subpopulation von C-Fasern scheint eine maßgebliche Rolle in der Entstehung von Schmerzen im Rahmen einer Hyperalgesie und des Entzündungschmerzes zu spielen. Weiterhin scheinen sie an der Entstehung neuropathischer Schmerzen sowie der Auslösung neurogener Vasodilatation beteiligt zu sein (Schmelz et al. 2000; Namer et al. 2015). Für die Temperaturwahrnehmung spielen sie nur eine untergeordnete Rolle. Diese Subgruppe von C-Fasern könnte in der Gruppe der verbliebenen intraepidermalen Nervenfasern bei 12 Monate alten Fabry-ko-Mäusen eine wichtige Rolle spielen und insbesondere die veränderte Reaktion der Mäuse auf einen Hitze-Stimulus erklären. So könnte die Degeneration wärmedetektierender C-Fasern in den Footpads alter Fabry-ko-Mäuse zu einer Hyposensibilität gegenüber Hitze führen. Die jedoch verbliebenen Fasern könnten zur Untergruppe der „stillen Nozizeptoren“ gehören und durch Hitze, Entzündungen oder Anstrengungen zu brennenden Schmerzen führen.

Die zugrundeliegende Ursache für die Degeneration intraepidermaler Nervenfasern bei M. Fabry ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung und kann in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch könnte eine mögliche Theorie der direkte zytotoxische Effekt der Gb3-Ablagerungen auf u.a. intraepidermale Nervenfasern sein (Jeyakumar et al. 2002). Bei gleicher Empfindlichkeit der intraepidermalen

Nervenfasern gegenüber Gb3 müsste sich hierdurch jedoch ein individuelles Befallsmuster bzw. individuelle Unterschiede der degenerierten und verbliebenen Nervenfasersubtypen ergeben. Diese individuellen Unterschiede würden aber den interindividuell vergleichbaren Befunden der QST bzw. der hier gezeigten Verhaltenstestungen widersprechen. Eine weitere Hypothese ist der Untergang von peripheren Nerven aufgrund neuronaler Gb3-Ablagerungen in Spinalganglien. In unterschiedlichen Studien konnte Gb3 die Auslösung verschiedener pathologischer Prozesse, wie bspw. Auslösung oxidativen Stress oder Produktion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (Shen et al. 2008; Schiffmann 2009; Namdar et al. 2012; De Francesco et al. 2013). Diese neuronalen Ablagerungen konnten in verschiedenen histopathologischen Untersuchungen festgestellt werden und könnten durch neuronale Apoptose zu Gangliopathie mit schließlich reduzierter IENFD führen (Üçeyler et al. 2013). Die Gb3-Ablagerungen könnten somit bspw. durch eine neurogene Entzündung in Spinalganglienneuronen den retrograden Untergang intraepidermaler Nervenfasern auslösen. Dennoch bleibt unklar, wieso A δ -Fasern empfindlicher reagieren und vor anderen Nervenfasersubgruppen degenerieren. Ob diese Fasern eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber den Gb3-induzierten Mechanismen aufweisen muss in weiteren Studien untersucht werden.

Andere Theorien zur Erklärung der Nervenfaserdegeneration beziehen die Umgebung der intraepidermalen Nervenfasern wie z.B. die Keratinozyten mit ein. Intraepidermale Nervenfasern pflegen einen intensiven Kontakt zu den sie umgebenden Hautzellen. Ebenso konnten Synapsen-ähnliche Kontakte zwischen intraepidermalen Nervenfasern und Keratinozyten nachgewiesen werden (Chateau et al. 2004; Üçeyler et al. 2013). In einer Studie von Hedstrom et al. konnte der Einfluss von Hautzellen auf intraepidermale Nervenfasern gezeigt werden. Die Autoren demonstrierten, dass eine Überexpression von GDNF in Keratinozyten den fortschreitenden Verlust intraepidermaler Nervenfasern verlangsamt (Hedstrom et al. 2014). So könnte eine verminderte GDNF-Expression zu einer vorzeitigen Degeneration intraepidermaler Nervenfasern führen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine hohe Übereinstimmung des hier verwendeten Mausmodells mit Krankheitsmanifestationen bei Fabry-Patienten. Damit stellt die Fabry-ko-Maus ein geeignetes Modell zur Untersuchung des dem Nervenfasernuntergang zugrundeliegenden Mechanismus dar.

4.3. Charakterisierung der Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen

4.3.1. *Veränderungen der neuronalen Morphologie in Fabry-ko-Mäusen*

Eine Beteiligung und Beeinflussung von Spinalganglienneuronen bei M. Fabry wurde aufgrund des Nachweises neuronaler Ablagerungen in verstorbenen Patienten durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits früh diskutiert (Scriba 1950; Steward et al. 1968; Miyatake et al. 1972; Kahn 1973; Tabira et al. 1974; Gadoth et al. 1983; Kaye et al. 1988). Einige Autoren beschrieben jedoch neben den Ablagerungen weitere Pathologien der Spinalganglienneurone bei betroffenen Patienten. 1972 berichteten bspw. Kahn et al. von einer Zelldegeneration in Spinalganglien von drei verstorbenen Fabry-Patienten (Kahn 1973). Auch Purpura et al. hatten 1976 Auswirkungen lysosomaler Speicherkrankheiten (LSD) auf die neuronale und insbesondere axonale Entwicklung entdeckt; so würden LSD laut Purpura et al. zur Ausbildung sog. „Meganeurite“ führen (Purpura et al. 1976). 1982 entdeckte Gadoth et al. in einer H.E.-Färbung an Spinalganglien neben „eosinophiler Granula“ eine deutliche Vergrößerung der Neurone (Gadoth et al. 1983). Aus diesen Entdeckungen schlussfolgerte die Gruppe, dass die Schmerzen bei M. Fabry auf Schädigungen der Spinalganglienneurone zurückzuführen seien. Erst mit der Entwicklung eines Fabry-Mausmodells durch Oshima et al. eröffnete sich schließlich die Möglichkeit morphologische Veränderungen der Spinalganglienneurone systematisch zu untersuchen.

Marshall et al., die die Effizienz der ERT im Fabry-Mausmodell untersuchten, waren eine der ersten Gruppen, die eine erhöhte Anzahl „vakuolisierter“

Spinalganglienneurone in Fabry-Rag-Mäusen, eine Kreuzung aus Fabry-ko- und immundefizienter *Rag1*-Maus beschrieben (Marshall et al. 2010). Die Gruppe hatte bereits in einer vorangegangenen Arbeit eine „Vakuolisierung“ von Spinalganglienneuronen sowie eine Reduzierung dieser nach exogener Zufuhr von α GalA gezeigt (Ziegler et al. 2007). In der Arbeit von Marshall et al. zur Effizienz der ERT erfolgte jedoch erstmals eine Quantifizierung „vakuolisierter“ Neurone bei naiven Mäusen und Mäusen nach acht Monaten Behandlung mit ERT bzw. einer Kombination aus ERT und substratreduzierender Therapie (SRT). Die Gruppe untersuchte 10 Tiere pro Messzeitpunkt, der nicht weiter erläutert wurde und beschrieb den prozentualen Anteil „vakuolisierter“ Spinalganglienneurone an der Gesamtneuronenzahl. So konnten ein deutlich erhöhter prozentualer Anteil vergrößerter Neurone in Fabry-Rag-Mäusen gegenüber non-litt-WT-Mäusen nachgewiesen und eine Reduzierung dieses Anteils nach Behandlung mit ERT bzw. ERT/SRT festgestellt werden (Marshall et al. 2010). 2014 konnten diese Ergebnisse durch dieselbe Gruppe bestätigt werden. So beobachteten Bangari et al. ab dem Alter von drei Monaten eine zunehmende „Vakuolisierung“ von Spinalganglienneuronen in Fabry-ko-Mäusen. Der Anteil vergrößerter Neurone lag dabei in drei Monate alten Mäusen bei $30,5 \pm 3,9\%$ der Spinalganglienneurone. Weiterhin konnte die Gruppe eine Zunahme dieses Anteils bis zu $65,8 \pm 6,3\%$ „vakuolisierter“ Neurone in 17 Monate alten Fabry-ko-Mäusen nachweisen. Bangari et al. schlussfolgerten, dass die Zunahme vergrößerter Neurone in Fabry-ko-Mäusen in Zusammenhang mit der erhöhten Wegzugslatenz im „Hotplate“-Test steht. Die Gruppe konnte ferner keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Anzahl vergrößerter Neurone sowie keinen Hinweis auf „vakuolisierte“ Neurone in non-litt-WT-Mäusen mit 129S6/SvEvTac-Hintergrund nachweisen (Bangari et al. 2015). Eine genaue Definition der „vakuolisierten“ Neurone bzw. die Kriterien, ab wann ein Neuron als „vakuolisiert“ bezeichnet wurde, wurden durch die Autoren nicht erläutert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls eine Untersuchung der morphologischen Eigenschaften der Spinalganglienneurone von Fabry-ko- gegenüber litt-WT-Mäusen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten von Marshall et al. und Bangari et al., in

denen bei einer kleinen Anzahl von Mäusen lediglich eine prozentuale Beschreibung vergrößerter Neurone durchgeführt wurde, erfolgte hier eine objektive und systematische quantitative Ausmessung der neuronalen Fläche mit Hilfe von ImageJ an insgesamt 73 Tieren. So konnte gezeigt werden, dass bereits junge Fabry-ko-Mäuse eine deutliche Vergrößerung der neuronalen Fläche gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen aufwiesen (**Abb. 9, Abb. 10**). Zusätzlich konnte eine weitere, altersabhängige Zunahme der Neuronenfläche gezeigt werden. So konnte in 12 Monate alten Fabry-ko-Mäusen eine nochmalige Vergrößerung der neuronalen Fläche gegenüber ihren jungen Artgenossen und gegenüber gleichaltrigen Kontrolltieren festgestellt werden (**Abb. 9, Abb. 10**). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der litt-WT-Mäuse kein Unterschied der neuronalen Fläche zwischen jungen und alten Mäusen bestand sowie kein geschlechtsspezifischer Unterschied in beiden Gruppen feststellbar war (**Abb. 9, Abb. 10**). Damit stimmen die hier beschriebenen Ergebnisse mit denen der vorangegangenen Arbeiten überein.

Im Gegensatz zu Marshall et al. und Bangari et al. wurde in der vorliegenden Arbeit eine deutlich größere Anzahl von Fabry-ko-Mäusen und ihren litt-WT-Geschwistern hinsichtlich morphologischer Veränderungen der Spinalganglien neurone untersucht. Insgesamt wurden in dieser Arbeit die Spinalganglien von 73 Mäusen von einem gegenüber Genotyp und Geschlecht verblindeten Untersucher vermessen. Die hier vorliegende Arbeit ist somit die erste Studie, die eine quantitative Vergrößerung der Neuronenfläche in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen anhand objektivierbarer Messungen nachweisen konnte. Daraus ergeben sich für zukünftige Studien aussagekräftige und vergleichbare Daten.

In den morphologischen Untersuchungen der Spinalganglien neurone der Fabry-ko-Mäuse fiel neben der Zunahme der neuronalen Fläche zusätzlich eine reduzierte Stabilität des gesamten Ganglions auf. Im Gegensatz zu den Spinalganglien der litt-WT-Mäuse erschienen die Ganglien der Fabry-ko-Mäuse instabiler. Häufig konnte bei Entnahme der Spinalganglien aus dem Foramen intervertebrale eine Art „Zerfließen“ beobachtet werden. Diese morphologische Instabilität könnte auf eine Beeinflussung des Zytoskeletts hindeuten. Zu diesem Thema existieren bislang nur wenige Arbeiten.

Eine jedoch wegweisende Arbeit hierzu stammt von Choi et al., die sich mit der Inhibition der Kollagensynthese in Fibroblasten bei M. Fabry beschäftigten (Choi et al. 2015). Die Gruppe untersuchte die Effekte von lyso-Gb3 (lysosomales Gb3, (Aerts et al. 2008; Niemann et al. 2014)) auf die Pathogenese des ascendierenden Aortenaneurysma bei M. Fabry und fokussierte sich hierbei auf das aortale Remodelling durch Fibroblasten. Choi et al. konnten nachweisen, dass Lyso-Gb3 inhibierend auf das Wachstum von Fibroblasten sowie auf deren Differenzierung zu Myofibroblasten und die Expression von Kollagen wirkt. Weiterhin konnte die Gruppe um Choi et al. diesen Effekt auf die Herunterregulierung der Expression des KCa3.1-Kanals zurückführen (Choi et al. 2015). Diese Arbeit deutet daraufhin, dass Lyso-Gb3 zu einer reduzierten Kollagensynthese und damit zur Entwicklung des ascendierenden Aortenaneurysma bei Fabry-Patienten führt. Im Hinblick auf die beschriebenen vergrößerten, teilweise instabilen Spinalganglienneurone bei Fabry-ko-Mäusen in der vorliegenden Arbeit, lassen die Beobachtungen von Choi et al. eine ähnliche Beeinflussung des Zytoskeletts von Spinalganglienneuronen durch Lyso-Gb3 bzw. Gb3 vermuten. So könnten Ablagerungen von Gb3 zu einer reduzierten Synthese oder zu einem beschleunigten Abbau von Neurofilamenten, der Hauptkomponente des neuronalen Skeletts führen. Da Neurofilamente ebenso das Grundgerüst der neuronalen Rezeptoren darstellen, könnte ihre Reduktion somit nicht nur die morphologischen Veränderungen sondern auch die vermutete veränderte Rezeptorausstattung der Spinalganglienneurone erklären.

Zusammenfassend besteht bei Fabry-ko-Mäusen eine veränderte neuronale Morphologie i.S. einer, verglichen mit litt-WT-Mäusen deutlich vergrößerten neuronalen Fläche, was eine Beeinflussung des neuronalen Zytoskeletts durch die Erkrankung nahelegt. Die vorliegende Arbeit liefert somit grundlegende Daten für zukünftige Studien zur weiteren Analyse der neuronalen Morphologie bei M. Fabry.

4.3.2. Veränderungen der neuronalen Rezeptorausstattung bei Fabry-ko-Mäusen

4.3.2.1. Vermehrte Ablagerungen von Gb3 in Spinalganglienneuronen bei Fabry-ko-Mäusen

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten ausgeführt, beschrieben einige Autoren bereits früh Ablagerungen in Spinalganglien von Fabry-Patienten (Kahn 1973; Kaye et al. 1988). Die gefundenen Ablagerungen wurden von einigen Autoren als Ursache der Schmerzentstehung bei M. Fabry vermutet (Gadoth et al. 1983). Mittlerweile wird Gb3 als Mediator pathologischer Prozesse bei M. Fabry angesehen. Es wird angenommen, dass Gb3 entweder selbst eine zelltoxische Wirkung aufweist oder dass seine Ablagerungen zu pathologischen Prozessen führen, die eine Zellapoptose induzieren. So konnten bspw. Shen et al. in ihrer Arbeit die Auslösung oxidativen Stress durch Gb3 zeigen (Shen et al. 2008). In anderen Studien konnte bei Fabry-Patienten die Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps durch Gb3 nachgewiesen werden (Namdar et al. 2012; De Francesco et al. 2013). Weiterhin gelang es einigen Forschern eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine in Fabry-Patienten festzustellen, was eventuell auf autoimmune Mechanismen, ausgelöst durch Gb3 hinweisen könnte (De Francesco et al. 2013; Mauhin et al. 2015). Mit der Entwicklung des Fabry-ko-Mausmodell 1997 durch Ohshima et al. ergaben sich neue Möglichkeiten in der Erforschung der Gb3-Ablagerungen bei M. Fabry (Ohshima et al. 1997). Viele Studien an Fabry-ko-Mäusen konnten in verschiedenen Geweben, wie bspw. Niere, Herz und Gehirn Gb3-Ablagerungen nachweisen (Marshall et al. 2010; Bangari et al. 2015). Die vorliegende Studie ist jedoch die erste Arbeit, die eine hohe Anzahl von Tieren hinsichtlich Gb3-Ablagerungen in Spinalganglienneuronen untersuchte. Hierzu wurde ein anti-mouse Antikörper gegen den Gb3-Rezeptor CD77 verwendet. Dieser Antikörper war bereits in Routinefärbungen von Hautbiopsien von Fabry-Patienten etabliert. Zu Beginn dieser Arbeit existierten lediglich zwei unterschiedliche CD77-Antikörper. Beide wurden in Voruntersuchungen an Nierengewebe und Spinalganglien von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen getestet. Hier

zeigte der in dieser Arbeit verwendete CD77-Antikörper eine höhere Spezifität gegenüber Gb3.

In der vorliegenden Arbeit konnten Gb3-Ablagerungen in Spinalganglienneuronen von Fabry-ko-Mäusen immunhistochemisch nachgewiesen werden. In den Färbungen zeigten bereits junge Fabry-ko-Mäuse verglichen mit gleichaltrigen litt-WT-Mäusen eine deutlich höhere Anzahl CD77-positiver Neurone. Weiterhin konnte eine altersabhängige Zunahme der CD77-immunoreaktiven Spinalganglienneurone in Fabry-ko-Mäusen beobachtet werden (**Abb. 11**). Auch in der Gruppe der litt-WT-Mäuse konnten CD77-positive Neurone sowie deren altersabhängige Zunahme festgestellt werden, was auf physiologische Ablagerungen von Gb3 in Spinalganglien hindeuten könnte. Verglichen mit der Anzahl CD77-positiver Neurone in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen zeigte sich in der Gruppe der Kontrolltiere jedoch ein deutlich niedrigeres Niveau (**Abb. 11**). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied konnte in keiner der beiden Gruppen nachgewiesen werden. Damit bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse die bisherigen Fallberichte über neuronale Gb3-Ablagerungen in Spinalganglien verstorbener Fabry-Patienten.

Aufgrund der Verwendung eines anti-mouse Antikörpers ergab sich in den immunhistochemischen Untersuchungen eine hohe Hintergrundfärbung, weswegen eine Intensitätsmessung nicht möglich war. Daher wurde eine manuelle Auszählung CD77-positiver Neurone durch einen gegenüber Genotyp und Geschlecht verblindeten Untersucher durchgeführt. Aufgrund dieser Auswertungsmethode konnte lediglich die Anzahl CD77-immunoreaktiver Neurone gezählt, nicht aber die Konzentration von Gb3 innerhalb der Spinalganglienneurone gemessen werden. Während der Auswertung der Anzahl CD77-positiver Neurone konnte jedoch subjektiv ein Unterschied in der Menge der Gb3-Ablagerungen insbesondere zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen festgestellt werden (s. **Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28**).

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis von Gb3-Ablagerungen in Spinalganglienneuronen von Fabry-ko-Mäusen könnte ein Hinweis auf eine Beeinflussung der Spinalganglienneurone i.S. einer Gangliopathie im Rahmen des M. Fabry darstellen (Üçeyler et al. 2011). So könnten diese Ablagerungen weitere

pathologische Prozesse innerhalb der Neurone induzieren und so zu Veränderungen der Nozizeption führen. Möglicherweise könnten die Ergebnisse der Schmerz-assoziierten Verhaltenstestungen sowie der IENFD auf unterschiedliche Empfindlichkeiten der verschiedenen Neuronen- und Nervenfasersubtypen gegenüber Gb3 bzw. den durch Gb3-Ablagerungen ausgelösten pathologischen Prozessen hinweisen. Ob Gb3 direkt toxisch auf Spinalganglienneurone wirkt oder eine Inflammation in Form einer neurogenen Entzündung auslöst und so zu einer Schädigung der Neurone mit anschließender antegraden Degeneration intraepidermaler Nervenfasern führt, muss durch zukünftige Studien weiter untersucht werden.

4.3.2.2. *Veränderungen schmerzassoziierter Ionenkanäle im Fabry-ko-Mausmodell*

Zur Erforschung der Beeinflussung von Schmerzkanälen durch M. Fabry bzw. durch die neuronale Ablagerung von Gb3 wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Schmerzkanäle bzw. -mediatoren hinsichtlich ihrer immunhistochemischen und molekulargenetischen Expression untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Veränderungen von Schmerzkanälen in Fabry-ko-Mäusen zu untersuchen, um die Ursache des Fabry-assoziierten Schmerzes aufzudecken.

4.3.2.2.1. *Veränderungen der neuronalen TRPV1-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen*

Dass TRPV1-Kanälen eine zentrale Rolle in der Initiierung neuropathischer Schmerzen bei M. Fabry zugeordnet wird, liegt in erster Linie an ihrer Charakteristik. Diese Kanäle können durch verschiedene Mechanismen, wie Hitze, Capsaicin, Azidose, mechanische Reize und Entzündungsmediatoren (z.B. NGF, SP, CGRP) aktiviert werden (Caterina et al. 1997; Sidi et al. 2003; Tominaga et al. 2005; Wang et al. 2005; Levine et al. 2007). Stimuli, die auch bei Fabry-Patienten zu Schmerzen, ggf. sogar zu Fabry-Krisen führen können. Ein Knockout-Mausmodell von Caterina et al. belegte schließlich die bedeutende Rolle der TRPV1-Kanäle in der Entwicklung einer Hyperalgesie gegenüber Hitze bei Inflammation (Caterina et al. 2000). In den hier aufgeführten Ergebnissen der

Verhaltenstestungen, sowie bereits in anderen Arbeiten ebenfalls gezeigt (Rodrigues et al. 2009; Lakoma et al. 2014), demonstrieren auch Fabry-ko-Mäuse eine Hypersensibilität gegenüber Hitze-Stimuli, was eine mögliche Beeinflussung von TRPV1-Kanälen durch den M. Fabry nahe legt. Auch Lakoma et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Expression von TRPV1-Kanälen in der unbehaarten Haut der Vorderpfoten von männlichen Fabry-ko-Mäusen. Die Autoren konnten sowohl in immunhistochemischen Untersuchungen als auch in Western Blots eine erhöhte epidermale TRPV1-Expression in Fabry-ko-Mäusen gegenüber Kontrolltieren nachweisen. Einen Unterschied in der epidermalen Kollokalisierung von TRPV1 und PGP9.5 zwischen Fabry-ko- und Kontrollmäusen konnte die Gruppe jedoch nicht feststellen (Lakoma et al. 2014). 2016 führten Lakoma et al. aber weitere immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen der TRPV1-Expression an kryokonservierten und *in vitro* kultivierten Spinalganglienneuronen durch. In diesen Untersuchungen konnte die Gruppe eine vermehrte neuronale TRPV1-Expression in drei Monate alten männlichen Fabry-ko-Mäusen gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen nachweisen. Weiterhin blockierte die Gruppe um Lakoma et al. die Ca^{2+} -abhängige Exozytose von TRPV1-Rezeptoren in Nozizeptoren durch DD04107. DD04107 ist ein palmitoyliertes Peptid und inhibiert die inflammatorische Rekrutierung von Ionenkanälen in die Plasmamembran von Nozizeptoren. Durch Nutzung von DD04107 konnten die Autoren eine Verminderung der Hypersensibilität gegenüber Hitze in drei Monate alten männlichen Fabry-ko-Mäusen nachweisen. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass die thermische Hypersensibilität auf eine veränderte Oberflächenexpression von TRPV1-Rezeptoren in Nozizeptoren von Fabry-ko-Mäusen beruht (Lakoma et al. 2016).

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, in der Spinalganglienneurone von jungen und alten, männlichen und weiblichen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen hinsichtlich einer veränderten immunhistochemischen Expression sowie Genexpression von TRPV1 untersucht wurden. Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung ergab eine deutlich erhöhte TRPV1-Expression in der Gruppe der Fabry-ko-Mäuse (**Abb. 12**). Diese vermehrte neuronale TRPV1-Expression bestand bereits in drei Monate alten

Fabry-ko-Mäusen und zeigte mit steigendem Alter eine weitere Zunahme. Auch in der Gruppe der litt-WT-Mäuse konnte eine altersabhängige Zunahme der TRPV1-Expression, jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau nachgewiesen werden (**Abb. 12**). Im Gegensatz zu den immunhistochemischen Untersuchungen, konnte in der qRT-PCR kein Unterschied in der Genexpression von TRPV1 zwischen Fabry-ko- und Kontrollmäusen festgestellt werden (**Abb. 19**).

Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Arbeit von Ji et al. gezeigt werden. Die Gruppe untersuchte den Einfluss der NGF-induzierten p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase)-Aktivierung nach peripherer Inflammation auf die periphere und neuronale TRPV1-Expression. Dabei konnte die Gruppe, entsprechend vorangegangener Arbeiten eine Erhöhung der TRPV1-Proteinkonzentration ohne Anstieg der TRPV1-mRNA nachweisen (Sanchez et al. 2001; Tohda et al. 2001; Voilley et al. 2001; Ji et al. 2002). Weiterhin beschrieben Ji et al. eine p38-Aktivierung in Spinalganglienneuronen durch aus entzündlichem Gewebe retrograd transportiertem NGF, welche in der erhöhten Translation und dem Transport von TRPV1 in die peripheren Enden der Nozizeptoren resultierte. Die Gruppe konnten ebenfalls zeigen, dass die postinflammatorische Aktivierung von p38 in Spinalganglienneuronen zu einer Hochregulation von TRPV1 in der Hinterpfotenhaut sowie in Spinalganglienneuronen von Versuchstieren führte (Ji et al. 2002). Diese Ergebnisse stimmen somit mit denen von Lakoma et al. in der unbehaarten Haut von Vorderpfoten sowie mit den hier gezeigten Ergebnissen in Spinalganglienneuronen bei Fabry-ko-Mäusen überein (Lakoma et al. 2014).

In Zusammenschau der Ergebnisse vorangegangener Studien und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich als Ursache der erhöhten TRPV1-Expression in Fabry-ko-Mäusen eine periphere oder zentrale Gb3-induzierte Entzündung, eventuell in Form einer neurogenen Entzündung vermuten. Denkbar wäre, dass die Entzündung zu einer erhöhten TRPV1-Expression in Spinalganglienneuronen führen könnte, welche in einem verstärkten antegraden Transport von TRPV1 in die peripheren Endigungen intraepidermaler Nervenfasern resultiert (Ji et al. 2002). Da TRPV1-Kanäle insbesondere in kleinen und mittleren, meist C-Faser exprimierenden Nozizeptoren vorkommen, könnte die verstärkte periphere TRPV1-Expression in dieser

Nervenfasersubgruppe zu einer Hypersensitivität der zurückgebliebenen C-Fasern führen. Hieraus könnten die in den Verhaltenstestungen nachgewiesene mechanische Hypersensibilität sowie Hypersensibilität gegenüber Hitze-Stimuli in jungen Fabry-ko-Mäusen resultieren. Weiterhin ist denkbar, dass die zusätzliche Beeinflussung anderer Schmerzmediatoren, wie bspw. CGRP, die progrediente Degeneration intraepidermaler Nervenfasern, die Erschöpfung der verbliebenen C-Fasern oder die weitere Selektion der restlichen Fasern zu der Entwicklung einer Hyposensibilität gegenüber Hitze-Stimuli in 12 Monate alten Fabry-ko-Mäusen führen könnten.

Eine in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführte Korrelationsuntersuchung der CD77- und TRPV1-Expression in Spinalganglienneuronen von Fabry-ko- und Kontrolltieren konnte keinen Genotyp-spezifischen Unterschied nachweisen. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die bei M. Fabry bestehende genetische Veränderung keine Auswirkungen auf bestehende physiologische Zusammenhänge zwischen Gb3 und TRPV1, sondern nur eine Verstärkung dieser Zusammenhänge hat.

Die in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Lakoma et al. an drei Monate alten Mäusen überein und könnten die Bedeutung des TRPV1-Ionenkanals für die Pathophysiologie des Fabry-assoziierten Schmerzes belegen.

4.3.2.2.2. Unterschiede der $Na_v1.8$ -Expression in Fabry-ko-Mäusen

Neben dem TRPV1-Kanal sind spannungsgesteuerte Na_v -Kanäle zunehmend in den Fokus der Schmerzforschung bei M. Fabry geraten. Sie sind u.a. für die Produktion und Weiterleitung von Aktionspotentialen innerhalb des Nervensystems verantwortlich (Waxman et al. 1999; Lee et al. 2005; Benarroch 2007). Da sie daneben jedoch auch die neuronale Erregbarkeit regulieren, könnte eine Veränderung ihrer Expression oder Funktion zu Änderungen neuronaler Aktivitätsmuster führen. Die resultierende Übererregbarkeit wird mit verschiedenen Schmerzformen, u.a. dem neuropathischen Schmerz in Verbindung gebracht (Waxman et al. 1999; Lai et al. 2003; Brouwer et al. 2014). Insgesamt existieren neun Untergruppen der Na_v -Kanäle (Brouwer et al. 2014). Die Gruppe, die für die Entstehung neuropathischer Schmerzen, wie beim M. Fabry vorkommend verantwortlich gemacht wird sind $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$; Kanäle die v.a. im PNS und hier insbesondere in kleinen, nozizeptiven Neuronen vorkommen

(Fang et al. 2002; Catterall et al. 2005; Lee et al. 2005; Dib-Hajj et al. 2010; de Lera Ruiz et al. 2015). Hierbei wird insbesondere $Na_v1.8$ eine essentielle Rolle in der Kälte-Wahrnehmung und $Na_v1.7$ die Initiierung von Aktionspotentialen als Antwort auf eine Depolarisation sensorischer Neurone durch schädliche Stimuli zugeordnet (Minett et al. 2012; Brouwer et al. 2014). Arbeiten zu Mutationsversuchen dieser Kanäle konnten die Bedeutung beider Kanäle für die Schmerzwahrnehmung und Schmerzweiterleitung untermauern. So führten „gain-of-function“-Mutationen des $Na_v1.7$ - bzw. 1.8 -Kanals zur Entwicklung der Erythromelalgie oder zu einer idiopathischen SFN (Yang et al. 2004; Fertleman et al. 2006; Faber et al. 2012; Brouwer et al. 2014). Ihre „loss-of-function“-Mutation resultierte dagegen in Hypalgesie (Cox et al. 2006; Goldberg et al. 2007). 2012 untersuchten Minett et al. die Rolle von $Na_v1.7$ bei neuropathischen Schmerzen. Die Gruppe beschrieb in dieser Arbeit drei Wege, wie $Na_v1.7$ die Schmerzleitung in Spinalganglienneuronen beeinflusst: 1. Durch Rekrutierung von $Na_v1.8$ zur Weiterleitung des Schmerzsignals in das Rückenmark (Momin et al. 2008), 2. Durch Unterstützung der Aktionspotentialausbreitung (Muroi et al. 2011; Raouf et al. 2012) und 3. Durch Regulation der Neurotransmitterfreisetzung an zentralen Nervenendigungen (Weiss et al. 2011). Weiterhin konnten Minett et al. unterschiedliche Reizschwellen verschiedener $Na_v1.7$ -exprimierender Spinalganglienneurone nachweisen, woraus sie schlussfolgerten, dass eine „gain-of-function“-Mutation des $Na_v1.7$ -Kanals brennende Schmerzen auslöst, weil die Reizschwelle der Hitze-sensiblen $Na_v1.7$ -exprimierenden ($Na_v1.8$ -negativen) Neurone niedriger ist als die der $Na_v1.7$ -exprimierenden $Na_v1.8$ -positiven „klassischen“ Neurone, die auf schädliche Mechanoperzeption reagieren (Minett et al. 2012). Auch die Gruppe um Leo et al. untersuchten die Rolle von $Na_v1.9$ und $Na_v1.8$ in der Pathogenese neuropathischer Schmerzen. So konnten sie in Untersuchungen von $Na_v1.9$ - und $Na_v1.8$ -Knockout-Mäusen v.a. eine reduzierte Antwort gegenüber Kälte nachweisen (Leo et al. 2010).

Erst in den letzten Jahren erfolgten Untersuchungen der Na_v -Kanäle im Fabry-ko-Mausmodell. So untersuchten Lakoma et al. neben der TRPV1-Expression ebenfalls die Expression von $Na_v1.8$ -Kanälen in der Vorderpfotenhaut von männlichen Fabry-ko-

Mäusen. Die Gruppe konnte eine erhöhte $\text{Na}_v1.8$ -Expression in der Epidermis der Vorderpfote von Fabry-ko-Mäusen gegenüber Kontrolltieren nachweisen. Diese erhöhte $\text{Na}_v1.8$ -Expression schien jedoch vermehrt in den dermalen Hautabschnitten als in den Nervenfasern vorzuliegen. Ferner beobachteten die Autoren eine höhere Proteinexpression von $\text{Na}_v1.8$ in den Fabry-ko-Männchen. Weitere Untersuchungen der $\text{Na}_v1.7$ -Expression erbrachten jedoch keinen Unterschied zwischen Fabry-ko- und Kontrolltieren (Lakoma et al. 2014). Die Gruppe um Lakoma et al. konnte ebenfalls in immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen an Spinalganglienneuronen und neuronalen Zellkulturen keine Unterschiede in der $\text{Nav}1.8$ -Expression zwischen Fabry-ko- und WT-Mäusen nachweisen (Lakoma et al. 2016).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse der vorangegangenen Arbeiten erfolgte in der vorliegenden Arbeit die fokussierte Untersuchung auf Veränderungen der neuronalen $\text{Na}_v1.7$ - bzw. $\text{Na}_v1.8$ -Expression in Fabry-ko-Mäusen. Zunächst erfolgte die Etablierung der Färbungen an den entnommenen Spinalganglien. Hier zeigte sich, dass mit den zur Verfügung stehenden anti- $\text{Na}_v1.7$ -Antikörpern keine spezifischen Färbungen durchführbar waren, weshalb im weiteren Verlauf die Fokussierung auf $\text{Na}_v1.8$ erfolgte. In den Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen von $\text{Na}_v1.8$ in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen, konnte kein Unterschied gegenüber der Gruppe der litt-WT-Mäuse festgestellt werden (**Abb. 15**). Lediglich in der Gruppe der 12 Monate alten Mäuse zeigte sich in den immunhistochemischen Färbungen eine Tendenz zur Reduktion der Anzahl $\text{Na}_v1.8$ -positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen (**Abb. 15**). Im Gegensatz dazu konnte in der qRT-PCR eine verminderte $\text{Na}_v1.8$ -Genexpression in jungen Fabry-ko-Mäusen gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen nachgewiesen werden. Alte Fabry-ko-Mäuse zeigten dagegen keinen Unterschied zu alten litt-WT-Mäusen (**Abb. 20**). Ein altersabhängiger Unterschied in der $\text{Na}_v1.8$ -Genexpression konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (**Abb. 20**).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der qRT-PCR deuten auf eine verminderte Expression von $\text{Na}_v1.8$ -Kanälen in jungen Fabry-ko-Mäusen hin. Da $\text{Na}_v1.8$ insbesondere für die Kälteerkennung essentiell ist, könnte die verminderte Expression

dieses Kanals die ebenfalls gezeigte Hyposensibilität gegenüber Kälte in dieser Altersgruppe erklären. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der molekulargenetischen und immunhistochemischen Untersuchung liegt vermutlich in den Methoden selbst. So können mit Hilfe der qRT-PCR präzise Aussagen bezüglich der Expression eines Kanals getroffen werden. Jedoch werden in der immunhistochemischen Färbung erst massive Veränderungen der Genexpression eines Kanals in Form eines veränderten Expressionsmusters sichtbar. Im Gegensatz zu den jungen Fabry-ko-Mäusen konnte in alten Fabry-ko-Mäusen kein Unterschied in der Genexpression von $Na_v1.8$ gegenüber litt-WT-Mäusen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte an einer physiologisch bedingten, mit dem Alter abnehmenden Genexpression von $Na_v1.8$ in litt-WT-Mäusen und damit Angleichung beider Expressionslevel in alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen liegen. Dies würde auch den lediglich geringen Unterschied in der Kältewahrnehmung in der Gruppe der 12 Monate alten Mäuse erklären.

Eine weder mit der qRT-PCR noch immunhistochemisch untersuchbare Aussage, ist die Funktion der vorhandenen Kanäle. So konnte die zusätzliche Vermutung einer Dysfunktion der vorhandenen Kanäle in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Eine verminderte Funktion der vorhandenen Kanäle könnte jedoch die bestehende Kälte-Hyposensibilität zusätzlich erklären. In bisher unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits verminderte $Na_v1.7$ -Ströme durch Patch clamp-Versuche an kultivierten Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden. Untersuchungen zu $Na_v1.8$ -Kanälen sind noch ausstehend. Diese Untersuchungen könnten die Vermutung der Dysfunktion der vorhandenen $Na_v1.8$ -Kanäle in Fabry-ko-Spinalganglien und der damit verbundenen Hyposensibilität gegenüber Kälte unterstützen. Daneben ist jedoch auch die Beeinflussung anderer Na_v -Untergruppen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden in der Pathophysiologie des Fabry-assoziierten Schmerzes weiterhin möglich. So wäre als Ursache der Hyposensibilität gegenüber Kälte ebenfalls eine Veränderung der neuronalen $Na_v1.9$ -Expression in Fabry-ko-Mäusen denkbar (Leo et al. 2010). Weiterhin konnte die Rolle des $Na_v1.7$ -Kanals bei M. Fabry in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt

werden. Mit Hilfe neuerer anti-Na_v1.7-Antikörper konnte aktuell eine Färbung an murinen Spinalganglienneuronen in unserer Arbeitsgruppe erfolgen. Dies eröffnet für zukünftige Arbeiten die Möglichkeit die neuronale Expression sowie Funktion von Na_v1.7 im Fabry-Mausmodell weiter zu erforschen.

So bilden die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse eine Grundlage zur weiteren Erforschung der Rolle der Na_v-Kanäle bei M. Fabry.

4.3.2.2.3. Verminderte CGRP-Expression in Spinalganglienneuronen von 12 Monate alten Fabry-ko-Mäusen

In zahlreichen Studien der vergangenen Jahre konnte die bedeutende Rolle von CGRP in der Schmerzentstehung und –weiterleitung belegt werden. CGRP kommt vorwiegend in kleinen bis mittleren, v.a. A δ - und C-Faser-exprimierenden Neuronen vor, welche eine 50%ige Kolo-kalisation mit TRPV1 aufweisen (Yu et al. 2009; McCoy et al. 2012). Die Sekretion von CGRP kann, ähnlich der Aktivierung TRPV1-positiver Neurone durch chemische und thermische sowie durch intensive mechanische Stimuli und anderer TRPV1-Agonisten ausgelöst werden (Tsukagoshi et al. 2006; Gold et al. 2010). Einige Studien konnten bspw. belegen, dass CGRP-Antagonisten in verschiedenen neuropathischen Schmerzmodellen zur Reduktion von Schmerzen führten (Yu et al. 1994; Yu et al. 1996; Bennett, A. D. et al. 2000; Massaad et al. 2004). Die bisherigen Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass CGRP eine zentrale Rolle in der Schmerzentstehung bei M. Fabry spielen könnte. Bisher gibt es jedoch keine Studien, die die Rolle von CGRP bei M. Fabry beleuchten. Die vorliegende Arbeit ist somit eine der ersten Arbeiten, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigte. Es konnte gezeigt werden, dass alte Fabry-ko-Mäuse gegenüber litt-WT-Mäusen eine reduzierte CGRP-Expression in Spinalganglienneuronen aufwiesen (**Abb. 16**).

Bereits Zhang et al. konnten in CGRP-knockout-Mäusen einen Verlust der Schmerzantwort auf Hitze nachweisen (Zhang et al. 2001). Diese Beobachtungen passen zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. So konnte in alten Fabry-ko-Mäusen sowohl eine Verminderung der neuronalen CGRP-Expression als auch eine Hyposensibilität gegenüber Hitze nachgewiesen werden (**Abb. 5, Abb. 16, Abb. 27**). Junge Fabry-ko-Mäuse, die keine Unterschiede der CGRP-Expression in Neuronen im

Vergleich zu ihren litt-WT-Artgenossen aufwiesen, zeigten im Gegensatz dazu in Verhaltenstestungen eine Hypersensibilität gegenüber Hitze, die wie o.g. aufgrund der Beeinflussung von TRPV1 entstehen könnte (**Abb. 5, Abb. 16, Abb. 27**). Es wäre somit möglich, dass die Verminderung der neuronalen CGRP-Expression in alten Fabry-ko-Mäusen ursächlich für Verhaltensänderungen im Hitze-Test sein könnte.

In weiteren Untersuchungen konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass CGRP in der Pathophysiologie des Schmerzes erst während abnormalen Schmerzbedingungen an Bedeutung gewinnt. So ließ sich durch alleinige Injektion von CGRP in Hinterpfoten von Versuchstieren bspw. keine Hyperalgesie auslösen. Erst im Rahmen von entzündlichem oder neuropathischem Schmerz scheint CGRP eine Rolle in der Schmerzentstehung einzunehmen (Saxen et al. 1993; Neugebauer et al. 1996; Russell et al. 2014). Übertragen auf das hier vorliegende Mausmodell und die vorliegenden Ergebnisse könnten diese Beobachtungen darauf hinweisen, dass auch bei M. Fabry inflammatorische Bedingungen vorliegen könnten. So könnten die in dieser Arbeit nachgewiesenen neuronalen Gb3-Ablagerungen eine neurogene Entzündung in Spinalganglien auslösen. Neurogene Entzündungen führen zur Sekretion von Neuropeptiden, insbesondere von Substanz P und CGRP an peripheren Nervenendigungen (Schmidth 2011). Diese vermehrte CGRP-Expression v.a. an C-Fasern führt schließlich zu einer Hypersensibilität gegenüber Hitze. Weiterhin lösen inflammatorische Prozesse die vermehrte Expression von TRPV1 aus, die, nach antegradem Transport in die peripheren Nervenendigungen ebenfalls eine Hypersensibilität gegenüber Hitze bedingt (Ji et al. 2002).

So könnte eine durch Gb3-Ablagerungen ausgelöste neurogene Entzündung an Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen zunächst die lokale Steigerung der neuronalen TRPV1-Expression sowie eine vermehrte Sekretion von CGRP auslösen. Weiterhin weisen TRPV1-Kanäle und das Neuropeptid CGRP eine 50%ige Kollokalisierung in kleinen insbesondere C-Faser-exprimierenden Neuronen auf (McCoy et al. 2012). Denkbar wäre jedoch auch, dass die inflammatorische Sekretion von CGRP zusätzlich eine weitere Steigerung der neuronalen TRPV1-Expression bedingen könnte (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 2005). Der Transport von TRPV1 und CGRP in die peripheren

Nervenfaserendigungen könnte schließlich in ihrer vermehrten epidermalen Expression sowie einer Hypersensibilität gegenüber Hitze in jungen Fabry-ko-Mäusen münden. Die peripher und neuronal verstärkte TRPV1-Expression würde ebenfalls die bestehende mechanische Hypersensibilität erklären. Weiterhin könnte die Verminderung der neuronalen CGRP-Expression in alten Fabry-ko-Mäusen auf eine Anpassung der Spinalganglienneurone auf die permanente neurogene Inflammation und damit verbundene hochregulierte CGRP-Sekretion hinweisen. Die veränderte neuronale CGRP-Expression als Adaptationsmechanismus sowie die veränderte IENFD mit zurückbleiben von lediglich mechano-sensitiven C-Fasern könnten somit die Entwicklung der Hyposensibilität gegenüber Hitze, sowie die persistierende Kälte-Hyposensibilität und mechanische Hypersensibilität erklären. Auch Beobachtungen bzw. Berichte von Fabry-Patienten über reduzierte Schmerzen mit zunehmendem Alter könnten diese Theorie ebenfalls unterstützen.

Kritikpunkt dieser Vermutung ist der fehlende Unterschied der neuronalen CGRP-Expression in der Gruppe der jungen Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse. So müsste eine deutlich verstärkte Sekretion von CGRP durch eine vermehrte Expression von CGRP in immunhistochemischen Untersuchungen feststellbar sein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte jedoch in der immunhistochemischen Methode selbst liegen. So wird in dieser Methode ein Antikörper gegen den CGRP-Rezeptor verwendet. Folgt man jedoch der Theorie dass eine neurogene Entzündung eine vermehrte Sekretion von CGRP verursacht, nicht jedoch die neuronale Rezeptorexpression von CGRP verändert, wäre mit dieser Methode die vorliegende Theorie nicht zu beweisen bzw. zu widerlegen. Die erhöhte Sekretion von CGRP, ausgelöst durch eine neurogene Entzündung müsste in einer gesteigerten Proteinexpression resultieren, die gegebenenfalls durch eine erhöhte Genexpression von CGRP verursacht wird.

Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse können somit zunächst als Hinweis auf die Rolle von CGRP in der Pathophysiologie des Fabry-assoziierten Schmerzes angesehen werden. Eine Beeinflussung des schmerzassoziierten Verhaltens der Fabry-ko-Maus durch veränderte Expression von CGRP scheint wahrscheinlich, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.3.2.3. *Reduktion neuronaler NF200-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen*

Zur weiteren Differenzierung der betroffenen Neurone in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der neuronalen NF200-Expression.

Es konnte gezeigt werden, dass Fabry-ko-Mäuse verglichen mit litt-WT-Mäusen eine deutlich reduzierte Anzahl NF200-exprimierender Neurone aufwiesen. NF200 ist ein Neurofilament, das die Stabilität der zellulären Integrität sichert sowie für die Regulation von Effektorproteinen wie Rezeptoren verantwortlich ist (DePianto et al. 2004; Lüllmann-Rauch 2009). Weiterhin kann es zur Abgrenzung von A-Faser- gegenüber C-Faser-exprimierenden Neuronen genutzt werden (Ma 2002). Die in dieser Arbeit festgestellte verminderte neuronale NF200-Expression könnte somit mit einer auftretenden zellulären Instabilität und dem Auftreten einer Hyposensibilität gegenüber Kälte in Fabry-ko-Mäusen zusammenhängen (**Abb. 5, Abb. 17, Abb. 28**). Denkbar wäre, dass eine zentrale Schädigung NF200-exprimierender Neurone in den Spinalganglien zu einer peripheren Degeneration intraepidermaler A δ -Fasern führen könnte. Dieser vorzeitige Untergang kälte-detektierender Fasern würde zu einer Hyposensibilität gegenüber Kälte führen, die bereits in jungen Mäusen einsetzt und mit steigendem Alter an Intensität zunimmt. Damit könnten die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse des Kälte-Tests auf die Degeneration A δ -Fasern und den Untergang NF200-positiver Neurone erklärt werden (**Abb. 5**). Weiterhin ergibt sich aus der Reduzierung der neuronalen NF200-Expression eine Erklärung für die vergrößerte Neuronenfläche in Fabry-ko-Mäusen. In einer Korrelationsuntersuchung konnte eine negative Korrelation zwischen der Neuronenfläche und der Anzahl NF200-exprimierender Neurone festgestellt werden (**Abb. 29, Abb. 30**). Somit könnte eine verminderte NF200-Expression zur Schwächung der neuronalen Stabilität bzw. des neuronalen Zytoskeletts führen und damit die Vergrößerung der Neuronenfläche bedingen.

Warum NF200-exprimierende Neurone bzw. A δ -Fasern eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer möglichen Gb3-induzierten neurogenen Entzündung aufweisen könnten, kann in der vorliegenden Studie nicht beantwortet werden. Hierzu bedarf es

in zukünftigen Arbeiten weiterer Untersuchungen, gegebenenfalls in Form von *in vitro*-Untersuchungen anhand von Neuronenkulturen.

4.3.3. Immunhistochemische Untersuchung der neuronalen IB4-Expression in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen

Kleine Nozizeptoren können ebenfalls anhand ihrer Immunoreaktivität gegenüber IB4 weiter unterteilt werden. Die meisten Nozizeptoren sind IB4-positive nicht-peptiderge Neurone, die GDNF-sensitive *Ret*-Rezeptoren exprimieren; IB4-negative Neurone weisen demgegenüber einen NGF-Rezeptor auf (Silverman et al. 1990; Bennett et al. 1996; Molliver et al. 1997; Bennett, D. L. et al. 2000; Breese et al. 2005; Chen et al. 2006; Leclere et al. 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorausstattung reagieren beide Untergruppen verschieden auf Entzündungen oder Axonschädigungen. So konnte bspw. in Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte NGF-Expression in einer thermischen und mechanischen Hyperalgesie resultiert (Lewin et al. 1994; Woolf et al. 1994; Andreev et al. 1995). Weitere Studien konnten unter Einwirkung neurotropher Faktoren und peripherer Entzündung eine erhöhte TRPV1-Expression und Funktion IB4-positiver Neurone nachweisen (Amaya et al. 2004; Breese et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollten durch IB4-Färbungen an Spinalganglienneuronen von Fabry-ko-Mäusen die betroffenen Neuronensubgruppen weiter differenziert werden. In der ersten Kohorte junger Fabry-ko-Mäuse konnte eine erhöhte neuronale IB4-Expression gegenüber gleichaltrigen *litt*-WT-Mäusen nachgewiesen werden (**Abb. 18**). Leider war die zunächst erfolgreich etablierte IB4-Färbung an den folgenden Kohorten nicht reproduzierbar. Trotz gleicher Ausführung konnte keine weitere spezifische Färbung durchgeführt werden. Auch Änderungen des zuvor funktionierenden Färbeprotokolls durch Variationen von Lösungen, Konzentrationen oder Abläufen resultierten in unspezifischen Färbungen. Somit konnte durch die fehlgeschlagene Reproduzierbarkeit der Färbung die Frage nach Unterschieden der neuronalen Expression von IB4 in jungen und alten Fabry-ko-Mäusen nicht vollständig beantwortet werden.

Der Hinweis einer vermehrten Expression IB4-positiver Neurone in Spinalganglien junger Mäuse könnte auf eine verstärkte Reaktion dieser Neuronenuntergruppe auf inflammatorische Stimuli hindeuten. In Zusammenschau mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, die eine erhöhte Expression IB4-positiver Neurone unter Einfluss neurotropher Faktoren und peripherer Entzündungen nachwiesen, könnten die hier gezeigte erhöhte IB4-Expression in jungen Fabry-ko-Mäusen ebenfalls die Hypothese einer neurogenen Entzündung mit Veränderung des neuronalen IB4-Expressionsmodells unterstützen (Amaya et al. 2004; Breese et al. 2005). Um diese Theorie weiter zu belegen, müssen in folgenden Untersuchungen weitere Färbungen durchgeführt und *in vitro* Versuche mit neurotrophen Faktoren erfolgen.

4.4. Etablierung einer Kultur aus Spinalganglienneuronen zur Untersuchung Schmerzassoziierter Ionenkanäle *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit erfolgte neben immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen ebenfalls die Etablierung einer Neuronenkultur aus Spinalganglien. Diese Kultur sollte neben immunhistochemischen Untersuchungen auch der Untersuchung von Proteinkonzentrationen mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* dienen. Nach erfolgreichem Abschluss der Etablierungsphase erfolgten immunhistochemische Untersuchungen, welche jedoch aufgrund ungenügender Reproduzierbarkeit erfolgreich durchgeführter Färbungen durch unspezifisches Färbeverhalten der Antikörper und aufgrund einer zu geringen Neuronenzahl nicht abgeschlossen werden konnten (**Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24**). Die geringe Neuronenzahl stellte ebenso für die Durchführung des *ELISA* einen limitierenden Faktor da.

Aktuell gelang es unserer Arbeitsgruppe höhere Neuronenzahlen aus Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen zu kultivieren, sodass in zukünftigen Arbeiten Neuronenkulturen zur weiteren Untersuchung der Pathophysiologie des M. Fabry genutzt werden können. So könnten mit Hilfe der Neuronenkultur neben neuronalen

Expressionsmustern auch Einflüsse von NGF und weiteren proinflammatorischen Faktoren auf die neuronale Expression schmerzassoziierter Kanäle und Neuropeptide *in vitro* untersucht werden. Weiterhin könnten durch sog. patch-clamp-Experimente Funktionseinschränkungen schmerzassoziierter Kanäle aufgedeckt werden. Auch könnten der grundlegende Einfluss von Gb3 weitere erforscht werden.

4.5. Methodenkritik und Limitationen der vorliegenden Arbeit

Aufgrund eines mildereren Phänotyps und der nicht beeinträchtigten Lebenserwartung stellt sich die Frage, ob das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell zur Erforschung des M. Fabry ausreichend geeignet ist (Ohshima et al. 1997; Marshall et al. 2010). Untersuchungen ergaben, dass Fabry-ko-Mäuse nur ein Viertel der in Menschen gemessenen Gb3-Konzentration aufwiesen (Ohshima et al. 1999). Daher ist fraglich, ob die mit diesem Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse vollständig auf den Menschen übertragbar sind. Diese Frage stellt sich jedoch bei allen Tiermodellen, die zur Erforschung der Pathophysiologie von Erkrankungen genutzt werden. Im Gegensatz zum neuentwickelten Fabry-Mausmodell mit artifiziell gesteigerter Gb3-Synthese schafft die in diesem Mausmodell vorgenommene Ausschaltung des *GLA*-Gens jedoch ein physiologisches Modell des M. Fabry. Die künstlich erhöhte Gb3-Akkumulation im Gewebe der G3Stg/GLA-ko-Maus schränkt die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse weiter ein. So stellt das hier verwendete Mausmodell ein physiologisches Modell zur Erforschung des M. Fabry dar, an dem insbesondere die pathophysiologischen Mechanismen untersucht werden können.

Bei den Verhaltenstestungen muss der hier verwendete Kälte-Test nach Brenner et al. kritisch betrachtet werden (Brenner et al. 2012). Aufgrund der Nutzung von Trockeneispulver kann während der Testungen keine gleichbleibende Temperatur garantiert werden. Aufgrund des häufigen Austauschs des Trockeneispulvers können zwar mögliche Temperaturschwankung minimiert, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. Diese minimalen Temperaturschwankungen könnten durch die Nutzung eines

„Coldplate“-Test weiter reduziert werden. Jedoch nutzten Lakoma et al. in ihrer Arbeit drei verschiedene Kälte-Testungen, die identische Ergebnisse erbrachten (Lakoma et al. 2014). Somit scheinen die Temperaturunterschiede im Kälte-Test nach Brenner et al. keinen bedeutsamen Einfluss auf die erbrachten Ergebnisse zu haben.

Ein weiterer Kritikpunkt der hier vorgelegten Arbeit ist die Nutzung eines anti-mouse antiCD77-Antikörpers zur Detektion von Gb3 in murinem Gewebe. Trotz der in verschiedenen Färbungen von Mausgewebe nachgewiesenen Spezifität dieses Antikörpers gegenüber Gb3-Ablagerungen, ergab sich eine starke Hintergrundfärbung, die eine Intensitätsauswertung unmöglich machte. Die Intensitätsmessung wäre eine interessante und eventuell aussagekräftigere Methode zur Erfassung der Gb3-Konzentration in Fabry-ko-Mäusen mit steigendem Alter gewesen. Durch die hier erfolgte manuelle Zählung Gb3-exprimierender Neurone konnte lediglich die Frage der Anzahl Gb3-positiver Spinalganglienneurone, nicht jedoch die der Menge an Gb3 beantwortet werden. Mit Hilfe neu entwickelter antiCD77-Antikörper und einer damit durchführbaren Intensitätsmessung kann in zukünftigen Arbeiten die Frage der Gb3-Konzentration in Spinalganglienneuronen von Fabry-ko-Mäusen immunhistochemisch beantwortet werden. Die Nutzung des hier verwendeten Antikörpers erschwerte ebenfalls die immunhistochemischen Untersuchungen an kultivierten murinen Spinalganglienneuronen. Aufgrund der starken Hintergrundfärbung konnten keine aussagekräftigen immunhistochemischen Untersuchungen auf die Kolo-kalisation von schmerzassoziierten Kanälen bzw. Peptiden mit Gb3 durchgeführt werden. Auch hier könnte die Nutzung neu entwickelter antiCD77-Antikörper die Hintergrundfärbung reduzieren und damit die Aussagekraft maximieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls die Untersuchung der neuronalen IB4-Expression mittels immunhistochemischer Untersuchungen. Die Frage nach Unterschieden dieser Expression zwischen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen konnte jedoch nicht abschließend beantwortet werden. Als eine mögliche Ursache wurde die Gewebequalität der zweiten Kohorte von Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen diskutiert. So hätte eine Schädigung des Gewebes bei Entnahme oder eine fehlerhafte Fixierung zu Schäden im Gewebe führen können. Da jedoch andere Färbungen an dem gleichen

Gewebe durchführbar waren, konnte dies als Ursache ausgeschlossen werden. Weiterhin wäre eine neue Zusammensetzung der, aufgrund des zeitlichen Abstandes zwischen den Färbungen neu bezogenen Antikörper-Charge möglich. Abschließend kann die Ursache der nicht-replizierbaren Färbung nicht geklärt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Neuronenkultur aus Spinalganglien erfolgreich etabliert werden. Limitierend für die weiteren immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen war jedoch eine zu geringe Neuronenanzahl. Trotz Steigerung der Anzahl verwendeter Spinalganglien, war eine Erhöhung der Neuronenzahl nicht möglich. Dies könnte mit einer ausgeschöpften Kapazität der verwendeten Enzyme zur Spaltung der Ganglienhüllen oder einer verlängerten Entnahmedauer und damit geringeren Anzahl vitaler neuronaler Zellen zusammenhängen. Auch durch Pooling der gewonnenen neuronalen Zellen, konnte keine für eine *ELISA* benötigte Anzahl neuronaler Zellen gewonnen werden. Zwischenzeitlich konnte in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Protokoll zur Anlage einer neuronalen Kultur etabliert werden. Zellzählungen und Vitalitätsuntersuchungen deuten auf eine höhere Neuronenanzahl hin. Mit Hilfe dieser Kulturen könnten die hier nicht durchgeführten Untersuchungen erfolgen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der Pathomechanismus des Fabry-assoziierten Schmerzes blieb trotz Entwicklung der Fabry-ko-Maus durch Ohshima et al. bisher weitergehend ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Charakterisierung des Fabry-ko-Mausmodells hinsichtlich Schmerz-assoziierten Verhaltens und Expression Schmerz-assoziiierter Ionenkanäle in Spinalganglienneuronen (Ohshima et al. 1997). Hierzu wurden insgesamt 42 drei Monate und 41 12 Monate alte männliche und weibliche Fabry-ko-Mäuse und ihre gleichaltrigen Wurfgeschwister untersucht. Die Verhaltenstestungen beinhalteten einen von Frey- sowie einen „Hotplate“- und „Cold“-Test zur Evaluation der mechanischen und thermischen Rückzugslatenz. Weiterhin erfolgten die Analyse der intraepidermalen Nervenfaserdichte in Fußsohlen der Mäuse sowie eine H.E.-Färbung von Spinalganglien zur Untersuchung morphologischer Veränderungen der Neurone. Zusätzlich folgten immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen der CD77-, TRPV1-, Na_v1.8-, CGRP-, NF200- und IB4-Expression an kryokonservierten und kultivierten Spinalganglienneuronen.

In Verhaltenstestungen konnten eine Hypersensibilität gegenüber mechanischen und Hitze-Stimuli sowie eine Kälte-Hyposensibilität festgestellt werden. Es zeigte sich eine reduzierte IENFD in Fußsohlen sowie eine Vergrößerung der neuronalen Fläche in Spinalganglien von Fabry-ko-Mäusen. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben eine erhöhte CD77- und TRPV1-Expression sowie eine erniedrigte NF200-Expression in Fabry-ko-Mäusen; Untersuchungen hinsichtlich der Na_v1.8-Expression ergaben keine Unterschiede. Molekulargenetisch konnte neben einer verminderten Na_v1.8-Expression in jungen Fabry-ko-Mäusen keine Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der Verhaltenstestungen sowie die verminderte IENFD bei Fabry-ko-Mäusen entsprechen klinischen Befunden bei Fabry-Patienten. Erstmals konnte in dieser Arbeit eine Vergrößerung der Neuronenfläche in Fabry-ko-Mäusen quantitativ nachgewiesen und eine vermehrte Expression von TRPV1 und CD77 festgestellt werden. Bei fehlendem Nachweis eines geschlechtsspezifischen Unterschieds der

Ergebnisse, konnte ein Einfluss des weiblichen Geschlechts auf den Phänotyp des M. Fabry ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können aufgrund der hohen Anzahl an Versuchstieren und dem Vergleich mit Wurfgeschwistern als Grundlage für weitere Studien dienen. Aufgrund methodischer Limitationen können jedoch nicht alle Fragen abschließend geklärt werden. So sind weitere Untersuchungen notwendig um den genauen Pathomechanismus der erhöhten TRPV1-Expression in Spinalganglienneuronen zu untersuchen. Weiterhin sind patch clamp-Analysen kultivierter Spinalganglienneurone notwendig um weitere Erkenntnisse über die Funktionalität der Ionenkanäle zu gewinnen. Darüber hinaus können mit Hilfe des hier verwendeten Mausmodells weitere in die Schmerzentscheidung bzw. -weiterleitung involvierte Kanäle wie bspw. TRPM8, Na_v1.9 oder HCN2 untersucht werden und in Untersuchungen neuronaler Kulturen der Einfluss neurotropher Faktoren wie NGF oder GDNF geklärt werden, um die eventuell zugrundeliegende neurogene Entzündung weiter aufzudecken.

6. Literaturverzeichnis

- Abramoff, M. D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004). "Image Processing with ImageJ." Biophotonics International 11(7): 36-42.
- Aerts, J. M. et al. (2008). "Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105(8): 2812-2817.
- Amaya, F. et al. (2004). "NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia." Eur. J. Neurosci. 20(9): 2303-2310.
- Anderson, W. (1898). "A case of "Angeio-Keratoma"." Br. J. Dermatol. Volume 10(Issue 4): 113-117.
- Andreev, N. et al. (1995). "Peripheral administration of nerve growth factor in the adult rat produces a thermal hyperalgesia that requires the presence of sympathetic post-ganglionic neurones." Pain 63(1): 109-115.
- Aumüller, G. (2014). Anatomie. Stuttgart, Thieme.
- Bagal, S. K. et al. (2015). "Voltage gated sodium channels as drug discovery targets." Channels (Austin) 9(6): 360-366.
- Bangari, D. S. et al. (2015). "alpha-Galactosidase A knockout mice: progressive organ pathology resembles the type 2 later-onset phenotype of Fabry disease." Am. J. Pathol. 185(3): 651-665.
- Benarroch, E. E. (2007). "Sodium channels and pain." Neurology 68(3): 233-236.
- Benjamin, E. R. et al. (2016). "The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalostat." Genet Med.
- Bennett, A. D. et al. (2000). "Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP(8-37) in a rodent model of chronic central pain." Pain 86(1-2): 163-175.
- Bennett, D. L. (2001). "Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function." Neuroscientist 7(1): 13-17.
- Bennett, D. L. et al. (1996). "Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptor in primary sensory neurons." Eur. J. Neurosci. 8(10): 2204-2208.
- Bennett, D. L. et al. (2000). "The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury." J. Neurosci. 20(1): 427-437.
- Biegstraaten, M. et al. (2015). "Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document." Orphanet J Rare Dis 10: 36.
- Bishop, D. F. et al. (1988). "Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85(11): 3903-3907.
- Brady, R. O. et al. (1967). "Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency." N. Engl. J. Med. 276(21): 1163-1167.
- Branton, M. et al. (2002). "Natural history and treatment of renal involvement in Fabry disease." J. Am. Soc. Nephrol. 13 Suppl 2: S139-143.

- Breese, N. M. et al. (2005). "Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse." Pain 115(1-2): 37-49.
- Brenner, D. S. et al. (2012). "A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice." PLoS One 7(6): e39765.
- Brouwer, B. A. et al. (2014). "Painful neuropathies: the emerging role of sodium channelopathies." J. Peripher. Nerv. Syst. 19(2): 53-65.
- Burlina, A. P. et al. (2011). "Early diagnosis of peripheral nervous system involvement in Fabry disease and treatment of neuropathic pain: the report of an expert panel." BMC Neurol 11: 61.
- Butters, T. D. et al. (2000). "Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: application to lysosomal storage disorders." Chem. Rev. 100(12): 4683-4696.
- Caterina, M. J. et al. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science 288(5464): 306-313.
- Caterina, M. J. et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature 389(6653): 816-824.
- Catterall, W. A. et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels." Pharmacol. Rev. 57(4): 397-409.
- Chaplan, S. R. et al. (1994). "Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw." J. Neurosci. Methods 53(1): 55-63.
- Chateau, Y. et al. (2004). "Connections between nerve endings and epidermal cells: are they synapses?" Exp. Dermatol. 13(1): 2-4.
- Chen, C. L. et al. (2006). "Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain." Neuron 49(3): 365-377.
- Choi, J. O. et al. (2010). "Characterization of Fabry mice treated with recombinant adeno-associated virus 2/8-mediated gene transfer." J. Biomed. Sci. 17: 26.
- Choi, J. Y. et al. (2015). "Lyso-globotriaosylceramide downregulates KCa3.1 channel expression to inhibit collagen synthesis in fibroblasts." Biochem. Biophys. Res. Commun. 468(4): 883-888.
- Cox, J. J. et al. (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." Nature 444(7121): 894-898.
- De Francesco, P. N. et al. (2013). "Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide." Mol. Genet. Metab. 109(1): 93-99.
- de Lera Ruiz, M. et al. (2015). "Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications." J. Med. Chem. 58(18): 7093-7118.
- DePianto, D. et al. (2004). "Intermediate filaments and tissue repair." Exp. Cell Res. 301(1): 68-76.
- Desnick, R. J. et al. (2003). "Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy." Ann. Intern. Med. 138(4): 338-346.
- Dib-Hajj, S. D. et al. (2009). "Transfection of rat or mouse neurons by biolistics or electroporation." Nat Protoc 4(8): 1118-1126.

- Dib-Hajj, S. D. et al. (2010). "Sodium channels in normal and pathological pain." Annu. Rev. Neurosci. 33: 325-347.
- Durant, B. et al. (2011). "Sex differences of urinary and kidney globotriaosylceramide and lyso-globotriaosylceramide in Fabry mice." J. Lipid Res. 52(9): 1742-1746.
- Echevarria, L. et al. (2016). "X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease." Clin. Genet. 89(1): 44-54.
- Eitzman, D. T. et al. (2003). "Fabry disease in mice is associated with age-dependent susceptibility to vascular thrombosis." J. Am. Soc. Nephrol. 14(2): 298-302.
- Ellaway, C. (2016). "Paediatric Fabry disease." Transl Pediatr 5(1): 37-42.
- Emeson, R. B. et al. (1989). "Alternative production of calcitonin and CGRP mRNA is regulated at the calcitonin-specific splice acceptor." Nature 341(6237): 76-80.
- Faber, C. G. et al. (2012). "Gain of function Nanu1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy." Ann. Neurol. 71(1): 26-39.
- Faber, C. G. et al. (2012). "Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109(47): 19444-19449.
- Fabry, J. (1898). "Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae)." Dermatol. Wochenschr. 43(1): 187-300.
- Fang, X. et al. (2002). "The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons." J. Neurosci. 22(17): 7425-7433.
- Fellgiebel, A. et al. (2011). "Basilar artery diameter is a potential screening tool for Fabry disease in young stroke patients." Cerebrovasc. Dis. 31(3): 294-299.
- Fertleman, C. R. et al. (2006). "SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes." Neuron 52(5): 767-774.
- Fleige, S. et al. (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." Mol. Aspects Med. 27(2-3): 126-139.
- Gadoth, N. et al. (1983). "Involvement of dorsal root ganglia in Fabry's disease." J. Med. Genet. 20(4): 309-312.
- Garcia-Martinez, C. et al. (2002). "Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(4): 2374-2379.
- Garman, R. D. et al. (2004). "Methotrexate reduces antibody responses to recombinant human alpha-galactosidase A therapy in a mouse model of Fabry disease." Clin. Exp. Immunol. 137(3): 496-502.
- Garman, S. C. (2007). "Structure-function relationships in alpha-galactosidase A." Acta Paediatr. 96(455): 6-16.
- Garman, S. C. et al. (2004). "The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase." J. Mol. Biol. 337(2): 319-335.
- Germain, D. P. (2010). "Fabry disease." Orphanet J Rare Dis 5: 30.
- Germain, D. P. et al. (2016). "Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat." N. Engl. J. Med. 375(6): 545-555.
- Gold, M. S. et al. (2010). "Nociceptor sensitization in pain pathogenesis." Nat. Med. 16(11): 1248-1257.

- Goldberg, Y. P. et al. (2007). "Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations." Clin. Genet. 71(4): 311-319.
- Harper, P. S. (2011). "Mary Lyon and the hypothesis of random X chromosome inactivation." Hum. Genet. 130(2): 169-174.
- Heare, T. et al. (2007). "Severe endothelial dysfunction in the aorta of a mouse model of Fabry disease; partial prevention by N-butyldeoxynojirimycin treatment." J. Inherit. Metab. Dis. 30(1): 79-87.
- Hedstrom, K. L. et al. (2014). "Treating small fiber neuropathy by topical application of a small molecule modulator of ligand-induced GFRalpha/RET receptor signaling." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111(6): 2325-2330.
- Holzapfel, B. W., L (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." Biologie in unserer Zeit 37: 120–126.
- Hughes, D. A. et al. (2016). "Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study." J. Med. Genet.
- Ioannou, Y. A. et al. (2001). "Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice." Am J Hum Genet 68(1): 14-25.
- Jeyakumar, M. et al. (2002). "Glycosphingolipid lysosomal storage diseases: therapy and pathogenesis." Neuropathol. Appl. Neurobiol. 28(5): 343-357.
- Jeyakumar, M. et al. (2002). "An inducible mouse model of late onset Tay-Sachs disease." Neurobiol Dis 10(3): 201-210.
- Ji, R. R. et al. (2002). "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia." Neuron 36(1): 57-68.
- Jung, J. et al. (2004). "Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding." J. Biol. Chem. 279(8): 7048-7054.
- Kahn, P. (1973). "Anderson-Fabry disease: a histopathological study of three cases with observations on the mechanism of production of pain." J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 36(6): 1053-1062.
- Kaye, E. M. et al. (1988). "Nervous system involvement in Fabry's disease: clinicopathological and biochemical correlation." Ann. Neurol. 23(5): 505-509.
- Kolodny, E. et al. (2015). "Cerebrovascular involvement in Fabry disease: current status of knowledge." Stroke 46(1): 302-313.
- Lai, J. et al. (2003). "The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain." Curr. Opin. Neurobiol. 13(3): 291-297.
- Lakoma, J. et al. (2014). "Pain related channels are differentially expressed in neuronal and non-neuronal cells of glabrous skin of fabry knockout male mice." PLoS One 9(10): e108641.
- Lakoma, J. et al. (2016). "Increased expression of Trpv1 in peripheral terminals mediates thermal nociception in Fabry disease mouse model." Mol Pain 12.
- Lauria, G. et al. (2005). "EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy." Eur. J. Neurol. 12(10): 747-758.

- Leclere, P. G. et al. (2007). "Impaired axonal regeneration by isolectin B4-binding dorsal root ganglion neurons in vitro." *J. Neurosci.* 27(5): 1190-1199.
- Lee, Y. et al. (2005). "Painful channels in sensory neurons." *Mol. Cells* 20(3): 315-324.
- Leipold, E. et al. (2013). "A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception." *Nat. Genet.* 45(11): 1399-1404.
- Leo, S. et al. (2010). "Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice." *Behav. Brain Res.* 208(1): 149-157.
- Levine, J. D. et al. (2007). "TRP channels: targets for the relief of pain." *Biochim. Biophys. Acta* 1772(8): 989-1003.
- Lewin, G. R. et al. (1994). "Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia." *Eur. J. Neurosci.* 6(12): 1903-1912.
- Liapi, A. et al. (2005). "Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex." *Eur. J. Neurosci.* 22(4): 825-834.
- Linhart, A. et al. (2000). "New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease." *Am. Heart J.* 139(6): 1101-1108.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart, Thieme.
- Ma, Q. P. (2002). "Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats." *Neurosci. Lett.* 319(2): 87-90.
- Maag, R. et al. (2008). "Assessment of pain and somatosensory function in Fabry disease: early diagnosis." *Clin. Ther.* 30 Suppl B: S52-53.
- Maag, R. et al. (2008). "Detection of a characteristic painful neuropathy in Fabry disease: a pilot study." *Pain Med* 9(8): 1217-1223.
- MacDermot, K. D. et al. (2001). "Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males." *J. Med. Genet.* 38(11): 750-760.
- Marshall, J. et al. (2010). "Substrate reduction augments the efficacy of enzyme therapy in a mouse model of Fabry disease." *PLoS One* 5(11): e15033.
- Massaad, C. A. et al. (2004). "Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats." *J. Neuroimmunol.* 153(1-2): 171-182.
- Mauhin, W. et al. (2015). "Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease." *JIMD Rep* 22: 1-10.
- McCoy, E. S. et al. (2012). "CGRPalpha-expressing sensory neurons respond to stimuli that evoke sensations of pain and itch." *PLoS One* 7(5): e36355.
- Mehta, A. et al. (2010). "Fabry disease: a review of current management strategies." *QJM* 103(9): 641-659.
- Mehta, A. et al. (2004). "Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey." *Eur. J. Clin. Invest.* 34(3): 236-242.
- Meikle, P. J. et al. (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." *JAMA* 281(3): 249-254.
- Minett, M. S. et al. (2012). "Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons." *Nat Commun* 3: 791.

- Miyatake, T. et al. (1972). "Sphingoglycolipids in the nervous system in Fabry's disease." J. Neurochem. 19(8): 1911-1916.
- Mogil, J. S. et al. (2011). "Pain sensitivity and vasopressin analgesia are mediated by a gene-sex-environment interaction." Nat. Neurosci. 14(12): 1569-1573.
- Molliver, D. C. et al. (1997). "IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life." Neuron 19(4): 849-861.
- Momin, A. et al. (2008). "Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets." Curr. Opin. Neurobiol. 18(4): 383-388.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE 2005(272): re3.
- Moriya, T. et al. (2015). "Full-length transient receptor potential vanilloid 1 channels mediate calcium signals and possibly contribute to osmoreception in vasopressin neurones in the rat supraoptic nucleus." Cell Calcium 57(1): 25-37.
- Muller, M. J. (2006). Neuropsychiatric and psychosocial aspects of Fabry disease. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann. Oxford.
- Muroi, Y. et al. (2011). "Selective silencing of Na(V)1.7 decreases excitability and conduction in vagal sensory neurons." J Physiol 589(Pt 23): 5663-5676.
- Murray, G. J. et al. (2007). "Cellular and tissue distribution of intravenously administered agalsidase alfa." Mol. Genet. Metab. 90(3): 307-312.
- Namdar, M. et al. (2012). "Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease." PLoS One 7(4): e36373.
- Namer, B. et al. (2015). "Differential sensitization of silent nociceptors to low pH stimulation by prostaglandin E2 in human volunteers." Eur J Pain 19(2): 159-166.
- Nelson, M. P. et al. (2014). "Autophagy-lysosome pathway associated neuropathology and axonal degeneration in the brains of alpha-galactosidase A-deficient mice." Acta Neuropathol Commun 2: 20.
- Neugebauer, V. et al. (1996). "Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation." Neuroscience 71(4): 1095-1109.
- Niemann, M. et al. (2014). "Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 defines Fabry disease." Circ Cardiovasc Genet 7(1): 8-16.
- Ohshima, T. et al. (1995). "Structural organization and expression of the mouse gene encoding alpha-galactosidase A." Gene 166(2): 277-280.
- Ohshima, T. et al. (1997). "alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94(6): 2540-2544.
- Ohshima, T. et al. (1999). "Aging accentuates and bone marrow transplantation ameliorates metabolic defects in Fabry disease mice." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(11): 6423-6427.
- Ortiz, A. et al. (2010). "End-stage renal disease in patients with Fabry disease: natural history data from the Fabry Registry." Nephrol. Dial. Transplant. 25(3): 769-775.
- Pensabene, L. et al. (2016). "Gastrointestinal Symptoms of Patients with Fabry Disease." Gastroenterol Res Pract 2016: 9712831.

- Planells-Cases, R. et al. (2005). "Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia." Pflugers Arch. 451(1): 151-159.
- Plenderleith, M. B. et al. (1993). "The plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurones which innervate the skin in the rat." Neurosci. Lett. 159(1-2): 17-20.
- Purpura, D. P. et al. (1976). "Distortion of neuronal geometry and formation of aberrant synapses in neuronal storage disease." Brain Res. 116(1): 1-21.
- Ramaswami, U. et al. (2006). "Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey." Acta Paediatr. 95(1): 86-92.
- Raouf, R. et al. (2012). "Sodium channels and mammalian sensory mechanotransduction." Mol Pain 8: 21.
- Rasband, W. S. (1997-2005). "ImageJ." U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Rodrigues, L. G. et al. (2009). "Neurophysiological, behavioral and morphological abnormalities in the Fabry knockout mice." Neurobiol. Dis. 33(1): 48-56.
- Rogers, D. C. et al. (1997). "Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment." Mamm. Genome 8(10): 711-713.
- Rush, A. M. et al. (1998). "Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia." J Physiol 511 (Pt 3): 771-789.
- Russell, F. A. et al. (2014). "Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology." Physiol. Rev. 94(4): 1099-1142.
- Saito, S. et al. (2011). "Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant alpha-galactosidase A structures in Fabry disease." J. Hum. Genet. 56(6): 467-468.
- Sanchez, J. F. et al. (2001). "The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat." Neuroscience 107(3): 373-381.
- Satheesh, N. J. et al. (2016). "TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity." Neuropeptides.
- Saxen, M. A. et al. (1993). "The mouse paw withdrawal assay: a method for determining the effect of calcitonin gene-related peptide on cutaneous heat nociceptive latency time." Life Sci. 53(5): 397-405.
- Schiffmann, R. (2009). "Fabry disease." Pharmacol. Ther. 122(1): 65-77.
- Schiffmann, R. et al. (2009). "Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy." Nephrol. Dial. Transplant. 24(7): 2102-2111.
- Schmelz, M. et al. (2000). "Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin?" Neuroreport 11(3): 645-648.
- Schmidt, R. et al. (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." J. Neurosci. 15(1 Pt 1): 333-341.
- Schmidh, R. F. (2011). Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. Berlin/Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

- Scriba, K. (1950). Zur Pathogenese des Angiokeratoma Corporis Diffusum Fabry mit cardio-vaso-renalem Symptomen Komplex Verhandl. deutsch. path. Gesellsch. 34.
- Seydelmann, N. et al. (2015). "Fabry disease and the heart." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 29(2): 195-204.
- Shah, J. S. et al. (2005). "Prevalence and clinical significance of cardiac arrhythmia in Anderson-Fabry disease." Am. J. Cardiol. 96(6): 842-846.
- Shen, J. S. et al. (2008). "Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells." Mol. Genet. Metab. 95(3): 163-168.
- Shiozuka, C. et al. (2011). "Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human alpha1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease." J Biochem 149(2): 161-170.
- Sidi, S. et al. (2003). "NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction." Science 301(5629): 96-99.
- Silverman, J. D. et al. (1990). "Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers." J. Neurocytol. 19(5): 789-801.
- Sims, K. et al. (2009). "Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry." Stroke 40(3): 788-794.
- Snider, W. D. et al. (1998). "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors." Neuron 20(4): 629-632.
- Sorge, R. E. et al. (2011). "Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice." J. Neurosci. 31(43): 15450-15454.
- Sorge, R. E. et al. (2015). "Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice." Nat. Neurosci. 18(8): 1081-1083.
- Spada, M. et al. (2006). "High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening." Am J Hum Genet 79(1): 31-40.
- Steward, V. W. et al. (1968). "Fabry's disease (angiokeratoma corporis diffusum). A report of 5 cases with pain in the extremities as the chief symptom." Pathol. Eur. 3(2): 377-388.
- Stucky, C. L. et al. (1999). "Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct." J. Neurosci. 19(15): 6497-6505.
- Tabira, T. et al. (1974). "Neuropathological and biochemical studies in Fabry's disease." Acta Neuropathol 30(4): 345-354.
- Taguchi, A. et al. (2013). "A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide synthesis." Biochem. J. 456(3): 373-383.
- Talbot, S. et al. (2016). "Neuroimmune Physiology and Pathology." Annu. Rev. Immunol.
- Tohda, C. et al. (2001). "Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity." J. Neurochem. 76(6): 1628-1635.

- Tominaga, M. et al. (2005). "Structure and function of TRPV1." Pflugers Arch. 451(1): 143-150.
- Torvin Moller, A. et al. (2009). "Functional and structural nerve fiber findings in heterozygote patients with Fabry disease." Pain 145(1-2): 237-245.
- Toyooka, K. (2011). "Fabry disease." Curr. Opin. Neurol. 24(5): 463-468.
- Tsukagoshi, M. et al. (2006). "Differential distribution of vanilloid receptors in the primary sensory neurons projecting to the dorsal skin and muscles." Histochem. Cell Biol. 126(3): 343-352.
- Üçeyler, N. (2016). "Small fiber pathology-a culprit for many painful disorders?" Pain 157 Suppl 1: S60-66.
- Üçeyler, N. et al. (2013). "Characterization of Pain in Fabry Disease." Clin. J. Pain.
- Üçeyler, N. et al. (2014). "Characterization of pain in fabry disease." Clin. J. Pain 30(10): 915-920.
- Üçeyler, N. et al. (2011). "Small fibers in Fabry disease: baseline and follow-up data under enzyme replacement therapy." J. Peripher. Nerv. Syst. 16(4): 304-314.
- Üçeyler, N. et al. (2014). "Increased arterial diameters in the posterior cerebral circulation in men with Fabry disease." PLoS One 9(1): e87054.
- Üçeyler, N. et al. (2012). "[Fabry disease : diagnosis and treatment]." Schmerz 26(5): 609-619.
- Üçeyler, N. et al. (2013). "Impaired small fiber conduction in patients with Fabry disease: a neurophysiological case-control study." BMC Neurol 13: 47.
- Valbuena, C. et al. (2011). "Kidney histologic alterations in alpha-Galactosidase-deficient mice." Virchows Arch. 458(4): 477-486.
- Venkatachalam, K. et al. (2007). "TRP channels." Annu. Rev. Biochem. 76: 387-417.
- Verma, J. et al. (2015). "Inherited metabolic disorders: prenatal diagnosis of lysosomal storage disorders." Prenat. Diagn. 35(11): 1137-1147.
- Voilley, N. et al. (2001). "Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors." J. Neurosci. 21(20): 8026-8033.
- Wagner, M. et al. (2014). "Kidney function as an underestimated factor for reduced health related quality of life in patients with Fabry disease." BMC Nephrol 15: 188.
- Wang, H. et al. (2005). "Pain TRPs." Neuron 46(1): 9-12.
- Warnock, D. G. et al. (2015). "Oral Migalastat HCl Leads to Greater Systemic Exposure and Tissue Levels of Active alpha-Galactosidase A in Fabry Patients when Co-Administered with Infused Agalsidase." PLoS One 10(8): e0134341.
- Waxman, S. G. et al. (1999). "Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain." Muscle Nerve 22(9): 1177-1187.
- Waxman, S. G. et al. (1999). "Sodium channels and pain." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(14): 7635-7639.
- Weidemann, F. et al. (2013). "Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications." J. Intern. Med. 274(4): 331-341.
- Weidemann, F. et al. (2011). "The Fabry cardiomyopathy: models for the cardiologist." Annu. Rev. Med. 62: 59-67.

- Weiss, J. et al. (2011). "Loss-of-function mutations in sodium channel Nav1.7 cause anosmia." Nature 472(7342): 186-190.
- Wilcox, W. R. et al. (2008). "Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry." Mol. Genet. Metab. 93(2): 112-128.
- Winer, J. et al. (1999). "Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro." Anal. Biochem. 270(1): 41-49.
- Woolf, C. J. et al. (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." Neuron 55(3): 353-364.
- Woolf, C. J. et al. (1994). "Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity." Neuroscience 62(2): 327-331.
- Yang, Y. et al. (2004). "Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia." J. Med. Genet. 41(3): 171-174.
- Yu, L. C. et al. (1996). "Intrathecal CGRP8-37-induced bilateral increase in hindpaw withdrawal latency in rats with unilateral inflammation." Br. J. Pharmacol. 117(1): 43-50.
- Yu, L. C. et al. (1994). "The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses in rats." Brain Res. 653(1-2): 223-230.
- Yu, L. C. et al. (2009). "Roles of calcitonin gene-related peptide and its receptors in pain-related behavioral responses in the central nervous system." Neurosci. Biobehav. Rev. 33(8): 1185-1191.
- Yuan, A. et al. (2006). "Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS." J. Neurosci. 26(39): 10006-10019.
- Zarate, Y. A. et al. (2008). "Fabry's disease." Lancet 372(9647): 1427-1435.
- Zhang, L. et al. (2001). "Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity." Pain 89(2-3): 265-273.
- Zhang, X. Y. et al. (2013). "Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain." Am J Hum Genet 93(5): 957-966.
- Ziegler, R. J. et al. (2007). "Correction of the biochemical and functional deficits in fabry mice following AAV8-mediated hepatic expression of alpha-galactosidase A." Mol Ther 15(3): 492-500.
- Ziegler, R. J. et al. (1999). "Correction of enzymatic and lysosomal storage defects in Fabry mice by adenovirus-mediated gene transfer." Hum. Gene Ther. 10(10): 1667-1682.

7. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1 Modelldarstellung TRPV1 aus (Planells-Cases et al. 2005). Legende: PKA = Proteinkinase A, PKC = Proteinkinase C, CaMKII = Ca ²⁺ Calmodulin-abhängige Kinase II (License Number: 3878161326609) | 16 |
| Abb. 2 Katabolismus der Glycosphingolipide und lysosomale Speicherkrankheiten. Modifiziert nach (Butters et al. 2000). CDH = Ceramide-dihexosid , CTH = Ceramide-trihexosid (Gb3). | 21 |
| Abb. 3 Geschlechtsspezifische Unterschiede im von Frey Filament-Test. Männliche und weibliche Fabry-ko-Mäuse zeigten verglichen mit litt-WT-Mäusen eine mechanische Hypersensibilität (*p<0,05 bis ***p<0,001). Zwischen den Geschlechtern zeigten sich innerhalb eines Genotyps kein oder nur geringe Unterschiede (Fabry-ko-Mäuse 2-3 Monate p=0,583, Fabry-ko-Mäuse 12-15 Monate *p<0,05; litt-WT-Mäuse 2-3 Monaten=0,257, 12-15 Monate *p<0,05). | 47 |
| Abb. 4 Thermische Rückzuglatenz (Hitze-Test). 2-3 Monate alte Fabry-ko-Mäuse zeigten eine Hypersensibilität gegenüber Hitze (**p<0,01). 12-15 Monate alte Fabry-ko-Mäuse wiesen dagegen eine deutlich verzögerte Rückzuglatenz auf (*p<0,05). Zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen bestand ein signifikanter Unterschied der thermischen Reizschwelle (***p<0,001). | 48 |
| Abb. 5 Rückzuglatenz im Kälte-Test. Junge und alte Fabry-ko-Mäuse wiesen verglichen mit litt-WT-Mäusen im Kälte-Test eine erhöhte Rückzuglatenz auf (2-3 Monate **p<0,01, 12-15 Monate *p<0,05). Die Reizschwelle für Kälte sank zwischen jungen und alten αGalA-ko-Mäusen nochmals ab (***p = 0,001). | 50 |
| Abb. 6 Geschlechtsspezifischer Unterschied im Kälte-Test. Lediglich zwischen alten Fabry-ko-Mäusen (**p<0,01) und jungen litt-WT-Mäusen (**p<0,01) zeigten sich Unterschiede im Verhalten der Geschlechter gegenüber einem Kälte-Stimulus. | 51 |
| Abb. 7 Reduzierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IEDNF) in Fabry-ko-Mäusen. Fabry-ko-Mäusen weisen eine Reduzierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte gegenüber litt-WT-Mäusen auf (2-3 Monate und 12-15 Monate ***p<0,000). Zusätzlich zeigte sich eine Verminderung der IEDNF zwischen jungen und alten Mäusen (Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse ***p<0,000). | 52 |
| Abb. 8 Reduzierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IEDNF) in Fabry-ko-Mäusen im Vergleich zu litt-WT-Mäusen: Darstellung der intraepidermalen Nervenfaserdichte mittels PGP9.5 (gelb). Exemplarische Markierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte durch Pfeile. a) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, b) 3 Monate alte litt-WT-Maus, c) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, d) 12 Monate alte litt-WT-Maus. | 53 |
| Abb. 9 Vergrößerte Neuronenfläche bei Fabry-ko-Mäusen im Vergleich zu litt-WT-Mäusen. Exemplarische Markierung der Neuronenfläche in gelb. a) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus; b) 3 Monate alte litt-WT-Maus, c) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus; d) 12 Monate alte litt-WT-Maus). | 54 |
| Abb. 10 Vergrößerung der neuronalen Fläche bei Fabry-ko-Mäusen. Es zeigte sich eine Vergrößerung der neuronalen Fläche sowohl zwischen jungen als auch alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen (2-3 Monate **p<0,05; 12-15 Monate ***p<0,001). Zwischen jungen und alten Fabry-ko-Mäusen nahm die Neuronenfläche noch einmal zu (***p<0,001). | 55 |

| | |
|---|----|
| Abb. 11 Vermehrte Gb3-Ablagerungen bei Fabry-ko-Mäusen gegenüber litt-WT-Mäusen. In allen vier Doppelfärbungen konnten im Vergleich zu altersadaptierten litt-WT-Mäusen vermehrte Gb3-Ablagerungen in jungen und alten Fabry-ko-Mäusen nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine nochmalige Zunahme der Gb3-Ablagerungen zwischen jungen alten alten Fabry-ko-Mäusen gezeigt werden. Abb. 12a: TRPV1/CD77-Doppelfärbung (**p<0,01, ***p<0,001); Abb. 12b: Nav1.8/CD77-Doppelfärbung (**p<0,01, ***p<0,001); Abb. 12c: CGRP/CD77-Doppelfärbung (**p<0,01, ***p<0,001); Abb. 12d: NF200/CD77-Doppelfärbung (**p<0,01, ***p<0,001)..... | 57 |
| Abb. 12 Vermehrte Expression TRPV1-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen. Sowohl zwischen 2-3 Monate alten als auch 12-15 Monate alten Fabry-ko- und ihren litt-WT-Mäusen zeigte sich eine vermehrte TRPV1-Expression in den Spinalganglien (**p<0,01, ***p<0,001). Ebenso bestand eine deutlich verstärkte TRPV1-Expression in alten Fabry-ko- bzw. litt-WT-Mäusen gegenüber ihren jungen Artgenossen (**p<0,01, ***p<0,001). | 58 |
| Abb. 13 Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen..... | 59 |
| Abb. 14 Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in litt-WT-Mäusen | 60 |
| Abb. 15 Kein Unterschied in Expression Nav1.8-positiver Neurone bei Fabry-ko-Mäusen. Sowohl zwischen jungen als auch alten Fabry-ko-Mäusen und altersadaptierten litt-WT-Mäusen konnte kein Unterschied in der Expression Nav1.8-positiver Neurone festgestellt werden. Lediglich in der Gruppe der litt-WT-Mäuse zeigten alte Mäuse gegenüber jungen Artgenossen eine Zunahme der Nav1.8-Expression (*p<0,05). | 62 |
| Abb. 16 Verminderte Anzahl CGRP-positiver Neurone in alten Fabry-ko-Mäusen. Alte Fabry-ko-Mäuse wiesen weniger CGRP-positive Neurone auf als altersentsprechende litt-WT-Mäuse (*p<0,05). Zwischen jungen Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen zeigte sich kein Unterschied. Junge Mäuse zeigten in beiden Gruppen gegenüber ihren älteren Artgenossen eine Abnahme CGRP-positiver Neurone (Fabry-ko-Mäuse **p<0,01; litt-WT-Mäuse ***p<0,001). | 64 |
| Abb. 17 Verminderung der NF200-positiven Neuronen bei Fabry-ko-Mäusen. Fabry-ko-Mäuse zeigten gegenüber litt-WT-Mäusen eine Reduzierung der NF200-Expression in Spinalganglien (**p<0,01, ***p<0,001). Mit zunehmendem Alter bestand bei Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen eine weitere Verminderung NF200-positiver Neurone im Vergleich zu jungen Artgenossen (**p<0,01, ***p<0,001)..... | 66 |
| Abb. 18 Vermehrte Expression IB4-positiver Neurone in jungen Fabry-ko-Mäusen gegenüber altersadaptierten litt-WT-Mäusen. Junge Fabry-ko-Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl IB4-positiver Neurone gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen auf (**p<0,01, ***p<0,001). | 67 |
| Abb. 19 TRPV1-Genexpression in Fabry-ko- und litt-WT-Mäusen. Kein Unterschied der Genexpression von TRPV1 sowohl zwischen 2-3 Monate alte Fabry-ko—und altersentsprechenden litt-WT-Mäuse als auch zwischen 12-15 Monate alten Fabry-ko- und altersadaptierten litt-WT-Mäusen. | 68 |
| Abb. 20 Verminderte Nav1.8-Genexpression in jungen Fabry-ko-Mäusen. Junge Fabry-ko-Mäuse zeigen gegenüber gleichaltrigen litt-WT-Mäusen eine verminderte Nav1.8-Genexpression. In der Gruppe der alten Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Weiterhin ergab sich | |

| | |
|--|-----|
| <i>kein altersabhängiger Unterschied der Genexpression von Na_v1.8 in der Gruppe der Fabry-ko- und litt-WT-Mäuse.</i> | 69 |
| Abb. 21 <i>Neuron in der Neuronenkultur einer Fabry-ko-Maus.</i> | 70 |
| Abb. 22 <i>Darstellung kultivierter Neurone mittels PGP 9.5-Färbung. a) litt-WT-Maus; b) Fabry-ko-Maus. Weißer Pfeil: Markierung der Neurone. Grauer Pfeil: Exemplarische Darstellung von Axonen.</i> | 71 |
| Abb. 23 <i>CGRP/PGP9.5-Doppelfärbung kultivierter Neurone. a) CGRP-Färbung (grün), b) Merge-Aufnahme der CGRP/PGP9.5-Doppelfärbung (CGRP=grün, PGP9.5=rot, DAPI=blau). Weißer Pfeil: Markierung CGRP-positiver Neurone.</i> | 72 |
| Abb. 24 <i>TRPV1/PGP9.5-Doppelfärbung kultivierter Neurone. a) Darstellung eines TRPV1-positiven Neurons (grün), b) Merge-Aufnahme der TRPV1/PGP9.5-Doppelfärbung (TRPV1=grün, PGP9.5=rot, DAPI=blau). Weißer Pfeil: Markierung der Neurone.</i> | 72 |
| Abb. 26 <i>TRPV1/CD77-Doppelfärbung. Links TRPV1, Rechts CD77. A-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus</i> | 128 |
| Abb. 27 <i>Na_v1.8/CD77- Doppelfärbung. Links Na_v1.8; Rechts CD77. a-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus; c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus; e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus; g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus</i> | 129 |
| Abb. 28 <i>CGRP/CD77-Doppelfärbung. Links CGRP; Rechts CD77. a-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus</i> | 130 |
| Abb. 29 <i>NF200/CD77-Doppelfärbung. Links NF200, Rechts CD77. A-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Mäuse, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus.</i> | 132 |
| Abb. 30 <i>Korrelation NF200/CD77/Neuronenfläche in Fabry-ko-Tieren. Negative Korrelation zwischen NF200 und der neuronalen Flächen (*p=0,05); negative Korrelation zwischen NF200 und CD77 (*p=0,05). Positive Korrelation zwischen CD77 und der neuronalen Fläche (**p=0,01).</i> | 133 |
| Abb. 31 <i>Korrelation NF200/CD77/Neuronenfläche in litt-WT-Tieren. Negative Korrelation zwischen CD77 und NF200. Keine signifikante Korrelation zwischen CD77 und der neuronalen Fläche; keine Korrelation zwischen NF200 und der neuronalen Fläche.</i> | 134 |

8. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1 Unterschiedliche Schmerzformen des M. Fabry nach (Üçeyler et al. 2013)..... | 6 |
| Tabelle 2 „Alarmzeichen“, die auf M. Fabry hinweisen nach (Üçeyler et al. 2012)..... | 7 |
| Tabelle 3 Eigenschaften der zur intravenösen Enzyersatztherapie zugelassenen Medikamente. Nach (Germain 2010; Üçeyler et al. 2012) | 8 |
| Tabelle 4 Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser | 11 |
| Tabelle 5 Lokalisation und Schmerzerkrankungen ausgewählter Na _v -Kanäle im peripheren Nervensystem nach (Brouwer et al. 2014)..... | 19 |
| Tabelle 6 Primär-Antikörper für Fluoreszenzfärbungen an Spinalganglien | 34 |
| Tabelle 7 Sekundäre Antikörper für Fluoreszenzfärbungen an Spinalganglien..... | 35 |
| Tabelle 8 Premix für Reverse Transkription..... | 39 |
| Tabelle 9 Einstellungen Thermocycler für Reverse Transkription..... | 40 |
| Tabelle 10 Premix für die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion | 40 |
| Tabelle 11 Untersuchte Primer mit Assay-Identifikator | 41 |
| Tabelle 12 Verwendete Primärantikörper für Kultur-Fluoreszenzfärbungen | 44 |
| Tabelle 13 Verwendete Sekundärantikörper für Kultur-Fluoreszenzfärbungen | 45 |
| Tabelle 14 Spearman-Korrelationskoeffizient der TRPV1- und CD77-positiver Neurone in Fabry-ko-Mäusen..... | 60 |
| Tabelle 15 Pearson-Korrelationskoeffizient der Korrelation TRPV1- und CD77-positiver Neurone in litt-WT-Mäusen..... | 61 |
| Tabelle 16 Geräte und Laborhilfen..... | 120 |
| Tabelle 17 Verbrauchsmaterialien | 121 |
| Tabelle 18 Antikörper, Lösungen und Puffer für die PGP9.5-Färbung..... | 122 |
| Tabelle 19 Lösungen und Puffer für die H.E.-Färbung..... | 123 |
| Tabelle 20 Antikörper und Reagenzien für die Fluoreszenzfärbungen | 124 |
| Tabelle 21 Enzyme, Primer-Puffer und Nukleinsäuren für reverse Transkription und Real-Time PCR | 124 |
| Tabelle 22 Puffer, Medien und Enzyme für Neuronenkultur | 125 |

9. Materialienliste

9.1. Geräte und Laborhilfen

Tabelle 16 Geräte und Laborhilfen

| Bezeichnung | Art | Hersteller |
|-------------------------|---------------------------------------|---|
| Binokular | Stemi 2000 Lichtquelle KL 1500 LCD | Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland |
| Brutschrank Histologie | Wärmeschrank | Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach, Deutschland |
| Brutschrank Kulturlabor | Heracell 150 | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| Schüttler | | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Sterilbank | Herasafe | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge | Rotofix 32 | Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland |
| Kühlzentrifuge | Centrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Vortexer | GLW L-46 | Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland |
| Wasserbad | WNB 45 | Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland |
| Kühlschrank | | Liebherr International AG, Bulle, Schweiz |
| -80°C Gefrierschrank | ULT-Freezer | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Mikroskop | Axiophot2 | Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland |
| | Durchlichtmikroskop; Olympus CKX41 | Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Absaugpumpe | ECOM-P 4153 | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| CCD-Kamera | | Visitron Systems, Tuchheim, Deutschland |
| Homogenisierer | Polytron PT 1600 | Kinematika AG, Luzern, Schweiz |

| | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| PCR-Cycler für reverse Transkription | Gene Amp. PCR-System 9100 | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Pipetten | Pipettman 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Heizblock (Schnitte) | | Liebisch, Bielefeld, Deutschland |
| Heizblock (PCR) | Thermoshaker | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Drahtgitter | | Laboreigene Herstellung |
| Plexiglas Käfige | | Laboreigene Herstellung |
| Waage | Pharmacy | Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland |
| Glaspipetten 5/10/20 ml | Pasteurpipetten Glas 225mm | Brand GmbH und Co.KG, Wertheim, Deutschland |
| Glaspipetten, ungestopft | | |
| Hargreaves Apparat | | Ugo Basile Inc., Comerio, Italien |
| Real Time PCR System | StepOnePlus™ Real Time PCR System | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |

9.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 17 Verbrauchsmaterialien

| Art | Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|--|
| Caps | 0,2 ml; 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Spritzen | BD Discardit™ II, 5ml, 10ml | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Pipettenspitzen | 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |
| Reaktionsplatten für Real-Time PCR | Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Verschlusskappen für Real-Time PCR | Micro Amp. 8-Cap Strip | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Verschlussfolien für PCR-Reaktionsplatten | Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate MicroAmp® Optical Adhesive Film | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Aluminiumfolie | Toppits | Melitta Unternehmensgruppe |

| | | |
|------------------------------------|--|---|
| | | Bentz KG, Minden, Deutschland |
| Tücher | | Zet-Box Labor- und Hygienetücher |
| Versiegelung für Kulturen | Parafilm® M | Bemis Company Inc., Oshkosh, WI, USA |
| Falcon Tubes | Greiner Centrifuge Tubes, 15 ml, 50 ml | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| PapPen | | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Objektträger | 26 x 76 mm | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| Coverslips | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Petrischalen | | Nunc™, Roskilde, Dänemark |
| Kulturschalen | 4 Well Platte | BioAssay Labor für biologische Analytik GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| 96 Well Fast Thermal Cycling Plate | | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Optical Adhesive Covers | | |
| PCR SoftTubes | 0,2 ml | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |

9.3. Antikörper, Lösungen und Puffer für die PGP9.5-Färbung

Tabelle 18 Antikörper, Lösungen und Puffer für die PGP9.5-Färbung

| Art | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------|-------------|---|
| Primär-Antikörper | PGP 9.5 | UltraClone Limited, England |
| Sekundär-Antikörper | Cy3 | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA |

| | | |
|-------------------|------------------------------|---|
| 2-Methylbutan | | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Saccharose 10% | | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| Einbettmittel | Tissue Tek | Sakura, Zoeterwoude, Niederlande |
| BSA | Bovines Serumalbumin, 10% | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| PBS | Phosphat-Buffer-Saline | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| PFA 4% | | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| Flüssigstickstoff | | Linde AG, München, Deutschland |
| Narkosemittel | Isofluran | Abbott, Wiesbaden, Deutschland |

9.4. Lösungen und Puffer für die H.E.-Färbung

Tabelle 19 Lösungen und Puffer für die H.E.-Färbung

| Art | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------|--------------------|--|
| Versiegelungsmittel | Vitro Clud | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| Färbung | Oil Red O | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| | Hämalaun | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

9.5. Antikörper und Reagenzien für die Fluoreszenzfärbung

Tabelle 20 Antikörper und Reagenzien für die Fluoreszenzfärbungen

| Art | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------|------------------------------|--|
| Primär-Antikörper | CD77 | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany |
| | VR1 | Santa Cruz, Heidelberg, Germany |
| | CGRP | Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA |
| | IB4 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| | Na _v 1.8 | Chemicon, EMD Millipore Cooperation, Temecula, CA, USA |
| | NF200 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| | PGP 9.5 | UltraClone Limited, England |
| Sekundär-Antikörper | Cy3 (CD77, PGP 9.5) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA |
| | Alexa Fluor (VR1) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA |
| | Alexa Fluor (NF200, Nav 1.8) | |
| | AMPCA (CGRP) | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA |

9.6. Enzyme, Primer-Puffer und Nukleinsäuren für reverse Transkription und Real-Time PCR

Tabelle 21 Enzyme, Primer-Puffer und Nukleinsäuren für reverse Transkription und Real-Time PCR

| Art | Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------|-------------|---|
| Aqua destillata | | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |

| | | |
|--|--|---|
| PCR-Buffer II + MgCl ² 10x Solution | | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| DesoxyNTPs Mixture 10 mM | | |
| Random Hexamers | | |
| RNAse Inhibitors | 20 U/μl | |
| MultiScribe Reverse Transkriptase | | |
| Taqman Universal PCR-Master Mix | | |
| 18s R RNA | | |
| Primer | TRPV1 (Mm01246302_m1) Na _v 1.8 (Mm00501467_m1) | |

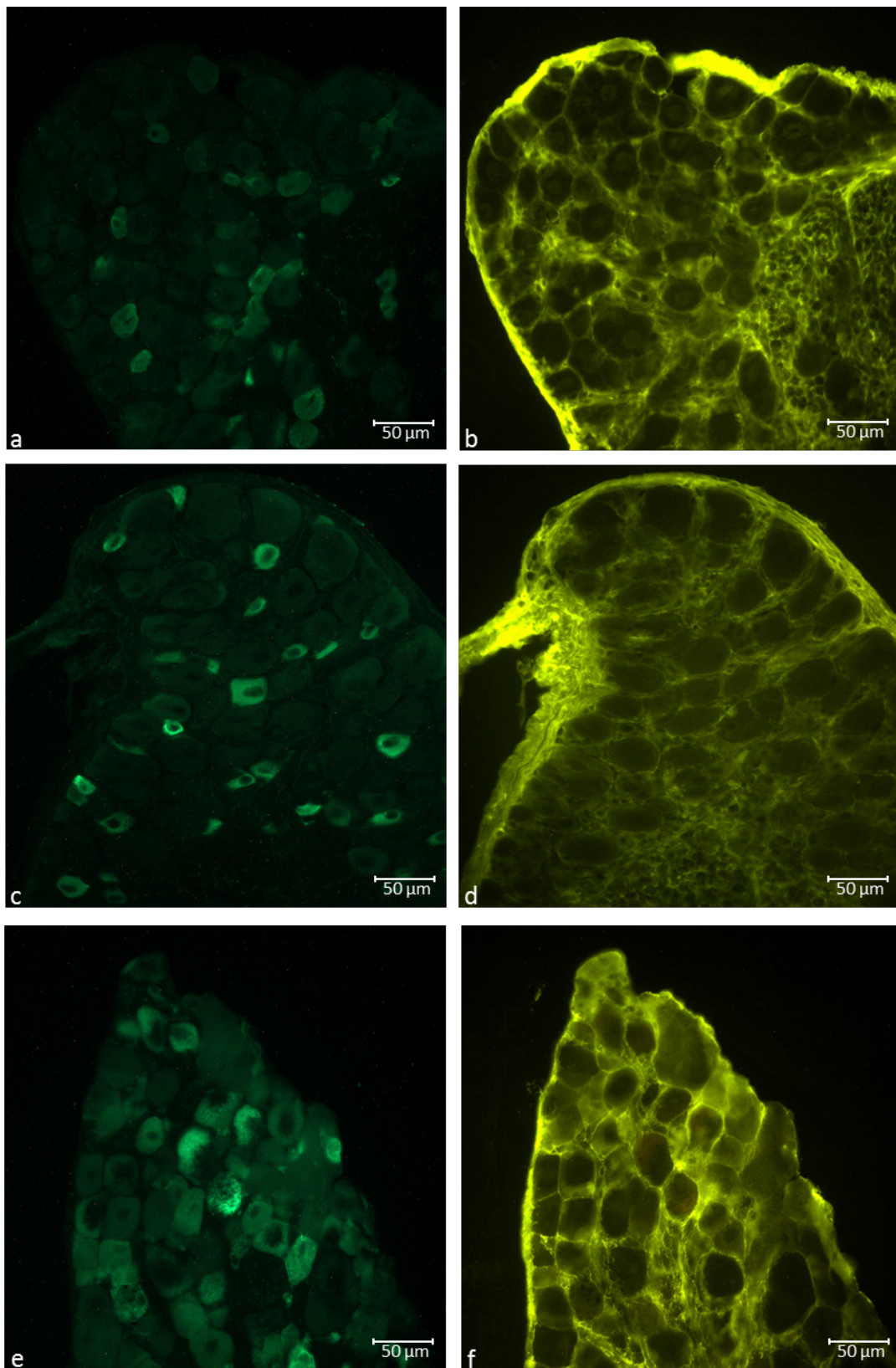
9.7. Puffer, Medien und Enzyme für Neuronenkultur

Table 22 Puffer, Medien und Enzyme für Neuronenkultur

| Art | Bezeichnung/Inhalt | Hersteller |
|--------------------------------|--|------------------------------------|
| DRG-Medium | Fetal Bovine Serum (FBS) | Hyclone, Logan Utah, USA |
| | DMEM/F12 (Ham) 1:1 | Gibco, Darmstadt, Germany |
| | Penicillin/Streptomycin (100X) 10,000U/ml - 10,000ug/ml) | |
| | L-Glutamine, 200 mM (100x) | |
| Complete Saline Solution (CSS) | Natriumchlorid | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| | Kaliumchlorid | Merck KGaA, Frankfurt, Deutschland |
| | Magnesiumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| | Sorbitol | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| | HEPES | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | | |
|---|----------------|--|
| | Calciumchlorid | Merck KGaA, Frankfurt, Deutschland |
| Liberase TL | | Roche Applied Science, Mannheim, Germany |
| Liberase TM | | |
| Papain, Suspension | | Worthington Biochemical, Lakewood, New Jersey, USA |
| Bovine Serum Albumin | | Sigma- Aldrich, Germany |
| Trypsin Inhibitor | | Roche Applied Science, Mannheim, Germany |
| Invitrogen™ Ambion™ 0,5 EDTA pH 8 (500ml) | | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |

10. Anhang



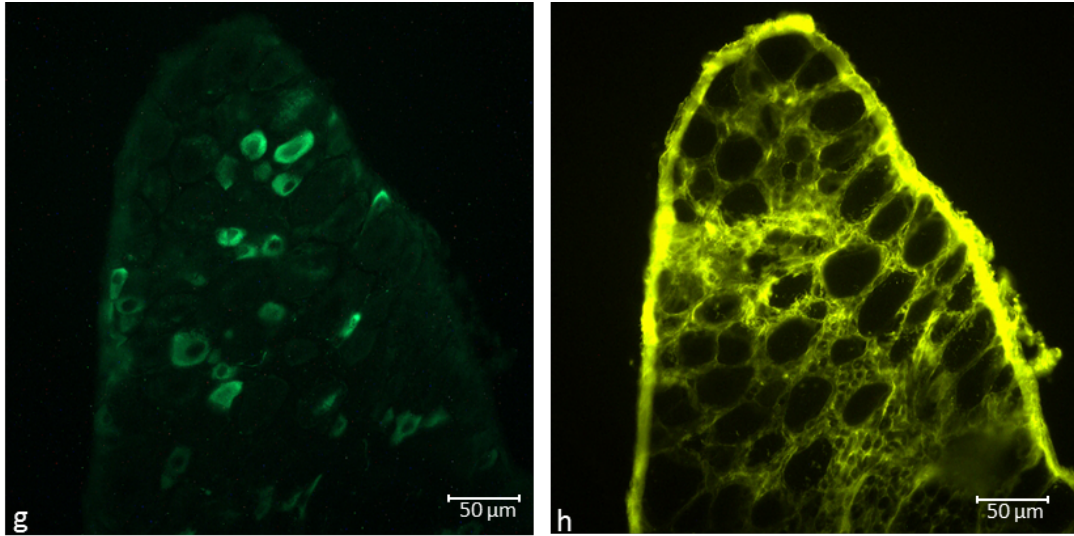
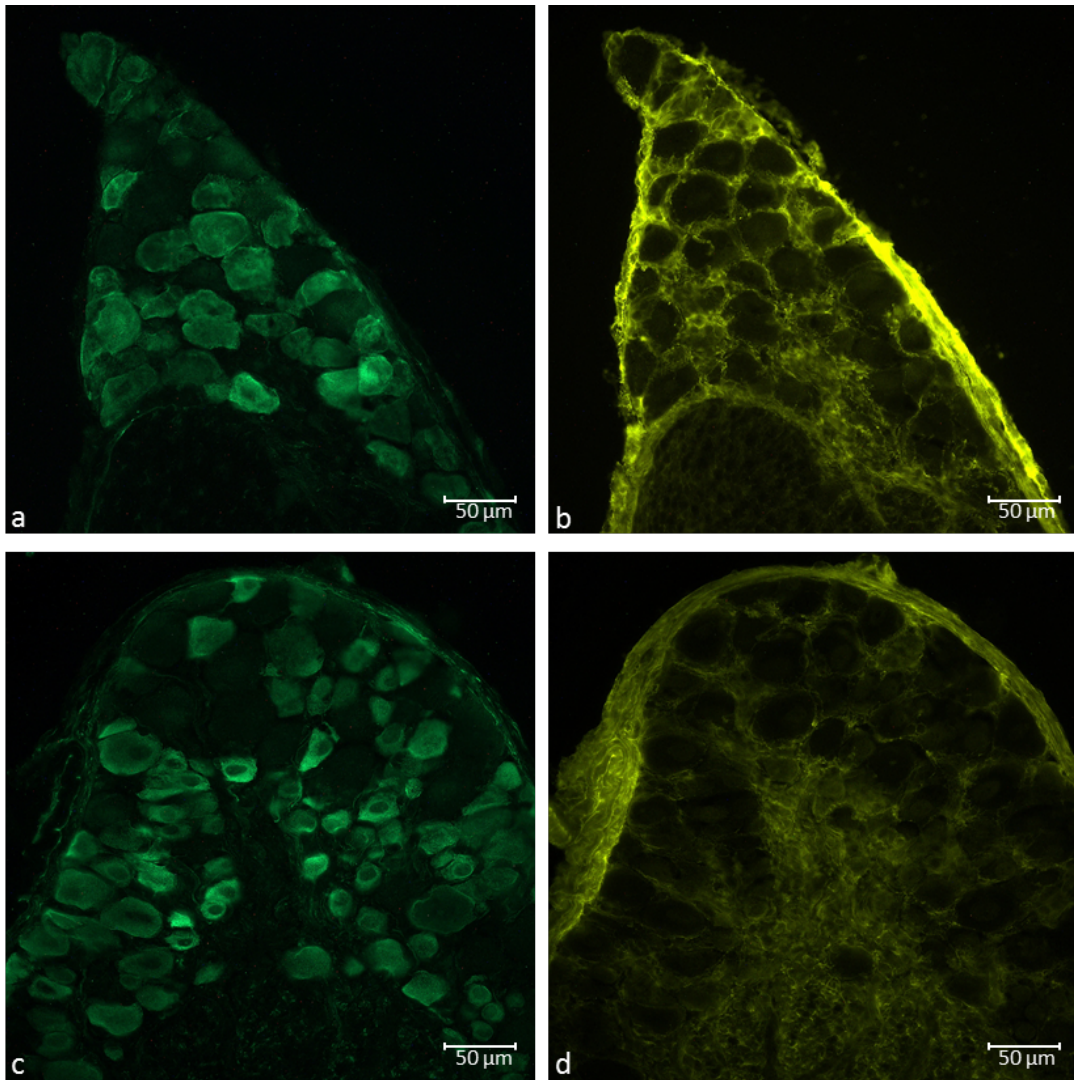


Abb. 25 TRPV1/CD77-Doppelfärbung. Links TRPV1, Rechts CD77. A-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus



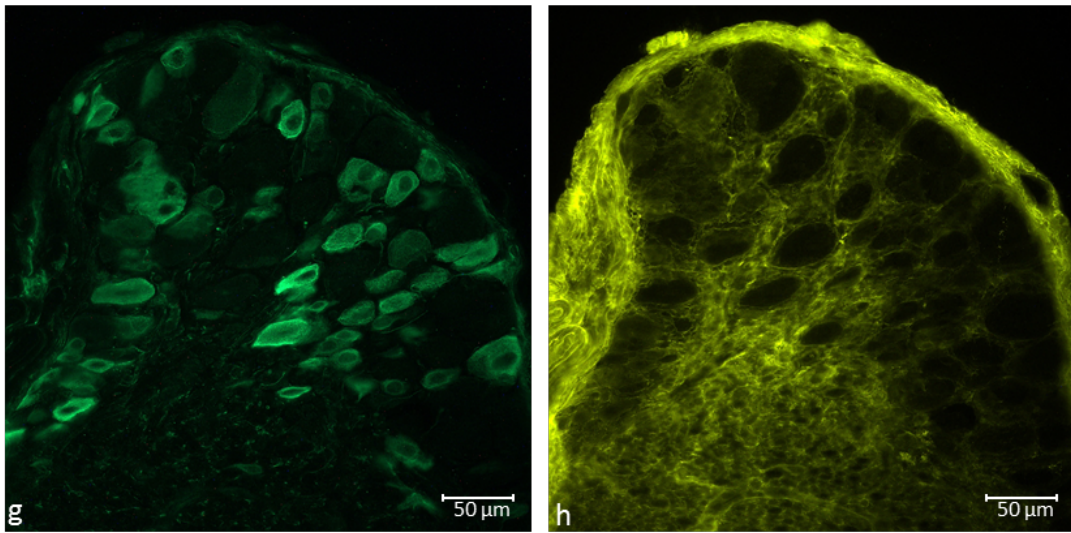
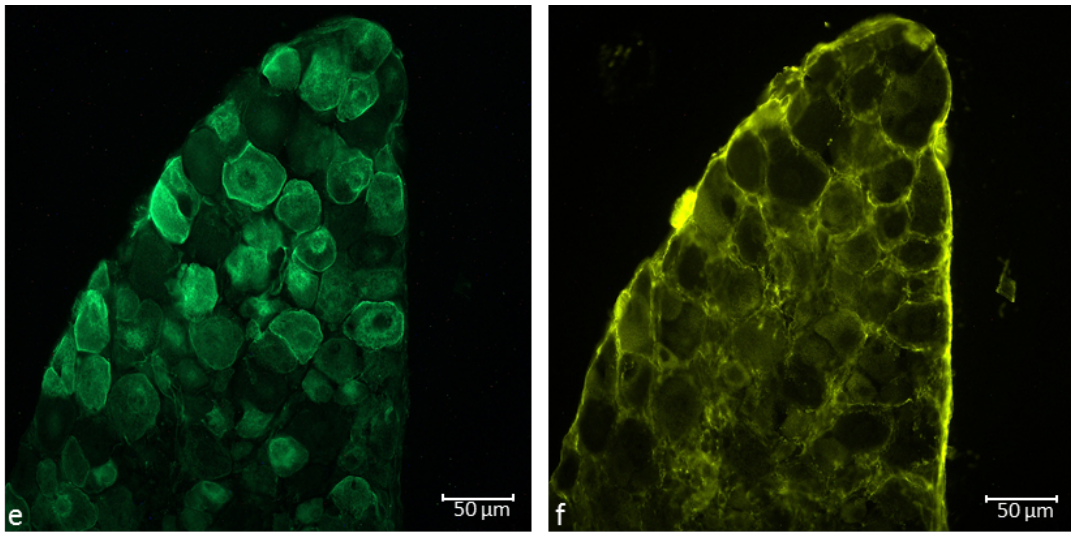
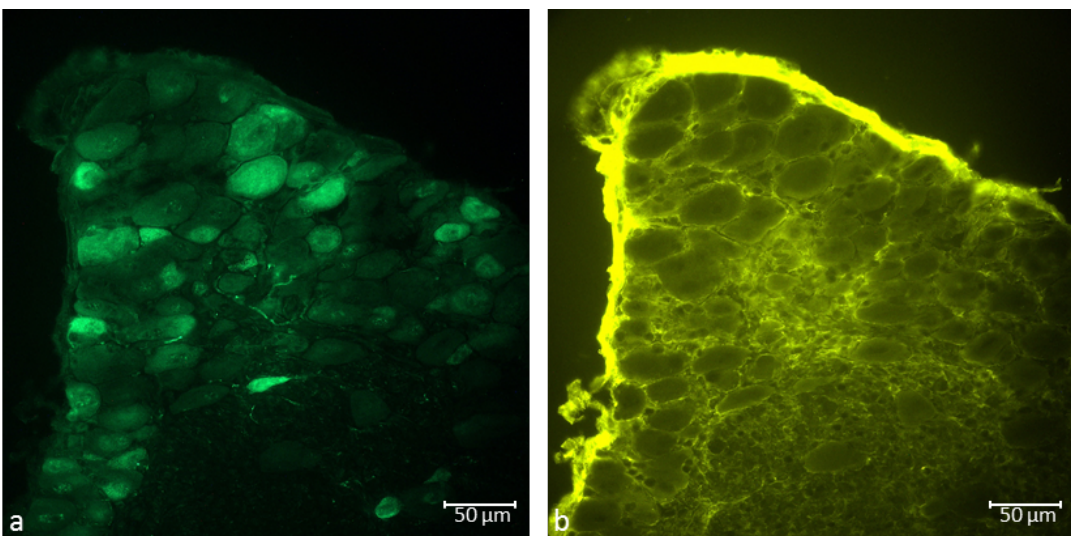


Abb. 26 $Na_v1.8/CD77$ - Doppelfärbung. Links $Na_v1.8$; Rechts CD77. a-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus; c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus; e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus; g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus



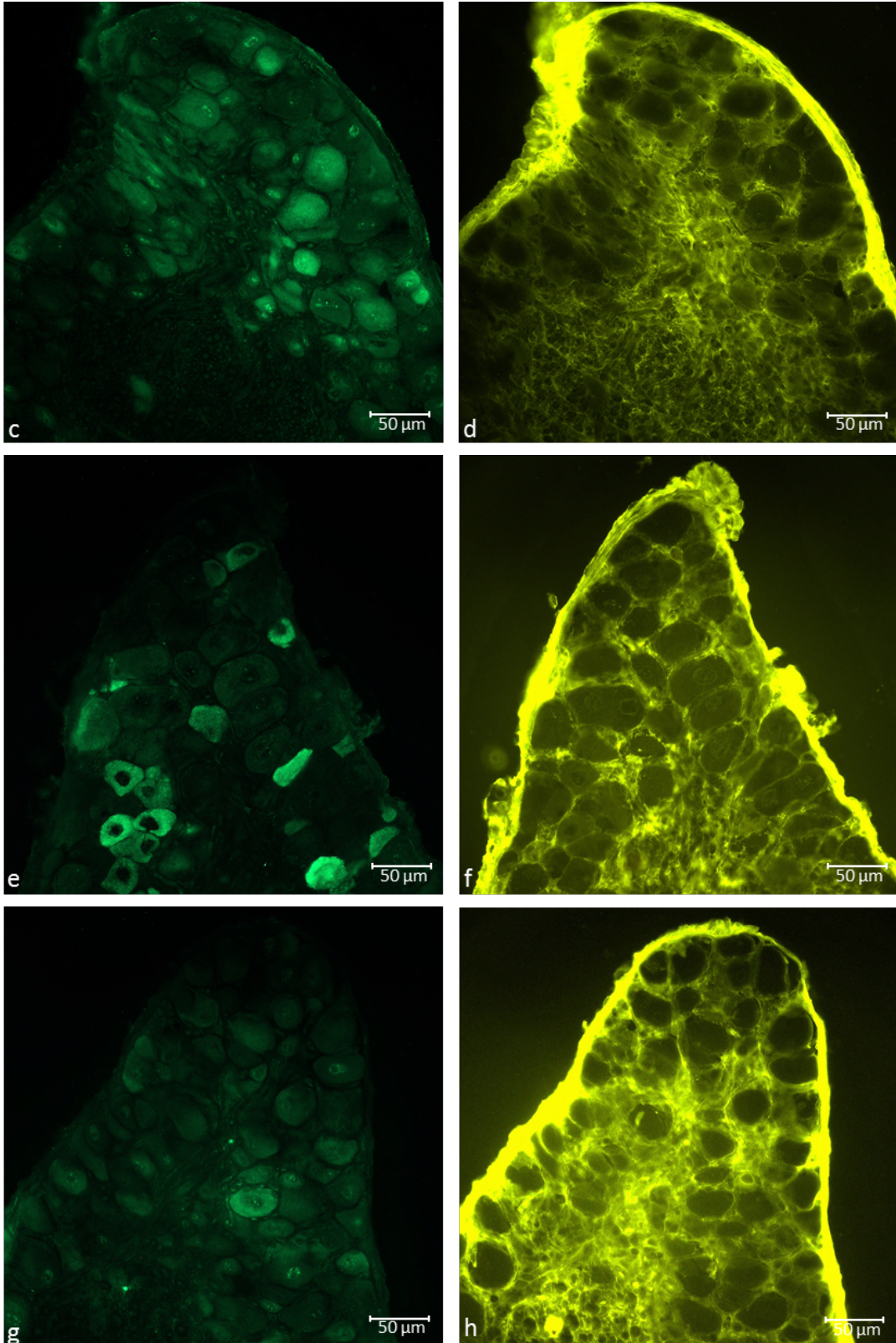
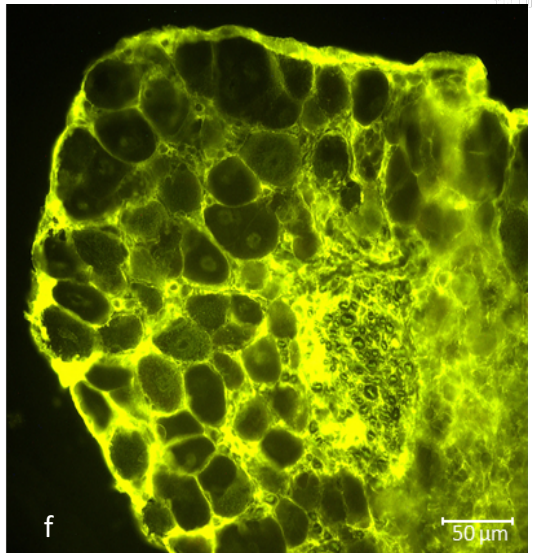
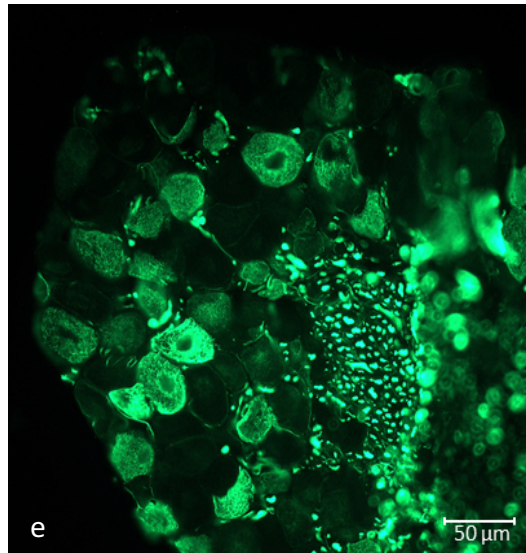
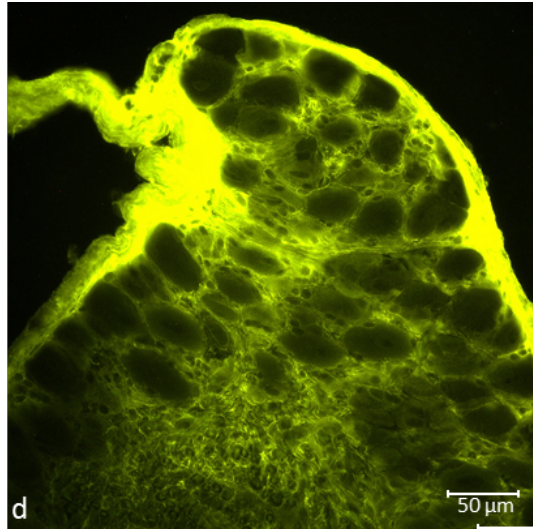
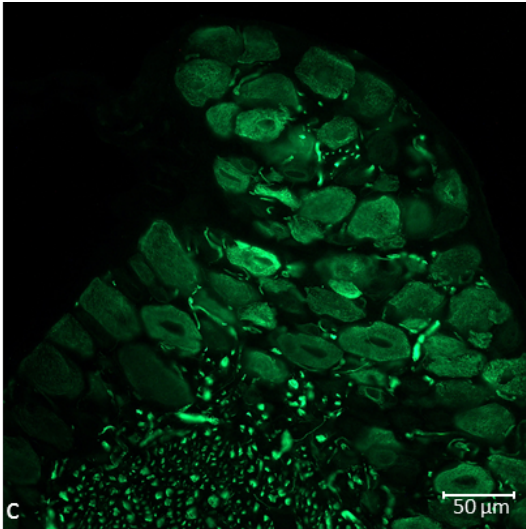
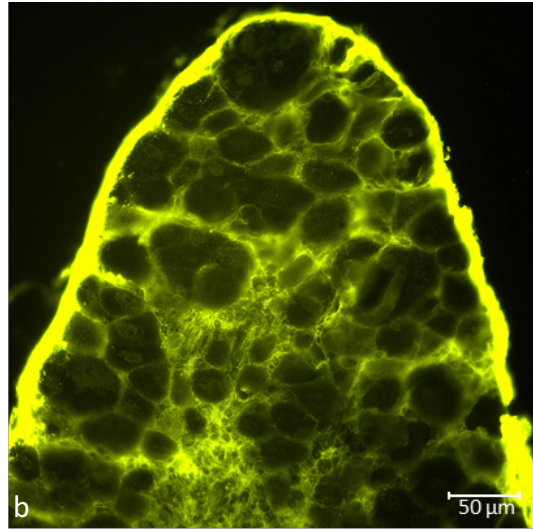
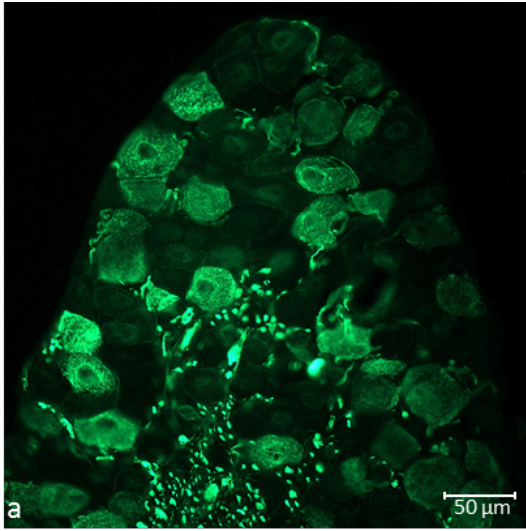


Abb. 27 CGRP/CD77-Doppelfärbung. Links CGRP; Rechts CD77. a-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Maus, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte litt-WT-Maus



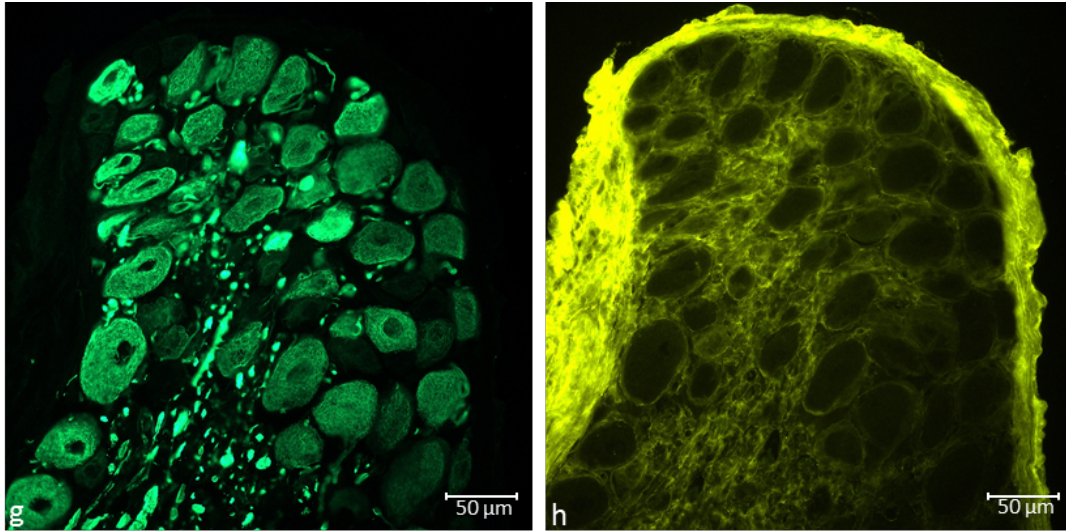
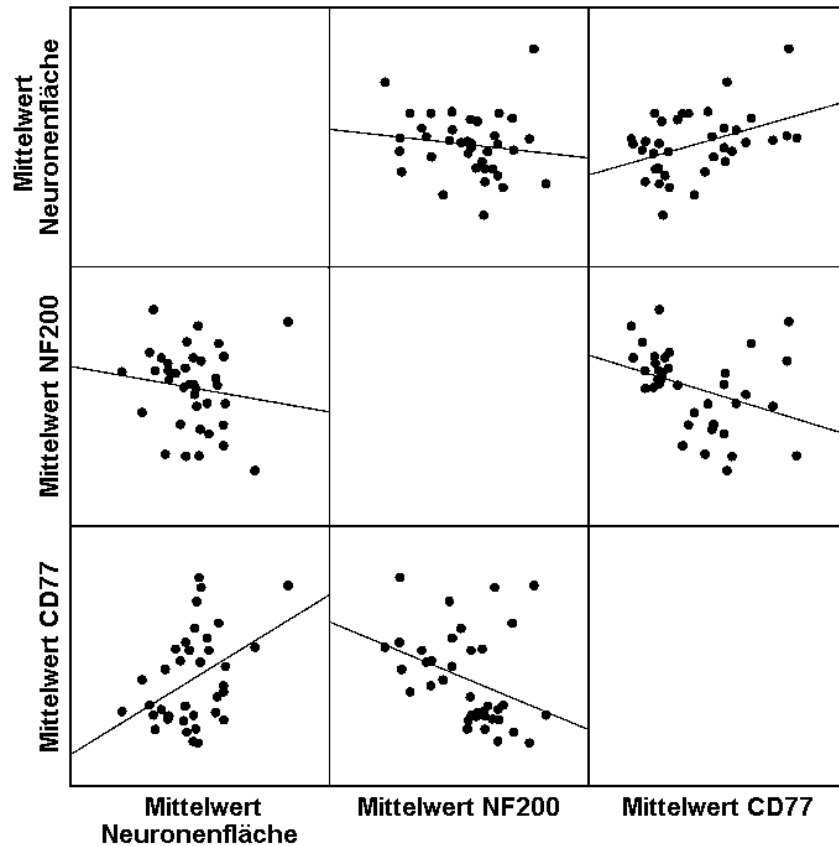


Abb. 28 NF200/CD77-Doppelfärbung. Links NF200, Rechts CD77. A-b) 3 Monate alte Fabry-ko-Maus, c-d) 3 Monate alte litt-WT-Mäuse, e-f) 12 Monate alte Fabry-ko-Maus, g-h) 12 Monate alte lit-WT-Maus.

Korrelation NF200 / CD77 / Neuronenfläche (Fabry 2-3Mo & 12-15Mo)



Korrelationen

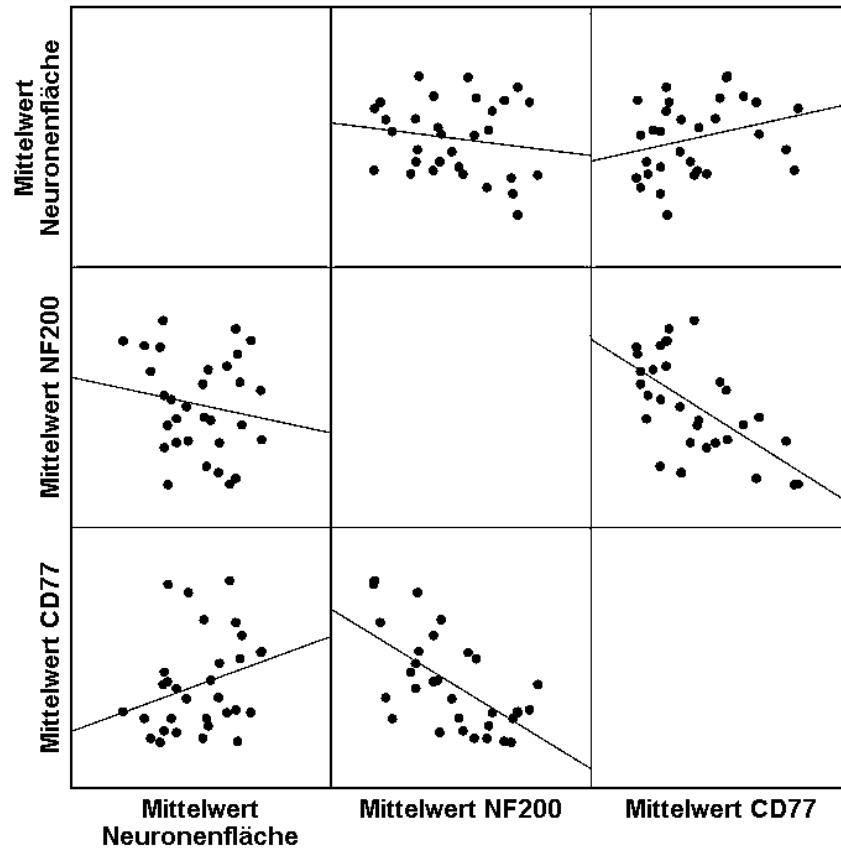
| | | | DRG neuron area | Mean NF200 | Mean CD77 |
|--------------|-----------------|-------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Spearman-Rho | DRG neuron area | Korrelationskoeffizient | 1,000 | -,205 | ,361 [*] |
| | | Sig. (2-seitig) | . | ,224 | ,028 |
| | | N | 41 | 37 | 37 |
| | Mean NF200 | Korrelationskoeffizient | -,205 | 1,000 | -,444 ^{**} |
| | | Sig. (2-seitig) | ,224 | . | ,005 |
| | | N | 37 | 38 | 38 |
| | Mean CD77 | Korrelationskoeffizient | ,361 [*] | -,444 ^{**} | 1,000 |
| | | Sig. (2-seitig) | ,028 | ,005 | . |
| | | N | 37 | 38 | 38 |

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**.. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Abb. 29 Korrelation NF200/CD77/Neuronenfläche in Fabry-ko-Tieren. Negative Korrelation zwischen NF200 und der neuronalen Flächen (*p=0,05); negative Korrelation zwischen NF200 und CD77 (*p=0,05). Positive Korrelation zwischen CD77 und der neuronalen Fläche (**p=0,01).

Korrelation NF200 / CD77 / Neuronenfläche (WT 2-3Mo & 12-15Mo)



Korrelationen

| | | DRG neuron area | Mean NF200 | Mean CD77 |
|-----------------|--------------------------|-----------------|------------|-----------|
| DRG neuron area | Korrelation nach Pearson | 1 | -,164 | ,284 |
| | Signifikanz (2-seitig) | | ,379 | ,122 |
| | N | 38 | 31 | 31 |
| Mean NF200 | Korrelation nach Pearson | -,164 | 1 | -,624** |
| | Signifikanz (2-seitig) | ,379 | | ,000 |
| | N | 31 | 31 | 31 |
| Mean CD77 | Korrelation nach Pearson | ,284 | -,624** | 1 |
| | Signifikanz (2-seitig) | ,122 | ,000 | |
| | N | 31 | 31 | 31 |

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Abb. 30 Korrelation NF200/CD77/Neuronenfläche in litt-WT-Tieren. Negative Korrelation zwischen CD77 und NF200. Keine signifikante Korrelation zwischen CD77 und der neuronalen Fläche; keine Korrelation zwischen NF200 und der neuronalen Fläche.

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Claudia Sommer möchte ich mich für die freundliche Überlassung dieses hochspannenden Themas und die Möglichkeit der Erlernung verschiedenster Methoden bedanken. Ihre Erfahrung und Unterstützung insbesondere in schwierigen Phasen der Arbeit waren eine große Hilfe und ein wichtiger Beitrag zum Gelingen der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Nurcan Üçeyler für die Betreuung meiner Arbeit, für ihre Unterstützung und die zahlreichen anregenden Diskussionen. Außerdem möchte ich mich für ihre Geduld und ihre hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation bedanken. Jede Phase der Arbeit wurden von ihr intensiv betreut und sie stand mir jederzeit mit großem Einsatz und ihrem Wissen zur Seite. Für die Weitergabe ihrer Erfahrungen bei der Präsentation der Ergebnisse auf Kongressen und die damit gewonnenen Erfahrungen möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht außerdem an Lydia Biko, Barbara Dekant, Barbara Broll und Sonja Mildner für die unermütlche und professionelle Einführung in alle in dieser Arbeit angewandten Methoden. Danke für die unschätzbare Arbeit und Hilfe, die Geduld, die zahlreichen Gespräche und die unvergleichliche Unterstützung über die gesamten vergangenen Jahre. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden und allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin meiner gesamten Familie, André und meinen Freunden. Danke, dass ihr mir in den nicht immer einfachen Phasen meines Studiums und der Dissertation stets verständnisvoll und unterstützend zur Seite standet.