

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer

**Intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse bei der Öffnung des
Perineuriums**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Clemens-Alexander Böcker
aus Marburg

Würzburg, Februar 2014

Referent: Prof. Dr. med. Alexander Brack

Korreferent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2016

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lokalanästhetika in der klinischen Praxis	1
1.1.1	Vor- und Nachteile der etablierten Lokalanästhetika	1
1.1.2	Ansätze zur selektiven Blockade von Schmerzfasern	2
1.2	Das Perineurium als Diffusionsbarriere	5
1.2.1	Aufbau peripherer Nerven	5
1.2.2	Molekulare Struktur der Tight Junctions	6
1.2.2.1	Integrale Membranproteine	6
1.2.2.2	Plaque-Proteine und Zytoskelett	8
1.2.3	Räumliche Organisation und Funktion der Tight Junctions	9
1.2.4	Tight Junctions in peripheren Nerven	10
1.3	Öffnung der perineuralen Barriere	11
1.3.1	Öffnung des Perineuriums durch hypertone Lösung	11
1.3.2	Matrix-Metalloproteinase 9 als Mediator der Barriereöffnung	13
1.3.3	Erk und Akt als potentielle intrazelluläre Vermittler der Barriereöffnung durch MMP9	15
1.3.4	Tissue-type plasminogen activator als potentieller Mediator der Barriereöffnung	17
1.4	Fragestellung der Promotion	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Versuchstiere	19
2.2	Verwendete Geräte und Materialien	19
2.3	Perineurale Injektion	21
2.4	Western Blot	21
2.4.1	Probenaufarbeitung	22
2.4.2	Trennung von Nerv und Nervenscheide	23
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA Assay)	23
2.4.4	SDS-Gelelektrophorese	24
2.4.5	Proteintransfer durch Western Blot	26
2.4.6	Coomassie-Färbung	26
2.4.7	Immundetektion	27
2.4.8	Densitometrie	30

2.5 Immunfluoreszenzfärbung	30
2.5.1 Probenaufarbeitung.....	30
2.5.2 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	31
2.5.3 Protokoll der Claudin-1 Färbung	31
2.5.4 Fotodokumentation der immunhistochemischen Färbungen.....	32
2.6 Verhaltensexperimente	32
2.7 Verwendete Software	32
2.8 Statistik und Versuchsauswertung	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung	34
3.1.1 Phosphorylierung von Erk und Erk-Expression nach Injektion von 10 % NaCl	34
3.1.2 Lokalisation der Erk-Phosphorylierung.....	35
3.1.3 Phosphorylierung von Erk und Erk-Expression nach MMP9-Injektion.....	36
3.1.4 Verhinderung der Abnahme von Claudin-1 durch MEK-Inhibition.....	38
3.2 Beeinflussung der Akt-Phosphorylierung	39
3.2.1 Phosphorylierung von Akt und Akt-Expression nach Injektion von 10 % NaCl	39
3.2.2 Phosphorylierung von Akt und Akt-Expression nach MMP9-Injektion.....	41
3.3 Perineurale Injektion von tPA	42
3.3.1 Verhaltensexperimente zur Koinjektion von tPA und DAMGO.....	42
3.3.2 Claudin-1 Immunreaktivität nach perineuraler Gabe von tPA	43
3.3.3 Beeinflussung des Claudin-1 Proteingehalts durch inaktiviertes tPA	46
3.3.4 Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung durch tPA.....	47
4 Diskussion	48
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	48
4.2 Freisetzung von MMP9 nach Injektion der hypertonen Kochsalzlösung	48
4.3 Interaktion von MMP9 und LRP-1	49
4.4 Beeinflussung des pErk-Signalweges durch LRP-1	50
4.5 Beeinflussung der Claudin-1 Konzentration durch pErk	53
4.6 Die Rolle von tPA bei der Öffnung des Perineuriums	54
4.7 Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick.....	56
4.7.1 Nervenschädigung durch Öffnung der perineuralen Barriere.....	57
4.7.2 Substanzauswahl zur Öffnung der perineuralen Barriere	58
4.7.3 Klinischer Effekt der antinozizeptiven Substanzen	59
5 Zusammenfassung.....	60

6 Literaturverzeichnis	63
7 Abbildungsverzeichnis	71
8 Verzeichnis der Hersteller	73
Danksagung.....	75
Lebenslauf	76

Abkürzungen

Akt	Proteinkinase B
ALK5	Activin receptor-like kinase-5
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP	Dual specificity (threonine/tyrosine) protein phosphatase
EGF	Epidermal growth factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IDV	Integrated density value
JAM	Junctional adhesion molecule
LDL	Low density lipoprotein
LRP-1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MARVEL	MAL [myelin and lymphocyte] and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MAP	Mitogen-activated protein
MDCK II Zellen	Madin-Darby canine kidney II Zellen
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP9-PEX	Hemopexin Domäne der Matrix-Metalloproteinase 9
NGS	Normal goat serum (Normales Ziegen Serum)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	Patient-controlled analgesia (Patientengesteuerte Schmerztherapie)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PPT	Paw pressure test
RAP	Receptor-associated protein
rtPA	Recombinant tissue-type plasminogen activator
SDS- PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFK	Src family kinase
TAMPs	TJ-assozierte MARVEL-Proteine
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor β
TJ	Tight junction
TRPA1	Transient receptor potential ankyrin 1
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
tPA	Tissue-type plasminogen activator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

1 Einleitung

1.1 Lokalanästhetika in der klinischen Praxis

Lokalanästhetika sind Substanzen, die zu einer reversiblen Blockade der Erregungsleitung in peripheren Nerven oder Spinalnervenwurzeln führen. Ihr klinischer Einsatz erstreckt sich auf verschiedene Verfahren der Regionalanästhesie, beispielsweise finden sie bei peripheren Nervenblockaden, rückenmarksnaher Anästhesie oder bei der Oberflächenanästhesie Verwendung. Klinische Indikation zum Einsatz von Lokalanästhetika ist insbesondere die Therapie von intraoperativen und postoperativen Schmerzen.

Schmerz ist dabei nach Definition der International Association for the Study of Pain (IASP) 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.“²

1.1.1 Vor- und Nachteile der etablierten Lokalanästhetika

Der Einsatz von Lokalanästhetika hat verschiedene klinische Vorteile, wie etwa eine bessere postoperative Schmerzkontrolle im Vergleich zur alleinigen systemischen patientengesteuerten Schmerztherapie (PCA).³⁻⁵ Beim Einsatz peripherer Nervenblockaden konnte eine Verringerung des Opioidverbrauchs um 40-70 % und damit eine Reduktion der opiatabhängigen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Obstipation nachgewiesen werden.⁶

Durch den Gebrauch der klinisch etablierten Lokalanästhetika resultieren aber auch verschiedene Nachteile. **Allergische Reaktionen** treten hauptsächlich bei Lokalanästhetika vom Ester-Typ auf und sind auf den Metaboliten Paraaminobenzoessäure zurückzuführen.⁷ Eine **Methämoglobinämie** wird durch den Prilocainmetaboliten o-Toluidin ausgelöst.⁸ **Systemische Nebenwirkungen** sind immer dann zu erwarten, wenn die Plasmakonzentration eines Lokalanästhetikums einen bestimmten, substanzspezifischen Grenzwert überschreitet. Ursache dafür können versehentliche intravasale Injektion, Überdosierung oder erhöhte Resorption am Injektionsort sein. Die systemische Toxizität manifestiert sich vor allem in Herz und Gehirn.⁸

Lokalanästhetika blockieren **unselektiv** die Impulsleitung in nozizeptiven, sensorischen und motorischen Nervenfasern. Dadurch wird bei peripheren Nervenblockaden die aktive Beweglichkeit der betreffenden Extremität stark eingeschränkt. Dies ist vor dem Hintergrund verschiedener Aspekte einer möglichst raschen und effektiven postoperativen Behandlung klinisch sehr ungünstig. Beispielsweise kann oft nur verzögert mit einer aktiven krankengymnastischen Behandlung begonnen werden. Eine selektive Blockade von sensorischen oder nozizeptiven Neuronen wäre dagegen vorteilhafter. Dadurch könnten die Probleme einer langen postoperativen Immobilisation verhindert werden. Durch eine spezifische Wirkung auf Schmerzfasern könnten auch oben beschriebene Probleme der systemischen Toxizität vermieden werden.

1.1.2 Ansätze zur selektiven Blockade von Schmerzfasern

Über die verabreichte Dosis des applizierten Lokalanästhetikums kann in eingeschränktem Maße ein selektiver Effekt erzielt werden: je dicker die Nervenfasern, desto höher die minimale, zur Blockade benötigte Lokalanästhetika-Konzentration. Die dünnen nozizeptiven A δ - und C-Fasern werden damit vor den dickeren motorischen Nervenfasern blockiert.⁹ Allerdings ist diese Methode sehr unzuverlässig. Wird die Konzentration im individuellen Fall zu niedrig gewählt bleibt zwar die motorische Funktion erhalten, die Nozizeption ist aber nur ungenügend blockiert. Bei zu hoher Konzentration wird eine ausreichende analgetische Wirkung erzielt, es resultieren aber motorische Einschränkungen.

Ein möglicher Ansatzpunkt zur zuverlässigen selektiven Blockade von Schmerzfasern ist es, Medikamente zu verwenden, die zwar unselektiv wirken, jedoch nur in nozizeptiven Fasern zu ihrem Wirkort vordringen können. Dem quarternären Lidocainderivat **QX-314** ist es unter normalen Bedingungen aufgrund der dauerhaft positiven Ladung nicht möglich, in das Innere von Nervenzellen vorzudringen. Capsaicin, der Wirkstoff der Chilischote, öffnet den transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) Kanal, der präferentiell auf Schmerzfasern exprimiert ist.¹⁰ Bei Koapplikation gelangt QX-314 durch den offenen Kanal ins Neuron. Es resultiert eine Schmerzblockade ohne motorische Defizite.¹¹ Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist, dass zunächst der Nozizeptor stimuliert und damit vorübergehend Schmerz erzeugt

Einleitung

werden muss. Die Aktivierung des TRPV1-Kanals durch Capsaicin geschieht innerhalb kürzester Zeit (<1 s). Bis zum Eintritt einer ausreichend großen, analgetisch wirksamen Menge QX-314 vergehen dagegen mehrere Minuten. Durch diese Verzögerung wären Patienten vermutlich über mehrere Minuten einem brennenden Schmerz ausgesetzt, bis die nozizeptionsspezifische Analgesie einsetzt.¹² Um dieses Problem zu umgehen, könnte Lidocain statt Capsaicin verwendet werden. Lidocain öffnet für QX-314 sowohl TRPV1 als auch als transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) Kanäle, die in einer Untergruppe von nozizeptiven Fasern in Koexpression mit TRPV1 gefunden werden.¹³⁻
¹⁵ Es stellt gleichzeitig ein unselektives Lokalanästhetikum dar, das in kürzester Zeit zur undifferenzierten Blockade der Erregungsleitung peripherer Nerven führt. Bei Verwendung von Lidocain tritt daher nur eine sehr kurze brennende Empfindung auf, dafür muss aber zumindest initial eine unselektive Blockade von Nervenfasern in Kauf genommen werden. Durch die längere Wirkdauer von QX-314 kommt es anschließend zu einer Periode der nozizeptionsspezifischen Analgesie.¹² Als besonders effektiv hat sich die Kombination aus 2 % Lidocain, 0,2 % QX-314 und 0,05 % Capsaicin erwiesen, die zu einem sensorischen Block mit einer Dauer von ca. 16 Stunden führt.¹⁶ Diese Dreifachkombination hatte in Langzeitstudien an Ratten allerdings neurotoxische Effekte und die verzögerte Entwicklung einer mechanischen Hypersensibilität zur Folge.¹⁷ Alternativ wäre auch die Verwendung von Bupivacain als TRPA1-Agonist denkbar.¹⁸

Einen zweiten möglichen Ansatz stellt die selektive Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v) dar. Insgesamt sind 9 Isoformen ($\text{Na}_v1.1$ - 1.9) dieses Kanaltyps bekannt, wobei $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ und $\text{Na}_v1.9$ eine wichtige Rolle bei der Nozizeption spielen. Die Bedeutung von $\text{Na}_v1.3$ ist noch nicht abschließend geklärt.¹⁹ Zum Zeitpunkt dieser Arbeit scheint **$\text{Na}_v1.7$** das am besten validierte Ziel für eine schmerztherapeutische Behandlung darzustellen. $\text{Na}_v1.7$ wird in kleinen Neuronen des Spinalganglions und in sympathischen Nerven exprimiert.²⁰ Der Kanal findet sich dabei präferentiell in nozizeptiven Fasern, ist jedoch auch in Einheiten der epikritischen Sensibilität zu finden.²¹ Nassar et al.²² konnten bei Nozizeptor-spezifischen $\text{Na}_v1.7$ -Knockout Mäusen eine Reduktion von akutem und inflammatorischem Schmerz nachweisen. Beim Menschen führt eine loss of function Mutation des $\text{Na}_v1.7$ -Gens SCN9A zum kompletten Verlust des Schmerzempfindens. Bei Betroffenen dieser

Einleitung

autosomal-rezessiv vererbten Krankheit sind alle übrigen sensorischen Qualitäten erhalten und es tritt keine sonstige Dysfunktion des autonomen, peripheren oder zentralen Nervensystems auf.²³ Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen bei Mäusen mit globalem $\text{Na}_v1.7$ -Defizit. Diese versterben kurz nach Geburt.²² Darüber hinaus sind auch gain of function Mutationen von *SCN9A* bekannt. Bei der Erythromelalgie und der paroxysmal extreme pain disorder kommt es über eine gesteigerte Funktion des Kanals zu verstärktem Schmerzempfinden.²⁴ Das Tarantulatoxin **ProToxin-II** ist ein selektiver $\text{Na}_v1.7$ -Inhibitor, der in elektrophysiologischen Untersuchungen am Nerven ohne Perineurium („desheathed“) zu einer Blockade der Aktionspotentiale von schmerzleitenden C- und auch $\text{A}\delta$ - Fasern führte. Am intakten Nerven war die Substanz dagegen aufgrund der Permeabilitätsbarriere des Perineuriums wirkungslos.²⁵

Opioidrezeptoren werden in drei primäre Typen (μ -Opioidrezeptor, MOR; δ -Opioidrezeptor, DOR; κ -Opioidrezeptor, KOR) unterteilt.²⁶ Das Wirkungsprofil der Rezeptoren in vivo unterscheidet sich. MOR vermitteln hauptsächlich Analgesie, Atemdepression, Miosis, Euphorie und Obstipation. Über KOR wird Analgesie, Miosis und Sedierung bewirkt. Die Stimulation von DOR führt ebenfalls zu Analgesie, daneben aber auch zu Dysphorie und Halluzinationen.²⁷ Alle drei Rezeptortypen werden verteilt über das gesamte Nervensystem gefunden. Dabei werden Opioidrezeptoren außerhalb des ZNS auch an peripheren Nervenendigungen nozizeptiver Fasern^{28,29} sowie in deren Axonen³⁰ exprimiert. Während die periphere Wirksamkeit von Opioiden am Nervenende, z.B. im Rahmen von intraartikulären Injektionen,³¹ relativ gut etabliert ist, wird die antinozizeptive Wirkung nach Injektion im Axonverlauf kontrovers diskutiert. Nach perineuraler Injektion sind unter normalen Bedingungen insbesondere hydrophile Opiode sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien ineffektiv.^{32,33} In entzündetem Gewebe konnten dagegen potente Effekte nachgewiesen werden.³⁴ Einen möglichen Grund dafür könnte die Öffnung des Perineuriums unter inflammatorischen Bedingungen darstellen. Nach Öffnung der Barriere des Perineuriums durch hypertone Lösungen (z.B. Mannitol oder 10 % NaCl) konnte auch im nicht-entzündeten Gewebe ein antinozizeptiver Effekt nach perineuraler Injektion von Opioiden nachgewiesen werden.^{34,35}

Sowohl die Opioidagonisten als auch der spezifische Na_v -Blocker ProToxin-II stellen pharmakologische Ansätze zur selektiven Blockade von Schmerzfasern dar. Allerdings

wird die Wirksamkeit beider Substanzgruppen *in vivo* stark durch die Permeabilitätsbarriere des Perineuriums eingeschränkt, welches ein Vordringen der Substanzen zu ihrem Wirkort verhindert. Eine vorübergehende Öffnung des Perineuriums würde damit einen vielversprechenden Ansatz bieten, das pharmakologische Spektrum für eine spezifische Blockade von nozizeptiven Fasern zu erweitern.

1.2 Das Perineurium als Diffusionsbarriere

1.2.1 Aufbau peripherer Nerven

Periphere Nerven stellen Bündel von Nervenfasern dar, die in verschiedene bindegewebshaltige Hüllen eingebettet sind. Das **Epineurium** umhüllt den gesamten Nerv und verbindet ihn mit seiner Umgebung. Das Innere des Nervens wird durch das **Perineurium** in Faszikel, Nervenfaserbündel, untergliedert. Einzelne Nervenfasern sind von **Endoneurium**, einem zartem Bindegewebe, umgeben.³⁶

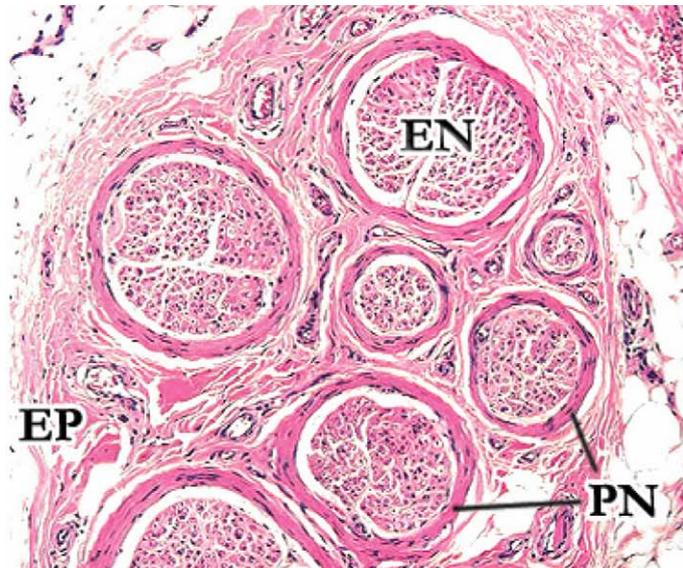


Abbildung 1: Querschnitt eines peripheren Nervens

Periphere Nerven beinhalten 3 strukturgebende Lamellen: Endoneurium (**EN**), Perineurium (**PN**) und Epineurium (**EP**) (Piña-Oviedo, *Adv Anat Pathol* 2008;15:147–164)

Eine besondere Bedeutung kommt in der vorliegenden Arbeit dem Perineurium zu. Es nimmt die Funktion einer Diffusionsbarriere ein (Perineuralscheide). Diese Scheide besteht aus mehreren Lamellen flacher Perineuralzellen, die sich mit Lagen von Kollagenfibrillen abwechseln.^{36,37} Entscheidend für die Barrierefunktion sind abdichtende Verbindungen zwischen den Perineuralzellen, sog. Tight Junctions (=Zonulae occludentes). Während Lokalanästhetika problemlos das Perineurium durchdringen können, ist dieses für polare und hydrophile Substanzen besonders von größerem Molekulargewicht nahezu undurchdringlich.

1.2.2 Molekulare Struktur der Tight Junctions

Tight Junctions (TJs) sind Proteinkomplexe, an deren Aufbau drei verschiedene molekulare Bausteine beteiligt sind: integrale Membranproteine (=Transmembranproteine), zytoplasmatische Plaque-Proteine (=Adaptorproteine) und Zytoskelettfilamente.³⁸ Insgesamt sind mehr als 40 verschiedene Proteine bekannt, die mit der Ausbildung von TJs assoziiert sind.³⁹ Die Gruppe der Transmembranproteine lässt sich in zwei große Familien, die der Claudine und die der TJ-assoziierten MARVEL-Proteine (TAMPs), unterteilen.⁴⁰ Beiden ist der Aufbau aus jeweils vier Transmembrandomänen gemeinsam. Zur Familie der TAMPs zählen Occludin, Tricellulin und MarvelD3. Alle TAMPs besitzen eine sog. MARVEL-Proteindomäne (MAL [myelin and lymphocyte] and related proteins for vesicle trafficking and membrane link).⁴¹ Ein zusätzliches, von diesen beiden Familien strukturell verschiedenes Transmembranprotein ist das junctional adhesion molecule (JAM).

1.2.2.1 Integrale Membranproteine

Occludin wurde 1993 als erstes Transmembranprotein der TJ-Familie entdeckt. Bei einer Größe von ca. 65 kDa besitzt es vier Transmembrandomänen und zwei extrazelluläre Schleifen. N- und C-Terminus der Aminosäurekette sind in Richtung Zytoplasma gerichtet.⁴² Die genaue Bedeutung von Occludin ist bis heute unklar. Die Menge an Occludin korreliert positiv mit dem Grad der TJ-Abdichtung in verschiedenen epithelialen Zelllinien.⁴³ Bei Transfektion in L-Fibroblasten, die natürlicherweise keine TJs ausbilden, sind jedoch nur wenige kurze TJ-artige Stränge in Gefrierbruchschnitten erkennbar.⁴⁴ TJs von embryonalen Stammzellen mit Occludin-Defizit zeigen keine signifikanten morphologischen oder funktionellen

Einleitung

Abweichungen.⁴⁵ In Occludin Knockout-Mäusen finden sich unauffällig entwickelte TJs, jedoch wurden komplexe Abweichungen im Phänotyp (z.B. Verringerung der postnatalen Wachstumsrate, Gastritis) beobachtet.⁴⁶ Vermutlich stellt Occludin also nicht den Grundbaustein der TJs dar, besitzt aber eine akzessorische, modulierende Funktion.

Auf der Suche nach weiteren Transmembranproteinen stieß man 1998 auf die Familie der **Claudine**. Furuse et al. gelang es, Claudin-1 und -2 als ca. 22 kDa große Proteine zu identifizieren.⁴⁷ Heute sind bei Säugetieren 27 verschiedene Mitglieder der Claudin-Familie bekannt.⁴⁸ Diesen gemeinsam ist eine molekulare Struktur mit vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen. Die beiden extrazellulären Schleifen nehmen, vergleichbar mit den Zähnen eines Reißverschlusses, Kontakt mit den entsprechenden Proteinabschnitten benachbarter Zellenmembranen auf.^{40,49} Über das C-terminale Ende der Proteine ist eine Interaktion mit Plaque-Proteinen möglich. Die Aminosäuresequenz der Claudine zeigt keine Ähnlichkeiten zu der von Occludin.³⁸ Claudine sind Schlüsselemente für Struktur und Funktion der TJs. Bei Transfektion von Claudin-1 in L-Fibroblasten werden TJs induziert, deren Struktur in Gefrierbruchschnitten stark dem TJ-Netzwerk in situ ähnelt.⁴⁴ Claudin-1 Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben kurz nach Geburt durch transepidermalen Flüssigkeitsverlust.⁵⁰ Das Ausmaß der „Abdichtung“ von Epithelien durch TJs scheint maßgeblich davon beeinflusst zu sein, welche Claudin-Isoformen exprimiert werden.⁴³ Einige Vertreter der Claudine besitzen dabei „abdichtende“ Eigenschaften, wie z.B. Claudin 1, 3 oder 5. Andere Claudine formen parazelluläre Poren, die den Durchtritt von Ionen und kleinen gelösten Substanzen erlauben.⁵¹ Beispielsweise ist das „durchlässige“ Claudin-2 vor allem im durchlässigen Epithel des proximalen Nierentubulus zu finden und fehlt in den undurchlässigeren distalen Segmenten.⁵² Diese verschiedenartige Funktionalität wird durch die beiden extrazellulären Schleifen der jeweiligen Claudine bestimmt. Es wird angenommen, dass die größere erste Schleife ausschlaggebend für die parazelluläre Abdichtung und selektive Ionenpermeabilität ist. Die zweite kleinere Schleife engt vermutlich den parazellulären Spalt ein und stabilisiert den Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellmembranen.⁵³ Von zusätzlicher Bedeutung ist die Phosphorylierung der Claudine durch verschiedene intrazelluläre Kinasen.⁴⁰ Beispielsweise führt die Phosphorylierung von Claudin-1 durch die Mitogen-

activated protein Kinase (MAP-Kinase) zu einer Verbesserung der Barrierefunktion, vermutlich durch Insertion von Claudin-1 in die TJ.⁵⁴ Beim erblichen Pseudohyperaldosteronismus Typ II führt die mutierte Kinase WNK4 dagegen zu einer vermehrten Phosphorylierung der Claudine 1-4 und zu einer erhöhten Chlorid-Permeabilität der Barriere.⁵⁵ Die durch Proteinkinase A (PKA) vermittelte Phosphorylierung von Claudin-3 führt zur Abschwächung der TJ-Barrierefunktion, möglicherweise durch gestörten Einbau von Claudin-3 in TJ-Stränge.⁵⁶

Tricellulin zählt wie Occludin zur Familie der TAMPs. Es scheint besonders in trizellulären Kontakten von Bedeutung zu sein, kann in geringerem Ausmaß jedoch auch an bizellulären TJs angetroffen werden.³⁸ Trizelluläre Kontakte stellen sich ultrastrukturell als eine Verlängerung der drei zusammenlaufenden bizellulären TJs nach basolateral dar. So wird eine vertikal orientierte Struktur aus drei TJ-Paaren und einem zentralen „Rohr“ gebildet. Diese zentrale Öffnung erlaubt bei geringer Expression von Tricellulin die Passage von Makromolekülen, bei erhöhter Tricellulin-Expression wird der Durchtritt größerer Moleküle blockiert.^{51,57}

MarvelD3 stellt das „jüngste“ Mitglied der TAMP-Familie dar. Es scheint mit Occludin und Tricellulin überlappende Funktionen zu besitzen, kann deren Ausfall jedoch nur teilweise kompensieren.⁴¹ TAMPs treten sowohl untereinander als auch mit Vertretern der Familie der Claudine in komplexe Wechselwirkungen und beeinflussen hierdurch die Struktur der TJs.⁵⁸

Im Gegensatz zu Claudinen und den Vertretern der TAMPs weisen die junctional adhesion molecules (**JAMs**) statt vier nur eine Transmembrandomäne auf. Sie gehören zur Immunglobulin-Superfamilie, bisher sind drei verschiedene JAMs bekannt. JAMs scheinen nicht direkt für Permeabilitätseigenschaften einer TJ verantwortlich zu sein, sind aber für deren Bildung und Stabilisation von Bedeutung.^{40,59}

1.2.2.2 Plaque-Proteine und Zytoskelett

Plaque-Proteine befinden sich im Zytoplasma direkt unterhalb der TJ-Membran. Ein großer Teil der Vertreter dieser TJ-Bausteine weist sog. PDZ-Domänen auf. Der Name leitet sich von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine ab, in denen PDZ-Domänen gefunden wurden: **P**SD95, **D**iscs large und **Z**onula occludentes-1. PDZ-Domänen stellen Module aus ca. 80-90 Aminosäuren dar, welche durch Interaktion mit spezifischen Sequenzen (PDZ-Bindemotiven) die Bindung an andere Proteine

vermitteln. So werden die oben beschriebenen integralen Membranproteine in den Aktin-Zytoskelettfilamenten verankert und es entsteht ein Proteingerüst durch Verbindungen der Plaque-Proteine untereinander. Neben dieser Funktion als Gerüstbausteine sind Plaque-Proteine an Signaltransduktionsprozessen an TJs beteiligt. Durch bislang unklare Mechanismen scheint eine Beeinflussung von Genexpression und Zellproliferation möglich.⁶⁰

1.2.3 Räumliche Organisation und Funktion der Tight Junctions

Tight Junctions sind essentieller Bestandteil verschiedener epithelialer Gewebe und erfüllen im Wesentlichen zwei unterschiedliche Funktionen.

Als „**Fence Function**“ bezeichnet man die Bildung einer strikten Grenze zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran der Epithelzellen. Zonulae occludentes schränken die Lateraldiffusion von integralen Membranproteinen innerhalb der Zellmembran ein. So wird eine Vermischung von Transmembranproteinen der apikalen und basolateralen Abschnitte verhindert, was die Grundvoraussetzung für eine polare Funktionalität und Bauweise der Epithelien darstellt.

Von entscheidender Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die „**Gate Function**“ oder „**Barrier Function**“. TJs schränken in unterschiedlichem Ausmaß die freie Diffusion von Molekülen durch den Interzellularspalt ein und regulieren so die parazelluläre Passage hydrophiler Substanzen.^{43,44}

Um die beschriebenen Funktionen erfüllen zu können, bilden TJs gürtelförmige Kontaktzonen zwischen den Membranen benachbarter Zellen aus. Die Transmembranproteine einer Plasmamembran interagieren dabei sowohl untereinander (cis-Interaktion) als auch mit den integralen Membranproteinen der angrenzenden Zelle (trans-Interaktion).⁴⁰ Die Membranproteine sind zu mehreren Verschlussleisten organisiert, welche als „TJ-strands“ mithilfe der Gefrierbruchtechnik sichtbar gemacht werden können.³⁹ TJs sind häufig Bestandteil sog. Haftkomplexe. Diese setzen sich von apikal nach basal aus Zonula occludens, Zonula adhaerens und Desmosom zusammen.³⁸

In der vorliegenden Arbeit spielen TJs vor allem als Bestandteil der unter 1.2.4 beschriebenen Blut-Nerven-Schranke in peripheren Nerven eine wichtige Rolle. Im Zusammenhang mit Schmerzen kommt ihnen darüber hinaus u.a. auch als Bestandteil des zentralen Korrelats dieser Barriere, der Blut-Hirn-Schranke, eine Bedeutung zu.

Peripherere entzündliche Schmerzen führen über eine veränderte Expression von TJ-Proteinen (Claudin-3, Claudin-5, Occludin, ZO-1) zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im ZNS und damit zu einer verbesserten Wirksamkeit von systemisch applizierten Opioiden. Dieser Effekt scheint durch eine verminderte Expression des transforming growth factor β (TGF- β) und dessen Rezeptor activin receptor-like kinase-5 (ALK5) vermittelt zu werden.^{61,62}

1.2.4 Tight Junctions in peripheren Nerven

Das Perineurium setzt sich aus einer äußeren Pars fibrosa mit mechanischer Funktion und einer weiter innen gelegenen Pars endothelia zusammen. Letztere nimmt die Funktion einer Diffusionsbarriere ein. Diese Perineuralscheide wird von mehreren konzentrisch angeordneten Lagen flacher Perineuralzellen gebildet, zwischen denen jeweils eine Schicht Kollagenfasern eingelagert ist. Jede Lamelle ist zu beiden Seiten von einer Basalmembran umgeben.³⁶ Entscheidend für die Barrierefunktion des Perineuriums sind TJs, die zwischen den Perineuralzellen ausgebildet werden. In immunhistochemischen Studien konnten Claudin-1 und -3, Occludin und ZO-1 als TJ-Proteine im Perineurium nachgewiesen werden.⁶³

Auch zwischen den Endothelzellen der endoneuralen Blutgefäße sind TJs etabliert, hier ist v.a. Claudin-5 von Bedeutung.^{64,65} Perineurium und endotheliale Barriere bilden zusammen die sog. Blut-Nerven-Schranke.⁶³ Diese ist für die Aufrechterhaltung eines konstanten endoneuralen Mikromilieus verantwortlich. In diesem spezialisierten *milieu inérieur* üben Axone, assoziierte Schwannzellen und andere residente Zellen ihre Funktion aus.⁶⁶ Eine Fehfunktion der Barriere führt zu Ödemen im Endoneurium und macht die Bestandteile des peripheren Nervensystems anfällig für schädliche Substanzen.⁶⁷ Nach Ligatur des N. ischiadicus bei Ratten konnte mittels Färbungsexperimenten ein Zusammenbruch und eine anschließende Wiederherstellung der Blut-Nerven-Schranke nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene geht dies mit Verlust und nachfolgender Regeneration der Tight Junction Proteine Claudin-1, Claudin-5 und Occludin einher.⁶⁷

Innerhalb des endoneuralen Milieus sind TJs auch in Myelinscheiden der peripheren Axone anzutreffen. Während der Myelogenese werden markhaltige Axone im peripheren Nervensystem mehrfach von Schwann-Zellen umwickelt. Durch

Kompaktierung der resultierenden membranösen Schichten kommt es zur Ausbildung der Myelinscheide, die der Isolation und der Verbesserung der Erregungsleitung des Axons dient. Claudin-19 ist wesentlicher Bestandteil von TJs innerhalb dieser Markscheide und trägt vermutlich zur Erfüllung der genannten Funktionen bei. So konnten in Claudin-19 Knockout-Mäusen Verhaltensabweichungen und Einschränkungen der Leitfähigkeit von peripheren Nervenfasern nachgewiesen werden.⁶⁸ Innerhalb des ZNS nimmt Claudin-11 in Oligodendrozyten eine vergleichbare Funktion ein.⁶⁹

1.3 Öffnung der perineuralen Barriere

1.3.1 Öffnung des Perineuriums durch hypertone Lösung

Opioide führen im entzündeten Gewebe zu einer deutlich ausgeprägteren Antinozizeption als im nicht entzündeten.⁷⁰ Im nicht entzündeten Gewebe lässt sich jedoch durch Koinjektion eines Opioids und einer hypertonen Lösung eine antinozizeptive Wirkung erzielen.³⁴

Die Injektion einer hypertonen Lösung (10 % NaCl oder Mannitol) und des selektiven MOR-Agonisten DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin) an den N. ischiadicus einer Ratte führt ipsilateral für ca. vier Stunden zu einer erhöhten Schmerzschwelle im Pfortendrucktest (PPT/Paw-Pressure-Test), wobei die Antinozizeption durch lokale Injektion von Naloxon vollständig inhibierbar ist (siehe Abbildung 2A). Ebenso wirkt die perineurale Koinjektion von ProToxin-II mit 10 % NaCl antinozizeptiv.⁷¹ Koinjektion der Substanzen mit 0,9 % NaCl bewirkt keine Antinozizeption. Grund für die Wirksamkeit der Substanzen im entzündeten Gewebe sowie bei Koinjektion mit 10 % NaCl ist die Öffnung der perineuralen Barriere. Der Farbstoff Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) kann unter Kontrollbedingungen nicht die Schranke des Perineuriums überwinden. Sowohl im entzündeten Gewebe als auch nach Injektion einer hypertonen Lösung öffnet sich die Barriere und auch endoneurale Bestandteile werden angefärbt^{34,35} (siehe Abbildung 2B).

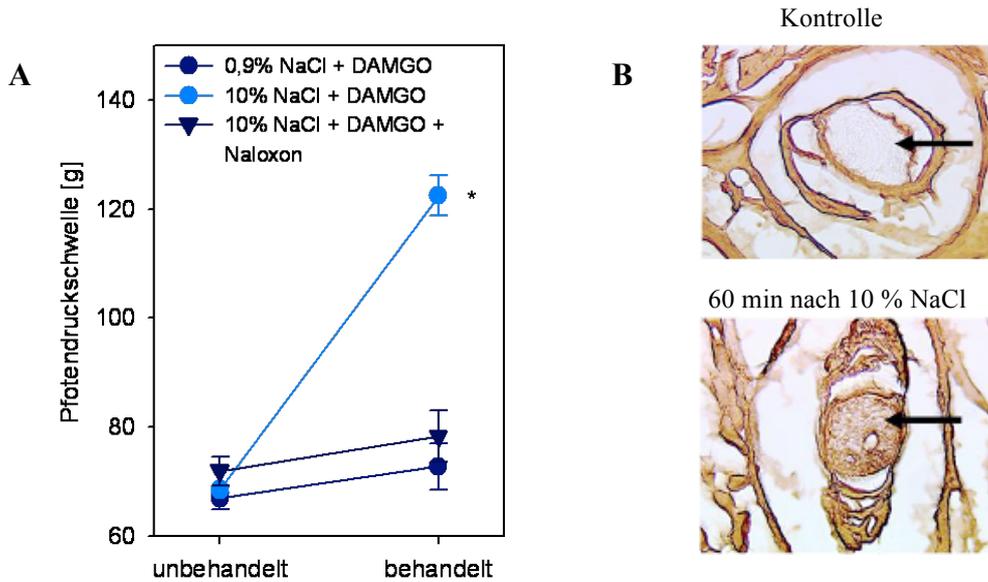


Abbildung 2: Öffnung des Perineuriums durch lokale Injektion von 10 % NaCl

(A) Antinozizeptive Wirkung bei perineuraler Koinjektion von Opioiden und hypertoner NaCl Lösung. Am N. ischiadicus wurden iso- bzw. hypertone NaCl-Lösung, DAMGO und ein Antagonist (Naloxon) injiziert und die nozizeptiven Schwellen in den Hinterpfoten vor und nach Injektion (* $p < 0,05$ ANOVA, $n = 7$) **(B)** Färbung mit Meerrettich-Peroxidase: unter Kontrollbedingungen verhindert das Perineurium die Anfärbung des Nerveninneren (Pfeil). Bei Applikation 1 h nach lokaler Injektion von 10% NaCl gelangt der Farbstoff durch die geöffnete Barriere ins Nerveninnere. (Rittner HL et al. Brain Behav Immun (2009) 23:548)

Molekulare Grundlage der Barriereöffnung bildet die Konzentrationsabnahme des Tight Junction Proteins **Claudin-1**. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte sowohl immunhistochemisch als auch in Western Blot Untersuchungen eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3).

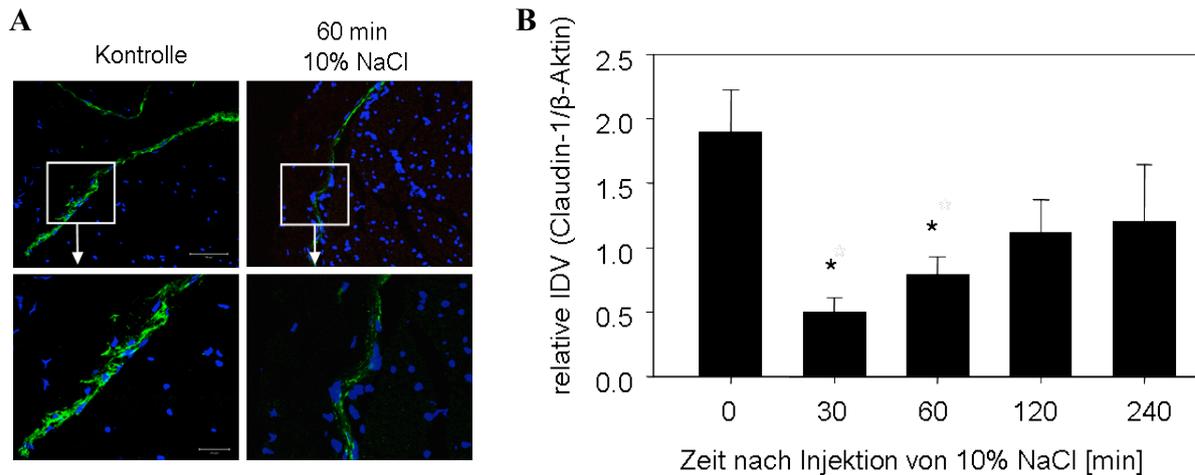


Abbildung 3: Injektion von 10 % NaCl reduziert die Claudin-1 Konzentration.

(A) Immunfluoreszenz mit Claudin-1 (grün) und Kernfärbung (DAPI, blau). Färbungen unter Kontrollbedingungen sowie 60 min nach Injektion von 10% NaCl. (B) Reduzierte Claudin-1 Expression 30-60 min nach Injektion von 10% NaCl. Proteinbanden von Western Blots wurden densitometrisch quantifiziert und das Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin bestimmt (* $p < 0,05$, ANOVA, $n = 4$, IDV = Integrated Density Value). (Hackel et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 17;109(29))

1.3.2 Matrix-Metalloproteinase 9 als Mediator der Barriereöffnung

Die durch hypertone Lösung induzierte Permeabilität des Perineuriums ist ein regulierter Vorgang, der sich spezifisch inhibieren lässt. Eine zentrale pathophysiologische Rolle kommt hierbei den **Matrixmetalloproteinasen** (MMPs) zu. MMPs stellen eine Familie von Zink-abhängigen Proteasen dar, von der beim Menschen bislang 23 verschiedene Mitglieder bekannt sind. Neben dem Zink-haltigen katalytischen Zentrum enthalten MMPs (mit Ausnahme von MMP7, 23 und 26) eine Hemopexin-artige Domäne, die unter anderem als Erkennungs-Sequenz für Substrate dient.⁷² MMPs werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) von verschiedenen Zellen in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Dabei ist das aktive Zentrum durch Interaktion seines Zinkatoms mit einem Cysteinrest des Propeptids blockiert. Die Dissoziation dieses intramolekularen Cystein-Zink-bezeichnet und führt zur Aktivierung der MMPs.⁷³ Die zentrale Funktion der MMPs besteht in der Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Damit spielen sie beim Umbau von Geweben z.B. im Rahmen der Wundheilungsprozesse eine wichtige Rolle und sind an der Entstehung

verschiedener Erkrankungen wie Atherosklerose, Arthritis oder invasiven Tumoren beteiligt.⁷⁴

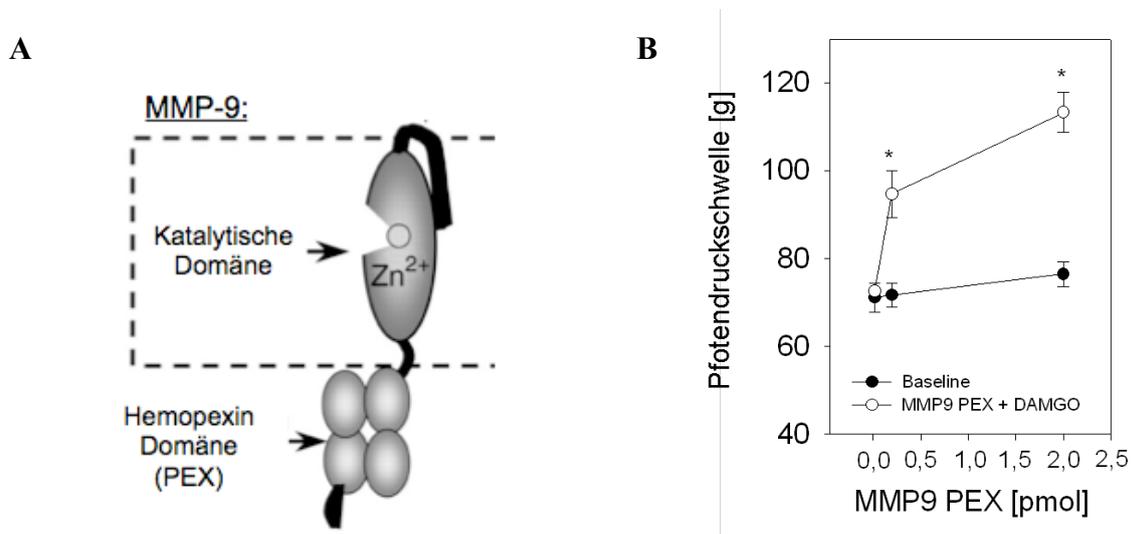


Abbildung 4: Öffnung des Perineuriums durch MMP9-PEX.

(A) Matrix Metalloproteinasen (MMPs) enthalten neben dem aktiven, katalytischen Zentrum die sog. Hemopexin-Domäne (PEX). (Murphy G et al. Ann Rheum Dis 2005 Nov;64 Suppl 4) **(B)** Die periphere Koinjektion von MMP-9 PEX und dem Opioidagonisten DAMGO führt zu einem Anstieg der Pfortendruckschwelle im Verhaltensexperiment. Die alleinige Injektion von DAMGO hat keinen antinozizeptiven Effekt. Die Öffnung des Perineuriums durch MMP-9 PEX erlaubt DAMGO, zu seinem Wirkort vorzudringen (* $p < 0,05$, ANOVA, $n = 6$).

Die **MMP9** (siehe Abbildung 4) hat eine zentrale Bedeutung bei der Öffnung des Perineuriums. Der Effekt ist jedoch nicht von der Proteinase-Einheit abhängig, sondern wird durch die Hemopexin-Domäne (**MMP9-PEX**) vermittelt. Durch Koinjektion einer 10 % NaCl-Lösung und eines gegen MMP9-PEX gerichteten Antikörpers lässt sich die antinozizeptive Wirkung von DAMGO aufheben.⁷¹ Durch perineurale Koinjektion von MMP9-PEX (ohne hypertone Lösung) zusammen mit DAMGO oder ProTx-II kann ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der nozizeptiven Schwellen ausgelöst werden (siehe Abbildung 4B). Auf molekularer Ebene führt die Injektion von MMP9-PEX wie 10 % NaCl zur Herabregulation von Claudin-1.⁷¹

Molekularer Angriffspunkt von MMP9-PEX ist der low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor. **LRP-1** gehört zur low density lipoprotein (LDL) Rezeptor Genfamilie. Deren Mitglieder fungieren als Scavenger-Rezeptoren und ermöglichen die rezeptorvermittelte Endozytose verschiedener Moleküle. LRPs beeinflussen z.B. über die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants den Cholesterinmetabolismus⁷⁵ und sind durch die Resorption verschiedener Proteasen an der Steuerung der proteolytischen Aktivität im extrazellulären Milieu beteiligt.⁷⁶ So konnte die Internalisierung der beiden Proteasen tissue plasminogen activator (tPA)⁷⁷ und MMP9⁷⁸ durch Interaktion mit LRP nachgewiesen werden. Daneben ist jedoch auch eine Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege durch verschiedene Liganden der LRP-Rezeptoren möglich. Interessanterweise fallen darunter z.T. auch Substanzen, deren Endozytose durch LRP vermittelt wird. MMP9 interagiert über die PEX-Domäne mit LRP-1 und stimuliert durch eine verstärkte Phosphorylierung der intrazellulären Signalproteine Akt (Proteinkinase B) und extracellular-signal regulated kinase (Erk) die Migration von Schwanzzellen.⁷⁹ In embryonalen sensorischen Nervenzellen führt die Interaktion der rezeptorbindenden Domäne von α -Makroglobulin mit LRP-1 zu einer verstärkten neurotrophischen Aktivität und zur vermehrten Phosphorylierung von Erk.⁸⁰ Endozytoseaktivität und Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege können durch Blockade von LRP durch das 39 kDa große receptor-associated protein (RAP) aufgehoben werden.^{79,81-83}

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine Beteiligung von LRP-1 an der Öffnung des Perineuriums nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen zeigen eine Kolokalisation von LRP-1 und Claudin-1 im Perineurium. Perineurale Applikation von MMP9-PEX und DAMGO zusammen mit dem LRP-1 Antagonisten RAP verhindert den antinozizeptiven Effekt, der bei Injektion von MMP9-PEX und DAMGO zu beobachten ist.⁷¹

1.3.3 Erk und Akt als potentielle intrazelluläre Vermittler der Barriereöffnung durch MMP9

Ausgehend von den Vorarbeiten von Campana et al.⁷⁹ wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die Interaktion von MMP9-PEX und LRP-1 über eine verstärkte Aktivierung (=Phosphorylierung) der intrazellulären Signalproteine Erk und Akt (pErk

Einleitung

und pAkt) zur Konzentrationsabnahme von Claudin-1 und damit zur Öffnung der perineuralen Barriere führt. Diese Theorie wird durch Verhaltensexperimente mit dem pErk-Inhibitor PD98059 gestützt. Der antinozizeptive Effekt, der bei peripherer Koinjektion von 10% NaCl und DAMGO zu beobachten ist, wird durch die zusätzliche Applikation von PD98059 aufgehoben.⁷¹

Erk ist eine Serin/Threoninkinase und gehört zur Familie der mitogen-activated protein Kinasen (MAPK). Die Phosphorylierung, d.h. Aktivierung, der MAPK geht im Allgemeinen von verschiedenen extrazellulären Stimuli aus, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder eine Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen zu einer Aktivierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen (z.B. Ras) führen. Die GTP-bindenden Proteine starten dann eine Phosphorylierungs-Kaskade. Dabei aktivieren MAPK Kinase Kinasen (MAP3K, z.B. Raf) MAPK Kinasen (z.B. MEK), die letztlich zur Phosphorylierung der verschiedenen MAPK (z.B. Erk) führen.¹ Der resultierende pErk-Spiegel ergibt sich aus der Balance zwischen den beschriebenen vorgeschalteten Kinasen und der Deaktivierung durch Phosphatasen. Da die Phosphorylierung sowohl des Threonin- als auch des Tyrosin-Restes für die Aktivität von pErk notwendig ist, genügt die Dephosphorylierung an einer Stelle zur Inaktivierung. Dies geschieht u.a. durch sog. „dual specificity (threonine/tyrosine) protein phosphatases“ (DUSPs).⁸⁴ Darüber hinaus wird der pErk-Spiegel auf verschiedenen Ebenen durch Feedback-Mechanismen gesteuert: pErk phosphoryliert den GTP-Austauschfaktor SOS, dadurch kommt es zur Desensibilisierung des GTP-bindenden Proteins Ras für externe Stimuli.⁸⁵ Hyperphosphorylierung der MAP3K Raf durch pErk führt zur verminderten Aktivierung der MAP2K MEK, daraus resultiert eine verminderte Phosphorylierung von Erk.⁸⁶ pErk vermittelt die Induktion seiner eigenen Dephosphorylierung durch Aktivierung verschiedener Phosphatasen (z.B. DUSP6).⁸⁷

Einleitung

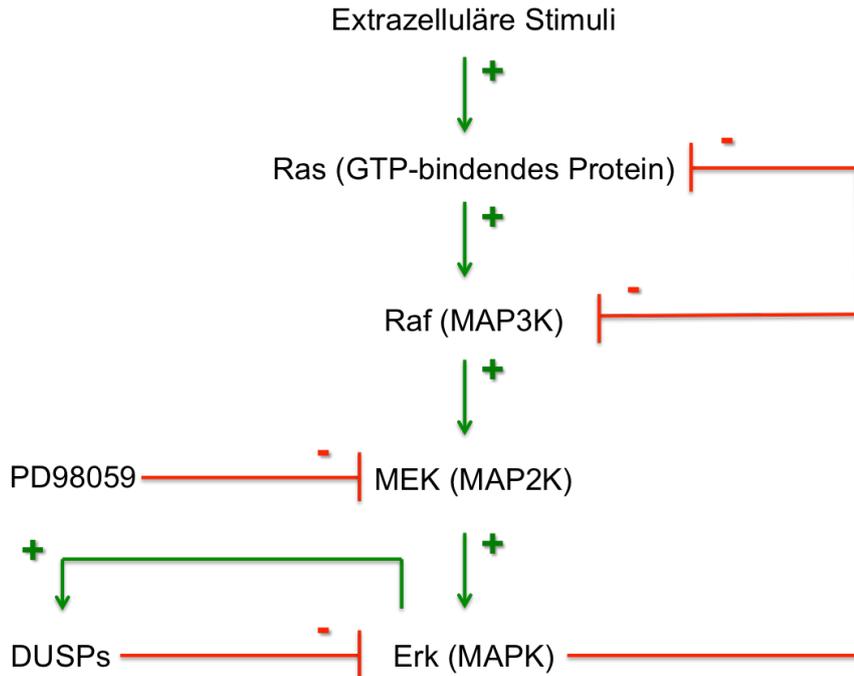


Abbildung 5: Beeinflussende Faktoren der pErk Konzentration.

Übersicht über Bestandteile der MAPK-Kaskade. +: Aktivierende Stimuli, -: inhibitorische Stimuli. Genaue Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach White *et al.*¹

PD98059 hemmt die vorgeschaltete mitogen-activated erk kinase (MEK). Da Erk 1 und 2 die einzigen bekannten Substrate der MEK darstellen, bedeutet eine MEK-Inhibition eine spezifische Blockade der Aktivierung (=Phosphorylierung) von Erk.⁸⁸

Akt = Proteinkinase B (PKB) ist ebenfalls eine Serin/Threoninkinase, die vor allem durch Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3), einen sekundären Botenstoff, der durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) generiert wird, aktiviert werden kann. Akt ist an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie Proliferation, Migration oder Differenzierung beteiligt.⁸⁹

1.3.4 Tissue-type plasminogen activator als potentieller Mediator der Barriereöffnung

Tissue-type plasminogen activator (tPA) ist eine Serinprotease, die in erster Linie für ihre Beteiligung an der Fibrinolyse von Blutgerinnseln bekannt ist. Durch tPA wird das im Blut zirkulierende Plasminogen zu Plasmin aktiviert, welches fibrinolytische Aktivität besitzt.⁹⁰ Gentechnologisch hergestelltes tPA (recombinant tissue-type

plasminogen activator [rtPA], Alteplase) wird therapeutisch zur Auflösung von Thromben benutzt, insbesondere bei der Behandlung von akuten Schlaganfallpatienten.⁹¹

Ebenso wie für MMP9 ist für tPA eine Interaktion mit dem LRP-1 Rezeptor beschrieben. In Studien an der Blut-Hirn-Schranke wurde eine Öffnung dieser Barriere durch Bindung von tPA an LRP-1 nachgewiesen.⁸³ Wie nach der Interaktion von MMP9 und LRP-1 wird auch nach Interaktion von tPA und LRP-1 eine vermehrte Phosphorylierung des Signalproteins Erk beobachtet.^{92,93} Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde die Vermutung angestellt, dass auch tPA durch Interaktion mit LRP-1 zu einer Phosphorylierung von Erk und zur Öffnung der perineuralen Barriere führen könnte. Ein großer Vorteil vor dem Hintergrund einer klinischen Anwendung wäre, dass tPA bereits breite klinische Anwendung findet⁹¹, die Substanz also schon zugelassen und gut auf dem Markt verfügbar ist.

1.4 Fragestellung der Promotion

Erstes Ziel der Promotionsarbeit ist es, intrazelluläre Signalwege bei der Öffnung des Perineuriums darzustellen. Ausgehend von den Vorarbeiten von Campana⁷⁹ lautet die Arbeitshypothese, dass durch die Interaktion der MMP9-PEX Domäne mit dem LRP-1 Rezeptor die Phosphorylierung von Akt und Erk aktiviert wird. Um diese Vermutung zu untersuchen, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Kommt es nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl bzw. MMP9 zur verstärkten Phosphorylierung von Akt und/oder Erk?
- In welchem Kompartiment peripherer Nerven (Perineurium oder Nerveninneres) tritt die verstärkte Phosphorylierung von Akt und/oder Erk auf?
- Kann die Abnahme des Claudin-1 Gehalts nach peripherer Injektion einer 10 % NaCl-Lösung durch den Erk-Inhibitor PD98059 blockiert werden?

Im zweiten Teil der Arbeit soll tPA als möglicher medikamentöser Ansatz zur Öffnung der perineuralen Barriere untersucht werden:

- Ist nach perineuraler Injektion von tPA eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 zu beobachten? Welche tPA-Dosierung ist dazu notwendig? Kann der Effekt auch durch enzymatisch inaktiviertes tPA erzielt werden?
- Ist nach perineuraler Injektion von tPA eine verstärkte Phosphorylierung von Erk zu beobachten? Welche tPA-Dosierung ist dazu notwendig?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Tierversuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 180 – 220 g verwendet. Die Ratten wurden unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall des Zentrums für operative Medizin, Oberdübacher Str. 6, 97080 Würzburg gehalten. Bei einem 12 h Tag - 12 h Nacht-Rhythmus und Raumtemperatur (20 – 25° C) hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter. Alle Eingriffe wurden unter Kurznarkose mit Isofluran durchgeführt. Die Genehmigung für die Tierversuche wurde von der zuständigen Tierschutzbehörde erteilt.

2.2 Verwendete Geräte und Materialien

- **Geräte:**

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>
Blotkammer Fast Blot B44	Biometra
Chemilumineszenzdetektor FluorChem FC2	Alpha Innotech
Deckgläser	Hartenstein
Inkubator Steri-Cult 2000	Forma Scientific
Kryostat CM3050S	Leica
Mikroskop BX51	Olympus
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise	Tecan
Mikrowellplatten (96 well)	Nunc
Nervenstimulator Stimuplex HNS12	B.Braun
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman
Objektträger Histo Bond	Marienfeld
Power Supply Peq Power E300	Peqlab
Ultraschall-Homogenisator HD 3080	Bandelin
Varipette	Eppendorf
Blottingpapier	Whatman
Zentrifuge Centrifuge 5418R	Eppendorf

Tabelle 2: Verwendete Geräte

• **Verwendete Chemikalien:**

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>
Albumin Standardlösung	Thermo Scientific
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce
Complete Mini Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten	Roche
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd 37 % Lösung	Merck
Glycin	AppliChem
HCl	Merck
HEPES	AppliChem
Lumi Light Plus Western Blotting Kit	Roche
Methanol	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Steriles Wasser Aqua	B.Braun
Sucrose	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vecta Shield Hard Set H-1400 Eindeckmedium	Vector

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Nicht aufgeführt sind mit Hilfe der gelisteten Chemikalien selbst angesetzte Lösungen. Auf diese soll an der Stelle ihrer jeweiligen Verwendung später einzeln eingegangen werden.

• **Inhibitoren und Enzyme:**

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>
Actilyse (tPA)	Boehringer Ingelheim
Non-enzymatic human tPA	Molecular Innovations
MMP9	Calbiochem Merck
PD 98059 (pErk Inhibitor)	Calbiochem Merck

Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren und Enzyme

2.3 Perineurale Injektion

Unter Kurznarkose mit Isofluran wurden die Nn. ischiadici der Ratten mit Hilfe eines Nervenstimulators (Stimuplex HNS12) in einer vergleichbaren Technik wie bei Patienten aufgesucht. Eine an die Apparatur angeschlossene 22 G-Nadel wurde von der Dorsalseite des Beines aus und distal des Os ischii durch Haut und oberflächliche Faszien vorgeschoben. Unter Applikation von wiederholenden elektrischen Impulsen mit einer Stärke von 0,4 mA wurde dann zunächst grob die Lokalisation des N. ischiadicus aufgesucht. Die Nähe zum Nerven war dabei durch die Plantarflexion der Rattenpfote, synchron zu den Impulsen des Nervenstimulators, zu erkennen. Zur Feineinstellung wurde anschließend die Impulsstärke bis auf 0,2 mA reduziert und dabei die Nadelposition bestimmt, an der der größte Bewegungsaus Schlag zu beobachten war. Je nach Versuchsaufbau wurden MMP9, 10 % NaCl-Lösung, tPA oder der Erk Inhibitor PD 98059 injiziert. Das gesamte Injektionsvolumen betrug dabei stets 300 µl. Nach Applikation der jeweiligen zu untersuchenden Substanzen und dem Verstreichen einer vorher festgelegten Zeitspanne wurden die Ratten gemäß dem Tierschutzprotokoll durch intrakardiale Injektion von 300 µl T61 (Embutramid) getötet. Die Nn. ischiadici wurden dann entnommen und für Western Blot oder Immunhistochemie aufgearbeitet.

2.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine der aufgearbeiteten Proben zunächst durch Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Im zweiten

Schritt („Blotten“) werden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo die Proteinbanden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden können. Dabei ist der Primärantikörper gegen ein Antigen des gesuchten Proteins gerichtet. Enzymmarkierte Sekundärantikörper binden wiederum an den konstanten, unspezifischen Teil des Primärantikörpers. Sie vermitteln eine Chemilumineszenz-Reaktion und können die markierten Banden so sichtbar machen.

2.4.1 Probenaufarbeitung

Den Ratten entnommene Nn. ischiadici wurden direkt nach der Präparation in jeweils 500 µl Zytosol-Lysepuffer mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail gegeben und mit Hilfe von Flüssigstickstoff kryokonserviert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben wieder aufgetaut. Die Nerven wurden geschnitten, mit Hilfe von Mikropistilles zerrieben, wiederholt durch eine 21 G Nadel aufgezogen und mittels Ultraschall homogenisiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben zunächst bei 4°C und 450 g für 10 min zentrifugiert, um nicht gelöste Gewebebestandteile vom weiterverwendeten Überstand abtrennen zu können. Dieser wurde für 1 h bei 20.000 g erneut zentrifugiert, um die Proteine der Membran- und Zytosolfraction voneinander zu trennen. Der Überstand wurde mit den enthaltenen zytosolischen Proteine abpipettiert (Zytosolfraction). Die im Pellet abgesetzten Membranproteine wurden durch Zugabe von 50 µl Membran-Lysepuffer gelöst (Membranfraction). Für die nachfolgenden Schritte (Proteinkonzentrationsbestimmung und Western Blot) wurde bei Claudin-1 Blots die Membranfraction, bei Erk/Akt Blots die Zytosolfraction verwendet³⁵.

Zytosol-Lysepuffer:	Membran-Lysepuffer:
<ul style="list-style-type: none">• 120 mM NaCl• 25 mM HEPES pH 7,6• 2 mM EDTA• 25 mM NaF• 1 % Triton X	<ul style="list-style-type: none">• 25 mM HEPES pH 7,6• 2 mM EDTA• 25 mM NaF• 1 % SDS

Tabelle 5: Zytosol-Lysepuffer und Membran-Lysepuffer; vor Benutzung wurden jeweils 10 ml mit einem Protease-Inhibitorcocktail (complete mini) versehen.

2.4.2 Trennung von Nerv und Nervenscheide

Für einige Experimente war zusätzlich eine Trennung von Nerv und Nervenscheide notwendig. Nach Behandlung mit 300 µl 10 % NaCl wurden nach 0,5 h die Nn. ischiadici der Ratten entnommen. Unter einem Mikroskop wurde mit Hilfe feiner Pinzetten eine Auftrennung in Nerv und Nervenscheide vorgenommen. Die beiden Kompartimente wurden dann getrennt wie unter 2.4.1 beschrieben aufgearbeitet und im Western-Blot jeweils auf ihren Gehalt an pErk und Erk untersucht.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA Assay)

Prinzip des BCA Assays:

Im Rahmen der Biuretreaktion entstehen in einer alkalischen, kupferhaltigen Umgebung bei Zugabe von Proteinen quantitativ einwertige Kupferionen (Cu^+). Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit Cu^+ einen violetten Komplex (siehe Abbildung 6), dessen Menge bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann⁹⁴. Hintergrund und Ziel der Proteinquantifizierung ist es, in der folgenden Gelelektrophorese für jede Probe eine gleiche Menge an Proteinen auftragen zu können. Erst damit wird es möglich, Aussagen über den Konzentrationsverlauf bestimmter Eiweißmoleküle zu treffen.

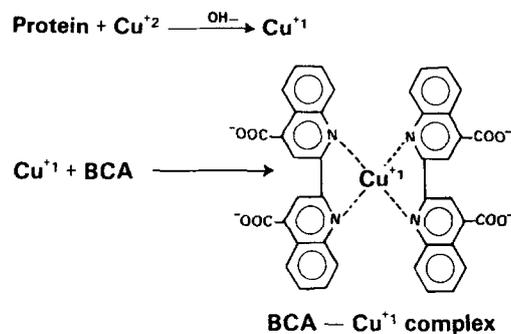


Abbildung 6: Bildung eines violetten Komplexes durch BCA und Cu^+ aus der Biuretreaktion. (Smith et al. Analytical Biochemistry 150, 76-85 (1985))

Protokoll:

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in der Zytosolfraction wurden 10 µl der aufgearbeiteten Proben zunächst mit Zytosol-Lysepuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Analog wurden 5 µl der Membranfraction mit Membran-Lysepuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt. Auf einer 96-well Mikrotiterplatte wurden dann in je drei

nebeneinanderliegende Nöpfchen jeweils 25 µl einer verdünnten Probe pipettiert. Im nächsten Schritt wurden dazu je 200 µl des BCA Protein Assay Reagenz gegeben. Dessen Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:50 angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm mit einem Photometer gemessen. Parallel wurde mit Hilfe einer Standardlösung von bovinem Serumalbumin (BSA) eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Lysate ermittelt werden konnte.

2.4.4 SDS-Gelelektrophorese

Prinzip der SDS-Gelelektrophorese:

Ziel der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es, Proteine nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen. Das anionische Detergenz SDS nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein. Zum einen führt es durch Störung der Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Aufbruch der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Damit diese Denaturierung vollständig erfolgt, werden die Proben zusätzlich auf ca. 95°C erhitzt und mit β -Mercaptoethanol vermischt, welches zusätzlich Disulfidbrücken aufzubrechen vermag. Zum anderen besitzt SDS eine sehr starke negative Ladung und bindet in einem festen Verhältnis an Proteine (ein Molekül SDS auf zwei Aminosäurereste, pro 1 g Protein binden ca. 1,4 g SDS). Dadurch werden die unterschiedlichen Ladungen der verschiedenen Proteine maskiert und die Moleküle stattdessen mit einer weitgehend einheitlichen negativen Ladung versehen.

Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben in die Taschen eines Polyacrylamidgels geladen. Bei angelegter Spannung wandern die SDS-markierten Proteine einheitlich in Richtung Anode und werden zunächst im Sammelgel konzentriert. Das folgende Trenngel hat eine Siebfunktion inne. Je kleiner die Proteinmoleküle, desto leichter fällt es ihnen, sich durch die Gelporen zu bewegen und umso höher ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Um die Proteinmasse später ablesen zu können, wird zusätzlich ein Marker mit angefärbten Standardproteinen bekannter Größe aufgetragen.

Protokoll der SDS-Gelelektrophorese:

Zur Beladung einer Geltasche wurde jeweils das Volumenäquivalent von 10 µg Protein einer Probe mit Zytosol-Lysepuffer (Zytosolfraktion) bzw. Membran-Lysepuffer

Material und Methoden

(Membranfraktion) und Ladepuffer auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt. Das Verhältnis des Ladepuffers zum Gesamtvolumen war dabei 1:5. Das Gemisch wurde für ca. 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Sammel- und Trenngel wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 6 selbst hergestellt und in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Kammer gesetzt. Je 15 µl der Proben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen eingefüllt. Um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren wurde in Experimenten mit Proben der Zytosolfraktion zunächst für ca. 15 Minuten eine Spannung von 90 V angelegt bis die Lauffront im Trenngel angekommen war. Dort lief die Elektrophorese ca. 90 Minuten bei 120 V bis die unterste angefärbte Bande des Markers das Ende der Kammer erreicht hatte. Analog wurde bei Experimenten mit Proben der Membranfraktion zunächst für ca. 45 Minuten eine Spannung von 50 V angelegt, die dann für etwa 120 Minuten auf 100 V erhöht wurde.

Elektrophoresegel:

<u>Material:</u>	<u>Sammelgel</u>	<u>12% Trenngel</u>
H ₂ O	2,85 ml	3,35 ml
3M TRIS pH 8,8	-	2,5 ml
0,5 M TRIS pH 6,8	1,25 ml	-
10% SDS	50 µl	100 µl
Acrylamid	850 µl	4ml
10% APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung des Elektrophoresegels

<u>Elektrophoresepuffer:</u>	<u>Ladepuffer (5x):</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 192 mM Glycin • 0,1 % SDS 	<ul style="list-style-type: none"> • 62,5 mM Tris pH 6.,8 • 2 % SDS • 10 % Glycerol • 1 % MSH • 1 % Bromphenolblau

Tabelle 7: Elektrophoresepuffer und Ladepuffer

2.4.5 Proteintransfer durch Western Blot

Beim eigentlichen „Blotten“ werden die Proteine durch eine senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem semi-dry Verfahren werden vier Whatman-Papiere, eine Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel nach folgendem Schema zusammengesetzt:

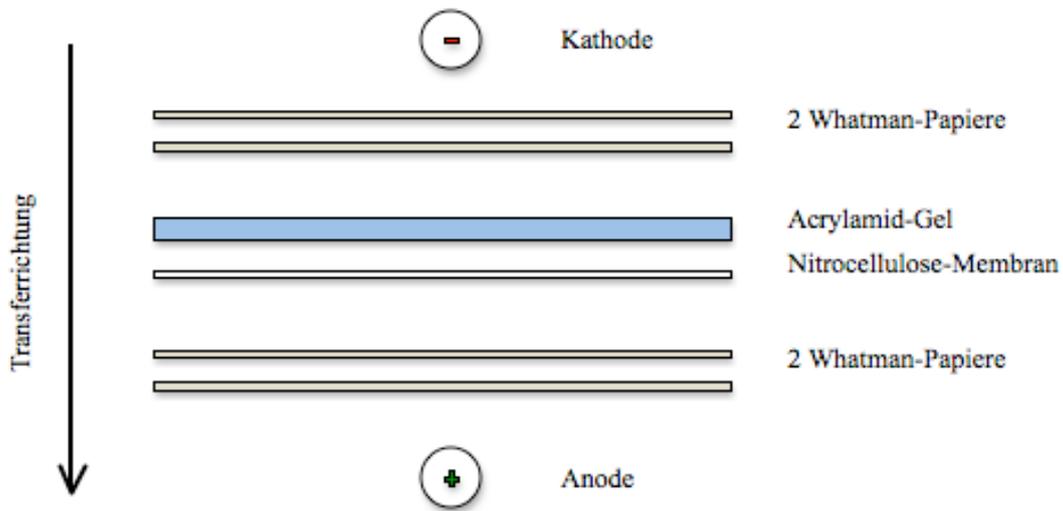


Abbildung 7: Schemazeichung des Semi-Dry Systems

Vor Zusammenbau des Systems wurden dabei Whatman-Papiere und Nitrocellulosemembran für ca. 5 Minuten in Semi-Dry Puffer eingeweicht. Der Transfer wurde bei einer Spannung von 15 V und einer Stromstärke von 0,2 – 0,4 A über 90 Minuten durchgeführt.

Semi-Dry Puffer (1x):

- 192 mM Glycin
- 25 mM Tris
- 20 % Methanol

Tabelle 8: Semi-Dry Puffer

2.4.6 Coomassie-Färbung

Durch die Anfärbung mit Coomassie-Blau können Proteinbanden im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden und so eine erste Aussage zur Proteinquantifizierung getroffen

werden. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch und reversibel an basische Seitenketten der Aminosäuren.

Die Polyacrylamid-Gele wurden zunächst für 10 Minuten mit Coomassie-Blau angefärbt, anschließend 15 Minuten in eine Entfärbelösung gegeben. Die Entfärbung wurde dann über Nacht mit Aqua dest. fortgeführt und die Gele am nächsten Tag abfotografiert.

<u>Coomassie Blau (0,5 l):</u>	<u>Entfärbelösung:</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Serva-Blau G250 1,25 g • Isopropanol 227 ml • Aqua dest. 227 ml • Essigsäure 46 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Essigsäure 10 % • Methanol 30 % • Aqua dest. 60 %

Tabelle 9: Coomassie Blau und Entfärbelösung

2.4.7 Immundetektion

Prinzip der Immundetektion:

Die Immundetektion dient der Visualisierung spezifischer, auf die Nitrocellulosemembran übertragener Proteinbanden. Dabei wird zunächst ein Primärantikörper eingesetzt, der direkt an ein Antigen des gesuchten Proteins bindet. Dieser Komplex wird mit Hilfe eines Sekundärantikörpers sichtbar gemacht, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und an den ein farbgebendes Enzym, z.B. Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt ist. HRP setzt die Substanz Luminol in ihre oxidierte Form um, deren Chemilumineszenz durch zusätzliche Geräte detektiert werden kann. Im verwendeten ECL-Gemisch ist Luminol in Lösung I enthalten. Damit die beschriebene Reaktion ablaufen kann, ist zusätzlich die H₂O₂-haltige Lösung II erforderlich. Um eine unspezifische Bindung der Primärantikörper zu verhindern, müssen die entsprechenden Bindungsstellen mit Hilfe einer Blockierlösung abgesättigt werden.

Protokoll der Immundetektion:

Nach erfolgtem Membrantransfer wurde das Polyacrylamidgel wie oben beschrieben mit Coomassie-Blau angefärbt. Mit der Nitrocellulosemembran wurden nacheinander folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Material und Methoden

<u>Dauer:</u>	<u>Vorgang:</u>
5 min	Waschen mit TBS-Tween
60 min	Blockieren mit ca. 40 ml Blockierlösung bei Raumtemperatur (RT)
5 min	Waschen mit TBS-Tween
Über Nacht	Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C
3 x 10 min	Waschen mit TBS-Tween
90 min	Inkubation mit Sekundärantikörper in Blockierlösung bei RT
3 x 10 min	Waschen mit TBS-Tween

Tabelle 10: Arbeitsschritte der Immundetektion

<u>TBS-Tween :</u>	<u>Blockierlösung:</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris • 150 mM NaCl • 0,1 % Tween-20 	<ul style="list-style-type: none"> • 2,5 % BSA • 2,5 % Milchpulver • in TBS-Tween gelöst

Tabelle 11: TBS-Tween und Blockierlösung

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden dabei nach dem in Tabelle 12 und 13 dargestellten Schema angesetzt. Anschließend wurde die Membran in einer Mischung der ECL-Lösungen I und II des Lumi Light Plus Western Blotting Kit (Roche) mindestens eine Minute inkubiert. Die lumineszierenden Banden wurden mit dem FluorChem 2 System (Alpha Innotech) fotografiert.

Um quantitative Aussagen zum Konzentrationsverlauf der Proteine nach Behandlung treffen zu können, war es zusätzlich notwendig, Banden von unbeteiligten Proteinen zur Ladekontrolle zu bestimmen. Nach Auswertung der Banden, die durch das erste Set von Primär- und Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurden, wurden dazu die Arbeitsschritte der Immundetektion mit einem zweiten Set von Primär- und Sekundärantikörper wiederholt. Als Ladungskontrolle für Erk, Akt und deren phosphorylierte Formen diente dabei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als Ladekontrolle für Claudin-1 wurde β -Aktin verwendet.

Material und Methoden

<u>Antigen:</u>	<u>Primärantikörper:</u>
Akt	Polyklonaler AK Kaninchen Cell Signaling #9272 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
β-Aktin	Monoklonaler AK Maus Sigma #A5441 1:10.000 in 5 % BSA in TBS-Tween
Claudin-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #51-9000 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
GAPDH	Monoklonaler AK Maus Millipore #MAB374 1:2000 in 5 % BSA in TBS-Tween
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Polyklonaler AK Kaninchen Cell Signaling #9102 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
Phospho-Akt	Polyklonaler AK Kaninchen Cell Signaling #9271 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Polyklonaler AK Kaninchen Cell Signaling #9101 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper

Als Sekundärantikörper wurden für die zugehörigen Primärantikörper verwendet:

<u>Primärantikörper:</u>	<u>Sekundärantikörper:</u>
Akt, p44/42 MAPK (Erk1/2), Phospho-Akt, Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Anti-Kaninchen IgG GE Healthcare #NA934 1:2000 in Blockierlösung
β-Aktin	Anti-Kaninchen IgG GE Healthcare #NA9310 1:3000 in Blockierlösung
Claudin-1	Anti-Kaninchen IgG Roche Lumi-Light WB Kit #2015218 1:1000 in Blockierlösung
GAPDH	Anit-Maus IgG GE Healthcare #NA9310 1:3000 in Blockierlösung

Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper

2.4.8 Densitometrie

Das Verfahren der Densitometrie wurde zur semiquantitativen Analyse der Western Blots eingesetzt. Dabei wird computergestützt die optische Dichte (Integrated Density Value, IDV) von Proteinbanden bestimmt, die in linearem Zusammenhang mit der vorhandenen Proteinmenge steht.

Die densitometrischen Analysen der Proteinbanden wurden mit der Software Alpha View (Alpha Innotech) durchgeführt. Es wurde nach dem Schema $IDV(\text{Protein X})/IDV(\text{Ladkontrolle})$ stets das Intensitätsverhältnis zwischen einer Bande des zu untersuchenden Protein X und der zugehörigen Ladungskontrolle errechnet.

2.5 Immunfluoreszenzfärbung

2.5.1 Probenaufarbeitung

Entnommene Nn. ischiadici wurden direkt nach der Präparation in Tissue Tek eingelegt. Mit Hilfe von 21 G Nadeln wurden sie in Längsrichtung ausgestreckt und so in einem zylindrischen Plastikgefäß fixiert. Anschließend wurden die Proben in Flüssigstickstoff kryokonserviert.

Am Kryostaten CM3050S (Leica) wurden 7 µm dicke Querschnitte der Nerven angefertigt und auf Histo Bond Objektträger (Marienfeld) übertragen. Die Schnitte wurden bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Das Grundprinzip der indirekten Immunfluoreszenz ähnelt dem der Western Blot Untersuchungen. Die angefertigten Schnitte werden zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen ein Antigen des gesuchten Proteins gerichtet ist. Um diesen Komplex sichtbar zu machen, wird in einem zweiten Schritt ein fluoreszierender Sekundärantikörper eingesetzt. Die Technik der indirekten Immunfluoreszenz hat gegenüber dem Western Blot den Vorteil, dass zusätzlich Aussagen über die Lokalisation der vermuteten molekularen Prozesse getroffen werden können.

2.5.3 Protokoll der Claudin-1 Färbung

Zunächst wurden die Schnitte 10 min mit Aceton bei 4°C fixiert. Nach einem Waschvorgang über 10 min mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden sie 120 min mit 1 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Proben wurden anschließend erneut mit PBS gewaschen (20 min) und 60 min mit 3 % BSA und 1 % Normalem Ziegen Serum (NGS) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 14) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst mit PBS gewaschen (30 min), dann 60 min mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 14) bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Nervenquerschnitte 10 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) behandelt. Sie wurden nachfolgend 40 min in PBS gewaschen und abschließend mit Vecta Shield Mounting Medium eingedeckt. Die Lagerung der fertigen Färbungen erfolgte bei 4°C.

Verwendete Antikörper:

<u>Primärantikörper:</u> Claudin-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #51-9000 1:100 in PBS
<u>Sekundärantikörper:</u> Alexa Fluor 488	Polyklonaler AK Esel anti-Kaninchen Invitrogen #A-21206 1:600 in PBS

Tabelle 14: Verwendete Antikörper der Claudin-1 Färbung

2.5.4 Fotodokumentation der immunhistochemischen Färbungen

Die Färbungen wurden am Mikroskop BX51 (Olympus) durchgesehen und bewertet. Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe der Software cellSens Dimension (Olympus). Beim Anfertigen der Aufnahmen wurden identische Belichtungszeiten gewählt, um die Färbungsintensitäten verschiedener Schnitte vergleichen zu können.

2.6 Verhaltensexperimente

Die Verhaltensexperimente wurden von Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel durchgeführt. Die Ratten wurden zunächst über 4 Tage an den Versuchsaufbau gewöhnt (Handling). Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden die zu untersuchenden Substanzen perineural injiziert und anschließend über die Messung der Pfortendruckschwelle (im Paw Pressure Test, PPT) das Schmerzverhalten der Tiere bestimmt. Der PPT wurde nach Randall und Selitto⁹⁵ durchgeführt. Dabei wurde über ein Algesiometer (Ugo Basile) mit einem Stempel zunehmender Druck auf die Dorsalseite einer Rattenpfote ausgeübt. Die Pfortendruckschwelle entspricht dem Wert (Angabe in g), bei dem die Ratte ihre Pfote zurückzieht. Um strukturelle Schäden zu vermeiden, wurde das Gewicht auf maximal 250 g begrenzt. Die Pfortendruckschwelle wurde im Abstand von 10 s dreimal bestimmt und anschließend ein Mittelwert gebildet.

2.7 Verwendete Software

Tabelle 15 zeigt die verwendete Software.

<u>Verwendung:</u>	<u>Software:</u>	<u>Hersteller:</u>
BCA Protein Assay	Magellan V5.01	Tecan
Densitometrie	Alpha View	Alpha Innotech
Immunfluoreszenzaufnahmen	cellSens Dimension	Olympus
Grafik	Sigma Plot 11.0	Systat Software Inc.
Literaturrecherche	Endnote X4.0.2	Thomson Reuters
Statistik	Microsoft Excel 2003	Microsoft
Statistik	Sigma Stat 3.5	Systat Software Inc.
Textverarbeitung	Microsoft Word 2011	Microsoft

Tabelle 15: Verwendete Software

2.8 Statistik und Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch die Programme Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc.) und Excel 2003 (Microsoft). Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das Programm Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc.). Dabei sind in den verwendeten Grafiken jeweils Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) abgebildet. Die densitometrischen Werte der Western Blot Analysen wurden an der jeweils zugehörigen Ladekontrolle normalisiert.

Für den statistischen Vergleich zweier voneinander unabhängiger Gruppen wurde bei erfüllter Normalverteilung und Varianzgleichheit der t-Test für zwei unverbundene Stichproben durchgeführt.

Bei multiplen Messungen mit mehr als zwei Gruppen wurde zur Versuchsauswertung eine Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of variance) durchgeführt. In Abhängigkeit vom betreffenden Experiment wurde die One-way- oder Two-way-ANOVA verwendet. Bei Feststellung eines signifikanten Effekts wurde zur post-hoc Analyse die Student-Newman-Keuls oder die Dunnet Methode verwendet. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

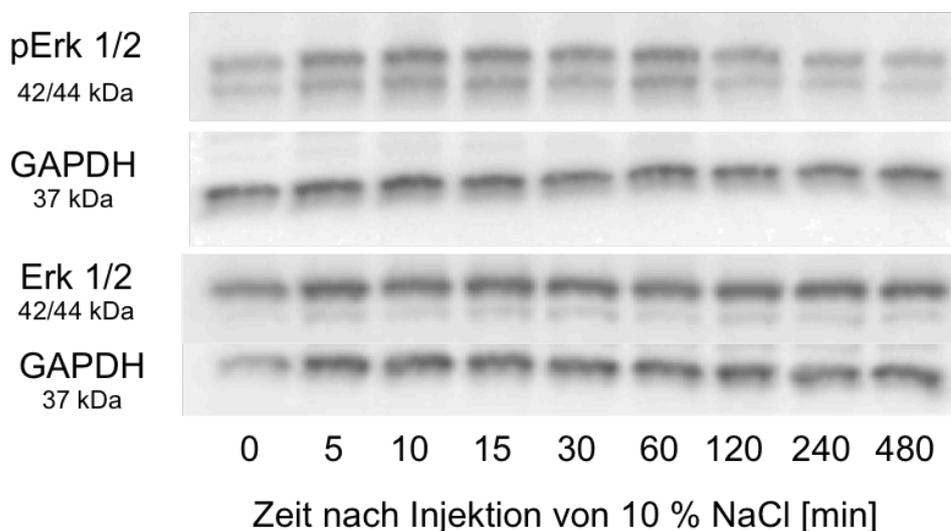
In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die perineurale Injektion von 10 % NaCl zur Abnahme des Claudin-1 Gehalts und damit zur Öffnung der perineuralen Barriere führt. Diese Wirkung wird über die Freisetzung der MMP9 vermittelt, welche durch Interaktion mit dem LRP-1 Rezeptor intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse beeinflusst. Um diese Signalwege genauer verstehen zu können, wurden Phosphorylierungsstudien der Signalproteine Akt und Erk unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

3.1 Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung

3.1.1 Phosphorylierung von Erk und Erk-Expression nach Injektion von 10 % NaCl

Im ersten Arbeitsschritt sollte der Konzentrationsverlauf von Erk und pErk nach Injektion von 10 % NaCl untersucht werden. Nach perineuraler Injektion der hypertonen Kochsalzlösung kam es über einen Zeitraum von 5-120 min zu einer verstärkten Phosphorylierung von Erk (pErk). Die Gesamtkonzentration des Signalproteins Erk blieb über den Untersuchungszeitraum unverändert (siehe Abbildung 8).

A



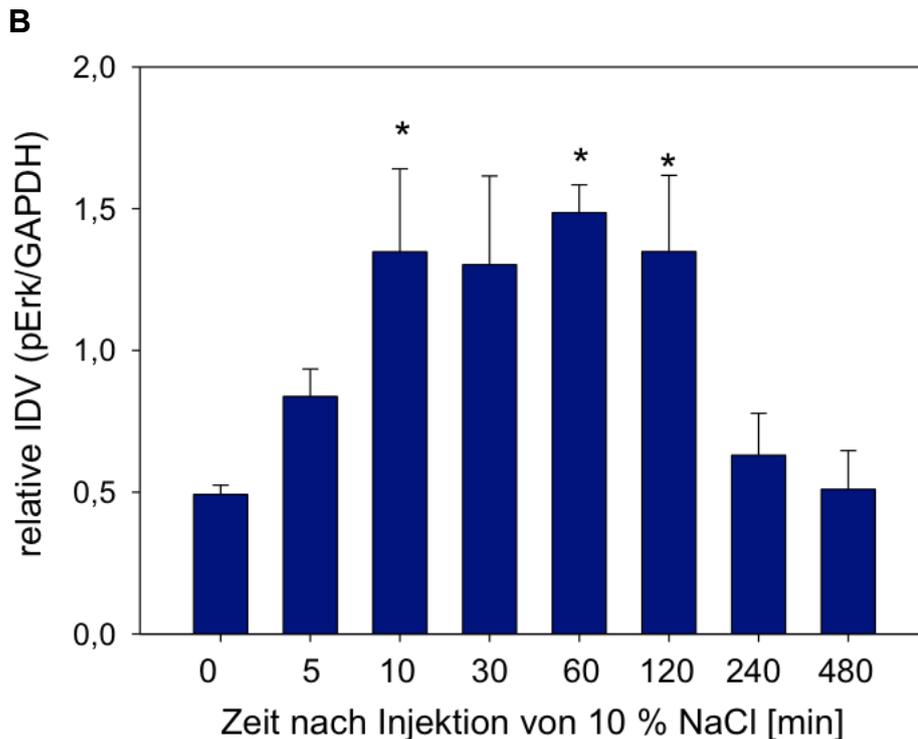


Abbildung 8: Erhöhte Phosphorylierung von Erk nach Injektion von 10 % NaCl.

(A) Darstellung eines exemplarischen Western Blots zur Untersuchung des Konzentrationsverlaufs von Erk und pErk nach lokaler Injektion von 10 % NaCl. Bei gleichbleibender Gesamtkonzentration von Erk kommt es 5-120 min nach Injektion zu einer verstärkten Phosphorylierung zu pErk. (B) Densitometrische Analyse der pErk Proteinbanden. Es zeigt sich eine signifikant vermehrte Phosphorylierung nach 10 min, 60 min und 120 min (* $p < 0.05$, ANOVA, $n = 3$).

3.1.2 Lokalisation der Erk-Phosphorylierung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, in welchem Gewebe des Nervens die verstärkte Erk-Phosphorylierung erfolgt. Dazu wurde 30 min nach Injektion von 10 % NaCl an den N. ischiadicus eine mechanische Trennung von Nerv und Nervenscheide vorgenommen (siehe 2.4.1). Die Western Blot Untersuchungen (siehe Abbildung 9) zeigten, dass eine vermehrte Phosphorylierung von Erk zwar in der Nervenscheide, nicht jedoch im Nerveninneren stattfand. Die Gesamtkonzentration von Erk blieb in beiden Kompartimenten unverändert.

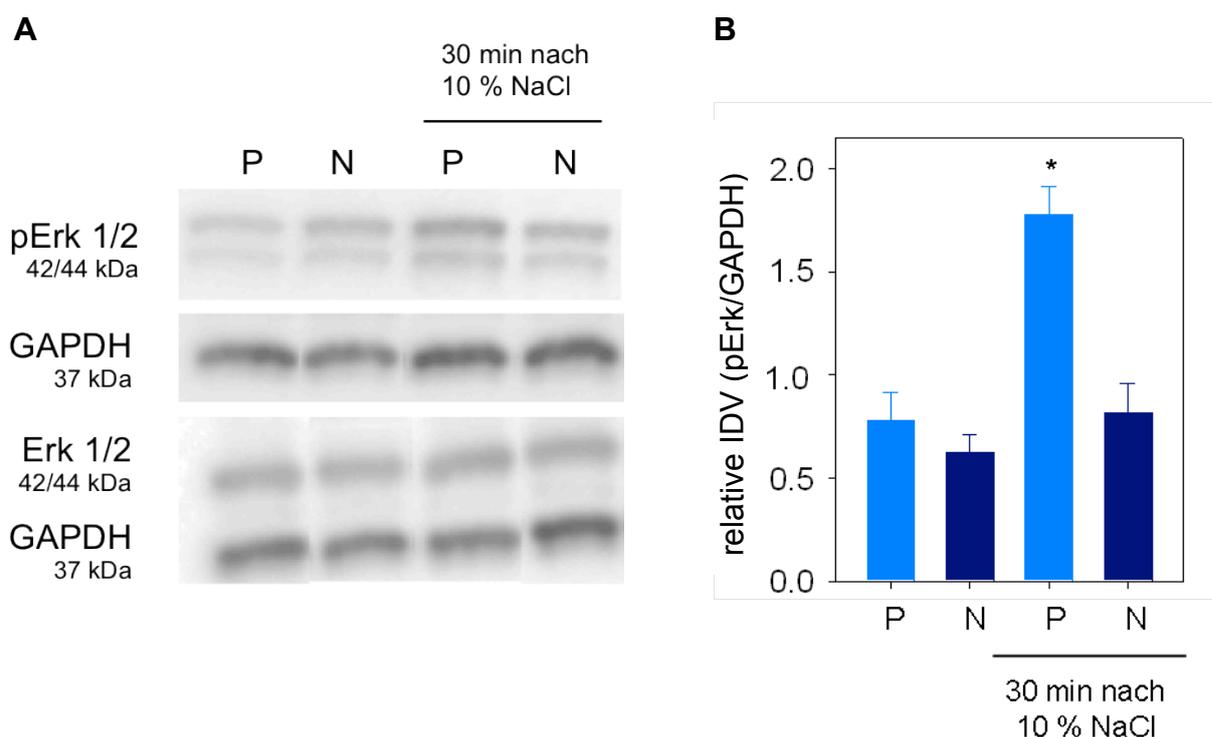


Abbildung 9: Verstärkte Phosphorylierung von Erk im Perineurium nach Injektion von 10 % NaCl.

Das Perineurium (**P**) wurde vom Nerven (**N**) bei unbehandelten Ratten und 30 min nach Behandlung mit 10 % NaCl getrennt. **(A)** Western Blot zur Analyse der pErk- und Erk-Konzentration in den getrennten Kompartimenten. **(B)** Densitometrische Analyse der Proteinbanden. Nur im Perineurium ist eine vermehrte Phosphorylierung zu beobachten (* $p < 0.05$, ANOVA, $n = 4$).

3.1.3 Phosphorylierung von Erk und Erk-Expression nach MMP9-Injektion

Entsprechend der Arbeitshypothese wurde angenommen, dass die Injektion von 10 % NaCl zur Freisetzung von MMP9 führt. Über eine Interaktion der MMP9-PEX Domäne mit dem LRP-1 Rezeptor könnte eine verstärkte Phosphorylierung von Erk vermittelt werden. Passend zu dieser Hypothese wurde wie nach Injektion von 10 % NaCl auch nach perineuraler Injektion von MMP9 eine verstärkte Phosphorylierung von Erk beobachtet (siehe Abbildung 10). Der maximale Effekt trat dabei 60 min nach Injektion auf, 120 min nach Injektion war die verstärkte Erk-Phosphorylierung wieder rückläufig. Die Erk-Gesamtkonzentration im Nerven blieb unverändert.

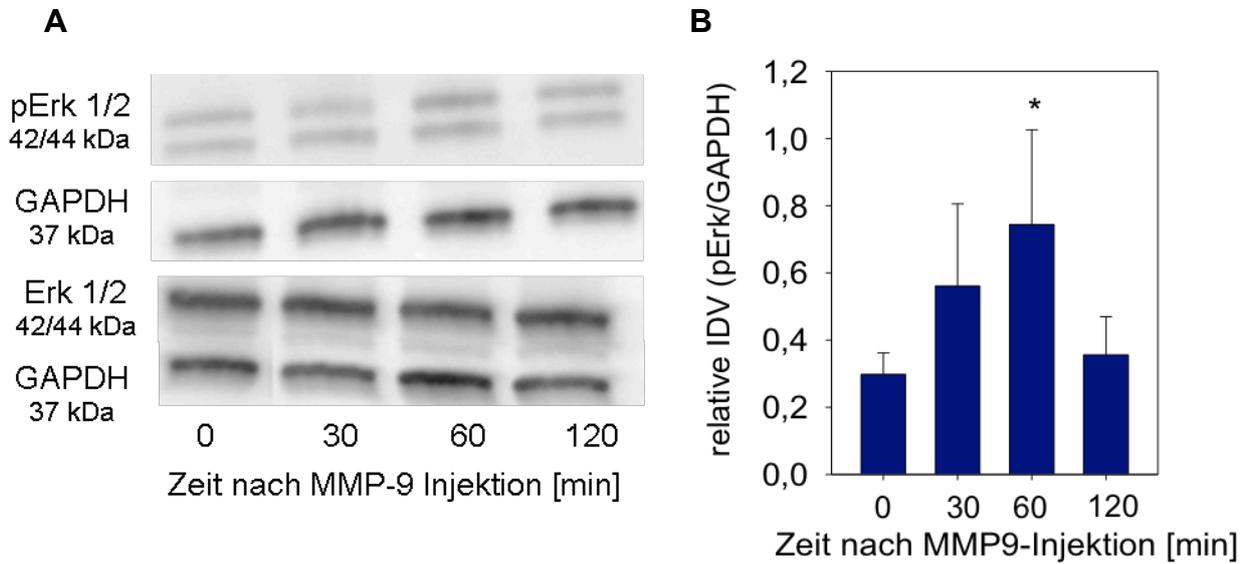


Abbildung 10: Verstärkte Phosphorylierung von Erk nach lokaler Injektion von MMP9.

(A) Exemplarischer Western Blot zur Untersuchung des Konzentrationsverlaufs von Erk und pErk nach lokaler Injektion von MMP9. Während die Gesamtkonzentration von Erk unverändert bleibt, zeigt sich eine vorübergehend erhöhte Phosphorylierung von Erk. **(B)** Densitometrische Analyse der pErk Proteinbanden. Es zeigt sich eine vermehrte Phosphorylierung mit einem Maximum des Effekts 60 min nach Injektion. 120 min nach Injektion ist der Effekt rückläufig (* $p < 0,05$, ANOVA, $n = 6$).

3.1.4 Verhinderung der Abnahme von Claudin-1 durch MEK-Inhibition

Um die Relevanz der Erk Phosphorylierung *in vivo* zu untersuchen, wurden Verhaltensexperimente an Ratten unter zusätzlicher Verwendung des MEK1-Inhibitors PD98059, der so die Phosphorylierung von Erk verhindert, von Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel durchgeführt (siehe Abbildung 11). Der antinozizeptive Effekt, der bei peripherer Koinjektion von 10 % NaCl und DAMGO zu beobachten war, wurde durch die zusätzliche Applikation von PD98059 aufgehoben. Ab einer applizierten Dosis von 10 μg PD98059 wurde im Vergleich zur alleinigen Injektion von 10 % NaCl und DAMGO eine signifikante Reduktion der Pfortendruckschwelle beobachtet. Dabei wird angenommen, dass die Injektion von 10 % NaCl über den pErk-Signalweg zur Abnahme des Claudin-1 Gehalts und damit zur Öffnung der perineuralen Barriere führt. So ist es dem Opioidagonisten DAMGO möglich, zu seinem Wirkort vorzudringen. Wird die Phosphorylierung von Erk durch PD98059 verhindert, bleibt die Barriere geschlossen und der antinozizeptive Effekt entfällt.

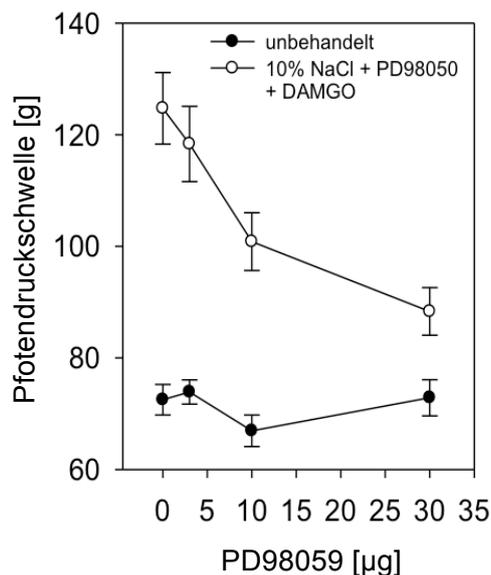


Abbildung 11: MEK1-Inhibition reduziert den antinozizeptiven Effekt von 10 % NaCl + DAMGO.

Periphere Koinjektion von 10% NaCl und DAMGO führt zu einem Anstieg der Pfortendruckschwelle. Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Injektion des MEK1-Inhibitors PD98059 aufgehoben. Eine signifikante Wirkung besteht bei der applizierten Dosis von 10 μg und 30 μg PD98059 (* $p < 0.05$, ANOVA, $n = 6$).

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Verhaltensexperimenten blockierte PD98059 auf molekularer Ebene vollständig die Konzentrationsabnahme von Claudin-1 nach Injektion von 10 % NaCl. So war 60 min nach perineuraler Applikation von 10 % NaCl und PD98059 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein signifikanter Unterschied des Claudin-1 Gehalts festzustellen (siehe Abbildung 12).

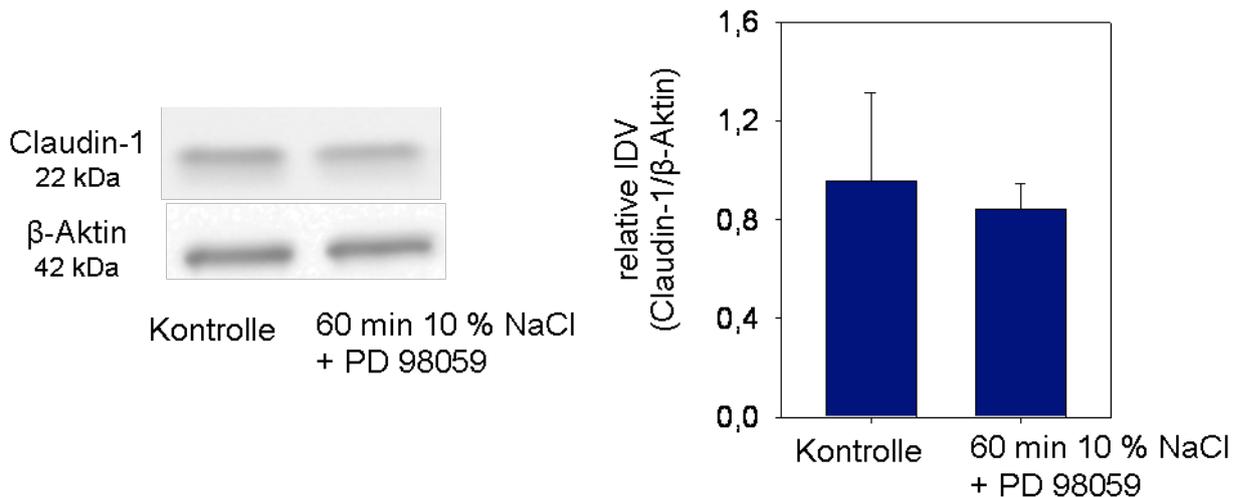


Abbildung 12: MEK1-Inhibition blockiert die Abnahme des Claudin-1 Gehalts nach Injektion von 10 % NaCl.

(A) Western Blot zur Analyse des Claudin-1 Gehalts nach Injektion von 10 % NaCl zusammen mit PD98059. Es ist keine Intensitätsveränderung der Banden erkennbar.

(B) Die densitometrische Analyse der Proteinbanden ergibt keine signifikante Änderung des Claudin-1 Gehalts ($p > 0,05$, t -Test, $n = 5$).

3.2 Beeinflussung der Akt-Phosphorylierung

3.2.1 Phosphorylierung von Akt und Akt-Expression nach Injektion von 10 % NaCl

Analog zum Vorgehen bei pErk wurde die Phosphorylierung von Akt nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl im Western Blot untersucht. Die Arbeitshypothese konnte hierbei nicht bestätigt werden. Nach Injektion der hypertonen Kochsalzlösung war zu keinem Untersuchungszeitpunkt (30 min, 60 min, 120 min und 240 min nach Injektion)

Ergebnisse

eine signifikante Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten (siehe Abbildung 13). Auch die Gesamtkonzentration von Akt blieb unverändert.

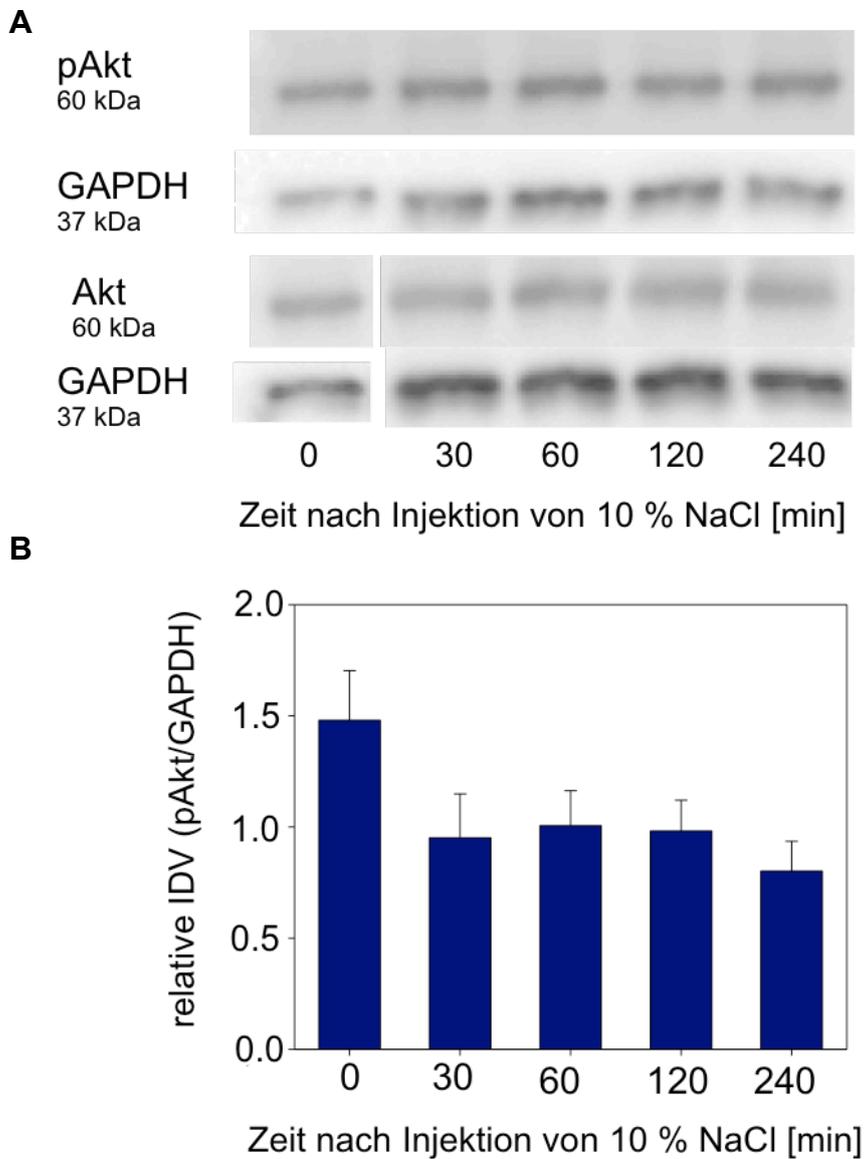


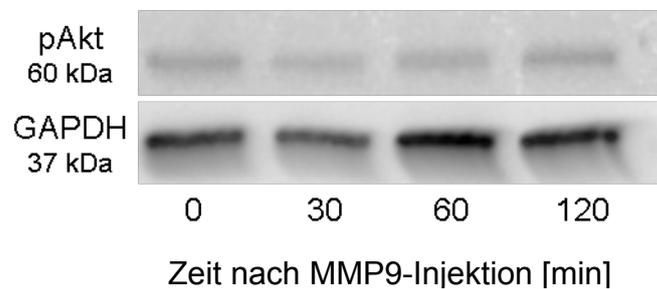
Abbildung 13: Perineurale Injektion von 10 % NaCl führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Akt.

(A) Exemplarischer Western Blot zur Analyse des Konzentrationsverlaufs nach Injektion von 10 % NaCl. Sowohl die pAkt- wie auch die Akt-Proteinbanden zeigen keine Intensitätsveränderung nach Behandlung. **(B)** Die densitometrische Analyse der Proteinbanden ergibt keine signifikant vermehrte Phosphorylierung von Akt ($p > 0,05$, ANOVA, $n = 4$).

3.2.2 Phosphorylierung von Akt und Akt-Expression nach MMP9-Injektion

Nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl konnte keine Veränderung der Phosphorylierung von Akt festgestellt werden. Western Blot Analysen (siehe Abbildung 14) zum Konzentrationsverlauf nach peripherer MMP9 Injektion bestätigten diese Ergebnisse. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (30 min, 60 min und 120 min nach Injektion von MMP9) konnte eine signifikant verstärkte Phosphorylierung von Akt im peripheren Nerven nachgewiesen werden.

A



B

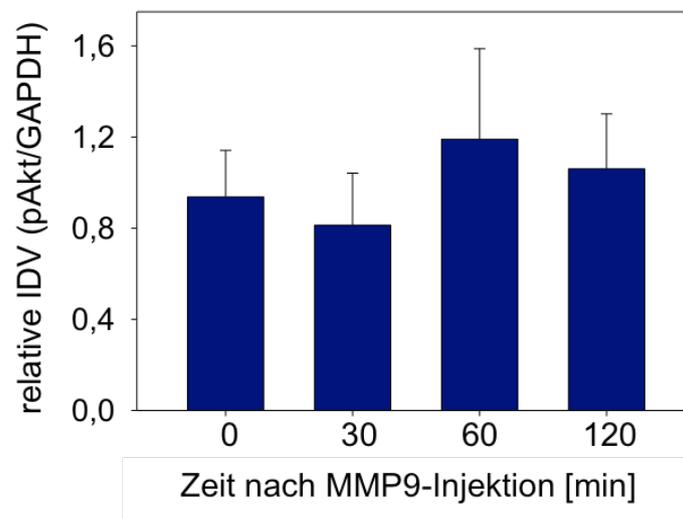


Abbildung 14: Injektion von MMP9 führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Akt.

(A) Western Blot zur Analyse von pAkt nach perineuraler Injektion von MMP9. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt (30 min, 60 min, 120 min nach Injektion) ist eine Intensitätszunahme der Banden erkennbar. (B) Die densitometrische Analyse der Proteinbanden zeigt über den Beobachtungszeitraum von 120 min keine signifikante Phosphorylierung von Akt ($p > 0,05$, ANOVA, $n = 6$).

3.3 Perineurale Injektion von tPA

Beobachtungen an der Blut-Hirn-Schranke konnten eine Öffnung der Barriere über direkte Interaktion von tPA mit LRP-1 nachweisen. In den nachfolgend dargestellten Experimenten sollten Auswirkungen einer perineuralen tPA-Injektion auf die Schrankenfunktion des Perineuriums untersucht werden.

3.3.1 Verhaltensexperimente zur Koinjektion von tPA und DAMGO

Die perineurale Koinjektion von tPA (als LRP-1 Agonist) und DAMGO ermöglicht antinozizeptive Effekte.

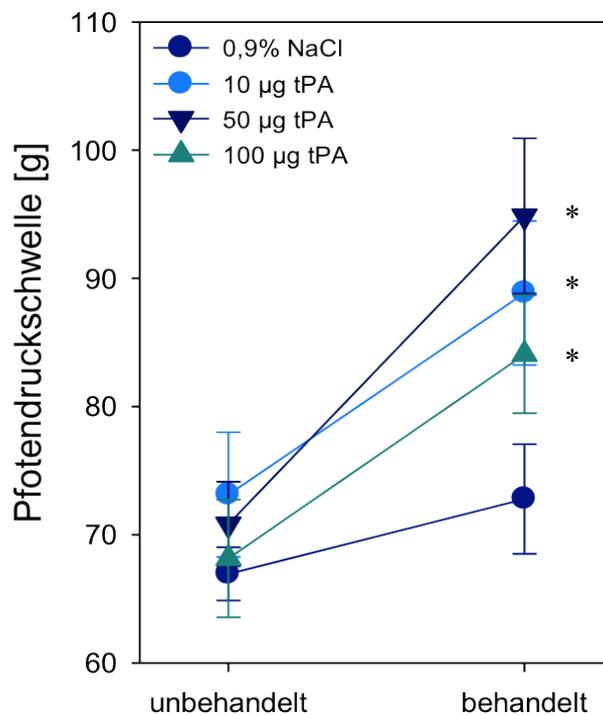


Abbildung 15: Antinozizeptiver Effekt nach perineuraler Koinjektion von tPA und DAMGO.

Nach Injektion verschiedener Dosierungen von tPA (10, 50 und 100 µg) zusammen mit DAMGO tritt jeweils ein signifikanter Anstieg der Pfortendruckschwelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Im Gegensatz dazu ist nach Koinjektion von 0,9 % NaCl und DAMGO kein antinozizeptiver Effekt zu beobachten (* $p < 0,05$, ANOVA, $n = 6$).

In Verhaltensexperimenten an Ratten zeigte sich nach Injektion von 10, 50 und 100 µg tPA zusammen mit DAMGO eine signifikante Zunahme der Pfortendruckschwelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der beobachtete Effekt war bei Behandlung mit 50 µg tPA und DAMGO am stärksten ausgeprägt. Nach Koinjektion von 0,9 % NaCl und DAMGO trat dagegen keine antinozizeptive Wirkung auf (siehe Abbildung 15). Die abgebildeten Verhaltensexperimente wurden von Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel durchgeführt.

3.3.2 Claudin-1 Immunreaktivität nach perineuraler Gabe von tPA

Um molekulare Auswirkungen einer perineuralen tPA-Injektion zu untersuchen, wurden zunächst immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Claudin-1 Immunreaktivität (grün) unter Kontrollbedingungen (linke Spalte) und 1 h nach Injektion von 100 µg tPA (rechte Spalte). Dargestellt ist jeweils die 20- und 40-fache Vergrößerung, Zellkerne sind mit DAPI in blau gegengefärbt. Nach Injektion von tPA war ein deutlicher Rückgang der Claudin-1 Immunfloreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten.

Ergebnisse

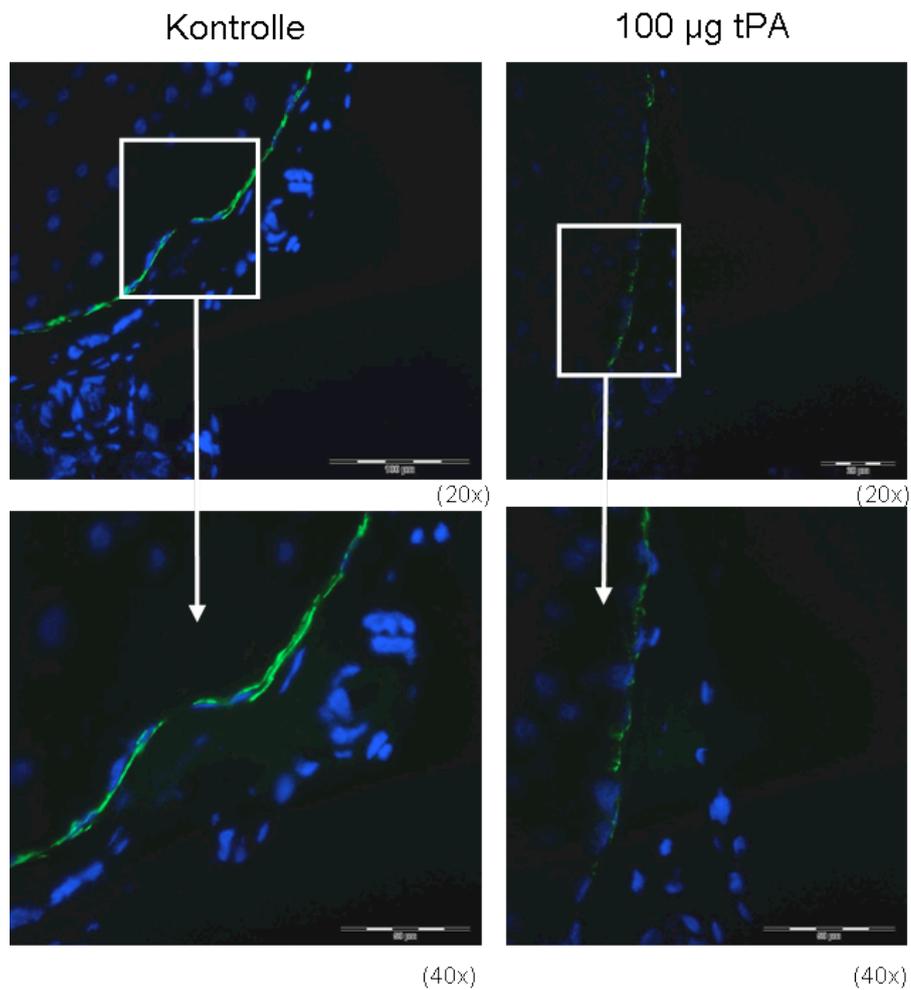


Abbildung 16: Perineurale Injektion von tPA reduziert die Claudin-1 Konzentration.
Immunfluoreszenz mit Claudin-1 (grün) und Kernfärbung (DAPI, blau). Färbungen unter Kontrollbedingungen sowie 60 min nach Injektion von tPA. Aufgrund der Vergrößerung durch das Mikroskop ist jeweils nur ein Abschnitt des Perineuriums getroffen.

Ergebnisse

Die Beobachtungen der Immunhistochemie konnten in Western-Blot Experimenten bestätigt werden.

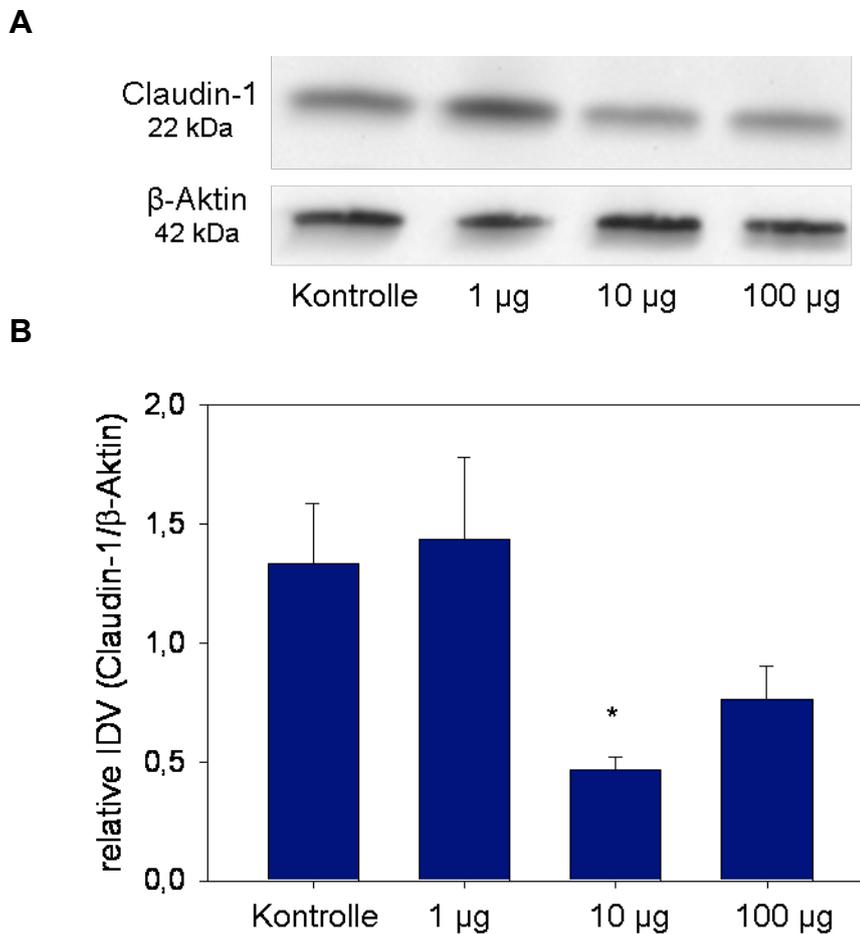


Abbildung 17: Injektion von tPA reduziert dosisabhängig den Claudin-1 Proteingehalt. (A) Western Blot zur Analyse des Claudin-1 Proteingehalts 1 h nach Injektion von 1 μ g, 10 μ g und 100 μ g tPA. (B) Densitometrische Analyse mehrerer Blots. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Claudin-1 Gehalts nach Injektion von 10 μ g tPA. (* $p < 0,05$, ANOVA, $n = 6$)

In Abbildung 17 ist eine signifikante Abnahme des Gehalts von Claudin-1 eine Stunde nach perineuraler Injektion von 10 μ g tPA zu erkennen. Nach Applikation von 100 μ g tPA bestand ebenfalls die Tendenz einer Gehaltsabnahme, jedoch war der Effekt nicht statistisch signifikant. Die Injektion von 1 μ g tPA hatte dagegen keinen Einfluss auf den Claudin-1 Gehalt.

3.3.3 Beeinflussung des Claudin-1 Proteingehalts durch inaktiviertes tPA

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte von der katalytischen tPA-Domäne abhängig sind, wurden die oben beschriebenen Experimente mit inaktiviertem tPA wiederholt. Zu diesem Zweck wurde die enzymatisch inaktive Proteinmutante S478A verwendet, bei der im katalytischen Zentrum ein Serin- gegen einen Alaninrest ausgetauscht ist.

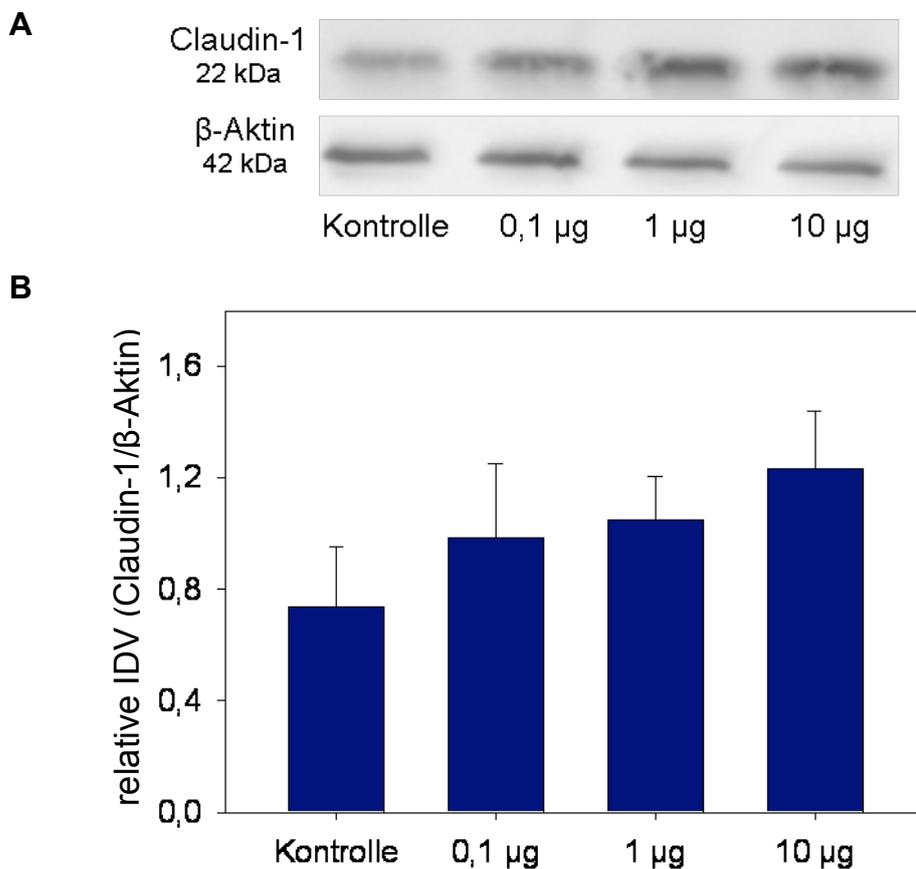


Abbildung 18: *Injektion von inaktiviertem tPA führt zu keiner signifikanten Änderung des Claudin-1 Gehalts nach 1 h.*

(A) *Exemplarischer Western Blot zur Analyse des Claudin-1 Gehalts. Injektion von 0,1 μ g, 1 μ g und 10 μ g inaktivem tPA, Probenentnahme 1 h nach Injektion. **(B)** Die densitometrische Analyse zeigt bei keiner der verwendeten Dosen eine signifikante Änderung des Claudin-1 Gehalts. ($p > 0,05$, ANOVA, $n = 3$)*

Im Western Blot (siehe Abbildung 18) wurde eine Stunde nach Injektion von 0,1 µg, 1 µg und 10 µg inaktiviertem tPA der Claudin-1 Gehalt untersucht. Bei keiner der verwendeten Mengen konnte eine signifikante Veränderung beobachtet werden.

3.3.4 Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung durch tPA

Analog zu den Versuchen mit Injektion einer hypertonen Kochsalzlösung wurde auch nach perineuraler Applikation verschiedener Mengen von (aktivem) tPA der pErk Gehalt in der Zytosolfraktion untersucht. Im Western Blot (siehe Abbildung 19) zeigte sich eine Stunde nach Injektion von 1 µg, 10 µg und 100 µg aktivem tPA keine signifikante Veränderung der Erk Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

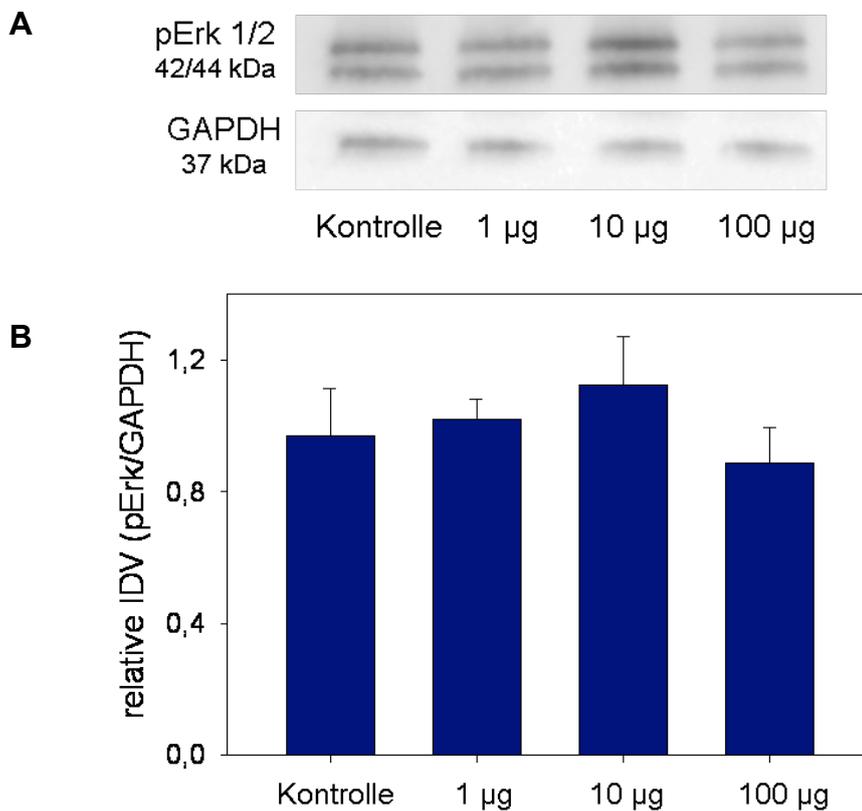


Abbildung 19: Injektion von tPA führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Erk nach 1 h.

(A) pErk Western Blot nach Injektion von 1 µg, 10 µg und 100 µg tPA. Probenentnahme 1 h nach Injektion (B) Densitometrische Analyse. Bei keiner der verwendeten tPA-Mengen kommt es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Phosphorylierung von Erk. ($p > 0,05$, ANOVA, $n = 6$)

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie sollten die Öffnung des Perineuriums sowie beteiligte intrazelluläre Signalprozesse unter verschiedenen Bedingungen (hypertone NaCl-Lösung, MMP9 und tPA) charakterisiert werden. Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse herausgearbeitet werden:

- Nach peripherer Injektion der 10 % NaCl-Lösung war über einen Zeitraum von 5-120 min eine verstärkte Phosphorylierung von Erk, nicht aber von Akt zu beobachten. Die Zunahme der Phosphorylierung von Erk wurde dabei nur im Perineurium, nicht im Nerveninneren nachgewiesen.
- Der Erk-Inhibitor PD98059 blockierte die Abnahme des Claudin-1 Proteingehalts nach Injektion von 10 % NaCl.
- Die perineurale Injektion von MMP9 führte ebenfalls zu einer vorübergehend verstärkten Phosphorylierung von Erk, nicht von Akt.
- Eine Stunde nach Injektion verschiedener Dosierungen von aktivem tPA zeigte sich eine Abnahme des Claudin-1 Gehalts, jedoch keine verstärkte Phosphorylierung von Erk. Eine Stunde nach Injektion von enzymatisch inaktivem tPA konnte keine Änderung des Claudin-1 Proteingehalts beobachtet werden.

4.2 Freisetzung von MMP9 nach Injektion der hypertonen Kochsalzlösung

Die 23 bekannten Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) können in gelöste und membrangebundene Vertreter untergliedert werden.⁷² Die Barriereöffnung des Perineuriums nach Injektion einer hypertonen Kochsalzlösung ist von der löslichen Matrix-Metalloproteinase MMP9 abhängig. Vorexperimente der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Konzentrationsabnahme von Claudin-1 nach Injektion von 10 % NaCl durch einen MMP9-Inhibitor verhindert wird.⁷¹ Der antinozizeptive Effekt, der bei Koinjektion von DAMGO (als Opioidagonist) und 10 % NaCl (zur Öffnung der perineuralen Barriere) zu beobachten war, wurde ebenfalls durch einen MMP9-Inhibitor aufgehoben. Zusammengefasst ließ sich daraus die Hypothese

ableiten, dass die Injektion der hypertonen Kochsalzlösung zur Freisetzung von MMP9 führt, welche über nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse die Öffnung des Perineuriums vermittelt. Nach Injektion von MMP9 wäre somit die Aktivierung der gleichen Signalprozesse wie nach Injektion von 10 % NaCl zu erwarten. Die Ergebnisse dieser Arbeit passen zu dieser Hypothese: sowohl nach Injektion der hypertonen Kochsalzlösung als auch nach Injektion von MMP9 wurde eine vorübergehend verstärkte Phosphorylierung von Erk in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen nachgewiesen. In beiden Fällen kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung von pAkt. Es existiert noch kein direkter Nachweis, dass MMP9 unter den beschriebenen Bedingungen nach Injektion der hypertonen Lösung freigesetzt wird. Jedoch lassen sich die Ergebnisse gut mit Studien vereinbaren, in denen hypertone Lösungen die Freisetzung von MMPs aus Kornealzellen⁹⁶ und Neutrophilen⁹⁷ ausgelöst haben. Auch ist noch nicht sicher geklärt, aus welchem Gewebe die sezernierte MMP9 stammt. MMPs werden unter normalen Bedingungen in peripheren Nerven vorwiegend in Schwann Zellen exprimiert und nach Verletzung aufreguliert.⁹⁸ In Vorarbeiten konnten MMP3, MMP7 und MMP9 im Perineurium nachgewiesen werden.⁷¹ – Daher postulieren wir, dass MMP9 aus dem Perineurium nach Behandlung mit hypertoner Lösung freigesetzt wird.

4.3 Interaktion von MMP9 und LRP-1

Mit Ausnahme von MMP7, MMP23 und MMP26 enthalten alle MMPs eine Hemopexin-artige Domäne, die vor allem als eine Erkennungssequenz für Substrate fungiert.⁷² MMP9-PEX enthält daneben auch die Bindungsstelle für LRP-1, Megalin/LRP-2 sowie den endogenen MMP-Inhibitor TIMP1 und ist an einer Dimerisierung von MMP9 beteiligt.⁹⁹⁻¹⁰¹ Darüber hinaus kann durch die Hemopexin-Domäne die katalytische Aktivität der MMP9 inhibiert werden.¹⁰² Das PEX-Polypeptid ist aus vier β -Faltblattstrukturen aufgebaut, die wie die Flügel eines Propellers symmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet sind (siehe Abbildung 4).¹⁰³

LRP-1 besteht aus einer großen extrazellulären Untereinheit (α -Kette: 515 kDa), die nichtkovalent mit einer kleinen transmembranären Untereinheit (β -Kette, 85 kDa) verbunden ist.¹⁰⁴ Die extrazelluläre α -Kette vermittelt die Interaktion mit verschiedenen Liganden, für die Anbindung von MMP9 ist dabei deren PEX-Domäne notwendig.¹⁰⁰ In Untersuchungen an Schwann Zellen wurde eine Interaktion der MMP9 PEX-Domäne

mit dem LRP-1 Rezeptor nachgewiesen. In Folge dieser molekularen Wechselwirkung kam es zur verstärkten Phosphorylierung der beiden intrazellulären Signalproteine Akt und Erk.⁷⁹ Nach Stimulation mit hypertoner Kochsalzlösung oder MMP9 wurde in der vorliegenden Studie eine vermehrte Phosphorylierung von Erk, nicht aber von Akt im Perineurium beobachtet. In Abhängigkeit vom betrachteten Gewebe scheinen also Unterschiede in der intrazellulären Signalantwort nach Stimulation von LRP-1 durch MMP9 zu bestehen. Insgesamt ist in der vorliegenden Literatur eine breite Spanne an möglichen Interaktionswegen und Interaktionsergebnissen von LRP-1 und MMP9 beschrieben. In Studien an Brustkrebs-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass der Proteaseinhibitor Protease Nexin-1 über Interaktion mit dem LRP-1 Rezeptor eine verstärkte Phosphorylierung von Erk bewirkt, die in einer erhöhten MMP9-Expression und Sekretion resultiert.¹⁰⁵ Die Reihenfolge in der Verknüpfung von LRP-1 und MMP9 ist hier also genau umgedreht: Aktivierung von LRP-1 durch einen anderen Agonisten führt zur verstärkten MMP9-Expression. Darüber hinaus kann LRP-1 neben seiner Funktion als Signalrezeptor auch als Endozytoserezeptor fungieren, beide Funktionen können durch Interaktion mit MMP9 ausgelöst werden. So wird im Endometrium durch LRP-1 vermittelte Endozytose der MMP9-Gehalt im Stroma reguliert.¹⁰⁶ Ähnlich wird durch Interaktion von α_2 -Makroglobulin mit LRP-1 sowohl dessen endozytotische Aufnahme^{82,107,108} als auch eine Aktivierung von Akt und Erk ausgelöst.¹⁰⁹ Die Aktivierung beider Funktionen des LRP-1 Rezeptors ist also nicht nur durch MMP9 möglich. Möglicherweise können zukünftige Studien nachweisen, ob die Anbindung eines Substrats an eine spezifische LRP-1 Proteindomäne ausschlaggebend für die ausgelöste Antwort (Endozytose oder intrazelluläre Signaltransduktion) ist.

4.4 Beeinflussung des pErk-Signalweges durch LRP-1

Wie unter 1.3.3 beschrieben, wird die intrazelluläre pErk-Konzentration durch ein sehr komplexes Netzwerk verschiedener Signaltransduktionsketten gesteuert. Neben der MAPK-Phosphorylierungskaskade, die durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert werden kann, regulieren auch mehrere Feedback- und Dephosphorylierungsmechanismen den resultierenden pErk-Spiegel. Es ist unklar, auf welchem molekularen Wege der LRP-1 Rezeptor im Perineurium in dieses „dynamische Gleichgewicht“ eingreift.

Aufgrund der beobachteten Kinetik erscheint es unwahrscheinlich, dass die initiale pErk-Konzentrationszunahme im Perineurium durch Hemmung des pErk-Abbaus oder durch Aufhebung der oben genannten negativen Feedbackmechanismen zu erklären ist. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass diese Prozesse zum funktionellen Endergebnis der Signaltransduktion beitragen. Dies ist damit begründet, dass das pErk-Signal nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ kodiert.⁸⁴ Für das Ergebnis einer Signalwegsaktivierung ist also nicht nur entscheidend, ob Erk überhaupt phosphoryliert wird, sondern auch wie hoch der resultierende pErk-Spiegel ist und wie lange die Konzentrationserhöhung anhält. Durch eine Hemmung (oder auch Aktivierung) der pErk-Dephosphorylierung oder der Feedbackschleife könnten diese Aspekte entscheidend beeinflusst werden.¹¹⁰

In *in vitro* Studien an neuronalen Zelllinien konnte ein komplexes Modell der Erk-Phosphorylierung durch die LRP-1 Liganden enzymatisch inaktives tPA (EItPA, enzymatisch inaktives und nicht spaltbares tPA mit Mutationen an S478A und R275E) und α 2-Makroglobulin entwickelt werden. Demnach wird vermutet, dass der NMDA-Rezeptor als Korezeptor von LRP-1 fungiert. Nach Anbindung eines der Liganden vermitteln beide gemeinsam die Aktivierung von intrazellulären Kinasen der Src-Familie (Src family kinases, SFKs). SFKs transaktivieren dann den transmembranären Rezeptor Trk, welcher wiederum die Erk-Phosphorylierung vermittelt.^{80,93,111} Die Aktivierung der MAPK-Kaskade könnte wie folgt erklärt werden: die Phosphorylierung von Trk an Tyrosinresten erlaubt die Rekrutierung des Adaptorproteins Shc. Shc vermittelt die Interaktion mit dem GTP-Austauschfaktor SOS und ermöglicht damit die Aktivierung von Ras und der MAPK-Kaskade.¹¹² In der vorliegenden Arbeit wurde eine Aktivierung des Erk-Signalweges durch einen anderen LRP-1 Agonisten, MMP9, beobachtet. Oben genannte Studien an neuronalen Zellen zeigen interessanterweise, dass LRP-1 in Abhängigkeit vom interagierenden Liganden verschiedene Korezeptoren rekrutieren und damit verschiedene intrazelluläre Signalwege beeinflussen kann. Anders als EItPA und α 2-Makroglobulin führt so der LRP-1 Ligand Myelin-assoziiertes Glykoprotein (myelin associated glykoprotein, MAG) zur Rekrutierung des Korezeptors p75NTR und aktiviert das GTP-bindende Protein RhoA.^{93,113} Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit ist nach eigener Kenntnis noch nicht untersucht worden, ob auch die Wirkung von MMP9 über den NMDA-Korezeptor und Trk vermittelt werden

könnte. Diese Möglichkeit ist durchaus in Betracht zu ziehen, da mit EItPA und α 2-Makroglobulin bereits zwei strukturell verschiedene LRP-1 Liganden bekannt sind, die den gleichen molekularen Effekt (vermehrte Phosphorylierung von Erk) wie MMP9-PEX nach dieser Modellvorstellung vermitteln können.⁷⁹ Das oben beschriebene Modell scheint dabei jedoch nicht auf alle Gewebetypen zuzutreffen. In Studien an Schwann-Zellen wird die Erk-Signalkaskade über einen Trk-unabhängigen Mechanismus durch einen LRP-1 Liganden aktiviert. Trotz Applikation des Trk-Inhibitors K252a bewirkt α 2-Makroglobulin hier eine vermehrte Phosphorylierung von Erk.¹¹¹ Eine Beteiligung der einzelnen Bestandteile des Modells an den Prozessen im Perineurium könnte durch Verwendung der spezifischen Inhibitoren K252a (Trk-Inhibitor), MK-801 (NMDA-Rezeptor Antagonist) und PP2 (SFK-Inhibitor) untersucht werden.^{93,111}

Eine weitere Verknüpfung der MAPK-Signalkaskade mit LRP-1 ist nach Phosphorylierung des Rezeptors selbst beschrieben. Der intrazelluläre C-Terminus von LRP-1 besteht aus etwa 100 Aminosäuren und kann sowohl durch Serin/Threonin- als auch durch Tyrosinkinase phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung unterstützt die Anbindung von Adaptorproteinen und bildet so die Grundlage zur Ausbildung von intrazellulären Signalplattformen.⁸⁴ Eine Verbindung zwischen dieser Phosphorylierung und der Aktivierung des MAPK-Signalweges konnte in *in vitro* Studien an Zellen mit konstitutiv aktiver zytoplasmatischer Tyrosinkinase Src nachgewiesen werden: die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP-1 durch die Tyrosinkinase Src erlaubt die Rekrutierung des Adaptorproteins Shc. Wie bereits oben beschrieben, vermittelt Shc die Interaktion mit dem GTP-Austauschfaktor SOS und ermöglicht damit die Aktivierung von Ras und der MAPK-Kaskade.^{114,115} Im Hinblick auf die beobachteten Prozesse im Perineurium bliebe dabei jedoch unklar, auf welchem Wege die Anbindung von MMP9-PEX zur Phosphorylierung von LRP-1 führt. Da LRP-1 nach aktuellem Kenntnisstand keine Kinaseaktivität besitzt, scheidet eine Autophosphorylierung des Rezeptors aus. Spekulativ denkbar wäre eine Konformationsänderung von LRP-1 durch Anbindung des Liganden, die nachfolgend die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne durch zytoplasmatische Kinasen, z.B. Src, erlaubt. Darüber hinaus wäre auch das Vorhandensein eines Korezeptors mit Kinaseaktivität denkbar. So ist für die Src-vermittelte Phosphorylierung von LRP-1

nach Anbindung eines anderen Liganden, des Platelet derived growth factors (PDGF), die zusätzliche Aktivität des PDGF-Rezeptors notwendig.¹¹⁶

4.5 Beeinflussung der Claudin-1 Konzentration durch pErk

Erk-Phosphorylierung im Perineurium führt zur Konzentrationsabnahme des Tight Junction Proteins Claudin-1.⁷¹ Die Blockade des pErk-Signalweges durch PD98059 verhinderte in den durchgeführten Experimenten die Abnahme des Claudin-1 Gehalts nach perineuraler Injektion einer hypertonen Kochsalzlösung. Durch den pErk-Inhibitor konnte außerdem der antinozizeptive Effekt, der bei Koinjektion von 10 % NaCl und DAMGO zu beobachten ist, aufgehoben werden. Dabei hemmt PD98059 die mitogen-activated erk kinase (MEK). Da Erk 1 und 2 die einzigen bekannten Substrate der MEK darstellen, bedeutet eine MEK-Inhibition eine spezifische Blockade der Aktivierung (=Phosphorylierung) von Erk.⁸⁸

Auf welchem molekularen Weg die Erk-Signalkaskade zu der beobachteten Claudin-1 Konzentrationsabnahme führt, ist bislang noch offen. Vielfach sind Einflüsse von Erk auf die Proteintranskriptionsebene beschrieben. Diese Möglichkeit erscheint im vorliegenden Fall aber sehr unwahrscheinlich, da Änderungen des Claudin-1 Gehalts bereits 5 Minuten nach Injektion der entsprechenden Lösungen zu beobachten waren. Wäre eine Modifikation der Genexpression für den Vorgang verantwortlich, wäre deutlich mehr Zeit erforderlich, bis sich die Veränderungen auf Proteinebene manifestieren.

Wie unter 1.2.2 beschrieben, sind die Transmembranproteine der TJs über Plaque-Proteine an Zytoskelettfilamenten verankert. Über Interaktion von pErk mit diesen zytosolischen Proteinen wäre eine Beeinflussung der Claudin-1 Konzentration denkbar. In Studien mit Krebszellen konnte eine Beeinflussung der Morphologie des Aktin-Zytoskeletts und der Abbau von Adhaerens-Kontakten in Folge einer LRP-1 vermittelten Erk-Aktivierung nachgewiesen werden.¹¹⁷ Die Öffnung von TJs der Kornea nach pharmakologischer Aktivierung der Proteinkinase C wird durch eine Aktivierung des Erk-Signalweges vermittelt und geht mit einer veränderten Verteilung des Plaque-Proteins ZO-1 einher.¹¹⁸ Die Beeinflussung der Zytoskelettfilamente und Plaque-Proteinen muss dabei natürlich nicht zwangsläufig direkt durch pErk erfolgen, auch die Zwischenschaltung eines weiteren Signalproteins ist denkbar.

Daneben ist auch eine Erk-vermittelte Endozytose von TJ-Proteinen beschrieben: In Madin-Darby canine kidney (MDCK) II Zellen beschleunigt der Epidermal growth factor (EGF) über den MEK/Erk-Signalweg die Clathrin-vermittelte Endozytose und lysosomale Degradation von Claudin-2.¹¹⁹ In den von der Arbeitsgruppe durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen am Perineurium konnten keine intrazellulären Ansammlungen von Claudin-1 beobachtet werden. Endozytose und lysosomaler Abbau von Claudin-1 müssten also sehr rasch erfolgen und vor dem frühesten Zeitpunkt der Nervenentnahme (eine Stunde nach Injektion von 10 % NaCl)⁷¹ abgeschlossen sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte Chloroquin als Inhibitor der lysosomalen Proteasen verwendet werden. Im Falle einer stattfindenden Endozytose müssten bei blockiertem lysosomalem Abbau dann größere Mengen an intrazellulärem Claudin-1 beobachtet werden können.

Von einer direkten Degradation von Claudin-1 durch extrazelluläre Matrixmetalloproteinasen ist nicht auszugehen, da in Western Blot Experimenten keine Spaltprodukte nachzuweisen waren und ein Abfall der Claudin-1 Konzentration auch bei alleiniger Applikation der MMP9 PEX-Domäne ohne katalytische Aktivität zu beobachten war.

4.6 Die Rolle von tPA bei der Öffnung des Perineuriums

In Studien an der Blut-Hirn-Schranke wurde eine Öffnung dieser Barriere durch Interaktion von tPA und LRP-1 nachgewiesen⁸³, auch eine nachfolgende Aktivierung von Erk ist bekannt.⁹² Als bekannter LRP-1 Agonist wurde tPA somit ausgewählt, um einen weiteren möglichen Einstieg in die Signalkaskade zu untersuchen, die an der Öffnung des Perineuriums beteiligt ist.

Passend zur Versuchshypothese trat nach perineuraler Injektion von enzymatisch aktivem tPA zusammen mit dem Opioidagonisten DAMGO ein antinozizeptiver Effekt auf während nach Koinjektion von DAMGO und 0,9 % NaCl keine Antinozizeption festzustellen war. Auf molekularer Ebene führte die perineurale Applikation von aktivem tPA dosisabhängig zu einer Claudin-1 Konzentrationsabnahme. Eine Stunde nach Injektion war dabei keine vermehrte Phosphorylierung von Erk festzustellen. Die Injektion von enzymatisch inaktivem tPA hatte nach einer Stunde keinen Effekt auf die Claudin-1 Konzentration. Die Öffnung des Perineuriums und die Konzentrationsabnahme von Claudin-1 nach tPA-Injektion scheinen also zumindest in

der ersten Stunde nicht durch die Erk-Signalkaskade vermittelt zu werden. Gleichzeitig ist in diesem Zeitraum die Barriereöffnung von der enzymatischen tPA-Aktivität abhängig. Verschiedene Erklärungsansätze können in Betracht gezogen werden:

Da tPA als Serinprotease proteolytische Aktivität besitzt und die Konzentrationsabnahme von Claudin-1 nur nach Applikation der enzymatisch aktiven Form beobachtet werden konnte, liegt zunächst die Vermutung einer direkten Degradation des TJ-Proteins nahe. Nach dem aktuellen Stand der vorliegenden Literatur sind allerdings nur wenige Substrate zur Spaltung durch tPA bekannt: Plasminogen, das inaktive Dimer des platelet derived growth factor (PDGF-CC)¹²⁰ sowie die NR1¹²¹ und NR2B¹²² Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Weiterhin wäre auf indirektem Wege eine Degradation durch die tPA-aktivierte Protease Plasmin möglich. In Studien an der Blut-Hirn-Schranke konnte eine indirekte Beeinflussung der Permeabilität nachgewiesen werden: Plasmin spaltet das monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), welches über Interaktion mit dem CCR2-Rezeptor eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und eine Redistribution des TJ-Proteins Occludin vermittelt.¹²³ Studien an menschlichen Zervix-Zellen lieferten Hinweise auf eine direkte Spaltung von Occludin durch Plasmin.¹²⁴ In den von der Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten konnten jedoch keine Änderungen der Occludin-Konzentration festgestellt werden.⁷¹

Weiterhin könnten durch die proteolytische Aktivität von tPA nach Anbindung an LRP-1 verschiedene Signalwege aktiviert werden. Bei der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke werden hierbei sowohl von Plasminogen abhängige als auch unabhängige Mechanismen diskutiert. In einem *in vitro* Modell führen enzymatisch aktives tPA und Plasminogen über eine Beeinflussung des Zytoskeletts von Astrozyten zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Hierbei wird ein Mechanismus postuliert, nach dem sowohl tPA (vermutlich über LRP-1) als auch Plasminogen an die Zelloberfläche binden. Es wird vermutet, dass die Kollokalisierung der beiden Rezeptoren für eine effektive, durch tPA induzierte Plasminbildung an spezifischen Regionen der Astrozytenoberfläche notwendig ist. Plasmin vermittelt dann die Aktivierung des Rho Kinase Signalweges, der wiederum über Veränderungen des Astrozyten-Zytoskeletts zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke führt und deren Permeabilität erhöht.¹²⁵

Bei einem möglichen Plasminogen-unabhängigen Mechanismus vermittelt tPA die Spaltung von PDGF. In Gegenwart von LRP-1 entfernt tPA proteolytisch die N-

terminale CUB-Domäne von PDGF-CC. Die so aktivierte Form (PDGF-C) bewirkt über Interaktion mit dem PDGF- α Rezeptor eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke.¹²⁰ Dazu passend ist bei Patienten, die wegen einem Schlaganfall mit tPA therapiert wurden, das Auftreten von hämorrhagischen Ereignissen und Hirnödemen mit einem erhöhten Blutspiegel von PDGF-CC assoziiert.¹²⁶ Diskutiert wird außerdem eine Spaltung von LRP-1 selbst, dessen zytoplasmatische Domäne nach proteolytischer Abspaltung intrazelluläre Signalprozesse aktivieren kann.¹²⁷ Ein anderes mögliches Substrat stellen protease activated receptors (PARs) dar, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch Spaltung der extrazellulären Aminosäurekette aktiviert werden.^{83,128} Man kann spekulieren, dass tPA erst nach Anbindung an LRP-1 Zugriff auf die PAR-Spaltungsdomäne erhält.

In jedem Fall erscheint es sinnvoll, durch Verwendung des LRP-1 Antagonisten RAP die Beteiligung von LRP-1 an der tPA vermittelten Öffnung des Perineuriums in zukünftigen Studien zu überprüfen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit nur Ergebnisse eine Stunde nach Injektion von tPA erhoben wurden. Hier könnten in weiteren Studien auch frühere bzw. spätere Zeitpunkte hinsichtlich der Phosphorylierung von Erk und der Effektivität von inaktiviertem tPA untersucht werden.

4.7 Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Der klinische Einsatz von Lokalanästhetika spielt insbesondere bei der postoperativen Schmerztherapie eine wichtige Rolle. Die schmerzleitenden Fasern im Operationsgebiet werden blockiert, die Beschwerden des Patienten so gemindert. Allerdings schalten die etablierten Substanzen dabei auch motorische Nervenfasern aus, die behandelte Extremität des Patienten ist damit gelähmt. Dies stellt insbesondere bei der Betreuung älterer Patienten einen großen Nachteil dar. Der Patient bleibt länger immobilisiert, wodurch die Gefahr postoperativer Komplikationen wie z.B. einer Pneumonie oder Lungenembolie ansteigt. Der frühe Beginn einer krankengymnastischen Behandlung, die entscheidend zum funktionellen Therapieergebnis beitragen kann, wird verzögert. Darüber hinaus ist die Immobilisation in vielerlei Hinsicht „unangenehm“ für den Patienten. Er kann nicht alleine zur Toilette gehen, ist auf Hilfe beim Duschen und Waschen angewiesen und muss evtl. länger im Krankenhaus bleiben. Durch eine

selektive Blockade von Schmerzfasern könnten diese Nachteile vermieden werden, auch unerwünschte systemische Nebenwirkungen an Herz und ZNS könnten entfallen.

Die perineurale Barriere verhindert den Zugang von verschiedenen hydrophilen Substanzen, die zu einer selektiven Blockade von sensorischen oder sogar nozizeptiven Fasern führen könnten. Experimente der Arbeitsgruppe zeigen, dass das Perineurium durch perineurale Injektion von hypertoner Kochsalzlösung oder MMP9 geöffnet werden kann. Im Verhaltensversuch an Ratten konnte sowohl bei Koinjektion des selektiven $\text{Na}_v1.7$ -Inhibitors ProToxin-II als auch der Opioidagonisten DAMGO und DPDPE ein antinozizeptiver Effekt festgestellt werden.⁷¹ Der Ansatz einer vorübergehenden Öffnung des Perineuriums ermöglicht es also, auch hydrophile Pharmaka für periphere Nervenblockaden einzusetzen und darüber eine selektive Blockade von Schmerzfasern zu erreichen.

Vor einer klinischen Anwendung dieses Prinzips sind jedoch noch verschiedene potentielle Hindernisse abzuklären:

4.7.1 Nervenschädigung durch Öffnung der perineuralen Barriere

Dem Perineurium kommt als Diffusionsbarriere eine wichtige physiologische Funktion zu. Es schützt die umhüllten Nervenfasern vor toxischen Substanzen und sorgt zusammen mit dem Endothel der endoneuralen Gefäße für die Aufrechterhaltung eines konstanten endoneuralen Mikromilieus.¹²⁹ Die Öffnung des Perineuriums stellt also eine nicht unerhebliche Störung der Integrität peripherer Nerven dar. Wie Experimente der Arbeitsgruppe zeigen, bleibt das Perineurium nach Injektion von hypertoner Kochsalzlösung nur vorübergehend für ca. 4 h geöffnet. Wurde der Opioidagonist DAMGO länger als 4 h nach perineuraler Injektion der hypertonen Kochsalzlösung appliziert, konnte kein antinozizeptiver Effekt mehr ausgelöst werden.⁷¹ Nach der gleichzeitigen Injektion von 10 % NaCl und DAMGO war im Verhaltensexperiment zunächst ein Anstieg der Pfortendruckschwelle zu beobachten. Nach etwa 8 h war dieser antinozizeptive Effekt abgeklungen und die Pfortendruckschwelle der behandelten Ratten entsprach wieder dem Wert der unbehandelten Kontrolltiere. Diese Beobachtung spricht gegen eine schwerere und dauerhafte Schädigung der Nervenfasern. In diesem Fall wäre ein dauerhafter Anstieg der Pfortendruckschwelle durch die irreversible Schädigung von Schmerzfasern zu erwarten. Auf histologischer Ebene zeigten sich eine

Woche nach Injektion der hypertonen Kochsalzlösung keine Zeichen einer Nervenschädigung. Morphologische Merkmale wie die Anzahl und Myelinisierung der Axone waren im Vergleich zur Injektion von isotoner Kochsalzlösung unverändert und es konnte keine Infiltration durch Makrophagen nachgewiesen werden. Vor einer möglichen klinischen Anwendung sind dennoch genauere Toxizitätsanalysen erforderlich.

4.7.2 Substanzauswahl zur Öffnung der perineuralen Barriere

Die Anwendung von hypertoner Kochsalzlösung zur Öffnung des Perineuriums ist im klinischen Alltag nicht denkbar. Die Injektion ist sehr schmerzhaft, zusätzlich besteht die Gefahr der Nervenschädigung durch Osmolaritäts- und Elektrolytverschiebungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war in diesem Zusammenhang, die beteiligten molekularen Signalprozesse genauer aufzuschlüsseln, um so mögliche Ansatzpunkte für eine medikamentöse, nebenwirkungsärmere Öffnung des Perineuriums aufdecken zu können.

Eine Möglichkeit stellt es dabei dar, weitere **Agonisten am LRP-1 Rezeptor** zu untersuchen. Bei perineuraler Injektion von tPA konnte ebenfalls eine Öffnung des Perineuriums nachgewiesen werden. Allerdings ist nicht klar, über welchen Signalweg dieser Effekt vermittelt wird. Besonders im Hinblick auf die oben beschriebene Gefahr der Schädigung von Nervenfasern durch Störung des endoneuralen Mikromilieus ist hier zu klären, ob die Öffnung des Perineuriums durch tPA dauerhaft oder ebenfalls nur vorübergehend erfolgt. Als weiteres Hindernis kann die fibrinolytische Wirkung von tPA angesehen werden. Die Injektion einer fibrinolytischen Substanz in eine frisch operativ versorgte Extremität könnte schwere Blutungskomplikationen nach sich ziehen. Da die Injektion von tPA lokal und nicht intravasal erfolgt, könnte dieser Effekt bei einer geringen erforderlichen Substanzmenge jedoch vernachlässigbar sein.

Einen zweiten Ansatzpunkt bietet die direkte Herabregulation des Tight Junction Proteins Claudin-1 durch **Interferenzpeptide**. Die Behandlung mit dem synthetisierten C1C2-Interferenzpeptid führt zur Konzentrationsabnahme von Claudin-1 im Perineurium.¹³⁰ Dieser Effekt scheint indirekt über eine endozytotische Internalisation des Peptids und intrazelluläre Kollokalisierung mit Claudin-1 vermittelt zu werden.^{130,131}

Ein wesentlicher Nachteil dieser Herangehensweise liegt in der Kinetik der beobachteten Prozesse: erst 48 h nach Applikation des C1C2-Peptids konnte durch die perineurale Injektion von DAMGO ein antinozizeptiver Effekt erzielt werden.¹³⁰

Zusammengefasst ist damit noch keine für die Klinik optimal geeignete Anwendung zur Öffnung des Perineuriums verfügbar. Ein langfristiges Ziel könnte daher sein, über die bekannten Signalwege eine Substanz zu finden, welche die Barriere des Perineuriums möglichst kurz und möglichst nebenwirkungsarm öffnen kann.

4.7.3 Klinischer Effekt der antinozizeptiven Substanzen

Auch wenn in Verhaltensexperimenten an Ratten bei Einsatz der selektiv antinozizeptiv wirksamen Substanzen (Opioide und ProToxin-II) ein deutlicher Anstieg der Pfotendruckschwelle festzustellen war⁷¹, garantieren diese Beobachtungen noch keinen ausreichend starken analgetischen Effekt beim Einsatz am Menschen. Insbesondere die Bedeutung von Opiodrezeptoren im Axonverlauf ist noch nicht abschließend geklärt.⁶⁵ Die Frage nach einer suffizienten analgetischen Potenz wird somit vermutlich erst in abschließenden klinischen Studien geklärt werden können.

5 Zusammenfassung

Fragestellung: Experimentelle Ansätze zur selektiven Blockade von nozizeptiven Neuronen sind *in vivo* stark durch die Diffusionsbarriere des Perineuriums eingeschränkt, die das Vordringen von hydrophilen Substanzen zu ihrem Wirkort verhindert. Entscheidend für diese Barrierefunktion sind Tight Junctions zwischen Perineuralzellen, an deren Ausbildung das Transmembranprotein Claudin-1 beteiligt ist. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die periphere Injektion einer 10 % NaCl-Lösung zur vorübergehenden Öffnung des Perineuriums führt. Dabei kommt es zur Freisetzung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), die über Interaktion mit dem low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 bewirkt. Durch perineurale Koinjektion von 10 % NaCl mit dem Opioidagonisten DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin) bzw. Tetrodotoxin ist damit im Verhaltensexperiment ein analgetischer Effekt auszulösen. Beobachtungen an der Blut-Hirn-Schranke konnten eine Öffnung über Interaktion von tPA mit LRP-1 zeigen. In dieser Studie sollten die Barriereöffnung sowie intrazelluläre Signalprozesse, die an der Öffnung des Perineuriums beteiligt sind, unter verschiedenen Bedingungen (hypertone NaCl-Lösung, MMP9 und tPA) charakterisiert werden.

Methodik: MMP9, 10 % NaCl-Lösung, tPA oder Erk Inhibitor (PD 98059) wurden mit Hilfe eines Nervenstimulators perineural an den N. ischiadicus von Wistar-Ratten injiziert. Danach wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Nerven entnommen, um im Western Blot die Claudin-1 Expression in der Membranfraktion sowie die Phosphorylierung der intrazellulären Signalproteine Erk und Akt darzustellen. Nach perineuraler Injektion von tPA wurden in Schmerzverhaltenstests die Barriere öffnenden Wirkungen und immunhistochemisch und im Western Blot Auswirkungen auf die Konzentration von Claudin-1 und pErk untersucht.

Ergebnisse: Nach peripherer Injektion der 10 % NaCl-Lösung war über einen Zeitraum von 5-120 min eine Reduktion von Claudin-1 in der Membranfraktion und eine verstärkte Phosphorylierung von Erk nicht aber von Akt zu beobachten. Die Konzentrationszunahme von pErk wurde dabei nur im Perineurium, nicht im Nerveninneren nachgewiesen. Ebenso führte die periphere Injektion von MMP9 zu reduziertem Claudin-1 und einer verstärkten Phosphorylierung von Erk In

Zusammenfassung

Verhaltensexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Injektion des Erk-Inhibitors PD98059 dosisabhängig zur Aufhebung der Antinozizeption führte, die nach Gabe von DAMGO in 10 % NaCl zu beobachten war. PD98059 blockierte den Abbau von Claudin-1 nach Injektion von 10 % NaCl. Perineurale Koinjektion von aktivem tPA (als LRP-1 Ligand) und DAMGO ermöglicht ebenfalls antinozizeptive Effekte. Immunhistochemisch und im Western Blot zeigte sich bei verschiedenen Dosierungen von aktivem tPA eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1, eine verstärkte Phosphorylierung von Erk war jedoch nicht nachzuweisen. Nach Injektion von enzymatisch inaktiviertem tPA konnte nach einer Stunde keine Claudin-1 Konzentrationsänderung beobachtet werden.

Interpretation: Nach Injektion von 10 % NaCl kommt es zur verstärkten Phosphorylierung von Erk, die sich durch eine Interaktion der MMP9 Hemopexin-Domäne (MMP9-PEX) mit dem LRP-1 Rezeptor erklären lässt. Folge dieser Signalprozesse ist eine Konzentrationsabnahme von Claudin-1 und eine erhöhte Permeabilität des Perineuriums. Ähnlich zeigen erste Experimente auch nach Injektion von tPA eine Konzentrationsabnahme von Claudin. Damit bietet LRP-1 einen innovativen Angriffspunkt, um auch *in vivo* durch Öffnung des Perineuriums neue hydrophile Medikamente zur selektiven Blockade von Schmerzfasern zu nutzen.

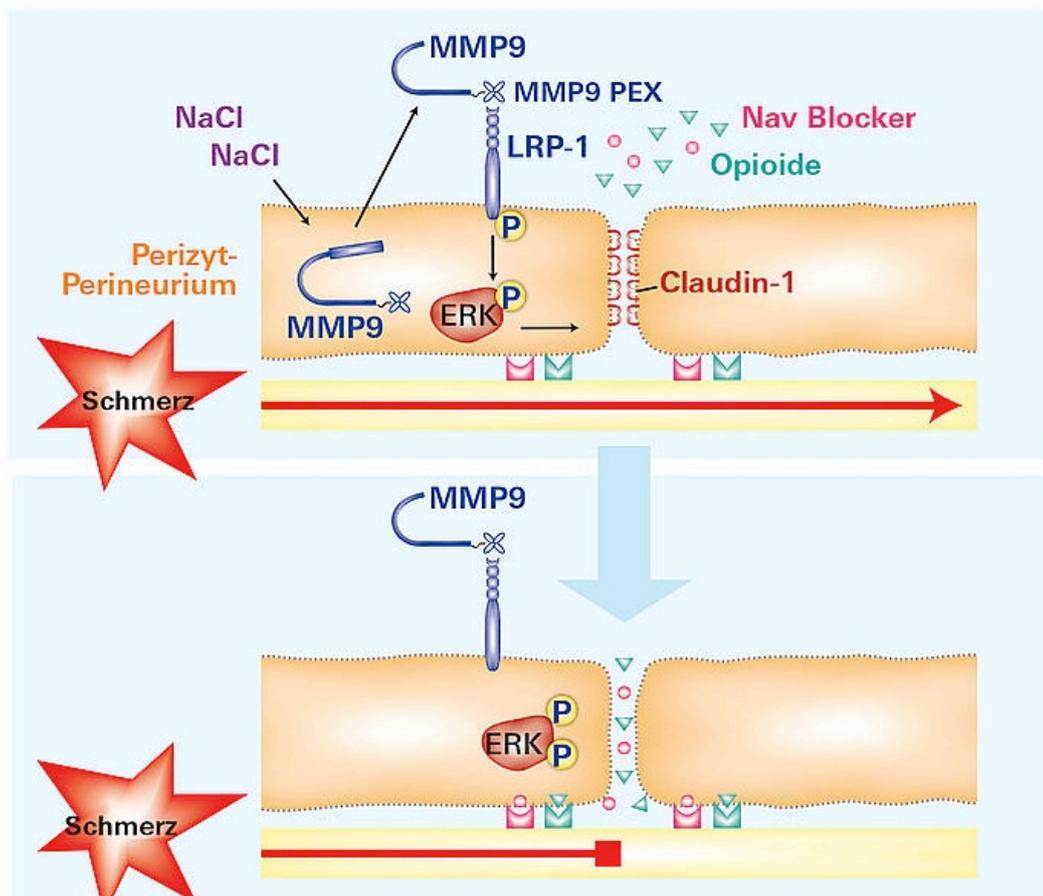


Abbildung 20: Zusammenfassung der Mechanismen zur Öffnung des Perineuriums.

Die Injektion einer hypertonen Kochsalzlösung (NaCl) führt zur vermehrten Freisetzung der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9), die über ihre Hemopexin-Domäne (MMP9-PEX) mit dem LRP-1 Rezeptor interagiert. Dieser vermittelt die verstärkte Phosphorylierung der Extracellular-signal Regulated Kinase (Erk), welche eine Konzentrationsabnahme des Tight Junction Proteins Claudin-1 bewirkt. Dadurch öffnet sich die Barriere des Perineuriums und die anitnozizeptiv wirksamen Substanzen (Opioide, Nav-Blocker) können zu ihrem Wirkort ins Nerveninnere vordringen. Die Weiterleitung des Schmerzsignals wird blockiert. (Hackel D et al. Proc Natl Acad Sci U S A (2012))

6 Literaturverzeichnis

1. White, J.P., Cibelli, M., Fidalgo, A.R. & Nagy, I. Extracellular signal-regulated kinases in pain of peripheral origin. *Eur J Pharmacol* **650**, 8-17 (2011).
2. IASP. Taxonomy: http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions.
3. Macfarlane, A.J., Prasad, G.A., Chan, V.W. & Brull, R. Does regional anaesthesia improve outcome after total hip arthroplasty? A systematic review. *Br J Anaesth* **103**, 335-345 (2009).
4. Richman, J.M., *et al.* Does continuous peripheral nerve block provide superior pain control to opioids? A meta-analysis. *Anesth Analg* **102**, 248-257 (2006).
5. Shum, C.F., *et al.* Continuous femoral nerve block in total knee arthroplasty: immediate and two-year outcomes. *J Arthroplasty* **24**, 204-209 (2009).
6. Chelly, J.E., Ghisi, D. & Fanelli, A. Continuous peripheral nerve blocks in acute pain management. *Br J Anaesth* **105 Suppl 1**, i86-96 (2010).
7. Lui, K.C. & Chow, Y.F. Safe use of local anaesthetics: prevention and management of systemic toxicity. *Hong Kong Med J* **16**, 470-475 (2010).
8. Zink, W. & Graf, B.M. [Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms]. *Anaesthesist* **52**, 1102-1123 (2003).
9. Scholz, A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth* **89**, 52-61 (2002).
10. Immke, D.C. & Gavva, N.R. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 582-591 (2006).
11. Binshtok, A.M., Bean, B.P. & Woolf, C.J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* **449**, 607-610 (2007).
12. Roberson, D.P., Binshtok, A.M., Basl, F., Bean, B.P. & Woolf, C.J. Targeting of sodium channel blockers into nociceptors to produce long-duration analgesia: a systematic study and review. *Br J Pharmacol* **164**, 48-58 (2011).
13. Jordt, S.E., *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-265 (2004).
14. Leffler, A., Lattrell, A., Kronewald, S., Niedermirtl, F. & Nau, C. Activation of TRPA1 by membrane permeable local anesthetics. *Molecular pain* **7**, 62 (2011).
15. Story, G.M., *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829 (2003).
16. Binshtok, A.M., *et al.* Coapplication of lidocaine and the permanently charged sodium channel blocker QX-314 produces a long-lasting nociceptive blockade in rodents. *Anesthesiology* **111**, 127-137 (2009).
17. Peters, C.M., Ririe, D., Houle, T.T., Aschenbrenner, C.A. & Eisenach, J.C. Nociceptor-selective Peripheral Nerve Block Induces Delayed Mechanical Hypersensitivity and Neurotoxicity in Rats. *Anesthesiology* (2013).
18. Brenneis, C., *et al.* Bupivacaine-induced cellular entry of QX-314 and its contribution to differential nerve block. *Br J Pharmacol* **171**, 438-451 (2014).
19. Dib-Hajj, S.D., Black, J.A. & Waxman, S.G. Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med* **10**, 1260-1269 (2009).

20. Toledo-Aral, J.J., *et al.* Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1527-1532 (1997).
21. Djouhri, L., *et al.* Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na⁺ channel alpha subunit protein. *J Physiol* **546**, 565-576 (2003).
22. Nassar, M.A., *et al.* Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12706-12711 (2004).
23. Cox, J.J., *et al.* An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* **444**, 894-898 (2006).
24. Cummins, T.R., Sheets, P.L. & Waxman, S.G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* **131**, 243-257 (2007).
25. Schmalhofer, W.A., *et al.* ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol* **74**, 1476-1484 (2008).
26. Kieffer, B.L. & Gaveriaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology* **66**, 285-306 (2002).
27. Mutschler, E., Geislinger, G., Kroemer, H., Menzel, S. & Ruth, P. *Arzneimittelwirkungen*, (2012).
28. Brack, A., *et al.* Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain* **108**, 67-75 (2004).
29. Stein, C., Schafer, M. & Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* **9**, 1003-1008 (2003).
30. Labuz, D., *et al.* Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* **119**, 278-286 (2009).
31. Kalso, E., Smith, L., McQuay, H.J. & Andrew Moore, R. No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour--lessons learned from IA morphine. *Pain* **98**, 269-275 (2002).
32. Grant, G.J., Vermeulen, K., Zakowski, M.I. & Langerman, L. Perineural antinociceptive effect of opioids in a rat model. *Acta Anaesthesiol Scand* **45**, 906-910 (2001).
33. Likar, R., *et al.* Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. *J Pain Symptom Manage* **21**, 330-337 (2001).
34. Antonijevic, I., Mousa, S.A., Schafer, M. & Stein, C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci* **15**, 165-172 (1995).
35. Rittner, H.L., *et al.* Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun* **23**, 548-557 (2009).
36. Pina-Oviedo, S. & Ortiz-Hidalgo, C. The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv Anat Pathol* **15**, 147-164 (2008).
37. Kucenas, S., *et al.* CNS-derived glia ensheath peripheral nerves and mediate motor root development. *Nat Neurosci* **11**, 143-151 (2008).
38. Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002907 (2010).

39. Anderson, J.M. & Van Itallie, C.M. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002584 (2009).
40. Schulzke, J.D., Gunzel, D., John, L.J. & Fromm, M. Perspectives on tight junction research. *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 1-19 (2012).
41. Raleigh, D.R., *et al.* Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* **21**, 1200-1213 (2010).
42. Furuse, M., *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-1788 (1993).
43. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B.E. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 1-44 (2003).
44. Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. & Tsukita, S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391-401 (1998).
45. Saitou, M., *et al.* Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* **141**, 397-408 (1998).
46. Saitou, M., *et al.* Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-4142 (2000).
47. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-1550 (1998).
48. Mineta, K., *et al.* Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* **585**, 606-612 (2011).
49. Schulzke, J.D. & Fromm, M. Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci* **1165**, 1-6 (2009).
50. Furuse, M., *et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **156**, 1099-1111 (2002).
51. Krug, S.M., *et al.* Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* **34**, 275-282 (2013).
52. Angelow, S., Ahlstrom, R. & Yu, A.S. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F867-876 (2008).
53. Krause, G., *et al.* Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 631-645 (2008).
54. Fujibe, M., *et al.* Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* **295**, 36-47 (2004).
55. Yamauchi, K., *et al.* Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4690-4694 (2004).
56. D'Souza, T., Agarwal, R. & Morin, P.J. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 26233-26240 (2005).
57. Krug, S.M., *et al.* Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* **20**, 3713-3724 (2009).

58. Cording, J., *et al.* In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci* **126**, 554-564 (2013).
59. Bazzoni, G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current opinion in cell biology* **15**, 525-530 (2003).
60. Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A. & Citi, S. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 601-613 (2008).
61. Ronaldson, P.T. & Davis, T.P. Targeting blood-brain barrier changes during inflammatory pain: an opportunity for optimizing CNS drug delivery. *Therapeutic delivery* **2**, 1015-1041 (2011).
62. Ronaldson, P.T., Demarco, K.M., Sanchez-Covarrubias, L., Solinsky, C.M. & Davis, T.P. Transforming growth factor-beta signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1084-1098 (2009).
63. Pummi, K.P., Heape, A.M., Grenman, R.A., Peltonen, J.T. & Peltonen, S.A. Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* **52**, 1037-1046 (2004).
64. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M. & Tsukita, S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* **147**, 185-194 (1999).
65. Rittner, H.L., *et al.* Modulation of tight junction proteins in the perineurium to facilitate peripheral opioid analgesia. *Anesthesiology* **116**, 1323-1334 (2012).
66. Weerasuriya, A. & Mizisin, A.P. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* **686**, 149-173 (2011).
67. Hirakawa, H., Okajima, S., Nagaoka, T., Takamatsu, T. & Oyamada, M. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res* **284**, 196-210 (2003).
68. Miyamoto, T., *et al.* Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 527-538 (2005).
69. Gow, A., *et al.* CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* **99**, 649-659 (1999).
70. Schafer, M., Imai, Y., Uhl, G.R. & Stein, C. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* **279**, 165-169 (1995).
71. Hackel, D., *et al.* Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012).
72. Klein, T. & Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids* **41**, 271-290 (2011).
73. Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5578-5582 (1990).
74. Murphy, G. & Nagase, H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* **29**, 290-308 (2008).
75. Strickland, D.K., Gonias, S.L. & Argraves, W.S. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 66-74 (2002).

76. Herz, J. & Strickland, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784 (2001).
77. Bu, G., Williams, S., Strickland, D.K. & Schwartz, A.L. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7427-7431 (1992).
78. Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P. & Strickland, D.K. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* **276**, 15498-15503 (2001).
79. Mantuano, E., *et al.* The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurosci* **28**, 11571-11582 (2008).
80. Yamauchi, K., *et al.* Low-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes neurotrophic activity in embryonic sensory neurons. *PLoS One* **8**, e75497 (2013).
81. Herz, J., Goldstein, J.L., Strickland, D.K., Ho, Y.K. & Brown, M.S. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* **266**, 21232-21238 (1991).
82. Williams, S.E., Ashcom, J.D., Argraves, W.S. & Strickland, D.K. A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* **267**, 9035-9040 (1992).
83. Yepes, M., *et al.* Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* **112**, 1533-1540 (2003).
84. Geetha, N., *et al.* Signal integration and coincidence detection in the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade: concomitant activation of receptor tyrosine kinases and of LRP-1 leads to sustained ERK phosphorylation via down-regulation of dual specificity phosphatases (DUSP1 and -6). *J Biol Chem* **286**, 25663-25674 (2011).
85. Waters, S.B., *et al.* Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J Biol Chem* **270**, 20883-20886 (1995).
86. Dougherty, M.K., *et al.* Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* **17**, 215-224 (2005).
87. Keyse, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 253-261 (2008).
88. Zhuang, Z.Y., Gerner, P., Woolf, C.J. & Ji, R.R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* **114**, 149-159 (2005).
89. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
90. Mackman, N. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 2273-2281 (2005).
91. Cohen, J.E., *et al.* State-of-the-art reperfusion strategies for acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci* **18**, 319-323 (2011).

92. Hu, K., *et al.* Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* **281**, 2120-2127 (2006).
93. Mantuano, E., Lam, M.S. & Gonias, S.L. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **288**, 34009-34018 (2013).
94. Smith, P.K., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
95. Randall, L.O. & Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**, 409-419 (1957).
96. Luo, L., Li, D.Q., Corrales, R.M. & Pflugfelder, S.C. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens* **31**, 186-193 (2005).
97. Chen, Y., Hashiguchi, N., Yip, L. & Junger, W.G. Hypertonic saline enhances neutrophil elastase release through activation of P2 and A3 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1051-1059 (2006).
98. Demestre, M., *et al.* Characterisation of matrix metalloproteinases and the effects of a broad-spectrum inhibitor (BB-1101) in peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* **124**, 767-779 (2004).
99. Cha, H., Kopetzki, E., Huber, R., Lanzendorfer, M. & Brandstetter, H. Structural basis of the adaptive molecular recognition by MMP9. *Journal of molecular biology* **320**, 1065-1079 (2002).
100. Van den Steen, P.E., *et al.* The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem* **281**, 18626-18637 (2006).
101. Ezhilarasan, R., *et al.* The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **124**, 306-315 (2009).
102. Roeb, E., *et al.* The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* **277**, 50326-50332 (2002).
103. Maskos, K. & Bode, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol* **25**, 241-266 (2003).
104. Selvais, C., *et al.* Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *Faseb J* **25**, 2770-2781 (2011).
105. Fayard, B., *et al.* The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res* **69**, 5690-5698 (2009).
106. Gaide Chevronnay, H.P., *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 146-156 (2012).
107. Hanover, J.A., Willingham, M.C. & Pastan, I. Receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin: solubilization and partial purification of the fibroblast alpha 2-macroglobulin receptor. *Ann N Y Acad Sci* **421**, 410-423 (1983).

108. Oie, C.I., *et al.* Rat liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) express functional low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Hepatol* **55**, 1346-1352 (2011).
109. Mantuano, E., Mukandala, G., Li, X., Campana, W.M. & Gonias, S.L. Molecular dissection of the human alpha2-macroglobulin subunit reveals domains with antagonistic activities in cell signaling. *J Biol Chem* **283**, 19904-19911 (2008).
110. Chuderland, D. & Seger, R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* **29**, 57-74 (2005).
111. Shi, Y., Mantuano, E., Inoue, G., Campana, W.M. & Gonias, S.L. Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal* **2**, ra18 (2009).
112. Segal, R.A. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual review of neuroscience* **26**, 299-330 (2003).
113. Stiles, T.L., *et al.* LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. *J Cell Sci* **126**, 209-220 (2013).
114. Barnes, H., Larsen, B., Tyers, M. & van Der Geer, P. Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J Biol Chem* **276**, 19119-19125 (2001).
115. Ravichandran, K.S. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* **20**, 6322-6330 (2001).
116. Loukinova, E., *et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* **277**, 15499-15506 (2002).
117. Langlois, B., *et al.* LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One* **5**, e11584 (2010).
118. Wang, Y., Zhang, J., Yi, X.J. & Yu, F.S. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* **78**, 125-136 (2004).
119. Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K. & Sugatani, J. Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J Cell Physiol* **226**, 2448-2456 (2011).
120. Su, E.J., *et al.* Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* **14**, 731-737 (2008).
121. Nicole, O., *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7**, 59-64 (2001).
122. Ng, K.S., Leung, H.W., Wong, P.T. & Low, C.M. Cleavage of NR2B N-terminus of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor by tissue plasminogen activator: Identification of the cleavage site and characterization of ifenprodil and glycine affinities on truncated NMDA receptor. *J Biol Chem* (2012).
123. Yao, Y. & Tsrka, S.E. Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *J Cell Sci* **124**, 1486-1495 (2011).

124. Zeng, R., Li, X. & Gorodeski, G.I. Estrogen abrogates transcervical tight junctional resistance by acceleration of occludin modulation. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 5145-5155 (2004).
125. Niego, B., Freeman, R., Puschmann, T.B., Turnley, A.M. & Medcalf, R.L. t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes. *Blood* **119**, 4752-4761 (2012).
126. Rodriguez-Gonzalez, R., *et al.* Platelet derived growth factor-CC isoform is associated with hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Atherosclerosis* **226**, 165-171 (2013).
127. May, P., Reddy, Y.K. & Herz, J. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* **277**, 18736-18743 (2002).
128. Soh, U.J., Dores, M.R., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* **160**, 191-203 (2010).
129. Hackel, D., Brack, A., Fromm, M. & Rittner, H.L. Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control. *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 199-206 (2012).
130. Zwanziger, D., *et al.* A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol Pharm* **9**, 1785-1794 (2012).
131. Zwanziger, D., Staat, C., Andjelkovic, A.V. & Blasig, I.E. Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 29-37 (2012).

7 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen.....	2
Abbildung 1: Querschnitt eines peripheren Nervens	5
Abbildung 2: Öffnung des Perineuriums durch lokale Injektion von 10 % NaCl	12
Abbildung 3: Injektion von 10 % NaCl reduziert die Claudin-1 Konzentration.	13
Abbildung 4: Öffnung des Perineuriums durch MMP9-PEX.	14
Abbildung 5: Beeinflussende Faktoren der pErk Konzentration.	17
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	20
Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren und Enzyme.....	21
Tabelle 5: Zytosol-Lysepuffer und Membran-Lysepuffer; vor Benutzung wurden jeweils 10 ml mit einem Protease-Inhibitorcocktail (complete mini) versehen.	22
Abbildung 6: Bildung eines violetten Komplexes durch BCA und Cu^+ aus der Biuretreaktion. (Smith et al. Analytical Biochemistry 150, 76-85 (1985)).....	23
Tabelle 6: Zusammensetzung des Elektrophoresegels.....	25
Tabelle 7: Elektrophoresepuffer und Ladepuffer	25
Tabelle 8: Semi-Dry Puffer	26
Abbildung 7: Schemazeichnung des Semi-Dry Systems	26
Tabelle 9: Coomassie Blau und Entfärbelösung	27
Tabelle 10: Arbeitsschritte der Immundetektion.....	28
Tabelle 11: TBS-Tween und Blockierlösung.....	28
Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper	29
Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper.....	30
Tabelle 14: Verwendete Antikörper der Claudin-1 Färbung	32
Tabelle 15: Verwendete Software	33
Abbildung 8: Erhöhte Phosphorylierung von Erk nach Injektion von 10 % NaCl.	35
Abbildung 9: Verstärkte Phosphorylierung von Erk im Perineurium nach Injektion von 10 % NaCl.	36
Abbildung 10: Verstärkte Phosphorylierung von Erk nach lokaler Injektion von MMP9.	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 11: MEK1-Inhibition reduziert den antinozizeptiven Effekt von 10 % NaCl + DAMGO.	38
Abbildung 12: MEK1-Inhibition blockiert die Abnahme des Claudin-1 Gehalts nach Injektion von 10 % NaCl.....	39
Abbildung 13: Perineurale Injektion von 10 % NaCl führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Akt.	40
Abbildung 14: Injektion von MMP9 führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Akt.....	41
Abbildung 15: Antinozizeptiver Effekt nach perineuraler Koinjektion von tPA und DAMGO.....	42
Abbildung 16: Perineurale Injektion von tPA reduziert die Claudin-1 Konzentration...44	
Abbildung 17: Injektion von tPA reduziert dosisabhängig den Claudin-1 Proteingehalt.	45
Abbildung 18: Injektion von inaktiviertem tPA führt zu keiner signifikanten Änderung des Claudin-1 Gehalts nach 1 h.....	46
Abbildung 19: Injektion von tPA führt zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Erk nach 1 h.....	47
Abbildung 20: Zusammenfassung der Mechanismen zur Öffnung des Perineuriums....	62

8 Verzeichnis der Hersteller

<u>Hersteller:</u>	<u>Ort:</u>	<u>Land:</u>
Alpha Innotech	Santa Clara, Kalifornien	USA
AppliChem	Darmstadt	Deutschland
Bandelin	Berlin	Deutschland
B.Braun	Melsungen	Deutschland
Biochrom	Berlin	Deutschland
Biometra	Göttingen	Deutschland
Boehringer	Ingelheim	Deutschland
Cell Signaling	Danvers, Massachusetts	USA
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
GE Healthcare	München	Deutschland
Invitrogen	Darmstadt	Deutschland
Leica	Solms	Deutschland
Marienfeld	Lauda-Königshofen	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Microsoft	Redmond, Washington	USA
Millipore	Billerica, Massachusetts	USA
Molecular Innovations	Novi, Michigan	USA
Nunc	Langenselbold	Deutschland
Olympus	Hamburg	Deutschland
Peqlab	Erlangen	Deutschland
Pierce	Bonn	Deutschland
Roche	Basel	Schweiz
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Sakura	Alphen aan den Rijn	Niederlande
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Sigma-Aldrich	Hamburg	Deutschland

Verzeichnis der Hersteller

Systat Software Inc.	San Jose, Kalifornien	USA
Tecan	Männedorf	Deutschland
Thermo Scientific	Bonn	Deutschland
Thomson Reuters	New York City, New York	USA
Vector	Peterborough	Großbritannien
Whatman	Dassel	Deutschland

Danksagung

In den etwa vier Jahren, die ich an dieser Dissertation gearbeitet habe, wurde ich von verschiedenen Seiten tatkräftig unterstützt. Ich möchte hier die Gelegenheit nutzen, mich bei diesen Helfern und Betreuern zu bedanken.

Vor allem möchte ich **Frau Priv.-Doz. Heike Rittner und Herrn Prof. Alexander Brack** für die herausragende Betreuung danken. Durch ihre Unterstützung und Förderung bekam ich die Möglichkeit, meine Arbeit in Form von Vorträgen und einem Poster auf mehreren wissenschaftlichen Kongressen vorzustellen. Während der stets sehr angenehmen und konstruktiven Zusammenarbeit konnte ich viele positive Erfahrungen im Bereich der experimentellen Forschung sammeln.

Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel danke ich für die praktischen Hilfestellungen im Labor, die Durchführung der Verhaltensexperimente und die vielen aufmunternden Worte.

Mein Dank gilt den Technischen Assistentinnen **Frau Bianca Schneiker und Frau Katarina Pech** für die Einarbeitung in die Methodik der Immunhistochemie und des Western Blots. **Frau Judith Skirde** will ich für viele hilfreiche Ratschläge bei technischen Problemen der Western Blot Untersuchungen danken. Allen Mitarbeitern des anästhesiologischen Labors danke ich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht auch an **Frau Prof. Esther Asan** aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, die mir für immunhistochemische Untersuchungen ein Immunfluoreszenzmikroskop zur Verfügung stellte.

Außerdem möchte ich der **Deutschen Schmerzgesellschaft (DGSS)** für die Unterstützung dieser Arbeit mit einem Promotionsstipendium danken.

Nicht zuletzt danke ich **meinen Eltern**, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht haben und mir in den verschiedenen Phasen meiner Ausbildung mit Rat und aufmunternden Worten zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Clemens-Alexander Böcker
Telefon: 015256425491
e-mail: alex-boecker@web.de
Geburtsdatum: 26.11.1986 in Marburg

Studium:

11/2013: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: sehr gut (1,0); 93,7% im schriftlichen Teil
03/2009: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: sehr gut (1,0); bundesweit bestes Ergebnis mit 96,6% im schriftlichen Teil
04/2007 – 11/2013: Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1997 - 2006: Gymnasium Feuchtwangen, Abschluss: Abitur (1,4)

Dissertation:

10/2011: Posterpreis und Auszeichnung für den besten Nachwuchsvortrag am Deutschen Schmerzkongress in Mannheim
05/2011 Teilnahme an der Juniorakademie der Deutschen Schmerzgesellschaft (DGSS)
10/2010: Promotionsstipendium der DGSS
03/2010: Beginn der Promotionsarbeit: “Intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse bei der Öffnung des Perineuriums“ in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Würzburg

Publikationen:

Hackel, D., Krug, S. M., Sauer, R.-S., Mousa, S. A., **Böcker, A.**, Pflücke, D., et al. (2012). Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Zwanziger, D., Hackel, D., Staat, C., **Böcker, A.**, Brack, A., Beyermann, M., et al. (2012). A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Molecular pharmaceutics*, 9(6), 1785–1794.

Yang, S., Krug, S., Heitmann, J., Bosten J., Hackel, D., **Böcker, A.**, Niedermirtl, B. Fromm, M., Brack, A., Rittner, H.L. Mechanisms of rtPA-induced opening of the blood nerve barrier (2014) Manuskript in Vorbereitung.

Lebenslauf

Vorträge:

Böcker, A., Hackel, D., Amasheh, S., Roewer, N., Fromm, M., Rittner, H., Brack, A. (2012). *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) Rezeptor als Angriffspunkt für die Öffnung des Perineuriums zur Regionalanalgesie in Ratten.* Vortrag an den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI und Abstract (*Anästhesiologie und Intensivmedizin 2012, 7: 370-420*)

Poster:

Böcker, A., Hackel, D., Amasheh, S., Fromm, M., Brack, A., Rittner, H. (2011). *Intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse bei der Regulation der Permeabilität des Perineuriums.* Vortrag und Poster am Deutschen Schmerzkongress.

Praktisches Jahr:

04/2013 – 07/2013: Neurologie, Universitätsklinikum Würzburg
02/2013 – 03/2013: Innere Medizin, University of Rochester, New York (unterstützt durch das Homberger-Austauschstipendium der Universität Würzburg)
12/2012 – 02/2013: Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg
08/2012 – 12/2012: Chirurgie, Universitätsspital Basel

Famulaturen:

03/2012 – 04/2012: Neurologie, Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim
04/2011: Kardiologie, Praxis Dr. med. Sturm in Ansbach
09/2010: Radiologie, Universitätsklinikum Würzburg
08/2009: Anästhesie, Verbundklinikum Landkreis Ansbach

Weitere Aktivitäten:

09/2010 – 12/2012: Studentische Hilfskraft im e-learning Projekt "CaseTrain" der Universität Würzburg
10/2008–03/2009: Assistenz im Kursus der makroskopischen Anatomie bei Prof. Dr. med. Jens Waschke
07/2006-03/2007 Zivildienst am Verbundklinikum Landkreis Ansbach

Interessen:

Schwimmen: Mitglied im Schwimmverein SG Frankenhöhe, mehrmalige Teilnahme an Deutschen Hochschulmeisterschaften
Segeln: Törns vor Italien, Kroatien und in der Ostsee