



**Einfluss von neuropathischem Schmerz und dessen
Behandlung mit D-4F auf die Expression von *Abca1* in Ratten**

Influence of neuropathic pain and its treatment with D-4F on the expression of
Abca1 in rats

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Maria Corinna Popp

aus

Bamberg

Würzburg, März 2022

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Störk

1. Betreuerin: Prof. Dr. Heike L. Rittner

2. Betreuer: PD Dr. Robert Blum

3. Betreuerin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

4. Betreuerin: Dr. Beatrice Oehler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Die Promovendin ist Ärztin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Einfluss von neuropathischem Schmerz und dessen Behandlung mit D-4F auf die Expression von *Abca1* in Ratten" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 31.03.2022

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Influence of neuropathic pain and its treatment with D-4F on the expression of *Abca1* in rats" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg, 31.03.2022

Signature

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuropathischer Schmerz – gesellschaftliche Bedeutung und Pathophysiologie.....	1
1.2	Die Rolle von Zytokinen und oxidierten Phospholipiden in der Schmerzwahrnehmung	4
1.3	ApoA-I Mimetikum D-4F	8
1.4	ABC-Transporter und Lipid Rafts	10
1.4.1	ABCA1-vermittelter Cholesterintransport.....	10
1.4.2	Bedeutung der Lipid Rafts	11
1.4.3	Schnittstelle Inflammation.....	13
1.5	Fragestellungen der Dissertation.....	14
2	Methoden und Material.....	16
2.1	Datenbankanalyse: Transkriptom-Screening	16
2.2	Tierexperimente	17
2.2.1	Schmerzmodelle.....	17
2.2.2	Applikation des D-4F-Peptid zur Behandlung des neuropathischen Schmerzes.....	18
2.2.3	Gewebeentnahme	18
2.3	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese RNA-Isolierung	19
2.4	PCR.....	21
2.5	Immunhistochemie	24
2.6	Photometrische Serumlipid-Analyse.....	28
2.7	Statistik und Programme	29
2.8	Geräte und Software	30

2.9	Chemikalien, Kits und Antikörper	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Regulation der ABC-Transporter in neuropathischen Schmerzmodellen	32
3.2	Erhöhte <i>Abca1</i> mRNA aber unveränderte <i>Abcg1</i> Regulation nach Nervenverletzung	36
3.3	Unveränderte ABCA1 Immunreaktivität in nozizeptiven DRG-Neuronen	37
3.4	Teilweise Normalisierung der <i>Abca1</i> Expression nach Nervenverletzung	38
3.5	D-4F hat keinen Einfluss auf die <i>Abca1</i> Überexpression in Ratten mit Nervenverletzung	39
3.6	Diabetische Neuropathie in Ratten lässt mRNA der ABC-Transporter unbeeinflusst	41
3.7	Kein Einfluss von D-4F auf Zytokin-Expression nach traumatischer Nervenverletzung	42
3.8	Unveränderte Zytokin-Expression bei diabetischer Neuropathie.....	44
3.9	Keine Veränderung der Serumlipide durch Nervenverletzung oder D-4F Applikation.....	45
4	Diskussion	46
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4.2	Diskussion der Methoden	47
4.2.1	Eigenschaften des DRG und Materialgewinnung	47
4.2.2	mRNA-Quantifizierung.....	48
4.2.3	Proteinbestimmung mittels Immunhistochemie	49
4.2.4	Enzymatische Farbttests zur Serumanalyse.....	51
4.3	Diskussion der Ergebnisse	52
4.3.1	Die Regulation der Transporter <i>Abca1</i> und <i>Abcg1</i> ist abhängig von der Neuropathie-Genese und Lokalisation des untersuchten Gewebes	52

4.3.2	D-4F wirkt nicht über <i>Abca1</i> Regulation antinozizeptiv.....	55
4.3.3	Auswirkungen von D-4F auf das inflammatorische Geschehen bei Neuropathie	57
4.3.4	Neuropathie, Serumlipide und D-4F – Zusammenhänge.....	59
5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	61
6	Zusammenfassung.....	63
7	Abstract.....	65
8	Literaturverzeichnis	67

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Danksagung

V Lebenslauf

VI Publikationen

1 Einleitung

1.1 Neuropathischer Schmerz – gesellschaftliche Bedeutung und Pathophysiologie

"The Relief of Pain Should Be a Human Right"

Diesem Zitat der Internationalen Vereinigung zur Erforschung des Schmerzes (International Association for the Study of Pain, IASP) zufolge ist die Behandlung von Schmerzen ein Menschenrecht. Dies bezieht sich natürlich auch auf die Bekämpfung akuten Schmerzes, jedoch stellen vor allem chronische Schmerzen ein wachsendes Problem im weltweiten klinischen und sozioökonomischen Bereich dar. Schätzungen zufolge leiden 20 % der Weltbevölkerung an chronischen Schmerzen; sie sind der Hauptgrund für Arbeitsunfähigkeit und stellen damit neben der individuellen Bürde ebenso eine ökonomische Belastung dar (www.iasp-pain.org, 02.01.2022). Dennoch sind die etablierten Behandlungsstrategien unzureichend. Opiate können zwar in vielen Fällen Erleichterung bei chronischen Schmerzzuständen schaffen, jedoch zum Preis gefährlicher Nebenwirkungen wie Atemdepression und Suchtentwicklung [1]. Nicht-Opioid-Analgetika haben gerade bei chronischen Schmerzen eine unzureichende Wirkung. Zusätzlich erhöht die Einnahme das Risiko von Leber- und Nierenschäden, gastroduodenalen Ulcera und kardiovaskulären Ereignissen [2]. Aufgrund dieser Unzulänglichkeiten der verfügbaren Therapieoptionen liegt ein Fokus der modernen Schmerzforschung auf der Entwicklung neuer Medikamentenklassen, wozu auch diese Arbeit einen Beitrag leisten soll.

Mechanismen und Modelle neuropathischen Schmerzes

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht, oder von betroffenen Personen so beschrieben wird, als wäre eine solche Gewebeschädigung die Ursache.“ (IASP Terminology 2017, 14.12.2017, www.iasp-pain.org). Unter physiologischen Bedingungen generieren mechanische, thermische oder chemisch noxische Reize Aktionspotentiale in peripheren Nerven, welche durch myelinisierte A δ (früher, gut lokalisierbarer

Schmerz) und nicht-myelinisierte C-fasern (später, schlecht lokalisierbarer Schmerz) über die Spinalganglien (DRGs) bis zum Cortex geleitet werden. Dieser Prozess wird als Nozizeption bezeichnet. Die Wahrnehmung dieser Reize als Schmerz entsteht erst durch die Verarbeitung im Cortex und ist eine subjektiv geprägte Sinnesempfindung [3]. Akuter Schmerz schützt den Organismus konstruktiv vor weiterer Gewebeschädigung durch Anpassung des Verhaltens, z.B. Wegziehen der Hand von einer heißen Herdplatte oder Vermeiden von Belastung eines gebrochenen Knochens. Dagegen hat chronischer Schmerz diese Warnfunktion verloren.

Eine häufig mit chronischem Schmerz assoziierte Erkrankung, bei dem die erhöhte Erregbarkeit von Neuronen eine wichtige Rolle spielt, ist die Neuropathie. Auch der chronisch neuropathische Schmerz hat seine Warnfunktion verloren. Ursache dieser Erkrankung ist die Läsion oder Funktionsstörung peripherer oder zentraler neuronaler Strukturen selbst. Die Folge sind unter anderem Parästhesie (primär nicht schmerzhaftes Missempfinden), Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindlichkeit) und Allodynie (Schmerz, ausgelöst durch einen primär nicht-schmerzhaften Reiz). Solche Funktionsstörungen können mechanisch durch direktes Trauma, toxisch, entzündlich oder metabolisch durch Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus ausgelöst werden [4, 5]. Dabei ist zu beachten, dass nicht jeder Nervenschaden zwangsläufig zu Schmerzen führt und es auch akute Formen des neuropathischen Schmerzes gibt, wie z.B. häufig bei einer akuten Zosterneuralgie [4]. Der chronisch neuropathische Schmerz stellt dagegen eine dauerhafte physische wie psychische Belastung für die Betroffenen dar, dessen komplexe molekulare Regulationsmechanismen bis heute noch nicht ausreichend verstanden sind [4, 6].

In der Neuropathie-Forschung wurden differenzierte Tiermodelle etabliert, um diese Art des Schmerzes genauer untersuchen zu können. Man kann diese grob unterteilen in Modelle peripherer Nervenverletzungen, zentraler Neuropathien, sowie medikamenten- und krankheitsinduzierte Modelle [7]. Diese Arbeit konzentriert sich auf neuropathische Schmerzmodelle, die auf peripheren Läsionen beruhen. Drei Modelle werden hier näher untersucht, zwei periphere Nervenverletzungen sowie eine krankheitsinduzierte periphere Neuropathie:

Chronic Constriction Injury (CCI) – traumatisch 

Spared Nerve Injury (SNI) – traumatisch 

Diabetische Polyneuropathie (DPN) – metabolisch 

Der zugrundeliegende Mechanismus der beiden traumatischen Neuropathien ist die direkte, mechanische Verletzung eines peripheren Nerven mit nachfolgender lokaler Entzündungsreaktion. Bei der CCI wird durch Ligation des N. ischiadicus Schaden mit konsekutiver Sensibilisierung an lokalen A- und C-Fasern verursacht. Die so operierten Tiere leiden für circa sieben Wochen an Allodynie sowie mechanischer und thermischer Hyperalgesie. Die SNI wird durch Durchtrennung des N. peroneus communis und des N. tibialis verursacht. Die dadurch entstehende partielle Denervation ist namensgebend, da der N. suralis intakt bleibt. Die Verletzung hat mechanische Allodynie und thermische Hyperalgesie im Versorgungsgebiet dieses Nerven zur Folge [7, 8]. Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Modellen ist die Fähigkeit zur Regeneration. Es ist bekannt, dass die vollständige Nervendurchtrennung bei SNI zu einer über sechs Monate hinaus persistierenden Neuropathie führt, während die Schäden durch Nervenligatur im CCI-Modell reversibel sind [8, 9].

Die DPN wiederum beruht auf autoimmunen, metabolischen und vaskulären Prozessen. Obwohl die Gänge der involvierten Mechanismen dieser Erkrankung noch nicht verstanden ist, geht man aktuell davon aus, dass die Ursache in der chronischen Hyperglykämie liegt. Eine dauerhaft erhöhte Blutzuckerkonzentration führt einerseits über mikrovaskuläre Dysfunktion zu Hypoxie-bedingten Nervenschäden und andererseits durch Entstehung toxischer Metabolite zu Degeneration peripherer Myelinscheiden und Nervenenden [10, 11]. Die Erkrankung wurde in den Experimenten dieser Arbeit mittels Injektion von Streptomycin (STZ) induziert, welches die Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört [7]. Dies führte – wie CCI und SNI - zu mechanischer Allodynie (siehe Abbildung 1).

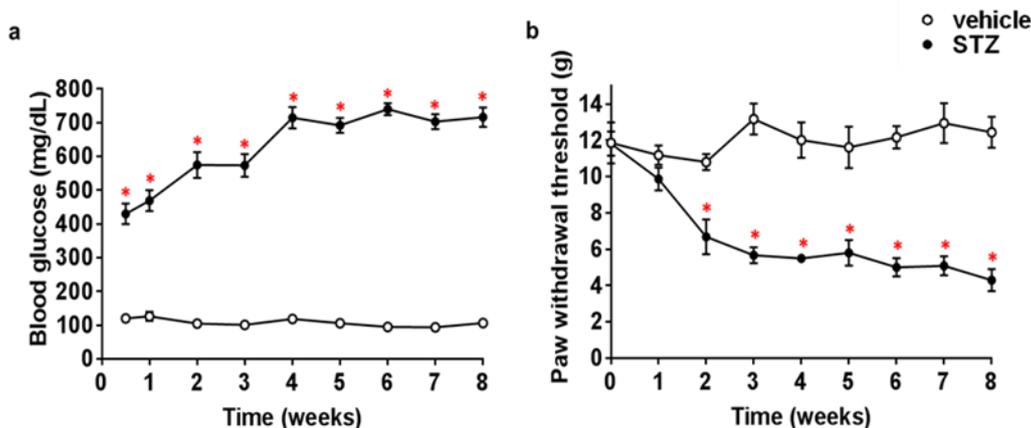


Abbildung 1: Diabetische Polyneuropathie in Wistar Ratten nach Injektion von Streptomycin (einmalig 45 mg/kg).

(a) Signifikant erhöhte Glucosekonzentration im Serum, gemessen via Biosensor-Methodik
 (b) Mechanische Allodynie als Zeichen der Neuropathie im von-Frey Haartest, in dem von-Frey Filamente bis zur Reizschwelle gegen die Hinterpfoten der Tiere gedrückt wurden.
 Quelle: Ben-Kraiem, A., 2021 [12]; Lizenz: CC BY 4.0

1.2 Die Rolle von Zytokinen und oxidierten Phospholipiden in der Schmerzwahrnehmung

Auf Gewebedestruktion, wie bei den oben beschriebenen Nervenverletzungen, antwortet der Organismus mit Inflammation, zu der unter anderem die Rekrutierung von Immunzellen, darunter Makrophagen und neutrophile Granulozyten, gehört. Klinische Zeichen einer solcher Entzündungsreaktion sind Rubor (Rötung), Calor (Überwärmung), Tumor (Schwellung), Functio laesia (Funktionseinschränkung) und eben Dolor (Schmerz) [13].

Zytokine

Makrophagen und neutrophile Granulozyten sezernieren nach Gewebeschaden Zytokine, welche eine steuernde Funktion im entzündlichen Geschehen haben und somit auch zur Entstehung des neuropathischen Schmerzes beitragen [14]. Sie werden in pro- und antiinflammatorische Zytokine eingeteilt. Wichtiger Initiator der proinflammatorischen Kaskade ist der Tumornekrosefaktor α (TNF α). TNF α bindet an den membranständigen TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) welcher sowohl in Immunzellen als auch in DRG und Axonen exprimiert wird. Über sogenannte TNF α -assoziierte Faktoren kommt es zur down-stream Aktivierung von Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und NF κ B. Diese induzieren wiederum die Transkription von proinflammatorischen Mediatoren,

wie Prostaglandinen, sympathomimetischen Aminen, Bradykinin und dem Nervenwachstumsfaktor. Die Folge ist eine erhöhte Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, darunter Interleukin 6 (IL-6) [15, 16]. IL-6 bindet über seinen Rezeptor IL-6R an das Membranprotein gp130 und setzt über die Aktivierung von Januskinasen (JAK) und dem STAT1-Signalweg (STAT = Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription) ebenfalls proinflammatorische Aktivität in Gang [15, 17]. Die vermehrt produzierten proalgetischen Moleküle steigern die Nozizeptor-Erregbarkeit und tragen so zur Entstehung der Neuropathie-typischen Hyperalgesie und Allodynie bei. Neben der indirekten Zytokin-Wirkung wird auch eine direkte Sensibilisierung von Nozizeptoren durch $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 diskutiert [16]. Gleichzeitig verstärken die proinflammatorischen Zytokine über positive Feedbackmechanismen ihre eigene Produktion sowie die Rekrutierung weiterer Immunzellen, was die Inflammation weiter anfeuert. Die wichtige Rolle von IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ bei der Schmerzentstehung zeigt andersherum die Verbesserung von neuropathischen Schmerzen durch experimentelle Antagonisierung dieser Zytokine mit Antikörpern, Antiseren oder anhand von Versuchen in Knock-out Tieren [15-18].

Antiinflammatorische Zytokine werden in der späteren Phase einer Inflammation ausgeschüttet. Interleukin 10 (IL-10), ein Vertreter dieser Gruppe, vermittelt seine Wirkung über Bindung an seinen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den beiden Untereinheiten IL-R1 und IL-R2. Durch Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs, hier vor allem über STAT3, wird die Produktion von IL-6 und $\text{TNF}\alpha$, sowie weiteren Schmerz-fördernden proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β gehemmt. Durch Aktivierung antiapoptotischer Faktoren schützt IL-10 zudem das neuronale Gewebe vor weiterer entzündungsbedingter Zerstörung [15, 16]. Durch diese Mechanismen kann IL-10 als eines der potentesten antiinflammatorischen Zytokine Neuropathie- und inflammationsbedingte Hyperalgesie limitieren [15].

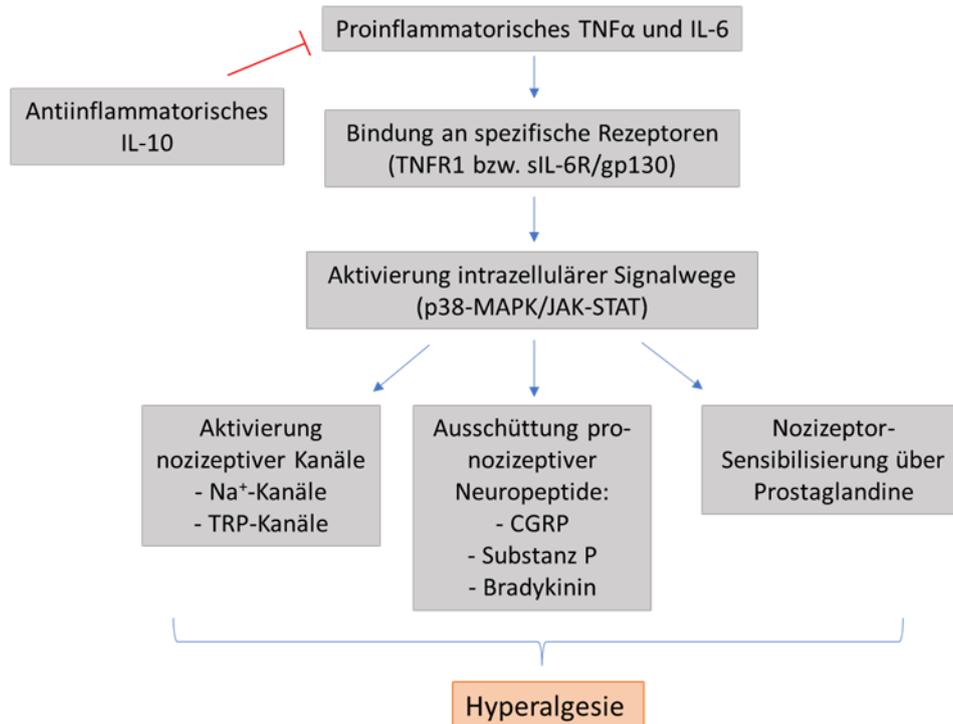


Abbildung 2: Wirkmechanismen der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine.

CGRP = Calcitonin Gene-Related Peptid; TRP-Kanäle = transiente Rezeptorpotentialkanäle; blaue Pfeile = Aktivierung/Förderung; rote Pfeile = Hemmung; Quelle: Eigene Darstellung

Reaktive Sauerstoffspezies und oxidierte Phospholipide

Neben Zytokinen bilden die rekrutierten Immunzellen im Verlauf der entzündlichen Reaktion nach Gewebeschaden mittels NADPH-Oxidasen weitere hochreaktive Entzündungsmediatoren: reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Ein sich normalerweise im Gleichgewicht befindlicher Auf- und Abbau dieser Produkte wird im entzündlichen Milieu gestört und es kommt zum oxidativen Stress [19]. Übermäßig vorhandene ROS führen durch Peroxidation von freien und membranständigen Lipiden zur Bildung oxidierter Phospholipide (OxPL), die wiederum in einem sich selbst verstärkenden Kreislauf mit weiteren Membranlipiden reagieren [20]. Als Folge der proinflammatorischen Wirkung von OxPL entstehen zum Beispiel in der Pathogenese der Atherosklerose vaskuläre Plaques, aber auch bei der Pathophysiologie weiterer chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie Alzheimer, multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis wird eine Akkumulation von schädlichen OxPL angenommen [21, 22]. In vivo vorkommende Vertreter von OxPL sind zum Beispiel POVPC (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholin), PGPC (1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-

glycero-3-phosphocholin) und PEIPC (1-palmitoyl-2-5,6-epoxyisoprostane E2-sn-glycero-3-phosphatidylcholin). OxPAPC (oxidiertes 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) ist eine synthetische Modells substanz, die als Vertreter bioaktiver OxPL zur Untersuchung der proalgetischen Wirkung verwendet wird. In Vorarbeiten der AG Molekulare Schmerzforschung wurde die Wirkung von OxPL im Rahmen akuter und chronischer Inflammation und Neuropathie anhand von Versuchen mit OxPAPC genauer untersucht. Hier zeigte sich, dass OxPL ein proalgetisches Potential haben, welches über Aktivierung von bestimmten Nozizeptor-Kanälen und Rezeptoren zur Schmerzentstehung beitragen [20, 23].

OxPL und transiente Rezeptorpotentialkanäle

Zentrale Akteure im Wirkmechanismus der inflammatorischen OxPL sind transiente Rezeptorpotentialkanäle (TRP) in der Nozizeptormembran, speziell der Subtyp Ankyrin 1 (TRPA1) und Vanilloid 1 (TRPV1). Diese Kanäle wirken durch Aktivität an der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischen Schmerzes mit. Der TRPV1 Kanal wird durch Capsaicin und thermische Reize aktiviert [3]. Der typische exogene Aktivator des TRPA1 Kanals ist Allylisothiocyanat, ein Metabolit von Senföl. Zusätzlich wird eine Aktivierung durch schmerzhaften Kältereiz diskutiert. Nach Öffnung der Kanäle kommt es zu einem Ionen-Einstrom (Na^+ , Ca^{2+}), durch den wiederum Natriumkanäle aktiviert und so Aktionspotentiale generiert werden [24]. Während akuter und chronischer Inflammation, sowie bei neuropathischem Schmerz und Nervenverletzung werden die beiden TRP-Kanäle auch in ihrer Funktion als Rezeptoren für ROS und OxPL diskutiert [20, 23]. In Anwesenheit von OxPAPC und dessen Derivaten sind die Ionenkanäle TRPA1 und TRPV1 vermehrt aktiv [23]. Die direkte erregende Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies an den Kanälen führt letztlich zum Schmerzempfinden. Außerdem scheint der OxPL-induzierte Calciumeinstrom die Ausschüttung von Neuropeptiden wie Substanz P und CGRP zu verursachen. Damit tragen OxPL auch zum Kreislauf der neurogenen Inflammation und der damit verstärkten Sensibilisierung der Nozizeptoren bei. Zusätzlich wird die Integration von oxidierten Lipiden in die Plasmamembran diskutiert. Durch die so modulierte Nozizeptormembran ist damit ebenfalls eine

mechanische Aktivierung der TRP-Kanäle mit proalgetischem Effekt denkbar [20, 23].

All diese Erkenntnisse und Überlegungen weisen auf die beschriebenen Mediatoren und Kanäle als potenzielle Angriffsziele in der Therapie neuropathischer Schmerzen hin. Die pharmakologische Wirkung des ApoA-I Mimetikums D-4F ist in diesem Zusammenhang vielversprechend.

1.3 ApoA-I Mimetikum D-4F

ApoA-I ist das wichtigste Strukturprotein des High Density Lipoprotein (HDL), welches überschüssige Fette aus der Peripherie zur Leber transportiert. Diesen Vorgang nennt man reversen Cholesterintransport und wird unter 1.4 genauer beschrieben [25]. In dieser Rolle wirken HDL und ApoA-I antiatherosklerotisch, doch übernehmen diese Moleküle auch eine wichtige antiinflammatorische Aufgabe im Rahmen kardiovaskulärer, neurodegenerativer und rheumatischer Erkrankungen. Zu diesen Funktionen zählen die Reduktion proinflammatorischer Zytokine, Minderung von oxidativem Stress und Lipidperoxidation sowie die Hemmung der Rekrutierung von Immunzellen [26, 27].

ApoA-I ist ein Protein, bestehend aus 243 Aminosäuren. Das künstlich hergestellte D-4F (D-amino-4-Phenylalanin ApoA-I-mimetisches Peptid) hat dagegen nur 18 Aminosäuren (Sequenz: Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂). Seine amphipathische Helixstruktur mit einer polaren und einer unpolaren Seite erlaubt ihm ApoA-I-mimetisch an Lipide und Rezeptoren zu binden. D-4F kann die Bildung atherosklerotischer Plaques verhindern und diese sogar teilweise rückgängig machen. Möglich ist dies durch gesteigerten Abtransport von Cholesterin, aber ebenso durch Reduktion von OxPL und der gehemmten Transformation von LDL zu OxLDL, welches proinflammatorisch auf Endothelzellen wirkt [28-30]. So wird D-4F bereits an Patienten in klinischen Phase II Studien zur Atherosklerose-Therapie untersucht [31]. Doch auch im Rahmen anderer chronisch-entzündlicher Erkrankungen scheint D-4F antiinflammatorisch zu wirken. In asthmatischen Mäusen hemmt D-4F durch Bindung an OxPL dessen proinflammatorischen Effekt und unterstützt die Wirkung von antiinflammatorischem HDL, z.B. durch die Stabilisierung des

antioxidativen Enzyms Paraoxonase, einem Bestandteil des HDL-Moleküls [32]. Ebenso konnte in Ratten mit chronischer Arthritis gezeigt werden, dass D-4F die Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten in Gelenke und Synovia hemmt, sowie eine verminderte Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Serum und Makrophagenkultur herbeiführt [27, 33].

Diese und andere Wirkmechanismen von D-4F sind im Zusammenhang mit chronischen Schmerzen noch nicht erforscht, jedoch konnte in den Vorarbeiten dieser Forschungsgruppe eine deutliche Reduktion inflammatorischer Hyperalgesie nach intraperitonealer (i.p.) D-4F-Gabe gezeigt werden [23, 34].

Ein zugrundeliegender Scavenger-Mechanismus könnte hierbei zur Reduktion der inflammatorischen Hypersensitivität führen. Bereits bei Van Lenten et. al. konnte in Zellkultur eine hohe Affinität von D-4F zu oxidierten Lipiden gezeigt werden [35]. Oehler et al. zeigten, dass D-4F durch „Abfangen“ von OxPAPC die Aktivierung von TRPA1 bzw. TRPV1 und den damit verbundenen Calcium-Einstrom in Nozizeptoren verringern konnte [23, 34].

Jedoch ist zu vermuten, dass dies nicht der einzige antinozizeptive Mechanismus ist. Deshalb konzentriert sich diese Arbeit auf die antiinflammatorische sowie Cholesterintransport-assoziierte Wirkung von D-4F. Da die Mechanismen im Zusammenhang mit Neuropathie untersucht werden sollten, wurden in den Vorarbeiten zu dieser Dissertation der Effekt des Peptids auf CCI-induzierte Allodynie untersucht. Wie bei inflammatorischer Arthritis zeigte D-4F auch hier eine Symptomlinderung gekennzeichnet durch erhöhte Schwellenwerte beim Wegziehen der Pfote im von-Frey Haartest. Dieses Ergebnis war täglich reproduzierbar, wobei die stärkste Wirkung ein bis drei Stunden nach Injektion zu verzeichnen war. Am Folgetag vor der nächsten Injektion konnte jedoch keine nachhaltig analgetische Wirkung beobachtet werden (siehe Abbildung 3).

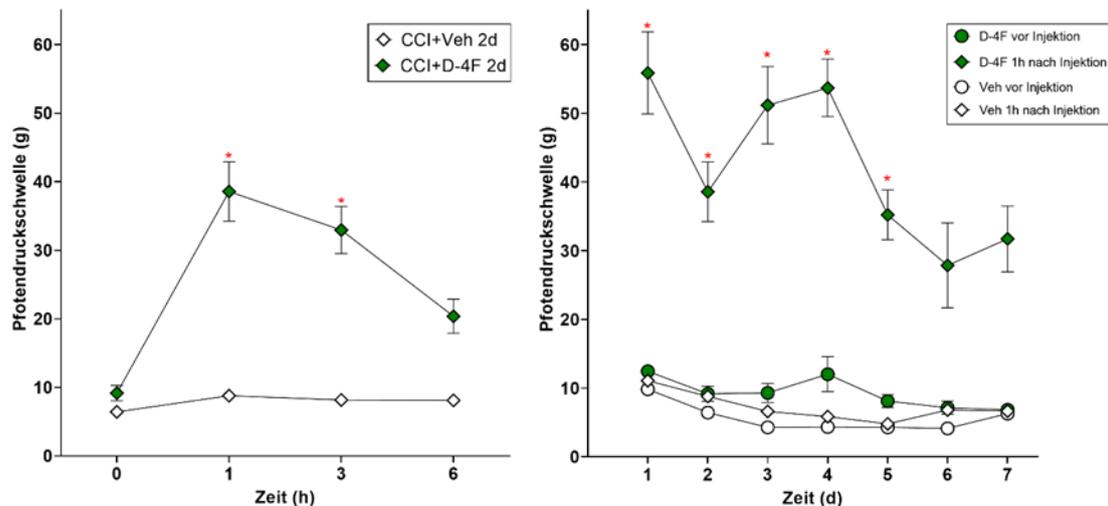


Abbildung 3: Antinozizeptive D-4F-Wirkung bei traumatischer Neuropathie.

Ratten mit CCI wurden über 7 Tage tägl. vor (0 h) sowie zu drei Zeitpunkten (1 h, 3 h und 6 h) nach D-4F- Injektion i.p. auf mechanische Allodynie mittels von-Frey Haartest untersucht. Der Kontrollgruppe wurde NaCl als Vehikel injiziert. **(a)** Kurzfristig analgetische D-4F Wirkung, beispielhaft dargestellt anhand des Tagesverlaufs von Tag 2. **(b)** Kein nachhaltig antinozizeptiver Effekt von D-4F über Nacht, aber reproduzierbare Analgesie 1 h nach erneuter Injektion; Daten dargestellt als Mittelwerte +/- SEM, n=6. Two-Way RM-ANOVA (post-hoc Holm-Sidak-Test); $p < 0,05$ *CCI+Veh vs. zeitlich entsprechendes CCI+D-4F; Quelle: Eigene Darstellung

1.4 ABC-Transporter und Lipid Rafts

Ein antinozizeptiver Mechanismus von D-4F bei Neuropathie-Behandlung könnte potenziell in der Aktivierung des ATP-bindenden Kassettentransporters A1 (ABCA1) liegen, denn D-4F bindet, wie ApoA-I, auch an diesen Transporter [36]. Der ABC-Rezeptor G1 (ABCG1) ist ebenfalls ein membranständiger Cholesterintransporter, der in Makrophagen, Endothel- und Gliazellen additiv zu ABCA1 wirkt. Daten anderer Forschungsgruppen weisen darauf hin, dass die Interaktion von ABCA1, ABCG1 und ApoA-I und die damit verbundene Regulation des Membrancholesterins von Nozizeptoren an Entstehung sowie Verringerung neuropathischer Schmerzen beteiligt sind [37]. Auch HDL, an dessen Bildung die beiden ABC-Transporter essenziell beteiligt sind, scheint mit Schmerz, wie zum Beispiel bei der diabetischen Polyneuropathie, assoziiert zu sein [38]. Der Einfluss von Nervenverletzungen bzw. deren Behandlung mit D-4F auf die Expression dieser Transporter ist nahezu unerforscht.

1.4.1 ABCA1-vermittelter Cholesterintransport

ABCA1 erlangte nach seiner Entdeckung große Aufmerksamkeit bezüglich seiner zentralen Rolle beim reversen Cholesterintransport und seinem Potential

in der Atherosklerose-Therapie. ABCA1 und ABCG1 gehören zur Gruppe der Transporter, die über eine ATP-bindende Kasette Moleküle über Zellmembranen schleusen. Lipid-freies HDL bindet über ApoA-I an den ABCA1-Transporter, über Aktivierung von cAMP und Proteinkinase A werden dann Cholesterin, aber auch freie Fettsäuren und Phospholipide auf das HDL-Molekül übertragen. Diesen Vorgang nennt man Cholesterin- bzw. Lipid-Efflux. Bezüglich der Funktion von ABCG1 weisen Versuche an Knock-out Tieren darauf hin, dass zunächst Lipid-freies ApoA-I an ABCA1 bindet und anschließend ABCG1 durch Cholesterin-Transfer auf das entstandene HDL-Molekül den reversen Cholesterintransport maximiert [39]. So wird überschüssiges Cholesterin aus Makrophagen und Endothelzellen abtransportiert, was den antiatherosklerotischen Effekt der Transporter, vor allem von ABCA1, erklärt [36, 40]. Die Expression beider Gene wird hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor Liver-X-Rezeptor reguliert. Durch Akkumulation von Cholesterin und proinflammatorischem OxLDL wird die Expression von *Abca1* und dem ähnlich funktionierenden *Abcg1* vor allem in Plaque-ständigen Makrophagen induziert [41, 42]. Doch auch unter inflammatorischen Bedingungen anderer Genese – wie Arthritis und ischämischer Hirnläsion – wurde eine erhöhte Expression von *Abca1* in Chondrozyten beziehungsweise Astrozyten beobachtet [43, 44]. Anhand publizierter Transkriptom-Datenbanken konnten im Vorfeld der Experimente Daten zur basalen Expression von sowohl *Abca1* als auch *Abcg1* in DRG- und Nervengewebe gefunden werden (siehe Tabelle 8). Wie die beiden Transporter jedoch unter neuropathischen Bedingungen reguliert werden, ist bislang unbekannt.

1.4.2 Bedeutung der Lipid Rafts

Durch die Bindung von ApoA-I als auch von ApoA-I Mimetika an ABCA1 wird JAK2 aktiviert, wodurch wiederum über STATs der ABCA1-abhängige Lipidtransport optimiert und erhöht wird [45]. So verursacht D-4F in murinen Makrophagen eine Stabilisierung und Aktivierung von ABCA1, was zu verstärktem Cholesterin-Efflux führt [36]. Durch diese Mechanismen ist ABCA1 nicht nur wichtig für den systemischen reversen Cholesterintransport, sondern trägt auch lokal zur Bildung und Organisation sogenannter Lipid Rafts bei. Lipid

Rafts sind Membranbereiche bestehend aus Phospholipiden und Cholesterin, die essenziell für Struktur und Integrität der Zellmembran sind [46, 47]. Auch wenn zu seiner genauen Funktionsweise weniger bekannt ist, scheint ABCG1 durch lokalen Lipidtransport ebenfalls zur Homöostase der Lipid Rafts beizutragen [36, 47, 48].

Durch die lokale Umstrukturierung der Lipid Rafts spielt der ABCA1-Transporter eine wichtige Rolle in der neuronalen Signalübertragung. Durch qualitative und quantitative Modifikation dieser Bereiche, z.B. Entfernung von Cholesterin oder OxPL aus der Zellmembran, kann es schlussendlich zu veränderter Sensitivität und Aktivität von nozizeptiven Rezeptoren, Kanälen und Transportern kommen [47]. Die Fähigkeit OxPL aus der Membran zu entfernen, macht das analgetische Potential von ABCA1 deutlich. Obwohl bezüglich des Membrancholesterins noch unklar ist, ob weniger oder mehr Cholesterin in diesen Domänen einen anti- oder pronozizeptiven Effekt hat, gibt es Hinweise darauf, dass vor allem der Oxidationszustand des Cholesterins entscheidend ist. Amsalem et al. z.B. zeigten, dass durch Inflammation generierte ROS zur Oxidation des Membrancholesterins und damit zum Verlust der Lipid Raft Integrität führten. In der Folge kam es durch die Cholesterin-Depletion in nozizeptiven DRG-Neuronen zu einer Nav1.9-vermittelten Ruhepotentialverschiebung. Dies verursachte letztlich eine Übererregbarkeit der Neurone, und damit thermische und mechanische Hyperalgesie [46]. Wie unter 1.2 ausgeführt, ist außerdem anzunehmen, dass auch andere Membranproteine, die zur Entstehung von inflammatorischer und neuropathischer Hyperalgesie und Allodynie beitragen, wie die TRP-Kanäle, durch solche Prozesse verändert reagieren. Genau hier wird die Wichtigkeit der Forschung zu ABCA1 und ABCG1 deutlich, da diese Transporter elementar an der Regulation und Zusammensetzung der Membranlipide beteiligt zu sein scheinen.

Die Regulation von *Abca1* und *Abcg1* scheint zwischen verschiedenen Gewebe- und Zellarten stark zu variieren, sodass bisher keine eindeutige Kausalität zwischen Transporter-Regulation und veränderter Zellmembranfunktion, insbesondere von Nozizeptoren, beschrieben werden konnte [49]. Um hier ein tieferes Verständnis zu erlangen, soll in dieser Arbeit – neben experimenteller

Untersuchung der Regulation in spezifischen Neuropathie-Modellen – außerdem ein Transkriptom-Screening bereits publizierter Datenbanken bezüglich der Expression dieser ABC-Transporter in Schmerzmodellen erfolgen.

1.4.3 Schnittstelle Inflammation

In den komplexen Regulationsmechanismen von *Abca1* und ferner *Abcg1* scheinen außerdem inflammatorische Prozesse eine Rolle zu spielen. Nach Bindung von ApoA-I wird unter anderem STAT3 aktiviert, wodurch in Makrophagen die Unterdrückung proinflammatorischer Zytokinproduktion nachgewiesen wurde. In dieser Funktion wurde ABCA1 als antiinflammatorischer Rezeptor beschrieben und auch ABCG1 scheint mit antientzündlichen Prozessen assoziiert zu sein [36, 45, 50, 51]. Wie unter 1.3 erläutert, zeigt D-4F direkte entzündungshemmende Effekte über HDL-Stabilisierung und OxPL-Scavenging. Aber auch ein indirekter Wirkmechanismus über ABCA1-Bindung und Aktivierung könnte über antiinflammatorische Kaskaden zu der beobachteten Symptomlinderung bei neuropathischen Tieren führen.

Aufgrund der geschilderten Erkenntnisse scheinen die Cholesterintransporter ABCA1 und ABCG1 durch ihren Einfluss auf die Membranlipide und die Zusammensetzung der Lipid Raft Domänen, sowie ihrem antiinflammatorischen Potenzial an der Entstehung und Rückbildung von neuropathischem Schmerz beteiligt zu sein. Damit sind sie wichtige potenzielle Targets des antinozizeptiv wirksamen D-4F, welches bereits in der Atheroskleroseforschung als ABCA1 Agonist beschrieben wurde. Welche molekularen Mechanismen der Funktion von ABCA1 und ABCG1 sowie der Wirkung von D-4F bei neuropathischem Schmerz zugrunde liegen, ist jedoch noch weitgehend unerforscht. Deshalb sollen im Folgenden sowohl die Regulation der beiden Cholesterintransporter bei peripheren Neuropathien sowie der Einfluss von D-4F untersucht werden. Außerdem soll auch die D-4F vermittelte Schmerzlinderung über mögliche Regulation der Zytokin-Expression beleuchtet werden.

1.5 Fragestellungen der Dissertation

Grundlage der Dissertation sind die Beobachtungen der AG Molekulare Schmerzforschung, dass D-4F mechanische und thermische Hypersensitivität im Rahmen einer schmerzhaften Neuropathie (CCI) vermindern kann. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch unzureichend erforscht. Möglicherweise spielt unter neuropathischen Bedingungen eine reaktive Hochregulation der ABC-Transporter Expression zur Wiederherstellung der Membranlipid-Homöostase eine Rolle. D-4F könnte durch Wiederherstellung eines physiologischen Zustands oder durch negative Rückkopplung auf die Transkription des ABC-Transporters normalisierend wirken. Neben diesem negativen Loop-Mechanismus kommt als antinozizeptiver Mechanismus des D-4F auch eine ABC-Transporter induzierte Hemmung der Expression entzündlicher Mediatoren in Frage.

Folgende Hypothesen wurden aus diesen Überlegungen für die Dissertation abgeleitet:

1. *Abca1/Abcg1* werden sowohl durch traumatische als auch diabetische Neuropathie vermehrt exprimiert. Bei einer reversiblen Nervenverletzung ist dabei die Wiederherstellung physiologischer Transporter-Expression zu erwarten, während die Hochregulation bei irreversibler Neuropathie persistiert.
2. Die antinozizeptive Wirkung von D-4F bewirkt eine Normalisierung der *Abca1/Abcg1* Expression.
3. D-4F hemmt die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie *Il6* und *Tnfa*, bzw. fördert die Expression des antiinflammatorischen *Il10* und führt so zur Minderung von Hyperalgesie und Allodynie.
4. Die systemische Gabe von D-4F beeinflusst Lipidkonzentrationen im Serum.

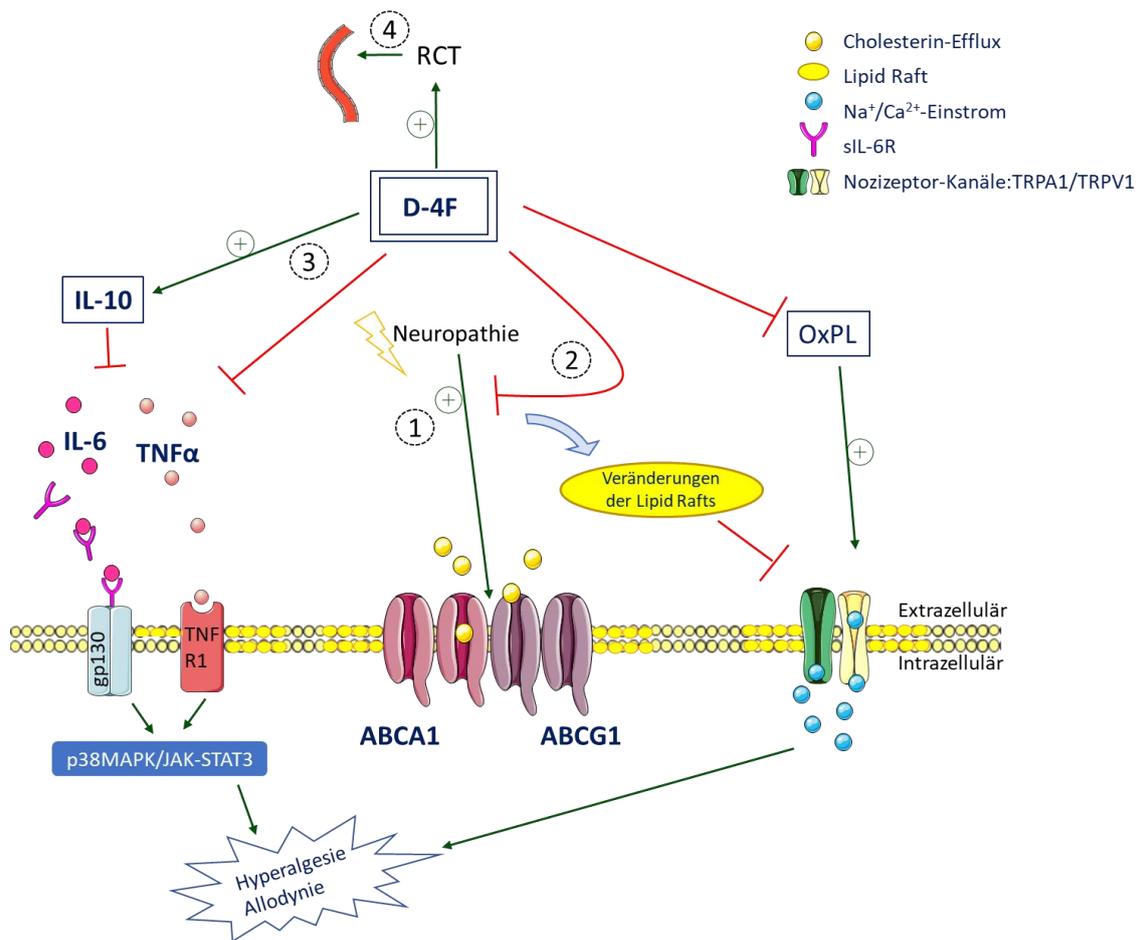


Abbildung 4: Illustration der Hypothesen

Darstellung der Nozizeptoroberfläche. Die Hypothesen entsprechen der Nummerierung 1-4. RCT = reverser Cholesterintransport; Quelle: Eigene Darstellung, erstellt mit Servier Medical Art by Servier Laboratories.

2 Methoden und Material

2.1 Datenbankanalyse: Transkriptom-Screening

Um einen Überblick zu bestehenden Erkenntnissen zur Regulation von *Abca1* und *Abcg1* in DRG und Nervengewebe zu gewinnen und die Ergebnisse der geplanten Tierexperimente vergleichen zu können, erfolgte eine Literatursuche zu öffentlich zugänglichen Transkriptom-Datenbanken über die Plattform MEDLINE/Pubmed (www.pubmed.gov, abgerufen 03.07.2021). Folgende Suchbegriffe wurden verwendet: Transcriptome AND neuropath* AND pain, Transcriptome AND inflammation AND pain, Transcriptome AND nerve AND neuropath*, Transcriptome AND nerve AND inflammation, Transcriptome AND nerve AND pain, Transcriptome AND Schwann cell AND neuropath*, Proteome AND neuropathic pain, Proteome AND nerve AND inflammation, Proteome AND nerve AND pain. Die gesamte Studiensuche ergab 898 englischsprachige Ergebnisse (inklusive Überschneidungen). Aus den relevanten Datensätzen (22 Publikationen) wurden zunächst Informationen zur basalen mRNA Expression im gesamten Gewebe, sowie in differenzierten Zellgruppen aus diesen Gewebearten extrahiert (6 Publikationen). Anschließend wurden Veränderungen der mRNA und der Proteinexpression in Schmerz-assoziierten Krankheitsmodellen zusammengefasst (16 Publikationen). Es wurden nur Studien mit Gewebe von adulten Mäusen, Ratten und Menschen einbezogen. Für das Screening der Transkriptom-Datensätze wurden die offiziellen Genbezeichnungen sowie Eintragsnummern laut UniProt verwendet.

Genbezeichnung	Eintragsnummer
<i>Abca1</i> (Maus, Ratte), <i>ABCA1</i> (Mensch)	P41233 (Maus), Q80ZB2 (Ratte), O95477 (Mensch)
<i>Abcg1</i> (Maus, Ratte), <i>ABCG1</i> (Mensch)	Q64343 (Maus), Q9EPG9 (Ratte), P45844 (Mensch)

Tabelle 1: UniProt Genbezeichnung und -nummer

Die Ergebnisse des Transkriptom-Screenings finden sich in Tabelle 8 und 9.

2.2 Tierexperimente

Alle Operationen (sham, CCI und SNI) sowie die Injektionen und Betreuung der Tierexperimente erfolgten durch Dr. med. Beatrice Oehler und Dr. rer. nat. Reine Solange Sauer, PhD. Die photometrische Analyse der Serumproben wurden im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg in Auftrag gegeben. Die Gewebeentnahme sowie alle weiteren Methoden inklusive der statistischen Auswertung wurden von der Promovendin selbst durchgeführt. Die Zuteilung aller Tiere zu Interventions- beziehungsweise Kontrollgruppe erfolgte zufällig.

2.2.1 Schmerzmodelle

Alle Tierexperimente wurden vom Veterinäramt der Regierung von Unterfranken, Würzburg anhand der Protokolle Nr. 44/14, 61/11 und 2-264 genehmigt, die Durchführung entsprach den internationalen Richtlinien zur Handhabung von Labortieren der (EU Directive 2010/63/EU).

Es wurden zwei Spezies, männliche C57BL/6-Mäuse (20-30 g) und männliche Wistar Ratten (180-250 g), untersucht.

Entsprechend 1.1 wurden drei Modelle neuropathischen Schmerzes geschaffen. Zur Untersuchung einer traumatischen Neuropathie wurde den Tieren entweder durch Nervenligatur (CCI) eine reversible Nervenverletzung oder eine irreversible Nervendurchtrennung (SNI) zugefügt [52]. Kontrollgruppen waren völlig unbehandelte Tiere (naiv) und sham operierte Tiere. Die Mäuse lebten im Anschluss an die Operation entsprechend dem Versuchsaufbau sieben Tage, drei oder sechs Wochen und wurden dann vor der Gewebeentnahme mittels Isofluran euthanasiert.

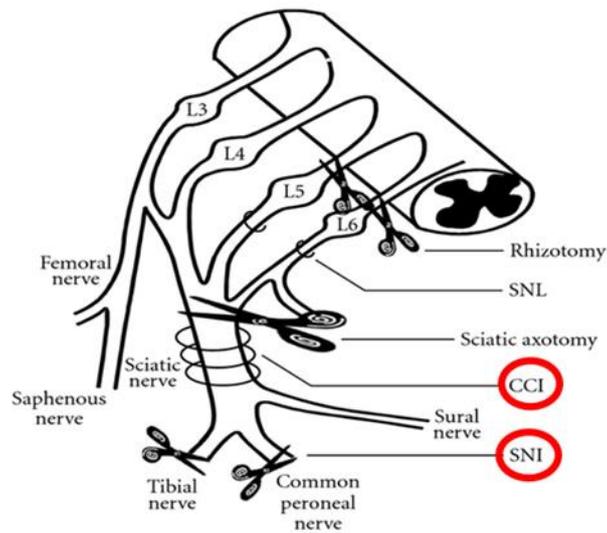


Abbildung 5: Operationsmethode CCI und SNI

Die verwendeten Techniken sind rot markiert. Bei der CCI wird der N. ischiadicus mit monofilem Faden 3- bis 4-mal ligiert. Die Durchtrennung des N. tibialis und fibularis definiert die SNI. Quelle: Suter, M.R., 2011 [52]; Lizenz: CC BY 1.0

Durch die Induktion von Diabetes mellitus mittels einmaliger intravenöser Injektion von 45 mg/kg Streptomycin, konnte eine weitere Form der peripheren Neuropathie untersucht werden [53]. Einer zweiten Gruppe, die als Kontrollgruppe dienen sollte, wurde die gleiche Menge 0,9 % NaCl injiziert.

2.2.2 Applikation des D-4F-Peptid zur Behandlung des neuropathischen Schmerzes

Um die molekularen Effekte von D-4F auf die mRNA von ABC-Transportern und Zytokinen untersuchen zu können, wurden Wistar-Ratten nach CCI-Operation zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Tieren der Interventionsgruppe wurde im Anschluss an die Operation täglich eine intraperitoneale D-4F-Injektion (12,5 mg/kg) verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge 0,9 % NaCl. Das Experiment belief sich auf einen Zeitraum von sieben Tagen.

2.2.3 Gewebeentnahme

Um die Spinalganglien bzw. Nerven zu entnehmen, wurden die Tiere nach CO₂-induzierter Euthanasie wie folgt präpariert:

Für die Entnahme des Nervus ischiadicus erfolgte ein Schnitt parallel und circa 1,5 mm anterior zum ertasteten Femur. Der unter der den Muskeln freigelegte Nerv wurde mit einer Pinzette vorsichtig der Länge nach gespreizt, um ein circa

1 cm langes Stück zu exzidieren. Im SNI Modell wurde die Gewebeprobe aus dem Bereich proximal der zuvor operativ zugefügten Nerven-Durchtrennung entnommen. Im CCI Modell wurde die Stelle der Nerven-Ligation aufgesucht und der verletzte Bereich des Nervens, sowie einige Millimeter proximal und distal davon entnommen.

Die Spinalganglien präsentierten sich als glasige Strukturen in den Foramina vertebralia der Wirbelsäule. Um sie herauslösen zu können, wurde die Wirbelsäule durch Schnitte kaudal der Schulterblätter und kranial des Schwanzansatzes und Entfernung der Rückenmuskulatur freigelegt. Bevor die Rippen entfernt wurden, erfolgte eine kleine Markierung des Wirbels auf Höhe der letzten Rippeninsertion. Auf dieser Höhe konnte die Lage des 13. thorakalen Spinalganglions angenommen werden. Die weitere Präparation erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Um die Spinalganglien in den Foramina vertebralia freizulegen, wurde die Wirbelsäule entlang der Dornfortsätze bzw. ventral mittig entlang der Wirbelkörper in zwei Längshälften geteilt und eröffnet. Ausgehend von der vorherigen Markierung wurde nun zuerst das Spinalganglion T13 identifiziert kaudal davon die Spinalganglien L3, L4 und L5 aufgesucht und mit einer Feinpinzette aus ihrer Vertiefung gehoben. Am Ganglion verbleibende Axone wurden mit einer feinen Präparierschere entfernt. Die Gewebeproben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für die Immunhistochemie zuvor in Tissue Tek eingebettet, und bei -80 °C gelagert.

2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese RNA-Isolierung

Um die Regulation der untersuchten Gene analysieren zu können, musste zuerst RNA aus dem präparierten Gewebe isoliert werden.

Dies erfolgte mithilfe des miRNeasy Micro Kit von QIAGEN. Alle folgenden Schritte wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe (DRG oder Nerv) in 700 µl Trizol mit dem QIAGEN Tissuelyser zerkleinert. TRizol™ ist ein Reagenz, welches unter anderem aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besteht. Diese Komponenten hemmen die RNase-Aktivität während andere Zellbestandteile, z.B. Proteine und DNA, aufgelöst werden. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform wurde die Mischung

15 min bei 12 000 x g zentrifugiert, wodurch zwei Phasen entstanden. Die sich im wässrigen Überstand befindliche RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß mit 525 µl Ethanol überführt. Nach Zugabe von Alkohol wurde die Mischung portionsweise in eine RNeasy MinElute Spin-Säule gegeben und wiederholt zentrifugiert. Die Säule enthält eine Siliciumdioxid-Membran, die unter korrekten pH-Bedingungen RNA ab 200 Nukleotiden Länge bindet, während andere Bestandteile der Lösung hindurchfließen. Die mRNA konnte so angereichert werden, da z.B. tRNA oder rRNA kürzer sind und deshalb nicht gebunden werden. Die Membran-gebundene mRNA wurde durch die schrittweise Zugabe von 500 µl RPE Puffer und 500 µl 80 % Ethanol von Verunreinigungen befreit. Nachdem man die Waschflüssigkeiten durch Zentrifugieren bei 8000 x g entfernt hatte, wurde die Membran 5 min bei 14 000 x g getrocknet. Im letzten Schritt pipettierte man 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran. Durch Zentrifugieren bei 14 000 x g über 1 min löste sich die aufgereinigte mRNA im Wasser.

cDNA-Synthese

Die gewonnene mRNA wurde im nächsten Schritt in die stabilere cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher. Zunächst wurde die RNA-Konzentration einer Probe mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer bestimmt, um die benötigte Reagenzienmenge berechnen zu können. Jede umzuschreibende Probe sollte genau gleich viel RNA, in diesem Fall 1 µg, enthalten, damit die Ausgangsbedingungen für jede entstehende cDNA-Probe und so wiederum Vergleichbarkeit und Quantifizierung der Gene in der folgenden qPCR zu ermöglichen. Jede RNA-Probe wurde mit RNase-freiem Wasser zu 13,2 µl Gesamtvolumen ergänzt und der folgende Master-Mix zugegeben:

Reagenz	Volumen (bei 20 µl Gesamtvolumen)	Endkonzentration
10x RT Buffer	2 µl	10 %
Random Primers	2 µl	10 %
dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl	4 %
Reverse Transkriptase	1 µl	5 %

RNase Inhibitor	1 µl	5 %
RNA (1 µg) in H₂O	13,2 µl	66 %

Tabelle 2: Mengenangaben für einen Ansatz zur cDNA-Synthese

Die Transkription fand im 2720 Thermal Cycler über 120 min bei 37 °C statt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptasen folgte ein 5-minütiger Zyklus mit 85 °C. Als negative Kontrollen wurden RNA-freie Proben angefertigt.

2.4 PCR

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion beruht auf dem Prinzip der DNA-Vervielfältigung und anschließender Detektion des untersuchten Gens. Der Prozess besteht aus drei Phasen:

- Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzung auf 95 °C in zwei Stränge getrennt.
- Primerhybridisierung: Durch Abkühlen der Temperatur auf 60 °C lagern sich die zugegebenen Primer (reverse bzw. forward) genspezifisch an jeweils einen DNA-Matrizenstrang (5'-3' bzw. 3'-5').
- Amplifikation: Die hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert beginnend am gebundenen Primer den komplementären DNA-Strang. So wird die vorhandene DNA-Menge des Zielgens in jedem Zyklus erneut verdoppelt.

Bei der herkömmlichen PCR-Methode kann nur eine rein qualitative Aussage über das Vorhandensein eines Gens getroffen werden [54]. Deshalb wurde hier die Analyse der DNA mittels quantitativer Real-Time PCR gewählt. Dazu wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, in dieser Arbeit SYBR Green, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Menge der detektierten Fluoreszenz korreliert dann direkt mit der des amplifizierten Zielgens.

In dieser Zielgen-Analyse wird außerdem die Methode der relativen Quantifizierung (RQ) genutzt. Als Referenzgen wurde hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) gewählt und die Menge des Zielgens auf die Menge von *Gapdh* bezogen. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass dieses Referenzgen (auch Housekeeping-Gen genannt) konstitutiv im Gewebe

exprimiert wird, also auch in verletzten oder erkrankten Tieren unverändert bleibt. Indem man also die Amplifikation des Zielgens auf die von *Gapdh* bezieht, kann man interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren ausgleichen. Außerdem lässt sich durch dieses endogene Kontrollgen die Effizienz der Amplifikation beurteilen und so die Reliabilität des Experiments erhöhen.

Durchführung und Auswertung

Die cDNA Proben wurden in 1:10 Verdünnung zu 5 µl in eine Mikrotiter-Platte für 96 Ansätze pipettiert. Für jedes Zielgen wurde ein Master-Mix wie in Tabelle 3 vorbereitet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt:

Reagenz	Volumen (bei 20 µl Gesamtvolumen)	Endkonzentration
PowerUp™ SYBR®Green	10 µl	50 %
3'-5' Primer (<i>forward</i>)	1 µl	5 %
5'-3' Primer (<i>reverse</i>)	1 µl	5 %
RNase freies Wasser	3 µl	15 %
cDNA (1:10 in H ₂ O)	5 µl	25 %

Tabelle 3: Mengenangaben für einen PCR-Ansatz

Name	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>
<i>Abca1</i> (Maus)	GCAAGGCTACCAATTACATTT G	GGTCAGAAACATCACCTCCTG
<i>Abca1</i> (Ratte)	CCTAAGCATTATCAAGGAGG GAAG	AGAGATGACAAGGAGGACGG AAG
<i>Abcg1</i> (Maus)	ACCTACCACAACCCAGCAGA CTTT	GGTGCCAAAGAAACGGGTTC ACAT
<i>Abcg1</i> (Ratte)	CTGACCTTTCCCCTCGAGAT	AGTACACGATGCTGCAGTAG GC
<i>Ii6</i> (Ratte)	CTGCTCTGGTCTTCTGGAGT	TGGAAGTTGGGGTAGGAAGG
<i>Ii10</i> (Ratte)	AGACCCACATGCTCCGAGAG	GGGCATCACTTCTACCAGGT
<i>Tnfa</i> (Ratte)	ACCACGCTCTTCTGTCTACTG	CTTGGTGGTTTGCTACGAC

Tabelle 4: Primerliste

Um für weitere Rechnungen einen verlässlichen Mittelwert zu erhalten, wurden von jeder Probe drei Replikate pipettiert. Als negative Kontrollen wurden cDNA-freie Ansätze pipettiert.

Der StepOne Plus™ qPCR Thermo-Cycler wurde wie folgt eingestellt:

Temperatur	Zeit	Zyklen	Zweck
50 °C	2 min	Hold	Aktivierung UDG (Reparaturenzym)
95 °C	2 min	Hold	Aktivierung Polymerase
95 °C	4 s	40	Denaturierung
60 °C	30 s	40	Primerhybridisierung und Extension

Tabelle 5: qPCR Zyklen

Schwellenwert und $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode

Während den PCR-Zyklen misst das Gerät die Amplifikation anhand sogenannter Ct-Werte (Cycle Threshold). Diese Schwellenwerte entsprechen dem jeweiligen Zyklus, an dem die Menge der fluoreszierenden amplifizierten Zielgen-DNA den Hintergrundwert übersteigt. Nachdem man die Ct-Werte erhalten hat, werden folgende Rechnungen angestellt [55].

Zunächst wird die Zielgenexpression mittels der endogenen Kontrolle normalisiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (endogene Kontrolle)}$$

Anschließend wird die relative Quantifizierung mittels Subtraktion der ΔCt -Mittelwerte einer (unbehandelten) Kontrollgruppe errechnet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Interventionsgruppe)} - \Delta\text{Ct (Kontrollgruppe)}$$

Der finale Wert, der auch für die statistische Auswertung verwendet wird, ist dann der RQ-Wert. So wird die Vervielfachung des mRNA-Levels besser veranschaulicht als durch logarithmische Ct-Werte:

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.5 Immunhistochemie

Prinzip

Die Methode der indirekten immunhistochemischen Färbung beruht auf einer zweifachen Antigen-Antikörper-Reaktion. Spezifische primäre Antikörper, in diesem Fall gewonnen aus Hasen- bzw. Ziegenserum, binden an das Epitop des Zielproteins. Wichtig ist dabei, dass die Antikörper möglichst keine Kreuzreaktivität aufweisen. Darauf folgt eine weitere Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und mit einem fluoreszierenden Farbstoff (hier Alexa Fluor bzw. Cy3) gekoppelt ist. Die gebildeten Konjugate absorbieren in der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie einfallendes Licht und werden so angeregt. Dabei emittieren die sekundären Antikörper Licht mit spezifischer Wellenlänge, anhand dessen Intensität man auf die gebundene Epitopmenge zurückschließen kann. Da eine gewisse unspezifische Hintergrundfärbung nicht zu vermeiden ist, wird die Fluoreszenz-Intensität dieser Regionen bei der anschließenden Auswertung vom Ergebnis subtrahiert.

Durchführung und Auswertung

Da in diesem Experiment die ABCA1 Expression in Nozizeptoren gemessen werden sollte, war eine Doppelfärbung mit einem bekannten Marker dieser speziellen Neurone notwendig. TRPV1 ist in peptidergen (Typ PEP1) und nicht-peptidergen (Typ NP2 und NP3) nozizeptiven Neuronen im DRG exprimiert, so wurde dieser als Antikörper zur Markierung von Nozizeptoren genutzt [56, 57].

Färbeprotokoll

Von den in Tissue Tek gefrorenen DRGs wurden mit dem Kryostat 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Pro Tier wurden anschließend jeweils fünf Schnitte mit einem Schnittabstand von mindestens 40 µm auf Objektträgern gefärbt. Alle im folgenden genutzten Reagenzien wurden auf Eis verarbeitet, die Proben lagerten stets bei Raumtemperatur (RT).

Durch Umrandung der Proben mit einem flüssigkeitsabweisenden Marker wurde eine gleichmäßige Verteilung der applizierten Reagenzien erreicht. Zunächst

wurden die Schnitte 20 min bei -20 °C in Ethanol fixiert, dann mit PBS 5 min bei RT rehydriert und für die Permeabilisierung der Zellmembranen drei Mal mit einer Waschlösung gespült.

Um unspezifischer Konjugatbildung vorzubeugen, wurden die Schnitte 3 h in einem Blockreagenz inkubiert. Über Nacht wurden die Proben mit dem primären Antikörper, verdünnt im Blockreagenz, inkubiert. Nach Spülung mit der Waschlösung erfolgte die Behandlung mit den sekundären Antikörpern in Verdünnung über 3 h. Zur Färbung der Zellkerne wurde außerdem DAPI 1:2000 in PBS (1x) verdünnt für 5 min aufgetragen. Nach einigen gründlichen PBS-Spülungen wurden die Objektträger zwei Mal mit destilliertem Wasser gespült, um restliche Salze zu entfernen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Aqua Polymount fixiert und bei 4 °C gelagert.

Reagenz	Inhalt	Endkonzentration
Waschlösung (auch zur Permeabilisierung)	TritonX-100	0,3 %
	PBS 1x (pH 7,4)	99,7 %
Blockreagenz (auch zur Antikörper-Verdünnung)	TritonX-1000	0,3 %
	PBS	89,7 %
	Donkey Serum	10 %

Tabelle 6: Angaben zu Reagenzien-Konzentrationen

Primäre Antikörper	Wirt	Verdünnung
ABCA1 polyklonal	Hase	1:400
TRPV1 monoklonal	Ziege	1:400
Sekundäre Antikörper	Wirt	Verdünnung
Alexa Fluor 488 (grün)	Maus (anti-rabbit)	1:1000
Alexa Fluor Cy3 (rot)	Maus (anti-goat)	1:1000

Tabelle 7: Antikörperliste

Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (BZ-9000 BIOREVO von Keyence) erstellt. Die Mikroskop-Einstellungen wurden bei Aufnahme des ersten Bildes bezüglich bester Auflösung beziehungsweise

optimalem Verhältnis von Signal- zu Hintergrund-Intensität gewählt. Die folgenden Kriterien wurden anschließend für die Anfertigung aller Aufnahmen beibehalten: 40-fache Vergrößerung, Belichtungsstärke 1 s (ABCA1), 1/1.3 s (TRPV1) und 1/400 s (DAPI). Für jede Gruppe wurden drei Tiere untersucht. Pro Tier wurden fünf immunhistochemische Bilder von DRGs akquiriert. Der intersektionale Abstand zwischen den fotografierten DRG-Schnitten betrug mindestens 40 µm. So entstanden pro Versuchstier 15 Bilder, die mit Hilfe der Software Image J analysiert wurden.

Image J Software

Die Bilder wurden mit Image J (NIH Freeware) in den einzelnen Farbkanälen betrachtet. Zuerst wurden TRPV1-„positive“ Zellen (rot) als Region of Interest (ROI) markiert. Diese ROI-Markierungen wurden dann auf die Bilder des ABCA1-Kanals (grün) gelegt. Abschließend wurden noch drei zufällig platzierte Hintergrundbereiche markiert.

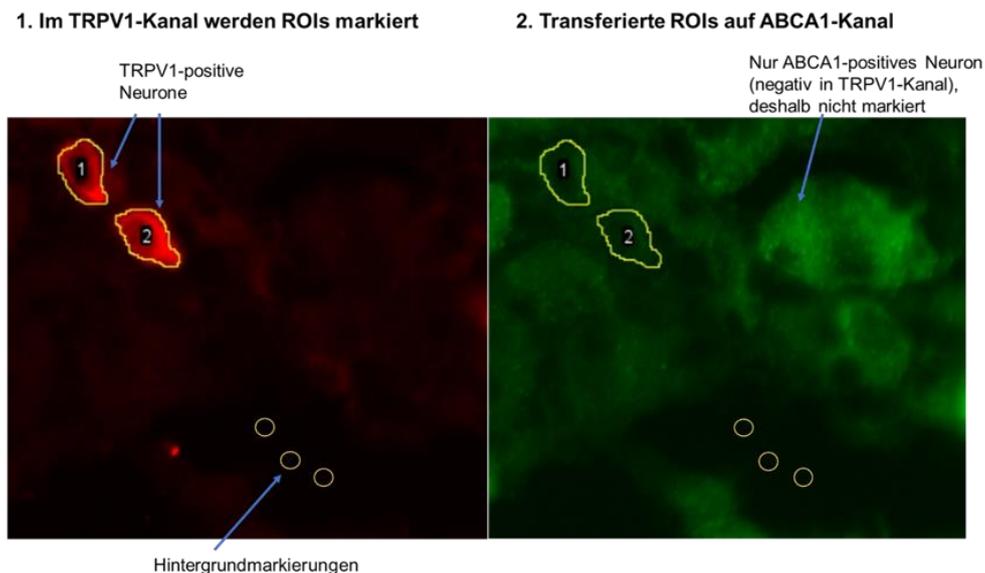


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Zellmarkierung zur Fluoreszenzmessung
Quelle: Eigene Darstellung

Nach Konvertierung des Fotos zu 8-bit Bildtiefe (Graustufen) wurden folgende Faktoren durch das Programm berechnet:

- Mittlerer Grauwert (mean grey value): durchschnittlicher Grauwert der Fluoreszenz innerhalb des ROI. Dieser ergibt sich aus der Summe der Grauwerte aller Pixel innerhalb des ROI geteilt durch die Anzahl der Pixel.
- Integrierte Dichte (integrated density): Produkt aus Fläche und mittlerem Grauwert.
- Fläche (area): in kalibrierter Einheit angegeben, hier Quadratmillimeter.

Für jedes einzelne Neuron wurde anhand dieser Werte die Intensität der Färbungen berechnet. Das Ergebnis folgender Formel ist die korrigierte totale Zellfluoreszenz (corrected total cell fluorescence; CTCF) [58]:

$$\text{CTCF} = \text{Integrierte Dichte einer Zelle} - (\text{Mittlerer Grauwert des Hintergrundes} \times \text{Fläche der Zelle})$$

Um die unterschiedliche Größe der Zellen auszugleichen, wurde die CTCF am Ende durch die entsprechende Fläche geteilt. Die pro Bild gemittelten CTCF/ μm^2 -Werte wurden dann für die statistische Analyse und graphischen Darstellung herangezogen.

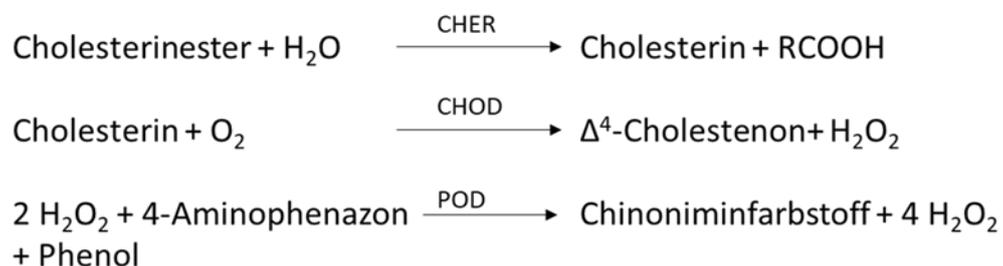
2.6 Photometrische Serumlipid-Analyse

Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte zügig nach Exitus der Tiere direkt aus dem linken Ventrikel des Herzens mittels einer 24 G Kanüle. Zur Gewinnung des Serums wurde das Vollblut in 2,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Serum wurde dann abpipettiert, bis eine Menge von mindestens 200 µl pro Tier gewonnen wurde. Die fertigen Serumröhrchen wurden dem Zentrallabor des Universitätsklinikum Würzburg auf Eis zur weiteren maschinellen Analyse übergeben.

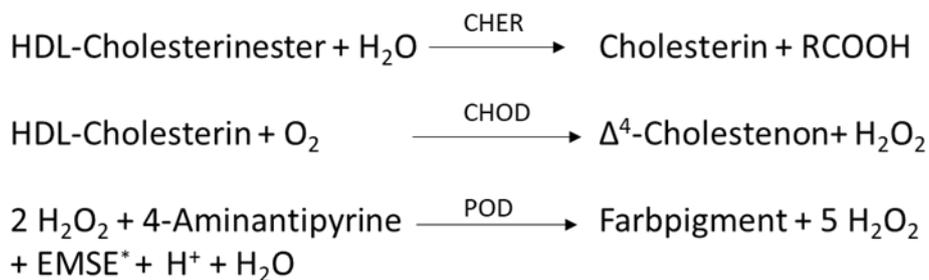
Photometrische Konzentrationsmessung

Die Messung der Serumkonzentrationen von Gesamt-Cholesterin und HDL-Cholesterin beruht auf dem Prinzip des enzymatischen Farbtests [59]. Das als Ester vorliegende Cholesterin wird unter Einwirkung der Cholinesterase (CHER) zu freiem Cholesterin und Fettsäuren gespalten. In der nächsten Reaktion entsteht im Beisein der Cholesterinoxidase (CHOD) 4-Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). In der nun folgenden sogenannten Trinder-Reaktion, katalysiert durch eine Peroxidase (POD), entsteht Chinoniminfarbstoff, welcher in seiner Menge proportional dem vorher entstandenen H₂O₂ entspricht [60]. Somit kann durch die photometrisch bestimmte Intensität auf die Analytkonzentration des Gesamt-Cholesterins zurückgeschlossen werden.



Minimale Unterschiede in der Reagenzien-Zusammensetzung bestehen zwischen der Gesamt-Cholesterinbestimmung und der Analyse der HDL-Cholesterin-Konzentration, die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen

jedoch sind identisch [61]. Um ausschließlich die HDL-Cholesterinkonzentration bestimmen zu können, werden der Serumprobe bei dieser Analyse zuerst Polyanionen und ein Detergens zugegeben. LDL, VLDL und Chylomikronen bilden mit diesen einen wasserlöslichen Komplex, welcher nicht mehr an den folgenden Reaktionen teilnehmen kann. So werden nur die HDL-Teilchen durch CHER und CHOD zu Wasserstoffperoxid umgesetzt und quantitativ gemessen.



* N-Ethyl-N-(3-methylphenyl)-N'-succinylethylendiamin

Sämtliche Konzentrationsbestimmungen wurden mit den vorgefertigten Kits HDLC4 und CHOL2 der Firma Roche mit Hilfe des Roche/Hitachi cobas c 701/702 Gerätesystems durchgeführt.

2.7 Statistik und Programme

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit Excel (Microsoft Office 2016) und GraphPad Prism 8. In allen Graphen wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere als Streudiagramm mit dem Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Für die Wahl des korrekten statistischen Tests wurden alle Datensätze vorab mittels Shapiro-Wilk-Normalitätstest und Brown-Forsythe zum Test der Gleichheit von Gruppenvarianzen analysiert. Zum Vergleich von zwei Gruppen mit gleichem Versuchszeitpunkt wurde der t-Test bzw. Mann-Whitney-Test (nicht-parametrischer Test bei nicht normal verteilten Daten) durchgeführt. Zum Vergleich eines Faktors (Art der Behandlung) zwischen mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA), bei zwei Faktoren (Behandlung und Zeit) eine Two-Way ANOVA zur Auswertung genutzt. In einem Fall lagen signifikante Varianzunterschiede vor, hier erfolgte die Auswertung

mittels Welch-ANOVA (siehe Abbildung 7). Bei signifikantem Ergebnis im ANOVA-Test diente der Tukey-Test post-hoc zum paarweisen Vergleich aller Gruppen untereinander. Der p-Wert < 0,05 wurde als signifikant definiert.

2.8 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Tissuelyser	Qiagen N.V, Venlo, Niederlande
Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research Pipetten (10, 100, 1000 µl, Multipipette)	“-“
Safelock Tubes (0,2, 0,5, 1, 2 ml)	“-“
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2720 Thermocycler	Applied Biosystems, Warrington, UK
StepOne Plus real-time PCR System	“-“
Combi Spin	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS, Tokyo, Japan
Cryostat CM3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Biorevo, BZ-9000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Microslide Coverslips	ThermoScientific, Waltham, USA
Roche/Hitachi cobas c 701/702	Roche, Basel, Schweiz
Software	Hersteller
NanoDrop2000/2000c	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
7300 System SDS	Applied Biosystems, Warrington, UK
NIS-Elements	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
NIH Image J	Bethesda, Maryland, USA
EndNoteX8	Clarivate Analytics, Boston, USA
Office 2016 (Excel, Word, PowerPoint)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

2.9 Chemikalien, Kits und Antikörper

Reagenz	Hersteller
miRNeasy Kit	Qiagen N.V, Venlo, Niederlande

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Warrington, UK
Cholesterol Gen.2 und HDL-Cholesterol Gen.4 gebrauchsfertige Reagenzien	Roche, Basel, Schweiz
PowerUp™ SYBR®Green	“-“
RNase-freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA
TRIzol Lysis Reagenz	“-“
Tissue-Tek compound	OCT, Miles Inc., Elkhart, USA
Chloroform (99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (99,9 %)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
RNase AWAY	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	“-“
Triton X-100 (0,3 %)	“-“
Donkey Serum	“-“
Super Pap Pen Liquid Blocker	Science Services, München, Deutschland
Aqua Polymount	Polysciences, Warrington, USA
Spezifische Primer (Details siehe Tabelle 4)	Eurofin Genomics, Ebersberg, Deutschland
Antikörper	Hersteller
DAPI	Roche, Basel, Schweiz
ABCA1 NB400-105 polyklonal	Novus Biologicals, Littleton, USA
TRPV1 VR1 E-8 monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Alexa Fluor 488 IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Alexa Fluor Cy3 IgG	“-“

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der ABC-Transporter in neuropathischen Schmerzmodellen

Öffentlich verfügbare Gen-Datenbanken wurden auf Informationen zu den Transportern *Abca1* und *Abcg1* gescreent. Die grundsätzlich vorhandene mRNA-Expression für beide Gene wurde in DRG- und Nervengewebe für Mensch, Ratte und Maus beschrieben. In murinem sowie menschlichem Gewebe wurde die Expression auch in spezifischen Zelltypen gemessen (Tabelle 8).

Gewebe	Zelltyp	Referenz/Versuchstier
<i>Abca1</i> und <i>Abcg1</i>		
DRG	Neurone	[62] Maus
DRG	C-Faser Neurone	[63] Maus
DRG	TRPV1-markierte Neurone	[64] Maus
DRG	gesamtes Gewebe	[65] Maus
DRG	gesamtes Gewebe (Neuronen, Mantelzellen, Fibroblasten) ¹	[66] Ratte
DRG	<i>Abca1</i> : höchste Expression in nicht-peptidergen und peptidergen Nozizeptoren <i>Abcg1</i> : höchste Expression in C-Kälte-Nozizeptoren	[57] Affe
DRG	gesamtes Gewebe	[65] Mensch
DRG	C-Faser Nozizeptoren und A β -Nozizeptoren (insgesamt niedrige Expression)	[67] Mensch
Nerv	gesamtes Gewebe (überwiegend Schwannzellen)	[66] Ratte
Nerv	gesamtes Gewebe	[65] Maus
Nerv	Schwannzellen	[68] Maus
Nerv	gesamtes Gewebe	[65] Mensch

Tabelle 8: Expression von *Abca1* und *Abcg1*

Die Angaben bezüglich einzelner Zelltypen bzw. Analyse des Gewebes als Ganzes entsprechend Angaben der jeweiligen Autoren. Analyse des gesamten Gewebes entsprechen jeweils den Beschreibungen der jeweiligen Referenz;

Anschließend folgte das Screening der Transkriptom-Daten (in geringerem Umfang auch von Proteom-Daten) bezüglich Veränderung der Genexpression in Schmerz-assoziierten Krankheitsmodellen (Tabelle 9). Nicht in allen Transkriptom-Datenbanken, die Angaben zu *Abca1* Expression machten, gab es

auch Informationen zu *Abcg1*. Insgesamt waren die Ergebnisse bezüglich des Regulationstrends nicht einheitlich (Tabelle 9a). In den wenigen verfügbaren Proteom-Daten wurde im DRG keine Veränderung der Proteinexpression festgestellt, was zumindest für SNI im Gegensatz zur entsprechenden mRNA Regulation steht (Tabelle 9b) [69, 70].

Nach lokal-traumatischen Nervenverletzungen war in der Mehrheit der Studien *Abca1* in Nerv und DRG hochreguliert (SNI, SNT = *sciatic nerve transection*, DRG-Kultur, CPIP = *chronic-post ischemic pain*), während bei systemischen Schmerzsyndromen und Neuropathien (Chemotherapie, Arthritis, Diabetes, Sichelzellanämie), sowie lokaler Weichteilentzündung (Complete Freund's Adjuvans Pfotenentzündung, Carrageen) *Abca1* unverändert war. Interessanterweise zeigte eine Studie zwischen Mensch und Maus einen Speziesunterschied, da *ABCA1* 24 h nach PNI hochreguliert war, nicht aber *Abca1* [71].

In der Regulation von *ABCG1* bzw. *Abcg1* wurde bei Analyse von DRG-Kulturen nach vier Tagen ebenso ein Unterschied zwischen Mensch und Maus festgestellt [72]. In den meisten Studien wurde allerdings kein signifikanter Einfluss der jeweiligen Behandlungen auf die Regulation des Gens beobachtet. Zu beachten ist dabei, dass die extrahierbaren Daten zu *Abcg1* insgesamt eine ausgeprägte Diskrepanz bei geringer Quantität vorwiesen.

Tabelle 9a: mRNA-Expression				
Modell	Gewebe/Zelltyp	<i>Abca1</i>	<i>Abcg1</i>	[Referenz] Versuchstier
Traumatische Neuropathie-Modelle (irreversibel)				
SNI 7 d	DRG	↑	↓	[73] Maus
SNI 7 d	DRG	↑	k.A.	[74] Ratte
SNI 7 d	DRG-Nozizeptoren	↑	k.A.	[75] Maus
SNI 7 d und 21 d ¹	DRG-Nozizeptoren	↑	k.A.	[70] Maus
DRG-Kultur 4 d ²	DRG-Neurone	↑	↔	[72] Mensch
DRG-Kultur 4 d ²	DRG-Neurone	↑	↓	[72] Maus
SNT 0.5, 3, 6, 9, 24 h	DRG	↔	k.A.	[76] Ratte
SNT 4, 7, 14 d	DRG	↑	k.A.	[76] Ratte

SNT 7 d	DRG-Neurone	↓	↔	[77] Ratte
SNT 7 d und 28 d¹	DRG	↑	k.A.	[70] Ratte
SNT 14 d	DRG	↑	↓	[78] Ratte
SNT 2, 24, 72 h	Nerv (differenziert in proximal und distal der Verletzung)	2 h; 24 h ↔ 72 h ↑ proximal und distal	2 h; 72 h ↔ 24 h ↑ nur proximal	[79] Maus
SNT 1, 4, 7, 14 d	Nerv	1 d ↔; 4 d ↑; 7 d ↔; 14 d ↔	k.A.	[80] Ratte
SNT 7 d	Nerv (sensorisch und motorisch differenziert)	↑ motorisch und sensorisch	k.A.	[81] Ratte
PNI 2 und 24 h³	Nerv (80 % Schwanzzellen)	2 h ↔; 24 h ↑	k.A.	[71] Mensch
PNI 2 und 24 h³	Nerv (80 % Schwanzzellen)	↔	k.A.	[71] Maus
Traumatische Neuropathie-Modelle (reversibel)				
CCI 14 d	Hinterhorn des Rückenmarks	↔	↔	[82] Ratte
PSL 8 d	DRG-Nozizeptoren	↔	↔	[83] Maus
PSL 3 und 14 d	DRG-Mantelzellen	↔	↔	[83] Maus
PSL 16 d⁴	DRG	↑	↓	[84] Maus
CPIP 7 d	DRG	↑	↔	[85] Ratte
Krankheitsinduzierte Neuropathie-Modelle				
CIBP 8-16 d⁴	DRG	↔	↔	[84] Maus
Tumor-assoziierte Radikulopathie	DRG	↔	↔	[86] Mensch
SCD-assoziiertes Schmerz (chronisch & VOC)	DRG	↔	↔	[87] Maus
STZ-induzierte DPN 14 d	DRG-Neurone	↔	↔	[88] Maus
Arthrose (MJL-induziert) 14 d⁴	DRG	↓	↔	[84] Maus
CAIA 54 d⁵	Spinale Mikroglia	↔	↔	[89] Maus
Medikamenteninduzierte Neuropathie-Modelle				
CIPN 10 d (Paclitaxel)	DRG-Nozizeptoren	↔	↔	[90] Maus
CIPN 28 d⁴ (Oxaliplatin)	DRG	↔	↔	[84] Maus

CMP (Carrageen)	29 d ⁴	DRG	↔	↔	[84] Maus
Modelle lokaler Inflammation					
CFA 2 d⁴		DRG	↔	↔	[84] Maus
CFA 3 d		DRG	↔	↑	[73] Maus
LID 3 d		DRG	↑	↓	[91] Ratte

Tabelle 9b: Proteinexpression peripher und zentral				
Modell	Gewebe/Zelltyp	ABCA1	ABCG1	[Referenz] Versuchstier
SNI 28 d	DRG	↔	↔	[69] Maus
CCI 7 d	Rückenmark	↓	↓	[92] Ratte
CFA 24 h	DRG	↔	↔	[69] Maus

Tabelle 9: Datenbank-Screening zu (a) mRNA- und (b) Proteinexpression

Als Kontrollgruppe dienten stets sham-Behandlungen oder contralaterale Präparate. SNT – sciatic nerve transection, PNI – peripheral nerve injury (hier N. suralis), PSL – partial sciatic nerve ligation, CPIP – chronic post-ischemia pain (\cong CRPS I), CIBP – cancer-induced bone pain, SCD - Sichelzellanämie: rezidivierende Schmerzen im Skelettsystem bzw. Schmerzkrisen durch Gefäßverschlüsse (vasookklusive Krisen, VOC) [89], MJL – mechanical joint loading, CAIA – collagen-antibody induced arthritis, CIPN – chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CMP – chronic muscle pain, LID – local inflammation of the DRG (Zymosan); ¹Hochregulation nach 21/28 d signifikant, jedoch verglichen mit 7 d bereits halbiertes Fold Change-Wert; ²Das Prozedere der DRG-Entnahme und Kultivierung erzeugt laut Autor ein der Axotomie gleichendes Modell, verglichen wird dieses Transkriptom mit DRGs direkt nach Entnahme; ³Entnahme und Zerteilung des N. suralis + Inkubation bei 37 °C; ⁴DRG zum Zeitpunkt des ausgeprägtesten Schmerzverhalten; ⁵Gewebeentnahme in postinflammatorischer Phase, d.h. keine Gelenkinflammation, jedoch persistierende Hypersensitivität

Aufgrund der Daten-Inhomogenität konnte auf Basis dieses Transkriptom-Screenings keine definitive Aussage über die Genexpression bei Neuropathie abgeleitet werden. Um den Wirkmechanismus von D-4F besser zu verstehen, wurde deshalb im folgenden experimentellen Teil dieser Arbeit zuerst die Regulation der Transporter-mRNA in drei spezifischen Neuropathie-Modell überprüft. Es wurden neben der metabolisch verursachten DPN zwei traumatische Verfahren angewandt – CCI und SNI – um mögliche Unterschiede zwischen reversibler beziehungsweise persistierender Neuropathie differenzieren zu können [93].

3.2 Erhöhte *Abca1* mRNA aber unveränderte *Abcg1* Regulation nach Nervenverletzung

Sieben Tage nach CCI oder SNI-Operation war *Abca1* im Nervengewebe der Mäuse deutlich hochreguliert. Die Expression verdreifachte sich in beiden Modellen verglichen mit naiven und sham Tieren. Im murinen DRG nach CCI verdoppelte sich die *Abca1* mRNA. Nach SNI gab es zwar eine Tendenz der Hochregulation von *Abca1*, jedoch war der Effekt nicht signifikant. Für *Abcg1* waren keine Unterschiede zu den Kontrollgruppen zu verzeichnen (Abbildung 7)

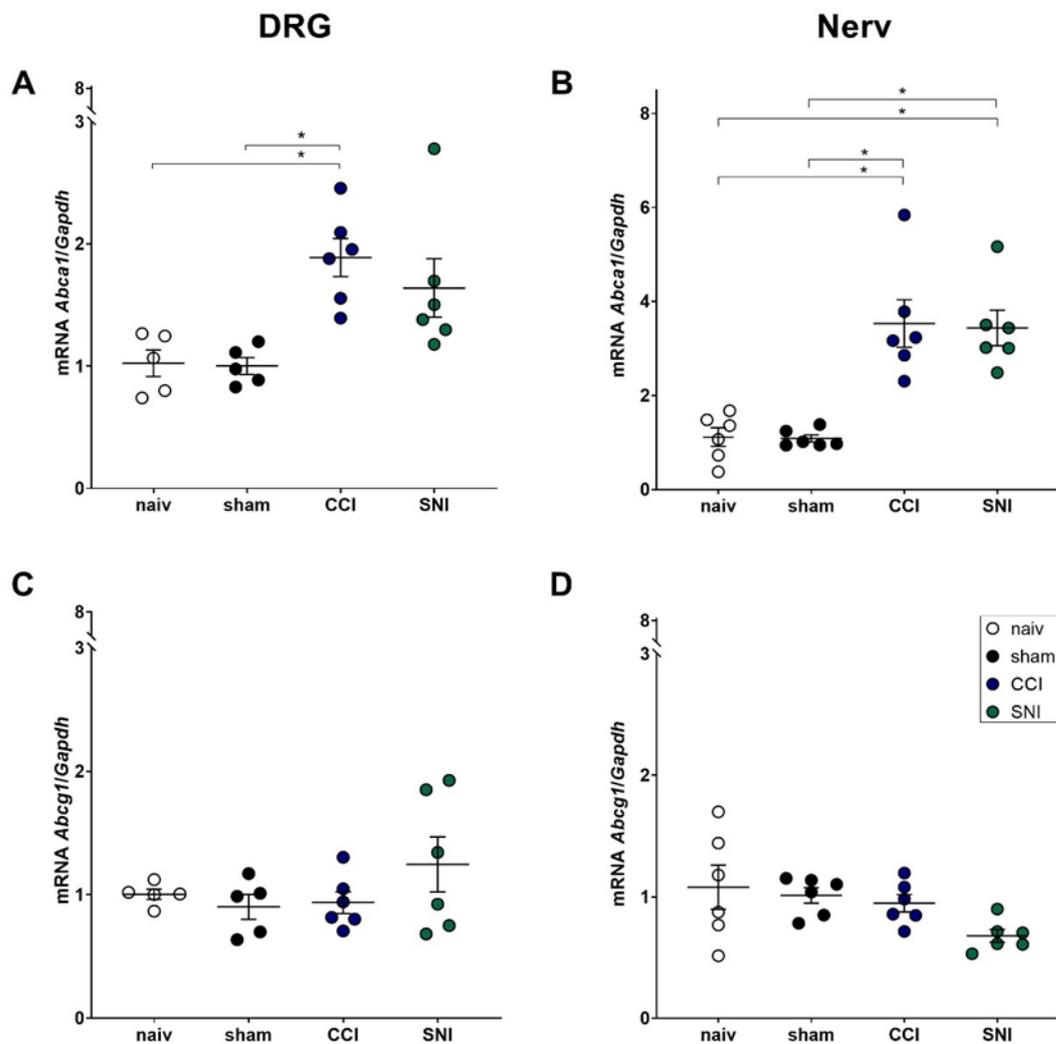


Abbildung 7: Erhöhung der mRNA des *Abca1*-Transporters 7 d nach Nervenverletzung
 7 d nach CCI- oder SNI wurden C57BL/6 Mäusen lumbale DRGs und Nervengewebe entnommen und mit naiven bzw. sham behandelten Tieren verglichen. **(A)** *Abca1* im DRG, **(B)** *Abca1* im Nerv, **(C)** *Abcg1* im DRG, **(D)** *Abcg1* im Nerv; Daten sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt, n=4-6. One-Way ANOVA (post-hoc Tukey-Test) bzw. Welch-ANOVA; p < 0,05 *CCI vs. sham/naiv, *SNI vs. sham/naiv; Quelle: Eigene Darstellung

3.3 Unveränderte ABCA1 Immunreaktivität in nozizeptiven DRG-Neuronen

Um die Proteinexpression des ABCA1-Transporters zu untersuchen, wurde dieser anschließend in Spinalganglien der operierten Mäuse immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 8). Da vor allem die Expression in nozizeptiven Neuronen von Interesse war, wurden diese mittels Färbung des TRPV1 Kanals lokalisiert und dann die Intensität beider Proteine gemessen. Interessanterweise spiegelte sich die Hochregulation von *Abca1* mRNA hier nicht in der Immunreaktivität der Proteine wider (Abbildung 9).

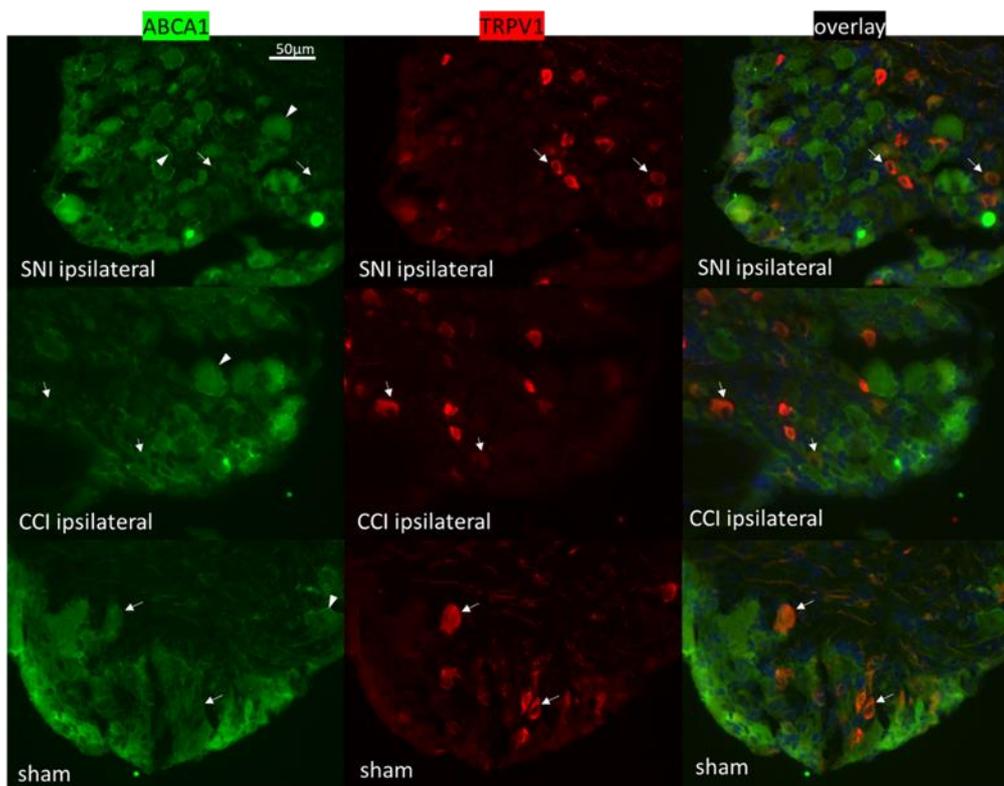


Abbildung 8: Immunhistochemie lumbale DRGs von Mäusen 7 d nach neuropathischer Verletzung

grün: ABCA1-Färbung; rot: TRPV1-Färbung; blau: DAPI-Kernfärbung; Pfeile zeigen Beispiele für TRPV1-positive Neurone; Pfeilspitzen zeigen Beispiele für hohe ABCA1 Immunreaktivität; Vergrößerung x40, Belichtungsstärke 1 s (ABCA1), 1/1.3 s (TRPV1) und 1/400 s (DAPI); Quelle: Eigene Darstellung

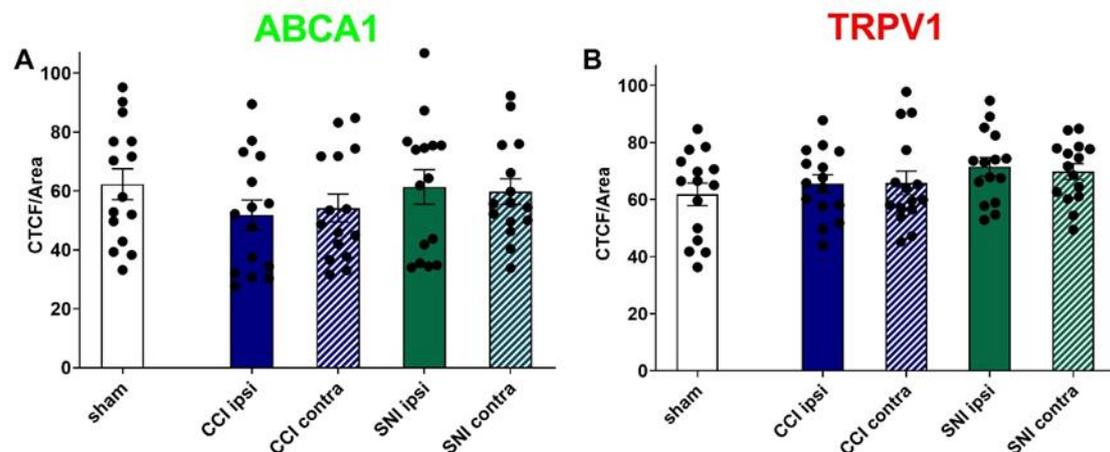


Abbildung 9: Keine Zunahme der Immunreaktivität von ABCA1 und TRPV1 durch Nervenverletzung in nozizeptiven DRG-Neuronen

Entsprechend Abb.7 wurde die Immunreaktivität in nozizeptiven DRG-Neuronen von Mäusen - markiert durch TRPV1-Färbung - quantifiziert. Als Kontrollgruppe dienten sowohl die kontralaterale Seite als auch sham-operierte Tiere. **(A)** ABCA1, **(B)** TRPV1; Daten sind als Mittelwert der korrigierten Zellfluoreszenz (CTCF) pro μm^2 +/- SEM dargestellt. Der Mittelwert (Balken) ergibt sich aus den Einzelwerten jeweils 15 ausgewerteter Bilder (Punkte). n=3, One-Way ANOVA; Quelle: Eigene Darstellung

3.4 Teilweise Normalisierung der *Abca1* Expression nach Nervenverletzung

Um zu evaluieren, ob sich *Abca1* nach neuropathischer Verletzung über die Zeit wieder normalisiert, wurde die mRNA im Nerven- und DRG-Gewebe nach einem Zeitraum von drei beziehungsweise sechs Wochen analysiert.

Im DRG gleicht sich die mRNA Expression bei beiden Schmerzmodellen im Verlauf wieder der Kontrollgruppe an. Sowohl nach drei als auch sechs Wochen ist kein signifikanter Unterschied mehr zwischen sham und CCI- bzw. SNI-Behandlung zu verzeichnen. Im murinen Nerven verhält sich dies interessanterweise anders. Die Tendenz der Überexpression von *Abca1* bleibt in beiden Modellen auch nach einigen Wochen bestehen. Während die Genexpression SNI-behandelter Mäuse jedoch konstant erhöht bleibt, scheint sie sechs Wochen nach CCI-Behandlung tendenziell wieder abzunehmen. Da *Abcg1* in der Neuropathie nach sieben Tagen nicht hochreguliert war, zeigt sich, wie zu erwarten, auch im zeitlichen Verlauf keine Änderung (Abbildung 10).

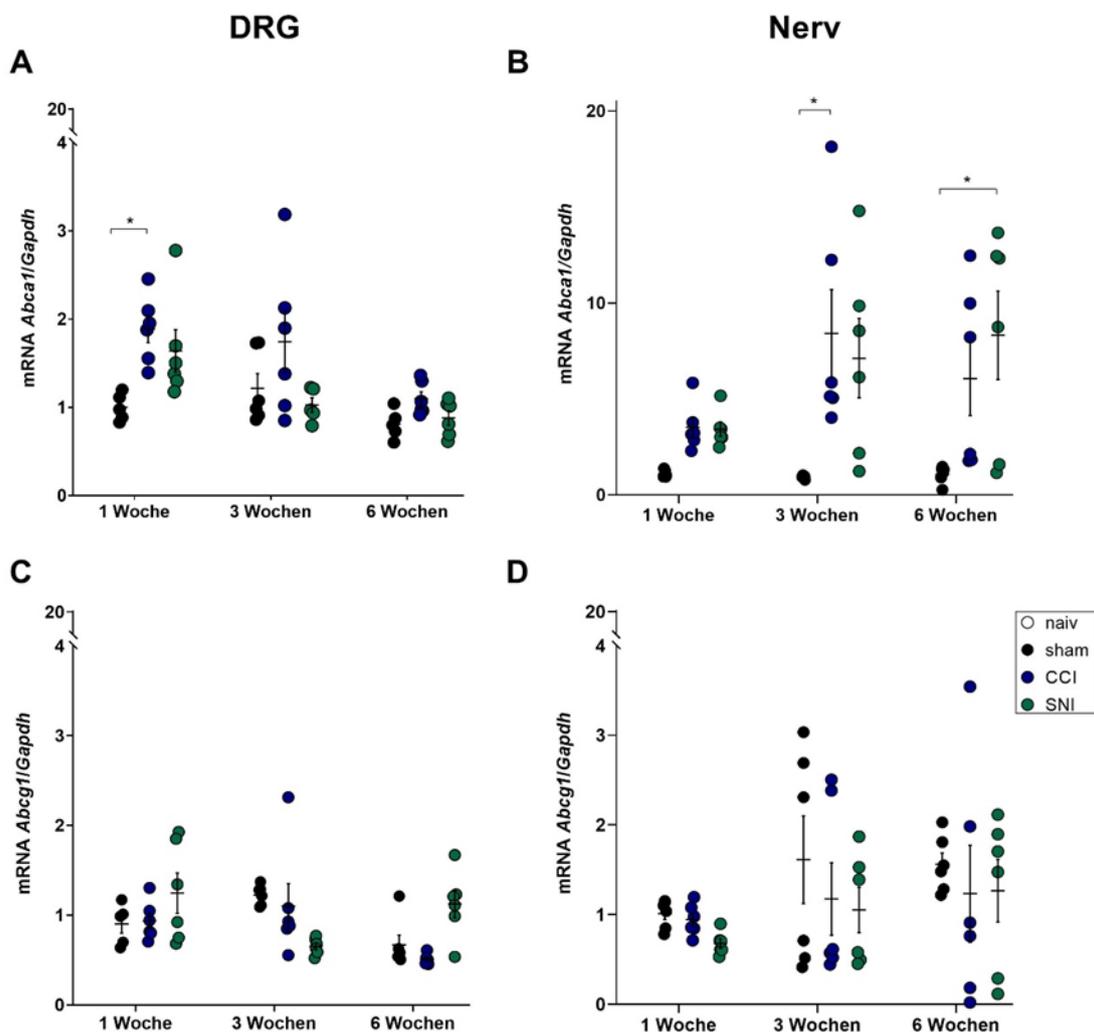


Abbildung 10: Normalisierung der *Abca1* mRNA im murinen DRG, aber persistierende Überexpression im Nerv

Entsprechend Abb.7 wurde Gewebe aus C57BL/6 Mäusen nach 3 und 6 Wochen untersucht. Als Kontrollgruppe dienten sham-operierte Tiere. **(A)** *Abca1* im DRG, **(B)** *Abca1* im Nerv, **(C)** *Abcg1* im DRG, **(D)** *Abcg1* im Nerv; Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $n=5-6$. Two-Way ANOVA (post-hoc Tukey-Test); $p < 0,05$ *CCI vs. sham, *SNI vs. sham; Quelle: Eigene Darstellung

3.5 D-4F hat keinen Einfluss auf die *Abca1* Überexpression in Ratten mit Nervenverletzung

Da sich in den vorangehenden Verhaltensdaten zeigte, dass D-4F einen antinozizeptiven Effekt hat (siehe Abbildung 3), sollte dessen Auswirkung auf die *Abca1* Regulation untersucht werden. Im Rattenmodell bestätigte sich zunächst das Ergebnis, dass Nervenverletzungen, in diesem Fall CCI, eine Hochregulation der *Abca1* mRNA zur Folge hat. Das Maß der Vervielfachung war ähnlich

ausgeprägt wie im murinen Modell. Ein Speziesunterschied zeigte sich in der Regulation von *Abcg1*, der hier zwar im DRG auch unverändert blieb, jedoch im Ratten-Nerv hochreguliert war. Die tägliche intraperitoneale Injektion von D-4F zeigte keinerlei Effekt auf die Expression von ABC-Transporter mRNA (Abbildung 11).

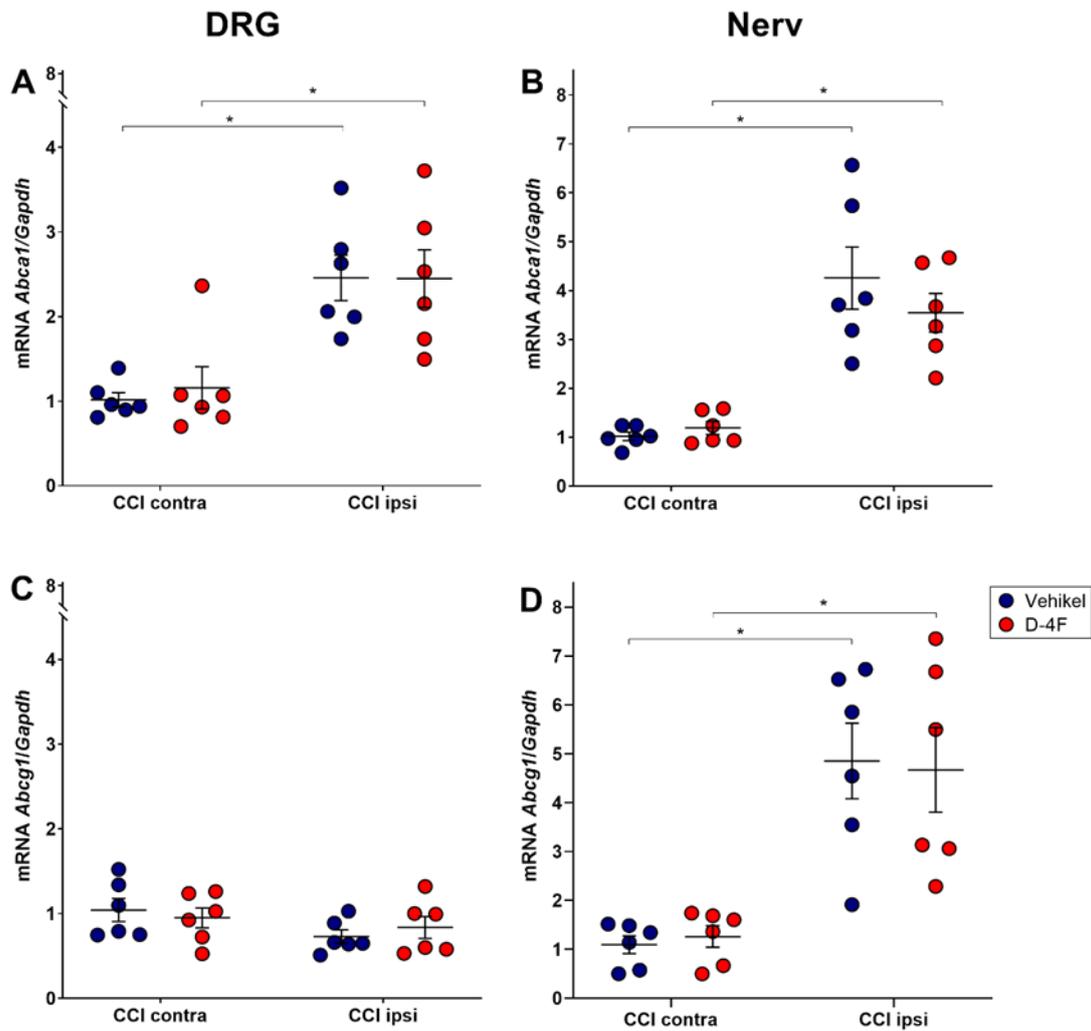


Abbildung 11: Keine Änderung der *Abca1*- und *Abcg1*-mRNA nach Behandlung mit D-4F
Wistar Ratten wurden nach CCI-Operation sieben Tage lang mit täglicher D-4F- oder NaCl-Injektion (12,5 mg/kg i.p.) behandelt. Verglichen wurden anschließend ipsi- und contralaterale Seite des N. ischiadicus bzw. DRGs innerhalb einer Gruppe sowie die ipsilateralen Seiten der Interventions- und Kontrollgruppe. **(A)** *Abca1* im DRG, **(B)** *Abca1* im Nerv, **(C)** *Abcg1* im DRG, **(D)** *Abcg1* im Nerv; Daten sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt, n=5-6. Two-Way ANOVA (post-hoc Tukey-Test); p < 0,05 *CCI ipsilateral vs. contralateral; Quelle: Eigene Darstellung

3.6 Diabetische Neuropathie in Ratten lässt mRNA der ABC-Transporter unbeeinflusst

Wie unter 1.1 beschrieben, handelt es sich bei DPN um eine Systemerkrankung. Eine ausgeprägte lokale Inflammation – wie nach Nerventrauma – gehört nicht zu ihrer Pathophysiologie [11]. Um die Auswirkungen dieses Neuropathie-Modells auf die ABC-Transporter zu untersuchen, wurden im Folgenden Nerven und DRGs von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus analysiert. Es konnte kein relevanter Einfluss dieser Neuropathie auf die mRNA Expression verzeichnet werden, außer einer einzelnen signifikanten Erhöhung von *Abcg1* im DRG nach 8 Wochen (Abbildung 12).

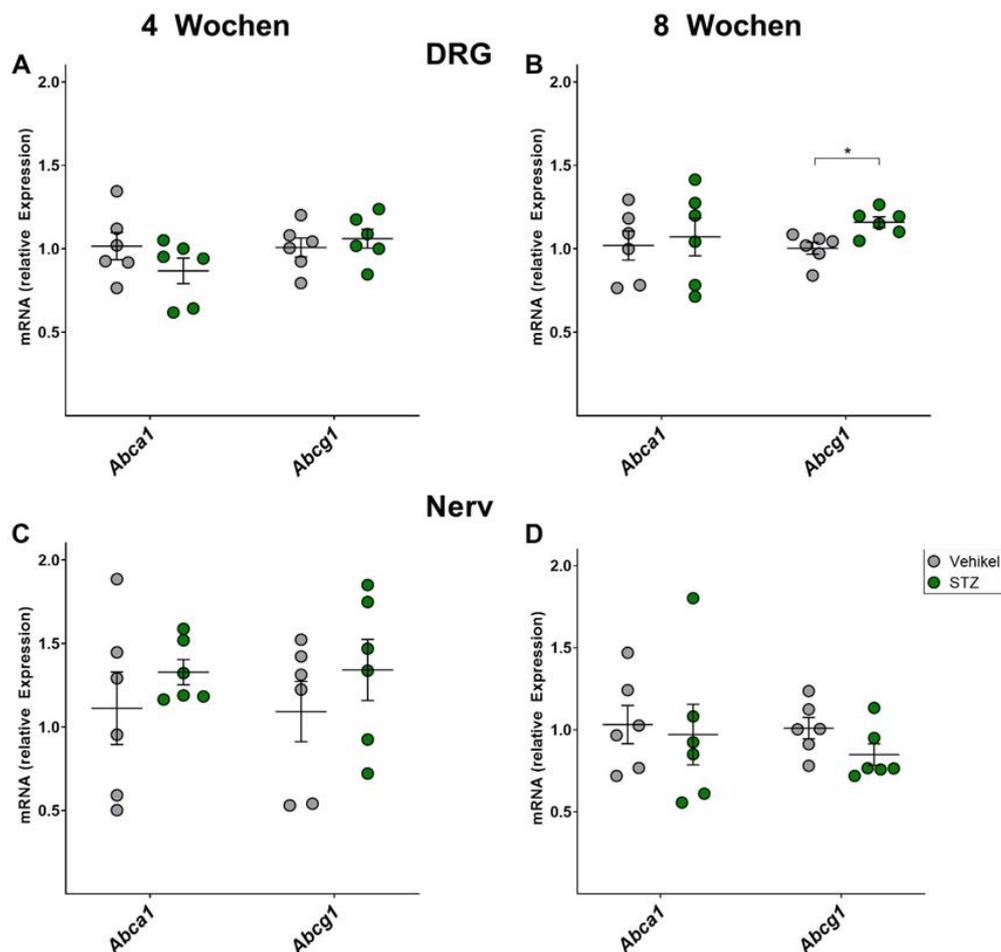


Abbildung 12: Keine Änderung der ABC-mRNA nach STZ-Injektion, bis auf *Abcg1* im DRG nach acht Wochen

Wistar-Ratten wurde STZ oder ein Vehikel (NaCl) i.v. injiziert. Die mRNA Expression wurde 4 und 8 Wochen nach Behandlung in DRG (A, B) und Nerv (C, D) untersucht. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, n=6. T-tests wurden für die paarweisen Vergleiche verwendet; p < 0,05 *Vehikel vs. STZ; Quelle: Eigene Darstellung

3.7 Kein Einfluss von D-4F auf Zytokin-Expression nach traumatischer Nervenverletzung

Bereits in Studien zu chronischer Arthritis und Asthma erwies sich D-4F über Hemmung von oxidativem Stress und Immunzellen-Rekrutierung als entzündungshemmend [32, 33].

Da die *Abca1* und *Abcg1* Expression durch D-4F Behandlung unverändert blieb, wurde überprüft, ob seine antinozizeptive Wirkung möglicherweise auf die Reduktion proinflammatorischer Zytokine in neuronalem Gewebe zurückzuführen ist. *Il6* und *Tnfa* wurden als proinflammatorische bzw. *Il10* als ein entzündungshemmendes Zytokin gewählt [94]. Im Nerv fiel eine Überexpression aller drei Zytokine nach CCI-Operation auf. Im DRG war dies nur für das proinflammatorische *Il6* der Fall. Die Behandlung mit D-4F hatte keinerlei Auswirkung auf die Expression dieser Gene (Abbildung 13).

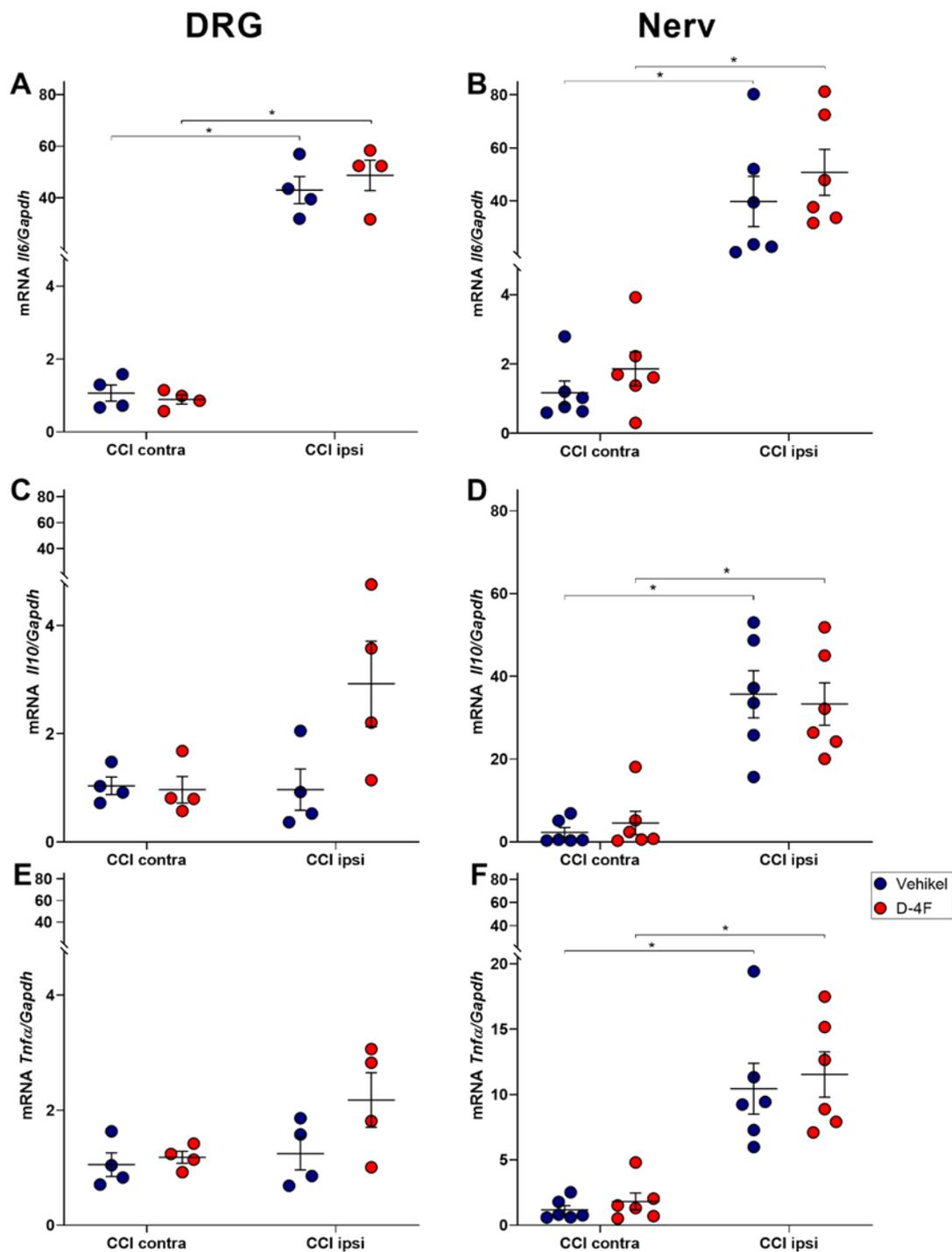


Abbildung 13: Keine Änderung der Zytokin-mRNA in DRG und Nerv nach Behandlung mit D-4F

Entsprechend Abb.11 wurde Nerven- und DRG-Gewebe nach D-4F- oder NaCl-Injektion auf die Expression von *Il6*, *Il10* und *Tnfa* untersucht. **(A)** *Il6* im DRG, **(B)** *Il6* im Nerv, **(C)** *Il10* im DRG, **(D)** *Il10* im Nerv, **(E)** *Tnfa* im DRG, **(F)** *Tnfa* im Nerv; Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, n(DRG)=4, n(Nerv)=6. Two-Way ANOVA (post-hoc Tukey-Test); $p < 0,05$ *CCI ipsilateral vs. contralateral; Quelle: Eigene Darstellung

3.8 Unveränderte Zytokin-Expression bei diabetischer Neuropathie

Neurale Makrophageninfiltration scheint bei DPN kaum vorhanden zu sein [11, 12]. Um die Auswirkung dessen auf entzündliche Mediatoren bei DPN zu analysieren und mit traumatischer Nervenverletzung vergleichen zu können, wurde die pro- und antiinflammatorische Zytokin-Expression in DRG und Nerv untersucht.

Zu keinem Zeitpunkt nach STZ-Injektion gab es messbare Änderungen der Expression von *Il6*, *Il10* oder *Tnfa*. Grundsätzlich zeigte sich anhand hoher Schwellenwerte in den Amplifikationszyklen der qPCR eine niedrige Gesamtexpression ungeachtet der Gewebeart, der Behandlung oder des Zeitpunkts (Abbildung 14).

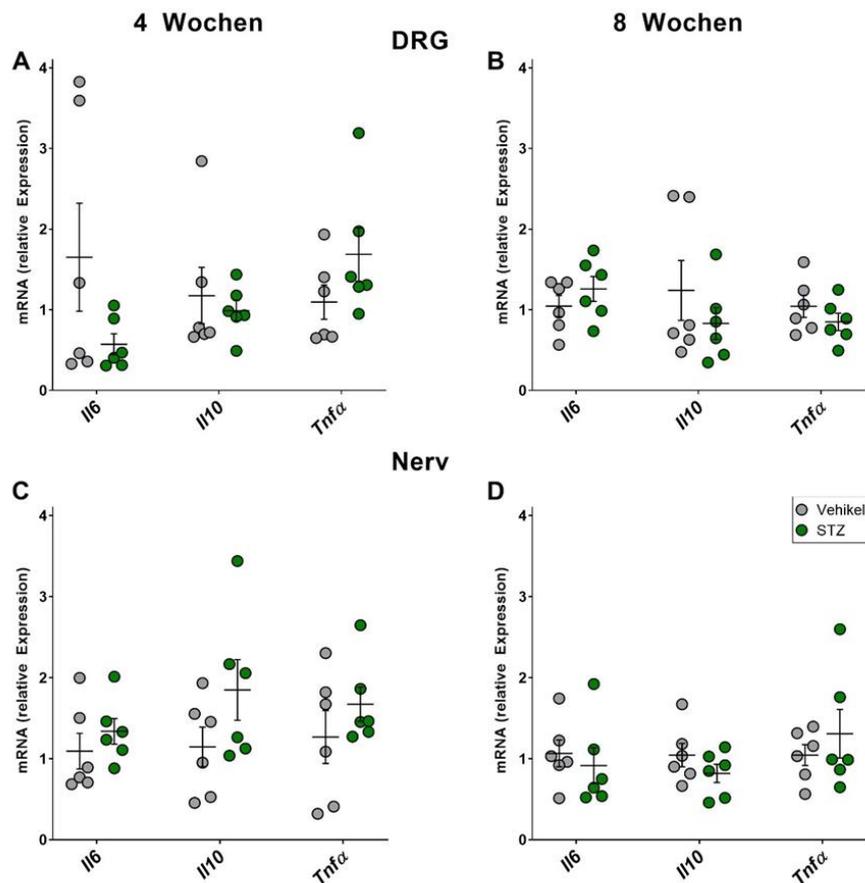


Abbildung 14: Keine Änderung der Zytokin-mRNA in DRG und Nerv 4 und 8 Wochen nach STZ-Injektion

Ratten wurden entsprechend Abb.12 behandelt und die mRNA Expression beschriebener Zytokine im DRG (A, B) und Nerv (C, D) untersucht. Daten sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt, n=6. T-tests bzw. Mann-Whitney wurden für die paarweisen Vergleiche verwendet. Quelle: Eigene Darstellung, publiziert in Ben-Kraiem, A., 2020 [12]; Lizenz: CC BY 4.0

3.9 Keine Veränderung der Serumlipide durch Nervenverletzung oder D-4F Applikation

D-4F verbessert durch Induktion des reversen Cholesterintransports die Entfernung von Cholesterin aus der Peripherie und zeigt dadurch in der Atherosklerose eine Plaque-reduzierende Wirkung [29]. Als Konsequenz dieser Überlegungen sollte untersucht werden, ob die systemische D-4F Applikation bei Neuropathie zu veränderten Serumlipiden führt. Außerdem wurde die Auswirkung von Nervenverletzungen selbst untersucht

Weder durch die CCI- beziehungsweise SNI-Operation noch durch intraperitoneale D-4F Injektionen änderten sich die Serumkonzentrationen von Gesamt- oder HDL-Cholesterin (Abbildung 15).

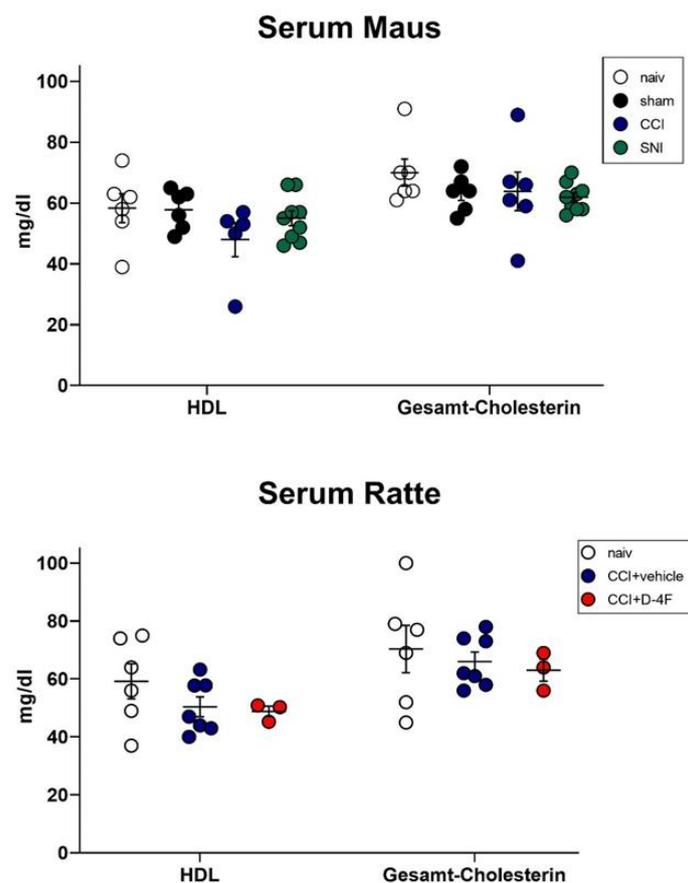


Abbildung 15: Unveränderte Serumlipide bei Neuropathie und nach D-4F Injektion
Mittels enzymatischem Farbstest wurden Serumlipide von (A) CCI und SNI behandelten Mäusen nach 7 d mit sham bzw. naiven Tieren verglichen. n(naiv)=5, n(sham)=6, n(CCI)=5, n(SNI)=9. One-Way ANOVA (B) Ebenso wurde das Serum von Ratten mit CCI 7 d nach tägl. D-4F- Injektion (12,5 mg/kg) mit dem von naiven oder mit NaCl-injizierten Tieren verglichen. n(naiv)=6, n(CCI)=7, n(CCI+D-4F)=3; Daten sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt. One-Way ANOVA; Quelle: Eigene Darstellung

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus dem Screening von Transkriptomdaten und den Versuchen dieser Arbeit ergibt sich die Annahme, dass sowohl *Abca1* als auch *Abcg1* in DRG und Nervengewebe spezieübergreifend exprimiert werden. Spezifischere Daten des Transkriptom-Screenings zeigen eine Expression in diversen Zellpopulationen dieser Gewebe, wie Nozizeptoren und Schwanzzellen. Bezüglich der *Abca1* mRNA in traumatischen Neuropathie-Modellen zeigte sich in der Mehrzahl der Quellen sowohl im Gesamtgewebe von DRG und Nerv als auch speziell in Nozizeptoren nach sieben Tagen bis zu drei Wochen eine Hochregulation, während die *Abcg1* mRNA – deutlich seltener untersucht – eher unverändert blieb. Krankheitsinduzierte Neuropathien hatten in den untersuchten neuronalen Strukturen keinen Einfluss auf die Genregulation der Transporter. In den wenigen für diese Arbeit vergleichbaren Quellen zur Proteinexpression, zeigte sich 28 Tage nach traumatischer Neuropathie sowie 24 Stunden nach lokaler Inflammation eine unveränderte Menge an ABCA1 und ABCG1 im DRG Gewebe.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit zeigte sich *Abca1* mRNA sieben Tage nach traumatischer Nervenläsion lokal im Nerven und im DRG hochreguliert. Im Unterschied dazu blieb die Proteinexpression dabei jedoch zumindest in peptidergen Neuronen unverändert, so dass andere somatosensorische Neurone oder nicht-peptiderge Nozizeptoren, Gliazellen oder Immunzellen die Quelle sein könnten.

Ungeachtet der eigentlichen Regenerationsfähigkeit der Neuropathie-Form normalisierte sich die *Abca1* mRNA im DRG innerhalb von sechs Wochen vollständig. Im Nerv zeigte sich dagegen im irreversiblen Modell des SNI eine erhöhte mRNA Regulation über Wochen, während nach reversiblen Nerventrauma über sechs Wochen eine Tendenz zur Normalisierung erkennbar war. Vier und acht Wochen nach Induktion einer diabetischen Neuropathie – welche sich vor allem durch mildere Nervenentzündung von traumatischen Modellen unterscheidet – blieb die *Abca1* mRNA unbeeinflusst. Die Transkriptionsregulation von *Abca1* war spezieübergreifend konserviert

während *Abcg1* – unbeeinflusst in Mäusen – im verletzten Rattennerv nach einer Woche wie *Abca1* überexprimiert war (s. Hypothese 1).

Die 7-tägige Behandlung mit D-4F hatte nach traumatischer Nervenverletzung weder Einfluss auf die Regulation von *Abca1* oder *Abcg1* noch auf die Entzündung gemessen anhand von Zytokin-Regulation. Der Wirkmechanismus muss also ein anderer sein und könnte in der Scavenger- bzw. Clearing-Funktion für oxidierte Phospholipide liegen. (s. Hypothese 2 und 3). Weder die systemische Applikation des Peptids noch das Nerven trauma selbst hatten nach sieben Tagen Einfluss auf Lipidkonzentrationen im Serum der untersuchten Tiere (s. Hypothese 4).

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Eigenschaften des DRG und Materialgewinnung

In einem DRG befinden sich bis zu 15 000 Neurone, darunter sogenannte große A-Neurone, für Tast- und Berührungsempfinden und die vor allem für die Neuropathie interessanten C-Neurone, die Nozizeptoren. Diese sind verantwortlich für Rezeption peripherer Schmerzreize und deren Leitung zum Kortex. Durch ihre Plastizität verändern DRG-Neurone unter neuropathischen Bedingungen ihre Genregulation, Sekretionsproteine und Membranzusammensetzung, was sie als potenzielle Targets neuer Therapieansätze – wie D-4F – qualifiziert und deshalb hier als Untersuchungsobjekt gewählt wurden [95, 96]. Ein weiterer Vorteil dieses Gewebes besteht in der segmentalen Innervation, durch die eine relativ genaue Zuordnung des verletzten N. ischiadicus zu den DRGs L3-L5 möglich ist.

Die Ganglien können gut lokalisierbar aus den entsprechenden Foramina vertebralia der Wirbelsäule präpariert werden, eine Beschädigung des Gewebes mit Auswirkung auf folgende molekulare Analysen kann jedoch trotz beschriebener Robustheit des Gewebes bei einer Größe von nur 1-3 mm nicht ausgeschlossen werden [96]. Eine weitere Limitation dieses Versuchsaufbaus ist, dass aus den Ergebnissen der qPCR nicht direkt auf Vorgänge in Nozizeptoren rückgeschlossen werden kann. Da die RNA-Isolation stets aus dem

ganzen Nerv bzw. DRG erfolgte, wurde zwangsläufig ein Zellgemisch aus Neuronen, Fibroblasten, Schwann- und Mantelzellen analysiert. Nach Verletzung des Nerven, wie bei CCI und SNI, entsteht zusätzlich lokal ein entzündliches Infiltrat, welches Granulozyten und Makrophagen enthält [97]. Da das Spinalganglion eine durchlässige Blut-Nervenschranke in den zellreichen Arealen hat, kommt es auch hier zur Einwanderung dieser Immunzellen [98].

Zum besseren Verständnis der ABC-Transporter Regulation in Nozizeptoren wäre eine Genquantifizierung z.B. mittels Magnetic Cell Separation, Single-Cell-PCR oder Single-Cell-RNA-Sequenzierung des gesamten Transkriptoms sinnvoll.

4.2.2 mRNA-Quantifizierung

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine sehr zuverlässige Methode, um die relative Expression von mRNA zu untersuchen. Der entscheidende Unterschied zur herkömmlichen PCR, welche eine rein qualitative Aussage bezüglich des Vorhandensein eines Gens erbringen kann (siehe 2.4), ist der Nachweis selbst kleiner Unterschiede in der Genregulation durch zeitgleiche Amplifikation und Detektion [54]. Jedoch ist die Voraussetzung für eine präzise Analyse ein ebenso sorgfältiges Vorgehen in den vorbereitenden Schritten der RNA-Extraktion und cDNA Synthese vor allem hinsichtlich der RNA Instabilität (Arbeiten auf Eis, RNase freie Bedingungen durch spezielle Filter-Pipetten, RNase Inhibitor, RNase freies Wasser und Kits) [99].

Die Auswahl der verwendeten Primer beruhte auf ausgiebiger Literaturrecherche, um sich schon bestehende Daten zu ihrer Effektivität zu Rate ziehen zu können. Um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermeiden, wurden die Sequenzen auf GC-Gehalt, Schmelztemperatur, Basenlänge und -zusammensetzung geprüft [100]. Außerdem wurde mittels dem Tool Primer-BLAST sichergestellt, dass die verwendeten Primer Intron-überspannend waren, sodass die Amplifikation nicht-codierender DNA-Abschnitte vermieden wurde [101]. Diese Sorgfalt beim Primer-Design ist vor allem für den hier verwendeten Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green wichtig, da dieser zwar sehr sensitive Ergebnisse liefert jedoch auch unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet und so auch Nicht-Zielgensequenzen

nachweisen kann. Eine Alternativmethode wäre die mRNA-Quantifizierung mittels Sonden gewesen, die spezifischer an die Zielgenesequenz binden [102].

So verlässlich die qPCR-Methode an sich auch sein mag, können Qualität der RNA-Extraktion und Effizienz der cDNA nie genau ermittelt werden. Der Effekt dieser Variationen wurde durch zeitgleiche Expressionsanalyse einer endogenen Kontrolle normalisiert. So konnte in der anschließenden Datenanalyse mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode zuerst die Amplifikation einer Probe kalibriert ($\Delta C_t = C_t$ (Zielgen) - C_t (endogene Kontrolle)) werden, um dann die Interventions- und Kontrollgruppe relativ miteinander vergleichen zu können (siehe 2.4) [55]. Für diese Arbeit wurde das Referenzgen *Gapdh* als endogene Kontrolle gewählt, da es aufgrund seiner relativ stabilen Expression unter variierenden Versuchsbedingungen und Krankheitszuständen als Kontrollgen in der Literatur etabliert ist [103]. Alternative konstitutiv exprimierte Gene wären Cyclophilin oder β -Actin. Bemerkenswert ist, dass für all diese Referenzgene trotz ihrer vermeintlichen Stabilität veränderte Regulationen unter zum Beispiel hypoxischen Bedingungen beobachtet wurden [104]. Zusätzlich zur Verwendung anderer Referenzgene, gibt es außerdem auch alternative Berechnungsmethoden zur Quantifizierung der PCR-Daten. Unterschiedliche Quantifizierungsalgorithmen, darunter zum Beispiel die Anwendung von Regressionsanalysen sind im Detail bei Cikos et al nachzulesen [105].

Bei der Zytokin-Quantifizierung in Ratten nach CCI musste aufgrund stark von der Norm abweichender *Gapdh*-Schwellenwerte in einzelnen DRG-Proben eine Degradation der Nukleinsäuren, möglicherweise durch zu lange Lagerung des Materials oder Temperaturschwankungen, angenommen werden (siehe Abbildung 13). Darum wurde entschieden die Ergebnisse dieser Proben, zum Preis eines Verlusts an statistischer Power bei $n=4$, für die Auswertung des Experiments auszuschließen.

4.2.3 Proteinbestimmung mittels Immunhistochemie

Der Nachteil des Gennachweises mittels qPCR ist, dass hier lediglich das Transkriptionsprodukt mRNA analysiert wird, von dem nicht automatisch auf die tatsächlich exprimierte Proteinmenge zurückgeschlossen werden kann. Gründe

dafür liegen einerseits in der auch heutzutage noch unvollkommen technologischen Quantifizierungsmethoden. Außerdem stehen zwischen mRNA und Proteinexpression weitere Schritte der posttranskriptionellen Modifikation, wie Splicing, Polyadenylierung und Capping, welche Auswirkung auf die Proteintranslation haben [106]. Zur Proteinquantifizierung standen die Methoden des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), des Westernblots, und der Immunhistochemie zur Verfügung. Neben einer hohen Sensitivität hat die hier verwendete Immunhistochemie gegenüber den anderen beiden Verfahren den Vorteil, dass die Lokalisation des Proteins mitbestimmt werden konnte.

Die Reliabilität dieser Nachweismethode beruht auf der Spezifität des gewählten Antikörpers. Da in der Literatur kein Protokoll für die Färbung von ABCA1 im murinen DRG existierte, wurde der Antikörper nach Vorliegen möglichst vieler Erfahrungswerten mit anderen Gewebearten ausgewählt. Die Entscheidung fiel auf den ABCA1-Antikörper von Novus Biologicals (NB400-105), der bereits erfolgreich in über 300 Publikationen verwendet wurde. und dessen Spezifität vom Hersteller über Negativ-Proben nachgewiesen wurde. Außerdem wurden unspezifische Signale durch Inkubation mit einem Blockreagenz weiter minimiert. Die Spezifität der sekundären Antikörper wurde mittels negativer Kontrollen, d.h. Inkubation ohne primäre Antikörper, verifiziert.

Eine weitere Schwierigkeit der immunhistochemischen Färbung stellt die optimale Balance zwischen Signalstärke und Hintergrundfärbung dar. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

1. Zur Gewebekonservierung wurde das Gefrieren in einem OCT-Medium (optimal cutting temperature) gewählt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Einbetten in Paraffin ist die geringere Protein-Degradation, somit kann ein stärkeres Fluoreszenzsignal erreicht werden.
2. Der hier verwendete Antikörper zeigte eine starke Hintergrundfärbung, welche jedoch durch die in einigen Testläufen titrierte Verdünnung von 1:400, reduziert werden konnte. Zusätzlich erfolgte in der Bildauswertung eine Subtraktion des Hintergrundsignals zur Berechnung der Zellfluoreszenz [58].

3. Anhand primär durchgeführter Einfachfärbungen mit dem ABCA1-Antikörper, stellte sich heraus, dass der Transporter ubiquitär im DRG-Gewebe exprimiert war. Da das Interesse auf der Expression des ABC-Transporters in Nozizeptoren lag, die in die Entstehung neuropathischen Schmerzes involviert sind, wurde die Co-Färbung mit TRPV1 gewählt. TRPV1 wird in eben solchen peptidergen mechano- und hitzesensiblen Nozizeptoren sowie in nicht-peptidergen Nozizeptoren, die auf mechanische Schmerzreize reagieren, exprimiert [56, 57]. Diese Co-Färbung wurde außerdem anderen möglichen Nozizeptor-Markern, wie CGRP, aufgrund der hier diskutierten Interaktion zwischen OxPL, TRPV1 und ABCA1 bei der Entstehung und Rückbildung neuropathischen Schmerzes, vorgezogen. Um gegenseitiges Überstrahlen und damit Verluste der Signalstärke zu minimieren, wurden die sekundären Antikörper mit Fluorophoren unterschiedlich emittierender Wellenlänge gewählt (AlexaFluor 488: 519 nm; Cy3: 570 nm).

Eine Limitation des Protokolls zur Intensitäts-Messung der Fluoreszenz besteht in der Definition TRPV1-positiver Zellen. In diesem Experiment wurden jene Zellen als „positiv“ festgelegt, die nach Ermessen der auswertenden Person deutlich intensiver gefärbt waren als Nachbarzellen und Hintergrund. In Ermangelung etablierter Schwellenwerte ist die Markierung folglich stark untersucherabhängig. Das sich der Entwicklung befindende Konzept des Deep Learnings, welches auf automatisierten Computeralgorithmen basiert, könnte hier in der Zukunft eine objektivere Bildanalyse ermöglichen [107].

4.2.4 Enzymatische Farbttests zur Serumanalyse

Es existieren verschiedene Methoden zur Cholesterinmessung im Serum, wie die Gaschromatographie oder Massenspektrometrie. Weniger Geräteaufwand bei gut korrelierenden Ergebnissen und noch dazu gut etabliert in der klinischen Routine zur Bestimmung von Gesamt-Cholesterin und HDL-Cholesterin ist der vollenzymatische Farbttest, erstmals publiziert 1974 von Roeschlau und Allain [59, 108]. Die Richtigkeit der Messergebnisse wurde durch Standardisierung gegen erwähnte Alternativmethoden (Abell/Kendall, Massenspektrometrie) vom

Geräte- und Kit-Hersteller (Roche) geprüft. Dabei betrug die Abweichung im Einklang mit offiziellen Vorgaben des National Institute of Health höchstens 3 % [109].

Allerdings ist zu beachten, dass die Qualitätsstandards der Methode für die Analyse humaner Blutproben beschrieben wurden. Die Präzision für die hier durchgeführte Messung von Nagetier-Serum ist unbekannt und könnte möglicherweise niedriger sein. Eine Limitation bei Bewertung der Ergebnisse ist das Fehlen verlässlicher Referenzwerte für Mäuse und Ratten. In der Literatur und Herstellerinformationen findet man sehr uneinheitliche Standardwerte, sodass in diesem Versuchsaufbau verletzte mit gesunden und D-4F behandelten Tieren in Relation gesetzt wurden (siehe 3.9). Ein Vorteil der Methode, neben dem grundsätzlich großen Erfahrungswert, ist die relative Störungssicherheit der Probenanalyse gegenüber Hämolyse und Lipämie-bedingter Trübung [110]. Die vom Hersteller garantierte Robustheit des Tests gegenüber klinisch alltäglichen Medikamenten ist hier jedoch nur eingeschränkt gegeben, da keine Daten bezüglich D-4F in diesem Zusammenhang existieren [111].

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Die Regulation der Transporter *Abca1* und *Abcg1* ist abhängig von der Neuropathie-Genese und Lokalisation des untersuchten Gewebes

In dieser Arbeit wurde sowohl im DRG- als auch Nervengewebe die mRNA-Expression von *Abca1* und *Abcg1* gezeigt. Durch traumatische Nervenläsion scheint dabei *Abca1* heraufreguliert zu sein.

Die Gewebeproben von Nerv beziehungsweise DRG bestehen aus verschiedenen Zellpopulationen. Da hier PCR-Analysen auf Basis des kompletten Gewebes durchgeführt wurden, kann der zelluläre Ursprung der Beobachtungen in dieser Arbeit nicht determiniert werden. Hinweise darauf, dass die gemessene Erhöhung der *Abca1* mRNA nicht von den Nozizeptoren selbst stammt, liefert das Transkriptom-Screening. Während in einigen Studien die undifferenzierte Transkriptom-Analyse von DRG-Gewebe wie hier eine erhöhte

Abca1 mRNA zeigte, wurde in selektiven Nozizeptor-Transkriptomen keine Veränderung durch traumatische oder toxische Nervenläsion detektiert [83, 90]. Die erhöhte Expression des Transportergens könnte also durch andere Neuronen-Populationen oder Satelittenglia zustande kommen. Außerdem wird *Abca1* bekanntermaßen auch Immunzellen exprimiert. Es ist also vorstellbar, dass nicht primär neuronale Zellen, sondern Makrophagen die Dynamik der Genregulation bestimmten. Aufgrund ihrer zentralen Rolle im reversen Cholesterintransport weisen sie ein sehr hohes Expressionsniveau von *Abca1* auf [112]. Findet nun aufgrund der Trauma-induzierten Entzündung eine Immunzellrekrutierung statt, könnte sich deren Genexpression auch in der Gewebeanalyse reflektieren. Da im Nerv als Ursprungsort der lokalen Inflammation nach Trauma mehr Makrophagen-Migration stattfindet als „upstream“ im DRG, wäre somit auch die deutlich ausgeprägtere Vervielfachung der *Abca1* mRNA dort nur konsequent. Auch die schnellere Normalisierung des Transporters im reversiblen Neuropathie-Modell wäre durch Abwanderung der Makrophagen aus dem regenerierten Nerv vorstellbar [9, 17].

Bei Diabetes-induzierter Neuropathie zeigte sich in der durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Immunhistochemie sogar eine Reduktion Gewebe-assoziiertes Makrophagen im erkrankten Nerv [12]. Entsprechend unveränderte Expressionsmuster von *Il6*, *Il10* und *Tnfa* in diesen Gewebeproben, bestätigen die Vorkenntnisse, dass die distale DPN – im Gegensatz zur traumatischen Neuropathie– nicht zu lokaler Inflammation führt [11, 113]. Dies ist nach obiger Theorie im Einklang mit der unveränderten ABC-Transporter mRNA in DRG und Nerv der diabetischen Ratten und entspricht den Ergebnissen des Transkriptom-Screenings [88]. In weiteren Studien wurde außerdem gezeigt, dass nur eine gezielte Induktion des regulierenden Liver-X-Rezeptors, nicht aber Diabetes allein zu erhöhter Expression von *Abca1/Abcg1* im Nerv führte [114]. Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze dafür, dass unter allen hier durchgeführten Untersuchungen zur traumatischen Neuropathie, *Abcg1* mRNA ausschließlich im Rattennerv nach CCI vermehrt exprimiert war, obwohl dieser Transporter durch ähnliche Regulationsmechanismen wie *Abca1* gesteuert wird [36]. Es könnten Speziesunterschiede vorliegen oder die Überlegung, dass ABCG1 vor allem für

die Lipidhomöostase unter physiologischen Bedingungen additiv zu ABCA1 wirkt, jedoch seine Genregulation nicht oder nur in sehr geringem Maße von pathologischen Zuständen beeinflusst wird. So wäre zu erklären, dass minimale Änderungen der Genexpression die Folge sind, welche außer im Falle des Rattennervs, bei dem aus rein anatomischen Gründen mehr entzündliches Material anfiel als bei der Maus, außerhalb des messbaren Bereichs der durchgeführten PCR lagen. Der einmalig minimal erhöhte *Abcg1*-Wert im DRG bei DPN hat an dieser Stelle keine biologische Relevanz.

Durch entsprechende Protein-Quantifizierung mittels Immunfluoreszenz im DRG wurde konträr zum Transkript keine Veränderung von ABCA1 durch die neuropathische Verletzung gefunden. Neben oben beschriebenem Einfluss der posttranskriptionellen Modifikationen, können diese Ergebnisse in der Diskrepanz zwischen PCR-analysiertem Gesamtgewebe versus Protein-Quantifizierung nur in TRPV1-positiver Zellpopulation liegen. Da diese nozizeptiven DRG-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielen, ist der ausbleibende ABCA1 Anstieg an dieser Stelle eine wichtige Erkenntnis. Anhand der Ergebnisse darf jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere neuronale Subgruppen erhöhte Proteinexpressionen vorweisen würden. Ebenso sollte die Vermutung, dass womöglich die Akkumulation von Makrophagen im analysierten Gesamtgewebe für die beobachtete *Abca1* Regulation verantwortlich sind, durch Co-Färbungen mit Makrophagen-spezifischen Antikörpern, z.B. CD68, überprüft werden.

Letztlich konnte in dieser Arbeit eine speziesübergreifend konstante Hochregulation von *Abca1* bei traumatischer Neuropathie gezeigt werden. Die Ergebnisse zum CCI-Modell konnten in Ermangelung publizierter Transkriptom-Daten nicht verglichen werden. Die Tendenz der Induktion von *Abca1* sieben Tage nach SNI entspricht der Mehrheit der Transkriptom-Analysen in Tabelle 9. Daten zu *Abcg1* waren hierzu nur in einer Studie zu finden [73]. Dort war *Abcg1* nach einer Woche vermindert exprimiert, was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Die Daten zur *Abca1/Abcg1* Regulation sind insgesamt eher uneinheitlich, zudem scheint es Unterschiede zwischen Nagern und Menschen zu geben. Aus den Ergebnissen des Datenbank-Screenings sowie der hier

durchgeführten Experimente, lässt sich jedoch die Tendenz erkennen, dass vor allem lokale Nerventraumata eher mit einer Induktion von *Abca1* verbunden zu sein, während systemisch verursachte Neuropathien, wie DPN oder CIPN weniger Einfluss auf diese Genexpression haben. Die Assoziation von überexprimiertem *Abca1* mit inflammatorischen Zuständen wird dabei durch weitere Hinweise aus Studien zu anderen Zellarten, z.B. Makrophagen und Chondrozyten, gestützt, die den Transporter unter lokal inflammatorischen Bedingungen, wie Arthritis und Gefäßplaque-Bildung, ebenfalls vermehrt exprimieren [42, 43].

Trotz der Limitation durch teilweise widersprüchliche Transkriptom-Daten, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau den vorsichtigen Schluss zu, dass *Abca1* mRNA in lokal inflammatorisch bzw. traumatisch versehrtem neuronalen Gewebe überexprimiert wird und sich zumindest in reversiblen Neuropathie-Modellen im Zeitverlauf wieder normalisiert.

Um dem Regulationsmechanismus bei Neuropathie weiter nachzugehen, sind nun differenziertere Gewebeanalysen notwendig. Wie die Transkriptom-Daten in Tabelle 9 zeigen, wurde auch in anderen Studien in den meisten Fällen das Gesamtgewebe des DRG analysiert. Es fehlt eine vollständige Analyse aller einzelnen Zelltypen innerhalb eines Schmerzmodells, um durch tatsächliche Vergleichbarkeit den wahren Ursprung der Expressionsänderung zu finden. Besonders wichtig wäre hierbei residente und eingewanderte Makrophagen von Neuronen bzw. Schwannzellen zu differenzieren. Single-Cell PCRs entsprechender Kulturen und die Co-Färbung von Gewebe mittels passender Antikörper (z.B. F4/80 bzw. S-100) wären dafür sinnvolle Methoden.

4.3.2 D-4F wirkt nicht über *Abca1* Regulation antinozizeptiv

Bei Oehler et al. wirkte D-4F antinozizeptiv bei inflammatorischer Hyperalgesie, woraufhin in den Tierversuchen zu dieser Arbeit die Wirkung bei Neuropathie untersucht wurde. Auch hier zeigte sich eine deutliche Minderung der Symptome. Die daraus abgeleitete Hypothese dieser Arbeit beruhte auf der Überlegung, dass D-4F durch seine grundsätzlich ABCA1-aktivierende Wirkung und damit verbundenem Abtransport von OxPL bei Gabe in analgetischer Absicht wiederum

normalisierend auf die Neuropathie-bedingt erhöhte Genexpression des Transporters selbst wirkt. Die hier vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass der antinozizeptive Mechanismus von D-4F nicht auf Herabregulation von *Abca1* beruht. Dieses Ergebnis widerspricht der aufgestellten Hypothese und ermöglicht wichtige Denkansätze in eine andere Richtung. D-4F wurde in der Atherosklerose-Forschung vielfach als Aktivator des ABCA1-abhängigen Cholesterintransports in Makrophagen und Endothelzellen beschrieben [115, 116]. Ob es eine ähnliche Interaktion mit ABCG1 gibt, wurde bisher nicht ermittelt. Es ist also möglich, dass D-4F auch an Nozizeptoren den Lipid-Efflux steigert, ohne dabei die Genregulation von *Abca1/Abcg1* zu beeinflussen. Welche Rolle würden die ABC-Transporter, insbesondere ABCA1, dann in der nozizeptiven Wirkung von D-4F spielen?

Lipid Rafts sind zentrale Organisationselemente der Nozizeptormembranen und jede Veränderung ihrer Zusammensetzung beeinträchtigt Kanal- und Rezeptorfunktionen. Über pro- oder antinozizeptive Effekte des Cholesteringehalts herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Es gibt einerseits Hinweise darauf, dass die Reduktion der Cholesterinmenge in Rafts zu verminderter Erregbarkeit von TRPA1 und TRPV1 sowie reduzierter CGRP-Freisetzung führt [117-119]. Und auch der Tetrodotoxin-resistente Kanal Nav1.8, ein wichtiger Aktionspotentialgenerator im Rahmen chronischer Schmerzen, zeigte nach Cholesterindepletion in Nozizeptoren eine verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit [120]. Andererseits konnten neuere Arbeiten zeigen, dass die erhöhte Erregbarkeit von Nav1.9, welche zu Hyperalgesie führt, durch inflammationsbedingte Oxidation von Membrancholesterin mit folgender Cholesterindepletion und Zerstörung der Lipid Rafts zustande kommt. Anreicherung der nozizeptiven Neurone mit nicht-oxidiertem Cholesterin verbesserte dagegen die Symptomatik [46].

Miller et. al beschreibt durch oxidativen Stress veränderte Lipid Rafts in Gliazellen als Inflammarafts, welche bei Neuropathie durch Trauma oder Chemotherapie zu unphysiologischer Signaltransduktion führen. Dies geschieht unter anderem durch Translokation des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR-4) in diese „beschädigten“ Membranbereiche mit folgender Dimerisierung. Auf diese Weise aktiviert, initiiert

der TLR-4 proinflammatorische Signalwege z.B. mittels erhöhter Produktion proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia. Die Blockade von TLR-4 wiederum kann neuropathische Beschwerden verbessern [47]. Interessanterweise wird TLR-4 ebenfalls durch die Bindung von inflammatorisch generiertem OxPL aktiviert, was letztlich zur Sensibilisierung von TRPV1 und TRPA1 in Nozizeptoren mit folgender Hyperalgesie führt [23, 121].

Denkbar wäre also, dass durch D-4F/ABCA1-abhängigen selektiven Efflux oxidierter Lipide die Integrität von Lipid Rafts und damit die physiologische Aktivität nozizeptiver Kanäle und Rezeptoren im Sinne einer Homöostase wiederhergestellt wird. D-4F hätte damit durch seine OxPL-bindende Wirkung und gleichzeitig über Aktivierung des ABCA1-Transporters eine doppelte Funktion zur Hemmung pronozizeptiver Kanalaktivität. In diesem Fall wäre die gemessene Überexpression von *Abca1* nach Nervenstrauma nicht Ursache der neuropathischen Hypersensitivität, sondern vielmehr Ausdruck eines Kompensationsmechanismus des Organismus. Die unveränderte Genexpression nach D-4F Behandlung wäre nach dieser Theorie sowohl zu erwarten als auch erwünscht.

Um diesen komplexen Zusammenhängen nachzugehen, ist es nötig die D-4F induzierte Modulation von OxPL und oxidiertem Cholesterin lokal in Nozizeptormembranen zu untersuchen. Während zum Nachweis intakten Cholesterins Färbemethoden mittels Filipin oder Streptolysin O beschrieben sind, fehlen für die Detektion oxidierter Lipide aufgrund ihrer hohen in vivo Instabilität etablierte Techniken [122-124]. Die bisher erfolgversprechendste Option wäre eine immunhistochemische Quantifizierung mittels des OxPAPC-bindenden Antikörpers E06 [20].

4.3.3 Auswirkungen von D-4F auf das inflammatorische Geschehen bei Neuropathie

Residentielle und eingewanderte Makrophagen sowie Schwannzellen sind verantwortlich für die erhöhte Zytokin-Produktion im Rahmen der traumatischen Neuropathie, wie sie auch hier anhand von mRNA Expression gemessen wurde [97]. Die Vertreter IL-6 und Tnf α führen über proinflammatorische

Kaskaden, wie unter 1.2 erläutert, zu neuronaler Hypersensitivität und können so neuropathischen Schmerz verursachen [14]. Die tägliche Behandlung mit D-4F über sieben Tage hemmte diese proinflammatorischen Mediatoren jedoch trotz antinozizeptiver Wirkung weder im Nerv noch im DRG. Auch eine Induktion des antiinflammatorischen *Il10* blieb aus. Dies überrascht angesichts der bisherigen Erkenntnisse zu D-4F und ABCA1/ABCG1. Im Rahmen rheumatischer und kardiovaskulärer Erkrankungen zeigte das ApoA-I Mimetikum über die Bildung antiinflammatorischer HDL-Moleküle und Inhibition genannter Zytokine direkte entzündungshemmende Eigenschaften [27, 33, 125]. ABCA1 und ABCG1 selbst werden als antiinflammatorische Rezeptoren beschrieben [36]. Zumindest eine indirekte Wirkung über die ABCA1-induzierte STAT3-Aktivierung mit folglich reduzierter Expression von *Il6* und *Tnfa* mRNA wäre demnach durch D-4F Behandlung zu erwarten gewesen [45]. Auch in Konsequenz der Theorien von Miller et al. (siehe 4.3.2) sollte D-4F über eine ABCA1-abhängige Regeneration der Membranintegrität die Aktivierung von TLR-4 in Makrophagen und damit die Produktion proinflammatorischer Zytokine verhindern [47, 126]. Es scheint also angesichts all dieser Fakten widersprüchlich, dass D-4F in den Versuchen dieser Arbeit keine Wirkung auf die Zytokin-Expression zeigt. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

Wichtig zu beachten ist die Limitation dieses Versuchs hinsichtlich der niedrigen n-Zahl durch Ausschluss der potenziell fehlerhaften Proben (siehe 4.2.2). Um sich zu vergewissern, dass die mRNA der Zytokine tatsächlich unbeeinflusst bleibt, sind Untersuchungen an weiteren Tieren notwendig, anschließend wäre eine Analyse der Proteinexpression sinnvoll. Außerdem fällt anhand der Verhaltensdaten ein wichtiger Unterschied bezüglich der langfristigen Wirkung von D-4F auf. Während bei inflammatorischer Hyperalgesie ein anhaltend analgetischer Effekt durch die Behandlung am Vortag zu erkennen war, blieb diese kontinuierliche Symptomlinderung bei Neuropathie aus. Ein so kurzfristiger Wirkmechanismus (maximal sechs Stunden) weist eher auf direkte Targets der D-4F-vermittelten Antinozizeption hin, als dass die Genregulation modifiziert wird. Diese Erkenntnis rückt den OxPL-Scavenging Mechanismus von D-4F wieder in den Vordergrund [23, 34]. Um die Auswirkung der Modell-spezifischen

Wirkdauer von D-4F genauer zu überprüfen, sollte die Zytokin-Expression nach D-4F-Behandlung in Modellen inflammatorischer Hyperalgesie überprüft werden.

4.3.4 Neuropathie, Serumlipide und D-4F – Zusammenhänge

Weder die traumatische Neuropathie selbst noch deren Behandlung mit D-4F zeigten Auswirkung auf die Konzentration von Serumlipiden. Da D-4F grundsätzlich verstärkend auf den reversen Cholesterintransport wirkt, könnte man bei systemischer Verabreichung erniedrigte Cholesterin- bei erhöhten HDL-Spiegeln erwarten [29]. Jedoch ist zu beachten, dass der Cholesterinspiegel im Blut über den Tagesverlauf bereits intraindividuell nicht konstant bleibt, sondern durch Variablen wie Stress, Alter, Geschlecht und letzte Nahrungsaufnahme vor Messung beeinflusst werden, folglich ist die interindividuelle Vergleichbarkeit zusätzlich erschwert [127]. Außerdem spielt möglicherweise hier eine Rolle, dass D-4F in jungen und metabolisch gesunden Tieren keinen Effekt auf einen ohnehin ausgeglichenen Lipidhaushalt hat. In der Literatur fand sich jedoch auch in an Atherosklerose erkrankten Tieren keine Änderung der Serumkonzentrationen, sodass eine andere Erklärung nötig ist [115, 128]. In diesen Studien wird ein D-4F-induzierter Shift von pro- zu antiinflammatorischem HDL ohne Änderung der Gesamtkonzentration beschrieben. Diese Wirkung ist auch bei Neuropathie-Behandlung denkbar und sollte mittels speziell designter Assays überprüft werden [129, 130]. Des Weiteren könnte die fehlende Serum-Modifikation im hier untersuchten Modell zeitlich bedingt sein. Sechs Stunden nach Injektion ließ die antinozizeptive D-4F Wirkung bereits nach, eine ebenso kurzfristige Änderung der Serumlipide wäre also zum Zeitpunkt der Blutentnahme (> 6 h nach Injektion), z.B. durch hepatischen Abbau von HDL, ebenfalls nicht mehr messbar. Nicht zuletzt liegt der Wirkmechanismus von D-4F bei Neuropathie bezüglich des Cholesterin-Efflux hypothetisch vor allem in Lipid-Shifts innerhalb der Nozizeptormembran, welche sich nicht im Serum reflektieren würden.

Unklar ist die Auswirkung der Cholesterinkonzentration im Serum auf neuropathische Schmerzen. Entsprechend der unterschiedlichen Theorien über die Nozizeptor-modulierende Eigenschaft von Membrancholesterin (siehe 4.3.2), herrscht auch hier Uneinigkeit in der Forschungsgemeinschaft. Statine, die

bekanntlich den Cholesteringehalt im Blut senken, werden vor allem speziesabhängig als Risiko- oder protektiver Faktor im Rahmen neuropathischer Krankheitsbilder beschrieben. Während die Statin-Behandlung von neuropathischen Mäusen deren Symptome verbesserte, scheint sie für Menschen das Risiko eine Neuropathie zu entwickeln eher zu erhöhen [131, 132]. In eindrücklichen MR-Untersuchungen an Patienten zeigten Jende et al., dass hohes Serumcholesterin sogar protektiv gegen das Fortschreiten von Nervenläsionen im Rahmen einer DPN wirken [133]. Mit Ausblick auf die potenzielle Behandlung von Menschen mit Neuropathie ist die Erkenntnis, dass D-4F in diesem Modell keine cholesterinsenkende Wirkung zeigt, demnach als positiv zu werten.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass traumatische Formen der Neuropathie, nicht jedoch diabetische, eine vermehrte Expression von *Abca1* vorweisen. Die antinozizeptive Wirkung von D-4F scheint jedoch weder auf Genregulation des Cholesterintransporters noch auf antiinflammatorischen Effekten zu beruhen. Da sich die Zunahme der *Abca1* mRNA vor allem mit Inflammation assoziiert zeigte, sind anhand dieser Ergebnisse am ehesten Immunzellen als Ursprung der Genexpression zu vermuten. Es bleibt zu klären, ob der mRNA-Anstieg von *Abca1* nach Nerven trauma Auslöser oder Folge der neuropathischen Hypersensitivität ist. Ebenso ist nämlich ein kompensatorischer Mechanismus als Reaktion auf Nervenverletzung denkbar. Einen Hinweis darauf gibt die Pathophysiologie der Tangier Erkrankung – eine Mutations-bedingte loss of function von ABCA1 – bei der 50 % der Betroffenen unter neuropathischen Symptomen leiden, während sich Agonisten des Liver-X-Rezeptors, Regulator der *Abca1/Abcg1* Expression, schmerzlindernd auswirken [92, 134, 135]. So könnte neben dem von Oehler et al. postulierten OxPL-eliminierenden Effekt von D-4F möglicherweise auch ein ABCA1-abhängig verstärkter Efflux oxidierter Membranlipide antinozizeptiv wirken [23, 34]. Ein großer Vorteil in der klinischen Anwendung von D-4F liegt außerdem in seiner gewichtsreduzierenden Wirkung, die es bei Versuchstieren gezeigt hat [136]. Gerade übergewichtige DPN-Patienten könnten davon profitieren, ohne potenziell ungünstige Effekte einer systemischen Cholesterinsenkung auf Nervenläsionen in Kauf nehmen zu müssen. Der Wirkmechanismus von D-4F und sein Effekt auf die ABCA1-Aktivität sollten deshalb im Hinblick auf die Lipidhomöostase von Nozizeptormembranen weiter ergründet werden, um das vielversprechende Potenzial dieses Wirkstoffs in der Therapie neuropathischer Schmerzen nutzen zu können.

6 Zusammenfassung

D-4F, ein ApoA-I-Mimetikum, lindert mechanische Hyperalgesie in Versuchstieren, die an entzündlichen und neuropathischen Schmerzen leiden. D-4F neutralisiert proalgetische oxidierte Lipide – in dieser Funktion ein entzündungshemmendes Medikament -, und aktiviert zudem ATP-bindende Kassettentransporter (ABCA1 und ABCG1) - als solches ein anti-atherosklerotisches Medikament. Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss von Neuropathie und deren Behandlung mit D-4F auf die Expression von *Abca1* und *Abcg1* sowie auf Zytokine zu untersuchen.

Mittels qPCR und Immunfluoreszenz wurden Veränderungen im Expressionsmuster von *Abca1*, *Abcg1* und Zytokinen (*Il6*, *Il10* und *Tnfa*) in verschiedenen Neuropathie-Modellen und zu verschiedenen Zeitpunkten in Ratten und Mäusen untersucht. CCI als reversible und SNI als irreversible Verletzung dienten als zwei unterschiedliche traumatische Formen neuropathischen Schmerzes, als weitere Entität mit andersartigen Entstehungsprozessen wurde die diabetische Polyneuropathie (DPN) als Modell einer krankheitsinduzierten Neuropathie untersucht. Die systemische Wirkung auf Serumlipide wurde sowohl nach Nervenverletzung als auch D-4F-Behandlung gemessen.

Abca1 war sieben Tage nach traumatischer Nervenverletzung in den sensiblen Hinterwurzelganglien (DRG) und im Nervus ischiadicus erhöht. Dies spiegelte sich jedoch nicht in der ABCA1 Immunreaktivität von TRPV1-positiven Neuronen wider. Während sich die Hochregulation von *Abca1* im DRG nach drei Wochen normalisierte, blieb die mRNA im Nervengewebe erhöht. *Abcg1* in diesem Modell und beide ABC-Transporter in DPN blieben unverändert. Durch CCI, nicht aber DPN (vier und acht Wochen), wurde *Il6* im DRG und *Il6*, *Il10* und *Tnfa* im N. ischiadicus nach sieben Tagen hochreguliert. Die D-4F-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Expression von *Abca1/Abcg1* oder *Il6*, *Il10* und *Tnfa*. In Übereinstimmung mit Daten von Atherosklerose-Patienten blieben HDL und Gesamt-Cholesterin nach D-4F-Behandlung im Serum normgewichtiger neuropathischer Tiere stabil.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Abca1* in nozizeptiven Neuronen und Immunzellen exprimiert wird. Eine mögliche pronozizeptive oder schmerzlindernde Rolle von ABCA1 bei frühem neuropathischem Schmerz bedarf weiterer Aufklärung: Die Überexpression könnte sowohl ein Zeichen für lokale Entzündung als auch für die Aktivierung von Nozizeptoren sein. Die antinozizeptive Wirkung von D-4F ist unabhängig von der *Abca1/Abcg1* Regulation oder einer entzündungshemmenden Wirkung. D-4F könnte entweder durch Neutralisation oxidierter Lipide oder durch ABCA1-induzierte Modifizierung von Membranlipiden eine veränderte Kanalaktivität in Nozizeptoren induzieren. Um ABCA1 als Target in der Therapie neuropathischer Schmerzen einzusetzen, sind weitere Studien bezüglich zugrunde liegender Mechanismen von Membrancholesterin und Lipid Rafts erforderlich.

7 Abstract

D-4F, an ApoA-I mimetic peptide, alleviates mechanical hyperalgesia after administration to rodents suffering from inflammatory and neuropathic pain. D-4F scavenges proalgesic oxidized lipids – working as an anti-inflammatory drug – but also activates ATP-binding cassette transporters (ABCA1 and ABCG1) – as such an anti-atherosclerotic drug. Aim of this dissertation was to investigate the impact of neuropathy and its treatment with D-4F on the expression of *Abca1/Abcg1* as well as cytokines.

Using qPCR and immunofluorescence, changes in the expression pattern of *Abca1*, *Abcg1* and cytokines (*Il6*, *Il10* and *Tnfa*) were investigated in different models of neuropathic pain at several timepoints in rats and mice. The reversible CCI and irreversible SNI as traumatic entities, and further diabetic polyneuropathy (DPN), served as models of neuropathic pain. The systemic effect on serum lipid changes were measured after nerve injury and D-4F treatment.

Abca1 was increased seven days after traumatic nerve injury in the dorsal root ganglia (DRG) and the sciatic nerve itself. This was not reflected in the ABCA1 immunoreactivity of TRPV1-positive neurons. While *Abca1* upregulation resolved in the DRG after three weeks, it remained elevated in nerve tissue. *Abcg1* and both ABC transporters in DPN were unchanged. CCI, but not DPN (four and eight weeks), increased *Il6* in the DRG and *Il6*, *Il10* and *Tnfa* in sciatic nerve tissue after seven days. Daily D-4F treatment had no effect on *Abca1/Abcg1* nor *Il6*, *Il10* or *Tnfa* expression. Consistent with data from atherosclerotic patients, serum HDL or cholesterol remained stable after D-4F treatment in lean neuropathic animals.

In conclusion, *Abca1* is expressed in nociceptive neurons and immune cells. A pronociceptive or pain resolving role of ABCA1 in early neuropathic pain needs to be clarified: its upregulation could be a sign of local inflammation or an activation of nociceptors. The antinociceptive effect of D-4F is independent of *Abca1/Abcg1* regulation or anti-inflammatory effects. D-4F might induce changes of nociceptive channel activity either by oxidized lipid scavenging or by activating

ABCA1-induced membrane lipid alterations. Further studies on the underlying mechanisms of membrane cholesterol and lipid rafts are required to support role of ABCA1 targeting to alleviate chronic pain.

8 Literaturverzeichnis

1. Reinecke H, Weber C, Lange K, Simon M, Stein C, Sorgatz H: *Analgesic efficacy of opioids in chronic pain: recent meta-analyses*. *Br J Pharmacol* 2015, **172**(2):324-333.
2. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F: *Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications*. *J Pharm Pharm Sci* 2013, **16**(5):821-847.
3. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D: *Cellular and molecular mechanisms of pain*. *Cell* 2009, **139**(2):267-284.
4. Baron R, Binder A, Wasner G: *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment*. *Lancet Neurol* 2010, **9**(8):807-819.
5. Kapur D: *Neuropathic pain and diabetes*. *Diabetes Metab Res Rev* 2003, **19** (Suppl 1):S9-15.
6. Backonja MM: *Defining neuropathic pain*. *Anesth Analg* 2003, **97**(3):785-790.
7. Jaggi AS, Jain V, Singh N: *Animal models of neuropathic pain*. *Fundam Clin Pharmacol* 2011, **25**(1):1-28.
8. Decosterd I: *Neuropathic Pain Model, Spared Nerve Injury*. In: *Encyclopedia of Pain*. Edited by Schmidt RF, Willis WD. Berlin, Heidelberg: Springer; 2007: 1300.
9. Sommer C: *Neuropathic Pain Model, Chronic Constriction Injury*. In: *Encyclopedia of Pain*. Edited by Schmidt RF, Decosterd I. Berlin, Heidelberg: Springer; 2007: 1290.
10. Calcutt N, Chaplan S: *Neuropathic Pain Model, Diabetic Neuropathy*. In: *Encyclopedia of Pain*. Edited by Schmidt RF, Willis WD. Berlin, Heidelberg: Springer; 2007: 1292.
11. Said G, Lacroix C, Lozeron P, Ropert A, Plante V, Adams D: *Inflammatory vasculopathy in multifocal diabetic neuropathy*. *Brain* 2003, **126**(Pt 2):376-385.
12. Ben-Kraiem A, Sauer RS, Norwig C, Popp M, Bettenhausen AL, Atalla MS *et al*: *Selective blood-nerve barrier leakiness with claudin-1 and vessel-associated macrophage loss in diabetic polyneuropathy*. *J Mol Med (Berl)* 2021, **99**(9):1237-1250.
13. Rather LJ: *Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus*. *Bull N Y Acad Med* 1971, **47**(3):303-322.
14. Sommer C: *[Cytokines in neuropathic pain]*. *Anaesthesist* 2001, **50**(6):416-426.
15. Bastien D, Lacroix S: *Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury*. *Exp Neurol* 2014, **258**:62-77.
16. Rittner HL, Brack A: *Leukocytes as mediators of pain and analgesia*. *Curr Rheumatol Rep* 2007, **9**(6):503-510.
17. Uceyler N, Sommer C: *Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases*. *Neurosci Lett* 2008, **437**(3):194-198.

18. Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB: *Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules*. *Anesth Analg* 2007, **105**(3):838-847.
19. Hackel D, Pflucke D, Neumann A, Viebahn J, Mousa S, Wischmeyer E *et al*: *The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain*. *PLoS One* 2013, **8**(5):e63564.
20. Oehler B, Brack A, Blum R, Rittner HL: *Pain Control by Targeting Oxidized Phospholipids: Functions, Mechanisms, Perspectives*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020, **11**:613868.
21. Lee S, Birukov KG, Romanoski CE, Springstead JR, Lulis AJ, Berliner JA: *Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis*. *Circ Res* 2012, **111**(6):778-799.
22. Leitinger N: *The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans*. *Subcell Biochem* 2008, **49**:325-350.
23. Oehler B, Kistner K, Martin C, Schiller J, Mayer R, Mohammadi M *et al*: *Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation*. *Sci Rep* 2017, **7**(1):5447.
24. Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP: *Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies*. *Pharmaceuticals (Basel)* 2016, **9**(4).
25. Tang C, Vaughan AM, Anantharamaiah GM, Oram JF: *Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1*. *J Lipid Res* 2006, **47**(1):107-114.
26. Getz GS, Reardon CA: *The structure/function of apolipoprotein A-I mimetic peptides: an update*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014, **21**(2):129-133.
27. McMahon M, Brahn E: *Inflammatory lipids as a target for therapy in the rheumatic diseases*. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, **17**(8):1213-1224.
28. Getz GS, Reardon CA: *Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis*. *J Inflamm Res* 2011, **4**:83-92.
29. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR *et al*: *Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice*. *Circulation* 2004, **109**(25):3215-3220.
30. Reddy ST, Anantharamaiah GM, Navab M, Hama S, Hough G, Grijalva V *et al*: *Oral amphipathic peptides as therapeutic agents*. *Expert Opin Investig Drugs* 2006, **15**(1):13-21.
31. Dunbar RL, Movva R, Bloedon LT, Duffy D, Norris RB, Navab M *et al*: *Oral Apolipoprotein A-I Mimetic D-4F Lowers HDL-Inflammatory Index in High-Risk Patients: A First-in-Human Multiple-Dose, Randomized Controlled Trial*. *Clin Transl Sci* 2017, **10**(6):455-469.
32. Nandedkar SD, Weihrauch D, Xu H, Shi Y, Feroah T, Hutchins W *et al*: *D-4F, an apoA-1 mimetic, decreases airway hyperresponsiveness, inflammation, and oxidative stress in a murine model of asthma*. *J Lipid Res* 2011, **52**(3):499-508.

33. Charles-Schoeman C, Banquerigo ML, Hama S, Navab M, Park GS, Van Lenten BJ *et al*: *Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis*. *Clin Immunol* 2008, **127**(2):234-244.
34. Oehler B, Kloka J, Mohammadi M, Ben-Kraiem A, Rittner HL: *D-4F, an ApoA-I mimetic peptide ameliorating TRPA1-mediated nocifensive behaviour in a model of neurogenic inflammation*. *Mol Pain* 2020, **16**:1744806920903848.
35. Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, Ruchala P, Waring AJ, Lehrer RI *et al*: *Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I*. *J Lipid Res* 2008, **49**(11):2302-2311.
36. Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N: *ABC transporters, atherosclerosis and inflammation*. *Atherosclerosis* 2010, **211**(2):361-370.
37. Navia-Pelaez JM, Choi SH, Dos Santos Aggum Capettini L, Xia Y, Gonen A, Agatista-Boyle C *et al*: *Normalization of cholesterol metabolism in spinal microglia alleviates neuropathic pain*. *J Exp Med* 2021, **218**(7).
38. Cai Z, Yang Y, Zhang J: *A systematic review and meta-analysis of the serum lipid profile in prediction of diabetic neuropathy*. *Sci Rep* 2021, **11**(1):499.
39. Tarr PT, Tarling EJ, Bojanic DD, Edwards PA, Baldan A: *Emerging new paradigms for ABCG transporters*. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1791**(7):584-593.
40. Haidar B, Denis M, Marcil M, Krimbou L, Genest J, Jr.: *Apolipoprotein A-I activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter*. *J Biol Chem* 2004, **279**(11):9963-9969.
41. Schmitz G, Grandl M: *Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation*. *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**(9):1499-1518.
42. Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, Buscher K, Dinh HQ, Kobiyama K *et al*: *Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry*. *Circ Res* 2018, **122**(12):1675-1688.
43. Choi WS, Lee G, Song WH, Koh JT, Yang J, Kwak JS *et al*: *The CH25H-CYP7B1-RORalpha axis of cholesterol metabolism regulates osteoarthritis*. *Nature* 2019, **566**(7743):254-258.
44. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y *et al*: *Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway*. *Nat Commun* 2017, **8**(1):28.
45. Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF: *The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor*. *J Biol Chem* 2009, **284**(47):32336-32343.
46. Amsalem M, Poilbout C, Ferracci G, Delmas P, Padilla F: *Membrane cholesterol depletion as a trigger of Nav1.9 channel-mediated inflammatory pain*. *EMBO J* 2018, **37**(8).
47. Miller YI, Navia-Pelaez JM, Corr M, Yaksh TL: *Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing*. *J Lipid Res* 2020, **61**(5):655-666.

48. Ye D, Lammers B, Zhao Y, Meurs I, Van Berkel TJ, Van Eck M: *ATP-binding cassette transporters A1 and G1, HDL metabolism, cholesterol efflux, and inflammation: important targets for the treatment of atherosclerosis*. *Curr Drug Targets* 2011, **12**(5):647-660.
49. Denis M, Bissonnette R, Haidar B, Krimbou L, Bouvier M, Genest J: *Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines*. *Mol Genet Metab* 2003, **78**(4):265-274.
50. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR: *ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation*. *Circ Res* 2014, **114**(1):157-170.
51. Yin K, Liao DF, Tang CK: *ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport*. *Mol Med* 2010, **16**(9-10):438-449.
52. Suter MR, Siegenthaler A, Decosterd I, Ji RR: *Perioperative nerve blockade: clues from the bench*. *Anesthesiol Res Pract* 2011, **2011**:124898.
53. King AJ: *The use of animal models in diabetes research*. *Br J Pharmacol* 2012, **166**(3):877-894.
54. Heath I, Heath S: *Diagnostic techniques in genetics*. Chichester, England: John Wiley & Sons; 2006.
55. Livak KJ, Schmittgen TD: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
56. Martin C, Stoffer C, Mohammadi M, Hugo J, Leipold E, Oehler B et al: *Nav1.9 Potentiates Oxidized Phospholipid-Induced TRP Responses Only under Inflammatory Conditions*. *Front Mol Neurosci* 2018, **11**:7.
57. Kupari J, Usoskin D, Parisien M, Lou D, Hu Y, Fatt M et al: *Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain*. *Nat Commun* 2021, **12**(1):1510.
58. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A: *Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events*. *Cell Cycle* 2014, **13**(9):1400-1412.
59. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC: *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. *Clin Chem* 1974, **20**(4):470-475.
60. Trinder P: *Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor*. *J Clin Pathol* 1969, **22**(2):246.
61. Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H et al: *Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects*. *Atherosclerosis* 2014, **233**(1):253-259.
62. Thakur M, Crow M, Richards N, Davey GI, Levine E, Kelleher JH et al: *Defining the nociceptor transcriptome*. *Front Mol Neurosci* 2014, **7**:87.
63. Chiu IM, Barrett LB, Williams EK, Strohlic DE, Lee S, Weyer AD et al: *Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity*. *Elife* 2014, **3**.
64. Goswami SC, Mishra SK, Maric D, Kaszas K, Gonnella GL, Clokie SJ et al: *Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-Seq transcriptome analysis*. *J Pain* 2014, **15**(12):1338-1359.

65. Ray P, Torck A, Quigley L, Wangzhou A, Neiman M, Rao C et al: *Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. Pain* 2018, **159**(7):1325-1345.
66. Sapio MR, Goswami SC, Gross JR, Mannes AJ, Iadarola MJ: *Transcriptomic analyses of genes and tissues in inherited sensory neuropathies. Exp Neurol* 2016, **283**(Pt A):375-395.
67. Tavares-Ferreira D, Shiers S, Ray P, Wangzhou A, Jeevakumar V, Sankaranarayanan I et al: *Spatial transcriptomics reveals unique molecular fingerprints of human nociceptors. In. bioRxiv* 2021.02.06.430065; 2021.
68. Albrecht DE, Sherman DL, Brophy PJ, Froehner SC: *The ABCA1 cholesterol transporter associates with one of two distinct dystrophin-based scaffolds in Schwann cells. Glia* 2008, **56**(6):611-618.
69. Rouwette T, Sondermann J, Avenali L, Gomez-Varela D, Schmidt M: *Standardized Profiling of The Membrane-Enriched Proteome of Mouse Dorsal Root Ganglia (DRG) Provides Novel Insights Into Chronic Pain. Mol Cell Proteomics* 2016, **15**(6):2152-2168.
70. Pokhilko A, Nash A, Cader MZ: *Common transcriptional signatures of neuropathic pain. Pain* 2020, **161**(7):1542-1554.
71. Meyer Zu Reckendorf S, Brand C, Pedro MT, Hegler J, Schilling CS, Lerner R et al: *Lipid metabolism adaptations are reduced in human compared to murine Schwann cells following injury. Nat Commun* 2020, **11**(1):2123.
72. Wangzhou A, McIlvried LA, Paige C, Barragan-Iglesias P, Shiers S, Ahmad A et al: *Pharmacological target-focused transcriptomic analysis of native vs cultured human and mouse dorsal root ganglia. Pain* 2020, **161**(7):1497-1517.
73. Parisien M, Samoshkin A, Tansley SN, Piltonen MH, Martin LJ, El-Hachem N et al: *Genetic pathway analysis reveals a major role for extracellular matrix organization in inflammatory and neuropathic pain. Pain* 2019, **160**(4):932-944.
74. Vega-Avelaira D, Geranton SM, Fitzgerald M: *Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. Mol Pain* 2009, **5**:70.
75. Berta T, Perrin FE, Pertin M, Tonello R, Liu YC, Chamessian A et al: *Gene Expression Profiling of Cutaneous Injured and Non-Injured Nociceptors in SNI Animal Model of Neuropathic Pain. Sci Rep* 2017, **7**(1):9367.
76. Li S, Xue C, Yuan Y, Zhang R, Wang Y, Wang Y et al: *The transcriptional landscape of dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. Sci Rep* 2015, **5**:16888.
77. Hu G, Huang K, Hu Y, Du G, Xue Z, Zhu X et al: *Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. Sci Rep* 2016, **6**:31851.
78. Maratou K, Wallace VC, Hasnie FS, Okuse K, Hosseini R, Jina N et al: *Comparison of dorsal root ganglion gene expression in rat models of*

- traumatic and HIV-associated neuropathic pain. Eur J Pain* 2009, **13**(4):387-398.
79. Shin JE, Ha H, Cho EH, Kim YK, Cho Y: *Comparative analysis of the transcriptome of injured nerve segments reveals spatiotemporal responses to neural damage in mice. J Comp Neurol* 2018, **526**(7):1195-1208.
80. Raju HB, Englander Z, Capobianco E, Tsinoremas NF, Lerch JK: *Identification of potential therapeutic targets in a model of neuropathic pain. Front Genet* 2014, **5**:131.
81. Wang Y, Guo ZY, Sun X, Lu SB, Xu WJ, Zhao Q et al: *Identification of Changes in Gene expression of rats after Sensory and Motor Nerves Injury. Sci Rep* 2016, **6**:26579.
82. Du H, Shi J, Wang M, An S, Guo X, Wang Z: *Analyses of gene expression profiles in the rat dorsal horn of the spinal cord using RNA sequencing in chronic constriction injury rats. J Neuroinflammation* 2018, **15**(1):280.
83. Jager SE, Pallesen LT, Richner M, Harley P, Hore Z, McMahon S et al: *Changes in the transcriptional fingerprint of satellite glial cells following peripheral nerve injury. Glia* 2020, **68**(7):1375-1395.
84. Bangash MA, Alles SRA, Santana-Varela S, Millet Q, Sikandar S, de Clauser L et al: *Distinct transcriptional responses of mouse sensory neurons in models of human chronic pain conditions. Wellcome Open Res* 2018, **3**:78.
85. Yin C, Hu Q, Liu B, Tai Y, Zheng X, Li Y et al: *Transcriptome profiling of dorsal root ganglia in a rat model of complex regional pain syndrome type-1 reveals potential mechanisms involved in pain. J Pain Res* 2019, **12**:1201-1216.
86. North RY, Li Y, Ray P, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G et al: *Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. Brain* 2019, **142**(5):1215-1226.
87. Paul JA, Aich A, Abrahante JE, Wang Y, LaRue RS, Rathe SK et al: *Transcriptomic analysis of gene signatures associated with sickle pain. Sci Data* 2017, **4**:170051.
88. Ma J, Pan P, Anyika M, Blagg BS, Dobrowsky RT: *Modulating Molecular Chaperones Improves Mitochondrial Bioenergetics and Decreases the Inflammatory Transcriptome in Diabetic Sensory Neurons. ACS Chem Neurosci* 2015, **6**(9):1637-1648.
89. Fernandez-Zafra T, Gao T, Jurczak A, Sandor K, Hore Z, Agalave NM et al: *Exploring the transcriptome of resident spinal microglia after collagen antibody-induced arthritis. Pain* 2019, **160**(1):224-236.
90. Megat S, Ray PR, Moy JK, Lou TF, Barragan-Iglesias P, Li Y et al: *Nociceptor Translational Profiling Reveals the Ragulator-Rag GTPase Complex as a Critical Generator of Neuropathic Pain. J Neurosci* 2019, **39**(3):393-411.
91. Strong JA, Xie W, Coyle DE, Zhang JM: *Microarray analysis of rat sensory ganglia after local inflammation implicates novel cytokines in pain. PLoS One* 2012, **7**(7):e40779.
92. Gui Y, Li A, Zhang J, Li G, Ruan X, Guo Q et al: *alpha-Asarone Alleviated Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain Through Inhibition*

- of Spinal Endoplasmic Reticulum Stress in an Liver X Receptor-Dependent Manner. *Anesth Analg* 2018, **127**(3):775-783.
93. Noh MC, Mikler B, Joy T, Smith PA: *Time Course of Inflammation in Dorsal Root Ganglia Correlates with Differential Reversibility of Mechanical Allodynia*. *Neuroscience* 2020, **428**:199-216.
 94. Borish LC, Steinke JW: 2. *Cytokines and chemokines*. *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**(2 Suppl):S460-475.
 95. Krames ES: *The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain*. *Pain Med* 2014, **15**(10):1669-1685.
 96. Esposito MF, Malayil R, Hanes M, Deer T: *Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation*. *Pain Med* 2019, **20**(Suppl 1):S23-S30.
 97. Scholz J, Woolf CJ: *The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia*. *Nat Neurosci* 2007, **10**(11):1361-1368.
 98. Hu P, McLachlan EM: *Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat*. *Neuroscience* 2002, **112**(1):23-38.
 99. Chomczynski P, Sacchi N: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
 100. Wu JS, Lee C, Wu CC, Shiue YL: *Primer design using genetic algorithm*. *Bioinformatics* 2004, **20**(11):1710-1717.
 101. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL: *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC Bioinformatics* 2012, **13**:134.
 102. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR: *Basic principles of real-time quantitative PCR*. *Expert Rev Mol Diagn* 2005, **5**(2):209-219.
 103. Rebouças E, Costa J, Passos MJ, J.R. SP, van den Hurk R, Silva JR: *Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2013, **56**:143-154.
 104. Zhong H, Simons JW: *Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **259**(3):523-526.
 105. Cikos S, Koppel J: *Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity*. *Anal Biochem* 2009, **384**(1):1-10.
 106. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK et al: *MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update*. *Nucleic Acids Res* 2018, **46**(D1):D303-D307.
 107. Segebarth D, Griebel M, Stein N, Collenberg C, Martin C, Fiedler D et al: *On the objectivity, reliability, and validity of deep learning enabled bioimage analyses*. *eLife* 2020, **9**:e59780.
 108. Roeschlau P, Bernt E, Gruber W: *Enzymatic determination of total cholesterol in serum*. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974, **12**(5):226.
 109. Baillie EE: *Recommendations for Improving Cholesterol Measurement: Executive Summary: A Report From the Laboratory Standardization Panel*

- of the National Education Program. *Laboratory Medicine* 1990, **21**(7):429-435.
110. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA: *Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. Clin Chem* 1986, **32**(3):470-475.
 111. Breuer J: *Report on the symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996, **34**(4):385-386.
 112. Oram JF, Vaughan AM: *ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. Curr Opin Lipidol* 2000, **11**(3):253-260.
 113. Hidmark AS, Nawroth PP, Fleming T: *STZ causes depletion of immune cells in sciatic nerve and dorsal root ganglion in experimental diabetes. J Neuroimmunol* 2017, **306**:76-82.
 114. Cermenati G, Giatti S, Cavaletti G, Bianchi R, Maschi O, Pesaresi M et al: *Activation of the liver X receptor increases neuroactive steroid levels and protects from diabetes-induced peripheral neuropathy. J Neurosci* 2010, **30**(36):11896-11901.
 115. Bloedon LT, Dunbar R, Duffy D, Pinell-Salles P, Norris R, DeGroot BJ et al: *Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. J Lipid Res* 2008, **49**(6):1344-1352.
 116. Liu D, Ding Z, Wu M, Xu W, Qian M, Du Q et al: *The apolipoprotein A-I mimetic peptide, D-4F, alleviates ox-LDL-induced oxidative stress and promotes endothelial repair through the eNOS/HO-1 pathway. J Mol Cell Cardiol* 2017, **105**:77-88.
 117. Startek JB, Boonen B, Lopez-Requena A, Talavera A, Alpizar YA, Ghosh D et al: *Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. Elife* 2019, **8**.
 118. Liu M, Huang W, Wu D, Priestley JV: *TRPV1, but not P2X, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. Eur J Neurosci* 2006, **24**(1):1-6.
 119. Saghy E, Szoke E, Payrits M, Helyes Z, Borzsei R, Erostyak J et al: *Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. Pharmacol Res* 2015, **100**:101-116.
 120. Pristera A, Baker MD, Okuse K: *Association between tetrodotoxin resistant channels and lipid rafts regulates sensory neuron excitability. PLoS One* 2012, **7**(8):e40079.
 121. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G et al: *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. Cell* 2008, **133**(2):235-249.
 122. Wilhelm LP, Voilquin L, Kobayashi T, Tomasetto C, Alpy F: *Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4. Methods Mol Biol* 2019, **1949**:137-152.
 123. Shoji A, Ikeya K, Aoyagi M, Takatsuji R, Yanagida A, Shibusawa Y et al: *Monitoring of cholesterol oxidation in a lipid bilayer membrane using streptolysin O as a sensing and signal transduction element. J Pharm Biomed Anal* 2016, **128**:455-461.

124. Gulyani A, Dey N, Bhattacharya S: *Highly Responsive Fluorescent Assemblies Allow for Unique, Multiparametric Sensing of the Phospholipid Membrane Environment. Chemistry* 2019, **25**(6):1507-1514.
125. Sherman CB, Peterson SJ, Frishman WH: *Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis. Cardiol Rev* 2010, **18**(3):141-147.
126. Bruno K, Woller SA, Miller YI, Yaksh TL, Wallace M, Beaton G *et al*: *Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. Pain* 2018, **159**(10):1908-1915.
127. Löffler G, Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie*, vol. 9. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
128. Buga GM, Frank JS, Mottino GA, Hendizadeh M, Hakhamian A, Tillisch JH *et al*: *D-4F decreases brain arteriole inflammation and improves cognitive performance in LDL receptor-null mice on a Western diet. J Lipid Res* 2006, **47**(10):2148-2160.
129. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L *et al*: *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. J Lipid Res* 2000, **41**(9):1481-1494.
130. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM: *A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. J Lipid Res* 2001, **42**(8):1308-1317.
131. Bhalla S, Singh N, Jaggi AS: *Statins: do they aggravate or ameliorate neuropathic pain? J Pain* 2014, **15**(11):1069-1080.
132. Pergolizzi JV, Jr., Magnusson P, LeQuang JA, Razmi R, Zampogna G, Taylor R, Jr.: *Statins and Neuropathic Pain: A Narrative Review. Pain Ther* 2020, **9**(1):97-111.
133. Jende JME, Groener JB, Rother C, Kender Z, Hahn A, Hilgenfeld T *et al*: *Association of Serum Cholesterol Levels With Peripheral Nerve Damage in Patients With Type 2 Diabetes. JAMA Netw Open* 2019, **2**(5):e194798.
134. Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Sampietro T: *Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management. Am J Cardiovasc Drugs* 2012, **12**(5):303-311.
135. Gavini CK, Bookout AL, Bonomo R, Gautron L, Lee S, Mansuy-Aubert V: *Liver X Receptors Protect Dorsal Root Ganglia from Obesity-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Mechanical Allodynia. Cell Rep* 2018, **25**(2):271-277 e274.
136. Ruan X, Li Z, Zhang Y, Yang L, Pan Y, Wang Z *et al*: *Apolipoprotein A-I possesses an anti-obesity effect associated with increase of energy expenditure and up-regulation of UCP1 in brown fat. J Cell Mol Med* 2011, **15**(4):763-772.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding Cassette
ANOVA	Analysis of Variance
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
CAIA	Collagen Antibody induced Arthritis
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CCI	Chronic Constriction Injury
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CHER	Cholesterinesterase
CHOD	Cholesterinoxidase
CIBP	Cancer induced Bone Pain
CIPN	Chemotherapy induced Peripheral Neuropathy
CMP	Chronic Muscle Pain
CPIP	Chronic Post-Ischemia Pain
Ct	Threshold-Cycle
CTCF	Corrected Total Cell Fluorescence
D-4F	Apolipoprotein A-I-mimetisches Peptid D-4F
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DPN	Diabetische Polyneuropathie
DRG	Dorsal Root Ganglion
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HDL	High-Density Lipoprotein
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
LID	Local Inflammation of the DRG
MJL	Mechanical Joint Loading
NIH	National Institute of Health

OxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
OxPAPC	Oxidiertes 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
OxPL	Oxidierte Phospholipide
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PNI	Peripheral Nerve Injury
POD	Peroxidase
PSL	Partial Sciatic Nerve Ligation
(q)PCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction
RM	Repeated Measurement
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive Oxygen Species
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Reverse Transkriptase
SCD	Sickle Cell Disease
SEM	Standard Error of the Mean
SNI	Spared Nerve Injury
SNT	Sciatic Nerve Transection
STZ	Streptomycin
TNF α	Tumornekrosefaktor
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
VOC	Vasookklusive Krise
x g	Relative zentrifugale Kraft

II Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen ohne Quellenverweis wurden durch die Promovendin selbst erstellt. Abdruckgenehmigungen für Abb. 1 und 14 bzw. 5 über Creative Commons Attribution License (CC BY) Version 4 bzw. Version 1; abzurufen unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> und <https://creativecommons.org/licenses/by/1.0/legalcode>.

Abbildung 1: Diabetische Polyneuropathie in Wistar Ratten nach Injektion von Streptomycin (einmalig 45 mg/kg).....	4
Abbildung 2: Wirkmechanismen der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine.....	6
Abbildung 3: Antinozizeptive D-4F-Wirkung bei traumatischer Neuropathie. ...	10
Abbildung 4: Illustration der Hypothesen.....	15
Abbildung 5: Operationsmethode CCI und SNI.....	18
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Zellmarkierung zur Fluoreszenzmessung.....	26
Abbildung 7: Erhöhung der mRNA des <i>Abca1</i> -Transporters 7 d nach Nervenverletzung.....	36
Abbildung 8: Immunhistochemie lumbale DRGs von Mäusen 7 d nach neuropathischer Verletzung.....	37
Abbildung 9: Keine Zunahme der Immunreaktivität von ABCA1 und TRPV1 durch Nervenverletzung in nozizeptiven DRG-Neuronen.....	38
Abbildung 10: Normalisierung der <i>Abca1</i> mRNA im murinen DRG, aber persistierende Überexpression im Nerv.....	39
Abbildung 11: Keine Änderung der <i>Abca1</i> - und <i>Abcg1</i> -mRNA nach Behandlung mit D-4F.....	40
Abbildung 12: Keine Änderung der ABC-mRNA nach STZ-Injektion, bis auf <i>Abcg1</i> im DRG nach acht Wochen.....	41
Abbildung 13: Keine Änderung der Zytokin-mRNA in DRG und Nerv nach Behandlung mit D-4F.....	43
Abbildung 14: Keine Änderung der Zytokin-mRNA in DRG und Nerv 4 und 8 Wochen nach STZ-Injektion.....	44
Abbildung 15: Unveränderte Serumlipide bei Neuropathie und nach D-4F Injektion.....	45

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UniProt Genbezeichnung und -nummer.....	16
Tabelle 2: Mengenangaben für einen Ansatz zur cDNA-Synthese.....	21
Tabelle 3: Mengenangaben für einen PCR-Ansatz.....	22
Tabelle 4: Primerliste.....	22

Tabelle 5: qPCR Zyklen	23
Tabelle 6: Angaben zu Reagenzien-Konzentrationen	25
Tabelle 7: Antikörperliste	25
Tabelle 8: Expression von <i>Abca1</i> und <i>Abcg1</i>	32
Tabelle 9: Datenbank-Screening zu (a) mRNA- und (b) Proteinexpression	35

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der langen Zeit die nötig war, um diese Arbeit zu erstellen, unterstützt haben.

Großer Dank gilt dabei Prof. Dr. Heike Rittner, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieses Projekts begleitet und unterstützt hat, wo es nur möglich war. Danke für deine unaufhörliche Geduld, deine Betreuung und deinen verlässlichen Rat.

Ich danke Prof. Dr. Alexander Brack für die beratenden Gespräche und das stets offene Ohr in jedweder Hinsicht.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Dr. Beatrice Oehler für die Möglichkeit, auf ihre bisherige Forschungsarbeit aufzubauen und die Betreuung meiner Experimente. Deren erfolgreiche Durchführung wäre ohne die Unterstützung von Dr. Jeremy Chen und Dr. Reine-Solange Sauer nicht möglich gewesen, – dafür danke ich beiden von Herzen.

Ebenfalls möchte ich mich bei PD Dr. Robert Blum für sein konstruktives Feedback und bei Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen für die Drittbetreuung herzlich bedanken.

Dafür, dass ich es bis dahin geschafft habe, wo ich heute bin, danke ich meinem Vater, auch wenn er nicht mehr hier ist und meiner Mutter, die immer für mich da war und ist.

Ich danke meinen Geschwistern Hanna und Simon, dass sie an meiner Seite sind, egal was ich tue.

Danke an meine Lieben – Ariane, Elise, Sophie, Juli, Felix, Jörn und Domi – für eure treue Freundschaft auf dem Weg hierher, und Manu dafür, dass du mein Zuhause bist.

