

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Univ.-Professor Dr. Dr. h.c. N. Roewer

Charakterisierung von weiblichen Claudin-12 knock-out Mäusen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Isabel Otto

aus Uttenreuth

Würzburg, Dezember 2019

Referent: Prof. Dr. med. Heike Rittner

Korreferent/ Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Kathleen Wermke

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Widmung

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Barriersysteme im peripheren Nerv	1
1.1.1	Der periphere Nerv	1
1.1.2	Die Blut-Nerven-Schranke	2
1.1.3	Die Myelin-Barriere	3
1.2	Tight Junction Proteine als wichtige Membranproteine der Blut-Nerven-Schranke	4
1.2.1	Molekulare Struktur und histologischer Aufbau der Tight Junction Proteine	4
1.2.2	Claudine als bedeutende Untergruppe der Tight Junction Proteine	5
1.2.3	Tight Junction Proteine und Barrierefunktion	7
1.3	Neuropathie und Barrierefunktion	8
1.4	Vorangegangene Forschungsergebnisse	9
1.5	Fragestellung der Promotion	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.1.1	Haltung der Mäuse	11
2.1.2	Knock-out Mäuse	11
2.2	Genotypisierung der Versuchstiere	11
2.2.1	Prinzip der Genotypisierung	11
2.2.2	Protokoll der DNA Extraktion	12
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der Versuchstiere	12
2.2.4	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	13
2.3	Immunhistochemie	14
2.3.1	Probenentnahme und Aufbereitung des Spinalganglions und des Nervus ischiadicus	14
2.3.2	Prinzip der immunhistochemischen Färbung	14
2.3.3	Protokoll des Färbevorgangs	15
2.4	Permeabilitätstest	15
2.4.1	Prinzip der Permeabilitätstests	15
2.4.2	Permeabilitätstest des Perineuriums	16
2.4.3	Permeabilitätstest der Myelin-Barriere	16
2.5	Bildanalyse	17
2.5.1	Bilderfassung	17

2.5.2	Quantitative Analyse der Aufnahmen der Nervenquerschnitte und Zupfpräparate.....	17
2.6	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	19
2.6.1	Prinzip der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	19
2.6.2	Protokoll der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	20
2.6.3	Auswertung der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion ...	21
2.7	Western Blot.....	22
2.7.1	Prinzip des Western Blots	22
2.7.2	Protokoll des Western Blots	22
2.8	Statistik und Versuchsauswertung	26
2.9	Verwendete Chemikalien, Antikörper und Primer/TaqMan Proben....	27
2.10	Verwendete Geräte, Materialien und Softwareprogramme	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Intakte Blut-Nerven-Schranke bei weiblichen <i>Cldn12</i>-KO Mäusen	32
3.1.1	Das Ausschalten von <i>Cldn12</i> hat keine Auswirkung auf die Barriere des Perineuriums	32
3.1.1.1	Unveränderte Permeabilität des Perineuriums bei weiblichen <i>Cldn12</i> -KO Mäusen	32
3.1.1.2	Immunreaktivität und Verteilungsmuster von Tight Junction Proteinen im Perineurium	33
3.1.2	Keine Veränderung in der Immunreaktivität von <i>Cldn5</i> als Hinweis auf die intakte Barriere der endoneurialen Gefäße	35
3.2	Normale Funktion der Myelin-Barriere trotz des Fehlens von <i>Cldn12</i> bei weiblichen Mäusen	36
3.2.1	Ähnliche Permeabilität der Myelin-Barriere bei beiden Versuchsgruppen	36
3.2.2	Keine Unterschiede in der Immunreaktivität von <i>Cldn19</i> zwischen der WT Gruppe und der <i>Cldn12</i> -KO Gruppe.....	37
3.2.3	Das Fehlen von <i>Cldn12</i> hat keine signifikante Auswirkung auf die Expression Myelin-spezifischer Proteine.....	38
3.2.4	Das Ausschalten von <i>Cldn12</i> wirkt sich nicht auf die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren von Schwanzzellen aus	39
3.3	Unveränderte Expression des Zell-Barrieren-Stabilisators <i>Shh</i> bei weiblichen <i>Cldn12</i>-KO Mäusen.....	40
3.4	Gleiche neuronale Zusammensetzung des Spinalganglions bei männlichen WT Mäusen und <i>Cldn12</i>-KO Mäusen.....	41
4	Diskussion.....	43
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
4.2	Methodendiskussion	45

4.2.1	Immunhistochemie	45
4.2.2	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	46
4.2.3	Western Blot.....	47
4.3	Ergebnisdiskussion.....	47
4.3.1	Wichtige Aufgabe der peripheren Barrieren beim Schutz vor neuropathischen Schmerzen.....	47
4.3.2	Periphere Veränderungen durch das Ausschalten von TJP	49
4.3.3	Bedeutung von SHh für die Barrierefunktion des peripheren Nerven.	49
4.3.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Schmerz	51
4.4	Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick.....	53
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis.....	57
7	Abbildungsverzeichnis.....	64
8	Tabellenverzeichnis.....	65
9	Abkürzungsverzeichnis.....	66
10	Publikation	68
	Danksagung.....	69
	Lebenslauf	70

1 Einleitung

1.1 Barriersysteme im peripheren Nerv

1.1.1 Der periphere Nerv

Das Nervensystem lässt sich in das periphere Nervensystem (PNS) und das zentrale Nervensystem (ZNS) untergliedern. Hierbei bilden das Rückenmark und das Gehirn das ZNS. Das PNS hingegen umfasst das Nervengewebe, das außerhalb dieser beiden Strukturen liegt. Neben den Spinalnerven zählen auch die Hirnnerven III-XII zum PNS. Dies ist jedoch eine rein topografische Unterscheidung. Funktionell lässt sich das PNS nicht vom ZNS abgrenzen. Über Afferenzen werden Informationen aus der Körperperipherie an das ZNS weitergeleitet, von diesem ausgewertet und anschließend über Efferenzen des PNS an das Zielorgan übermittelt. Die Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung der Informationen erfolgt im PNS über die Neurone in den Spinalganglien. Die Spinalganglien sind eine Ansammlung von Perikarya (Nervenzellkörper), die als Verdickung an der Hinterwurzel der Spinalnerven imponieren. Dabei werden Isolectin B4 (IB4)-positive Neurone und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-positive Neurone unterschieden, die für die Schmerzwahrnehmung von Bedeutung sind (1, 2). Eine weitere Untergruppe von Neuronen, Neurofilament 200 (NF200)-positive Neurone, werden mit Schmerz und Propriozeption assoziiert (3). Die weitere Fortleitung des Informationsflusses erfolgt über Nervenfasern. Dabei differenziert man zwischen Nervenfasern mit und ohne Myelinscheide. Im PNS bilden die Myelinscheiden eine Schutzbarriere und isolieren den Nerv elektrisch. Jede Nervenfasern wird im peripheren Nerv vom Endoneurium umgeben. Viele Nervenfasern, auch als Axone bezeichnet, bilden einen Faszikel. Dieser wiederum wird vom Perineurium umhüllt (4). Eine Gruppe von Faszikeln wird vom bindegewebigen Epineurium, einer Fortsetzung der Dura mater, umschlossen. Das Epineurium enthält neben kollagenem Bindegewebe Fettzellen, durch welche der Nerv gepolstert wird. Die den Nerv versorgenden großen Blutgefäße sind ebenfalls in dieser Schicht eingebettet (5) (*Abbildung 1*).

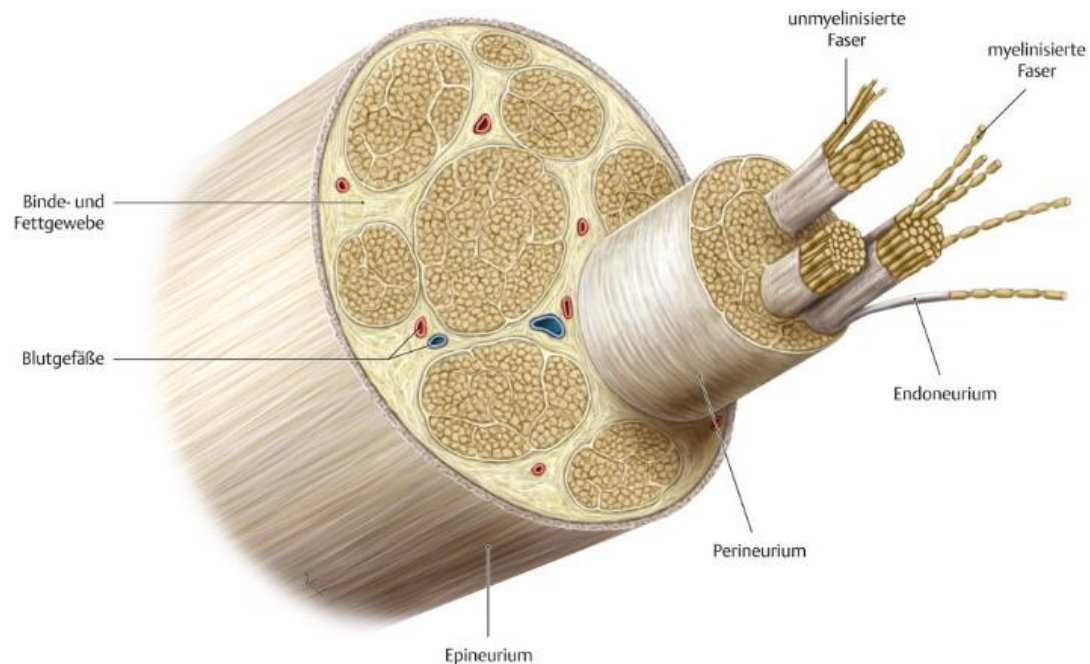


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des peripheren Nerven

Darstellung des Epineuriums mit Binde- und Fettgewebe, in dem Blutgefäße lokalisiert sind. Die einzelnen Nervenfaserbündel (Faszikel) sind vom Perineurium umgeben. Mehrere Nervenfasern, myelinisiert oder unmyelinisiert, bilden dabei einen Faszikel. Eine einzelne Nervenfaser wird vom Endoneurium umrundet (6).

1.1.2 Die Blut-Nerven-Schranke

Da das PNS empfindlich auf Noxen aus der Umgebung und Veränderungen der Homöostase reagiert, sowie wichtig für den Erhalt von Vitalfunktionen ist, wird es durch verschiedene Schichten geschützt. Eine zentrale Bedeutung für den Schutz des Nerven hat die Blut-Nerven-Schranke (BNS) (7), die durch das Perineurium und die endoneurialen Gefäße gebildet wird. Für das korrekte Funktionieren der Barriere und den Schutz des Nerven vor mechanischen und entzündlichen Schäden scheint zudem der Zell-Barrieren-Stabilisator Sonic Hedgehog (SHh) besonders wichtig zu sein (8).

Perineurium

Das Perineurium wird in eine äußere Schicht, die Pars fibrosa, und eine innere Schicht, die Pars epitheloidea, unterteilt. Die äußere Schicht hat hauptsächlich mechanische Aufgaben, während die innere Schicht des Perineuriums die

Funktion einer Diffusionsbarriere (Perineuralscheide) übernimmt. Diese Schicht enthält bis zu 20 Lamellen, die sich um den Faszikel wickeln. Dabei wird jede Lamelle sowohl von innen als auch von außen von einer Basallamina, bestehend aus epitheloiden Myofibroblasten, bedeckt. Diese sind für die Dehnbarkeit des Perineuriums verantwortlich. Die Zellen der Perineuralscheide sind modifizierte Fibroblasten, die über Tight Junctions (TJ), Gap Junctions und Adherens Junctions miteinander verbunden sind (4, 9, 10).

Endoneuriale Gefäße

Die zweite bedeutende Struktur der BNS sind die endoneurialen Gefäße, die im Endoneurium lokalisiert sind. Als Endoneuralraum wird der Raum bezeichnet, der vom Perineurium umschlossen wird. Dieser Raum enthält eine endoneuriale Flüssigkeit, die der zerebrospinalen Flüssigkeit des ZNS sehr ähnlich ist. Eine zentrale Aufgabe im Endoneurium übernehmen die Endothelzellen der endoneurialen Kapillaren. Diese sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase, den Schutz des nervalen Mikromilieus und die Minimierung von im Blut gebildeter Toxine verantwortlich (4). Die Endothelzellen sind über TJ miteinander verbunden, die allerdings permeabler als die des Perineuriums sind. Bei Geburt sind die TJ-Verbindungen sehr durchlässig, mit zunehmendem Alter ändert sich dies hingegen und die Dichte der TJ-Proteine (TJP) nimmt allmählich zu (11). Neben den Kapillaren sind im Endoneuralraum Makrophagen und Mastzellen zu finden.

1.1.3 Die Myelin-Barriere

Zusätzlich zur BNS bilden myelinisierende Schwannzellen eine weitere Barrierefunktion im PNS, die Myelin-Barriere (MB). Diese Barriere entsteht, indem sich Gliazellen in mehreren Schichten um die Nervenfasern wickeln. Hierdurch wird die Nervenfasern geschützt und isoliert. Durch diese Myelinschichten wird zudem die Leitungsgeschwindigkeit des Nerven erhöht. In regelmäßigen Abständen wird die Myelinscheide des Nerven durch kurze myelinfreie Bereiche, die Ranvier-Schnürringe, unterbrochen. In diesem Bereich springt die Erregungsleitung von Schnürring zu Schnürring. Durch diesen Aufbau

ist eine schnellere Fortleitung eines Signals im Vergleich zu marklosen Axonen möglich. Unter dem Mesaxon versteht man eine doppelgewundene Membran aus Schwannzellen, welche den Nerv umspannt. Dabei unterscheidet man ein inneres Mesaxon von einem äußeren Mesaxon. Während das innere Mesaxon in die neuronale Zellmembran übergeht, setzt sich das äußere Mesaxon in das kompakte Myelin fort. Bei dem Prozess der Myelinisierung werden zudem stellenweise schmale Bereiche hinterlassen, bei denen die Zytoplasmamembran der Schwannzellen nicht zu Myelin kompaktiert ist. Aus diesem Grund bleiben zytoplasmahaltige Kanäle bestehen, die auch als Schmidt-Lantermann Einkerbungen bezeichnet werden. Durch diese Einkerbungen steht das Zytoplasma der Schwannzellen in Kontakt mit der inneren Schicht der Myelinhülle (9, 12).

1.2 Tight Junction Proteine als wichtige Membranproteine der Blut-Nerven-Schranke

1.2.1 Molekulare Struktur und histologischer Aufbau der Tight Junction Proteine

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass TJP enge Verbindungen zwischen Plasmamembranen benachbarter Zellen bilden. Die Struktur dieser Verbindungen wurde erstmals von Farquhar und Palade vor über 50 Jahren beschrieben (13). Einige Jahre später wurde mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie versucht TJ Verbindungen sichtbar zu machen. Hierbei stellten sich die TJP als ein Geflecht aus Fibrillen dar, die aus einer Reihe von Transmembranpartikeln bestehen und somit eine Diffusionsbarriere formen (14, 15). Die Anzahl und Morphologie der Membrankontakte unterschieden sich dabei zwischen verschiedenen Geweben (16). Parallel dazu fanden Physiologen heraus, die den epithelialen Transport untersuchten, dass TJP, die als undurchlässige Struktur galten, zum Teil durchlässig für Ionen und gelöste Stoffe sind (17). Durch diese Beobachtungen veranlasst, wurden TJP in verschiedenen Geweben verglichen und durch elektronenmikroskopische und physiologische Methoden charakterisiert. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die

Physiologie der epithelialen Barriere stark variiert. Es wurde angenommen, dass die Ursache für die gewebespezifischen Barriereunterschiede eine unterschiedliche Zusammensetzung und Architektur der TJP ist. Es dauerte jedoch bis 1986 bis das Protein Zonula occludens 1 (ZO-1) identifiziert und mittels Immunelektronenmikroskopie den TJP zugeordnet werden konnte (18). Dieser Entdeckung folgte die Identifizierung von ZO-2 (19) und ZO-3 (20) sowie Cingulin (21). Es stellte sich jedoch heraus, dass alle vier Proteine periphere Membranproteine sind, die an die Oberfläche der Membran gebunden sind, und diese daher keine interzelluläre Barriere erzeugen können. Kurze Zeit später identifizierten Tsukita et al. mit Hilfe einer biochemischen Fraktionierungsmethode das erste TJ-Transmembranprotein, Occludin (Ocln) (22). In Knock-out-Studien an Mäusen wurde nachgewiesen, dass Ocln für die Barriereabdichtung nicht essenziell ist (23). Diese Gruppe identifizierte noch im selben Jahr mehrere Mitglieder der Claudin (Cldn) -Familie, die eine wichtige Funktion bei der Barriereabdichtung haben (24).

1.2.2 Claudine als bedeutende Untergruppe der Tight Junction Proteine

Durch biochemische Charakterisierung der TJP konnte gezeigt werden, dass diese aus einem Komplex mehrerer Proteine bestehen. Dazu zählen Transmembranproteine, zytoplasmatische Plaque-Proteine, Signalproteine und Adapterproteine, die eine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett herstellen.

Von besonderem Interesse sind die Transmembranproteine, da diese neben einem intramembranösen Anteil auch einen extrazellulären Anteil aufweisen. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese für die Bildung von Poren sowie für die Barrierefunktion verantwortlich sind. Die Transmembranproteine der TJP lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umschließt Proteine mit einer einzelnen Transmembrandomäne. Dazu werden JAM (junktionales Adhäsionsmolekül), Crb3 (Crumbs Protein Homolog 3) und CAR (Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor) gezählt. Eine weitere Gruppe bilden die dreifachen Transmembrandomänen-Proteine, zu denen BVES (epikardiale

Blutgefäßsubstanz) gehört. Die letzte Untergruppe beschreibt die vierfachen Transmembrandomänen-Proteine. Dieser Gruppe gehören die Proteine der Claudine- und TAMP-Familie (Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine) an. Mitglieder der TAMP-Familie sind wiederum Ocln, Tricellulin und MarvelD3. Es deutet vieles darauf hin, dass von den genannten Transmembrandomänen Claudine die Hauptdeterminanten für die parazelluläre Permeabilität sind (25).

Die ersten Claudine wurden 1998 von Furuse et al. entdeckt. Sie sind wichtige strukturelle Komponenten der TJP (24). Seitdem ist die Anzahl der identifizierten Proteine, die als Mitglieder der Claudin-Familie anerkannt wurden, gestiegen. Bis heute wurden 27 Säugetier-Claudin-Gene identifiziert (26). Nicht alle diese Gene sind jedoch in jedem Säugetier zu finden. *Claudin-13* ist zum Beispiel bei Nagetieren vorhanden, existiert jedoch beim Menschen nicht (27). Es wurden beim Menschen lediglich 26 Claudine entdeckt.

Claudine sind Tetraspanproteine mit einer molekularen Masse von 21-28 kDa. Sie besitzen vier Transmembrandomänen (TMD), deren N- und C-Terminus ins Cytoplasma ragt (28). Diese Domänen sind so angeordnet, dass zwei große extrazelluläre Schleifen (ECL1 und ECL2) und eine kleine zytoplasmatische Schleife resultieren. ECL1 enthält etwa 50 geladene Aminosäuren, diese regulieren die parazelluläre ladungsabhängige Diffusion von gelösten Stoffen. ECL2, mit etwa 25 Aminosäuren, vermittelt die Claudin-Dimerisierung zwischen benachbarten Zellen, hierdurch wird der größenabhängige parazelluläre Transport kontrolliert. Der zytoplasmatische C-Terminus von Claudin weist ein PDZ-Bindungsmotiv auf. Hiermit können Claudine an die PDZ-Domäne von Gerüstproteinen, zu denen auch ZO-1 gehört, binden. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung von Claudinen in TJP (29).

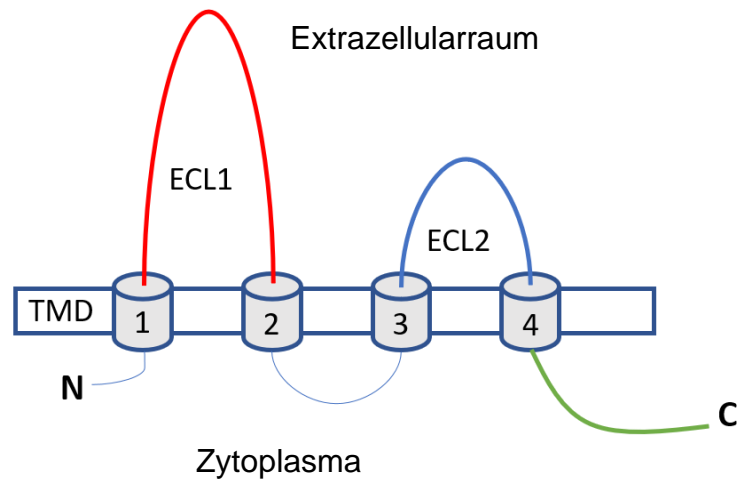


Abbildung 2: Aufbau von Claudinen

Schematische Darstellung des TJP Claudin mit seinen vier Transmembrandomänen (TMD), zwei extrazellulären Schleifen (ECL 1 und ECL2) und dem zytoplasmatischen N- und C-Terminus

Claudin-12

Cldn12, ein 27,1 kDa großes Protein, ist eines der wenigen Claudine, das kein PDZ-Bindemotiv besitzt. Phylogenetisch scheint es nur entfernt mit allen anderen Claudinen verwandt zu sein (25). Cldn12 ist sowohl im Darm, in der Blut-Hirn-Schranke (BHS), als auch in der BNS lokalisiert. In Abwesenheit von Cldn5 übernehmen Cldn12 basierte TJP in Blutgefäßen des Gehirns die Aufgabe eines molekularen Siebs und lassen nur Moleküle mit einer Größe kleiner als 800 Da durch (30). Zudem ist Cldn12 in den parazellulären Transport von Calcium involviert. Ein Ausschalten von Cldn12 führte zu einer Verringerung des Vitamin-D induzierten Calcium Transports bei Epithelzellkulturen (31).

1.2.3 Tight Junction Proteine und Barrierefunktion

In vorherigen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass elektronendichte Moleküle, für die der parazelluläre Weg undurchlässig ist, frei im Interzellularraum diffundieren, aber auf Höhe der TJP anhalten. Dies deutet darauf hin, dass dies der Ort der Permeabilitätsbarriere ist (13, 32, 33). Morphologische und funktionelle Studien zeigten anschließend, dass Claudine die bedeutenden

Barriere bildenden Proteine sind (34). Es wird angenommen, dass Wechselwirkungen zwischen Claudin-Molekülen in derselben Membran mit Molekülen der Nachbarzelle zur Bildung von zwei antiparallelen Claudin-Polymeren führen. Durch die Wechselwirkung der Claudin-Moleküle bilden sich parazelluläre Poren aus. Diese parazellulären Poren sind mit einem Gatter versehen, und fungieren als parazelluläre Barriere (35). Die physiologischen Eigenschaften dieser Barriere sind mit denen einer semipermeablen Diffusionsbarriere zu vergleichen. Dabei wird anhand der Größe und Ladung entschieden, welche der gelösten Stoffe die Schranke passieren dürfen (36). Somit kann der parazelluläre Verbindungsweg auf zwei Arten überquert werden. Der ladungsabhängige Transportweg, der aus nebeneinander angeordneten Poren besteht, ermöglicht die Diffusion von Ionen und kleinen ungeladenen Molekülen. Der Durchmesser einer Pore wird hier auf etwa 4 bis 8 Å geschätzt (37-39). Der größenabhängige Transportweg hingegen ermöglicht den Transport von Makromolekülen von einer Größe bis zu 60 Å (36, 39).

1.3 Neuropathie und Barrierefunktion

Einige neurodegenerative Erkrankungen und Verletzungen im ZNS und im PNS sind mit einem Verlust von TJP und einer erhöhten Permeabilität der Barrieren des peripheren Nerven verbunden (40, 41). Die Expression von TJP beeinflusst die Funktion des Nervensystems indem sie kontrollieren, welche Moleküle die Barrieren passieren können (42). Cldn1, das vor allem im Perineurium lokalisiert ist, schützt die Perineuralbarriere und ist nach einer Verletzung des Nerven herunterreguliert (43). Cldn5, ein bedeutendes TJP der BHS, fungiert nicht nur im ZNS bei Multipler Sklerose als Neuroprotektor, sondern auch im PNS nach einer Verletzung des Nerven (44). Lim et al. zeigten zudem, dass auch die Expression von *Ocln* und *ZO-1* im Perineurium nach einer Nervenverletzung verringert ist (45). Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen zu schmerzhaften Neuropathien hauptsächlich auf die BNS. Die Auswirkungen auf die MB hingegen wurden erst wenig erforscht. Die TJP der Myelinstruktur, zu denen auch Cldn19 gehört, sind für die Aufrechterhaltung der sensorischen und motorischen Nervenleitungsgeschwindigkeit wichtig. Elektrophysiologische

Analysen zeigten, dass bei *Cldn19* knock-out (KO) Mäusen die Leitungsgeschwindigkeit von Signalen in peripheren myelinisierten Fasern reduziert ist (46). Das periphere Myelinprotein 22 (PMP22), das für die Myelinisierung von Schwannzellen verantwortlich ist, zählt ebenfalls zu den TJP. Ein Fehlen von *Pmp22* bei Mäusen führte zu einer eingeschränkten Ausbreitung des Aktionspotentials sowie zu einem Untergang der MB. Dieser war mit einer Demyelinisierung sowie einer verringerten Expression von *Cldn19* und *ZO-1* verbunden (46).

1.4 Vorangegangene Forschungsergebnisse

Bei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass *Cldn12* im Nervus suralis bei Patienten mit schmerzhafter chronisch entzündlicher demyelinisierender Polyradiculoneuropathie (CIDP) und nicht entzündlicher Polyneuropathie signifikant reduziert ist. Die Nervenpräparate entstammten von männlichen Patienten sowie weiblichen Patientinnen nach der Menopause (47). Um die funktionelle Rolle von *Cldn12* und die Folgen des Fehlens von *Cldn12* auf die BNS sowie die MB im PNS zu untersuchen, wurden *Cldn12*-KO Mäuse generiert. Bei den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Ausschalten von *Cldn12* zur mechanischen Hypersensitivität, einer erhöhten Permeabilität der Perineuralbarriere und der MB, sowie zu einer veränderten TJP-Expression und Morphologie führt (47).

Interessanterweise reagierten fertile weibliche *Cldn12*-KO Mäuse auf mechanische Stimuli der Hinterpfote hingegen mit keiner erhöhten Sensitivität (47). Durch diese Versuchsergebnisse veranlasst, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen Auswirkungen auf die MB und die BNS hat.

1.5 Fragestellung der Promotion

Ziel meiner Promotion ist es, die peripheren Barrieren weiblicher *Cldn12*-KO Mäuse zu untersuchen. Ausgehend von vorangegangenen Pilotexperimenten in

der Arbeitsgruppe lautet die erste Arbeitshypothese, dass trotz des Fehlens von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen die Integrität der BNS und der MB im PNS nicht beeinflusst ist. Um diese Behauptung zu bestätigen, soll die Permeabilität der MB und der Perineuralbarriere des Ischiasnerven weiblicher *Cldn12*-KO untersucht werden.

Basierend auf der vorherigen Arbeitshypothese, soll im zweiten Teil meiner Promotion gezeigt werden, dass das Ausschalten von *Cldn12* die Immunreaktivität barrierespezifischer TJP im PNS nicht signifikant beeinflusst.

Da ich postuliere, dass das Fehlen von *Cldn12* keine Auswirkungen auf die Barriersysteme des PNS hat, ist davon auszugehen, dass die mRNA Expression des Zell-Barrieren-Stabilisator *Shh* bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen unverändert ist.

Um zu untermauern, dass das Ausschalten von *Cldn12* nicht die MB beeinflusst, sollen zudem die mRNA Expression der beiden Transkriptionsfaktoren der Schwanzzellen, *Krox20* und *Sox10*, sowie die Myelin-spezifischen-Proteine untersucht werden. Zu diesen Myelin-spezifischen-Proteinen gehören das Myelin basische Protein (*Mbp*) und *Pmp22*.

Die Arbeit soll zudem dazu dienen, die bisherigen Untersuchungen zu den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen zu ergänzen. Abschließend soll daher gezeigt werden, dass die bei männlichen Mäusen auftretende Hypersensitivität auf mechanische Reize nicht durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Neurone im Spinalganglion verursacht wird. Dazu wird der prozentuale Anteil von CGRP, IB4 und NF200 an exemplarischen Spinalganglion-Schnitten von männlichen *Cldn12*-KO Mäusen errechnet und mit denen der WT Gruppe verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Haltung der Mäuse

Die Tierversuche wurden an 8 bis 10 Wochen alten weiblichen Mäusen C57BL/6 durchgeführt. Die Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen in kleinen Gruppen im Tierstall des Zentrums für operative Medizin, Oberdürbacher Str. 6, 97080 Würzburg in Standardkäfigen gehalten. Bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 bis 25 °C und einem 12 h Tag- 12 h Nacht-Rhythmus hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Genehmigung für das Versuchsvorhaben (AZ-2-264) erteilte die Regierung von Unterfranken nach § 8 Abs. 1 TierSchG.

2.1.2 Knock-out Mäuse

Um die Auswirkungen einer Ausschaltung des *Cldn12* Gens auf die Barrierefunktion peripherer Nerven zu untersuchen, wurden weibliche KO Mäuse für *Cldn12* etabliert. Dazu wurden durch das Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden genetische Manipulationen an den embryonalen Stammzellen der Tiere vorgenommen. Diese wurden anschließend in die Keimbahn der Mäuse eingebracht. Die entstandene *Cldn12*-KO Linie wurde daraufhin zehnmal mit C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt. Die resultierenden KO und Wildtyp (WT) Mäuse zeigten normale Körper-, Verhaltens- und Reproduktionseigenschaften.

2.2 Genotypisierung der Versuchstiere

2.2.1 Prinzip der Genotypisierung

Mit Hilfe der Genotypisierung wird die genetische Zusammensetzung (Genotyp) der Maus festgestellt. Dadurch lässt sich herausfinden, ob es sich um eine WT Maus oder homozygote *Cldn12*-KO Maus handelt. Anhand des ermittelten

Genotyps wurde nun festgelegt, welche Tiere miteinander gekreuzt werden sollen, um die Aufrechterhaltung der Zucht zu gewährleisten.

2.2.2 Protokoll der DNA Extraktion

Um Probenmaterial für die Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere zu erhalten, wurde diesen ein Gewebestück (1-2 mm²) aus deren Ohren gestanzt und in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde zu dieser Gewebeprobe 5 µl Proteinase K und 50 µl Lysepuffer (*Tabelle 1*) hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde daraufhin über Nacht bei 55 °C und einer Geschwindigkeit von 700 rpm in einen Thermomixer gestellt. Am nächsten Morgen wurde die Temperatur des Thermomixers auf 85 °C erhöht und die Probe für weitere 45 min inkubiert. Durch die Erhöhung der Temperatur wird die Aktivität der Proteinkinase K gehemmt. Zuletzt wurde zu jeder Gewebeprobe 100 µl destilliertes Wasser gegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung Lysepuffer

Lysepuffer
100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
5 mM EDTA
0,2% SDS
200 mM NaCl

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der Versuchstiere

Anschließend wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im 2720 Thermal Cycler vervielfältigt. Pro Versuchstier wurden jeweils zwei Reaktionen gefahren, eine für das WT-Allel und eine für das *Cldn12*-KO Allel. Die Reaktionsansätze für die PCR wurden, wie in *Tabelle 2* aufgeführt, hergestellt.

Tabelle 2: Mastermix zur Genotypisierung von WT Mäusen und *Cldn12*-KO Mäusen

Reagenz	Menge
MgCl ₂	3,4 µl
Go Taq®G ₂ DNA Polymerase	0,5 µl
Primer WT/KO fw/rev	1,25 µl
5X Green Go Taq® Reaction Buffer	5 µl
dNTP	1 µl
H ₂ O	11,6 µl

(KO = *Claudin-12* KO, WT = Wildtyp, fw = forward, rev = reverse)

2.2.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

In diesem Schritt wurde die amplifizierte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Zur analytischen Trennung der DNA-Fragmente wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE (*Tabelle 3*) gelöst und bei 800 Watt für 3 min in der Mikrowelle aufgekocht. Daraufhin wurde das Gel in einem Wasserbad auf 37 °C heruntergekühlt und 10 µl des DNA-Farbstoff-Komplexes (SYBR® Safe DNA gel stain) hinzugefügt. Anschließend wurde das Agarosegel in die dafür vorgesehene Kammer gegossen, vor Licht geschützt und etwa 30 min gewartet bis dieses ausgehärtet war. Das ausgehärtete Gel wurde nun mit 1x TAE-Puffer in eine Flachbettgelapparatur gegeben und mit jeweils 11 µl der amplifizierten DNA-Probe sowie 3 µl eines Markers (Gene Ruler 100bp Plus), der zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dient, beladen. Die Elektrophorese lief daraufhin für 1,5 h bei 60-100 V. Abschließend wurden die DNA-Fragmente mittels UV-Licht visualisiert und fotografiert (FluorChem FC2 Imaging systems, Multimage II; Alpha Innotech).

Tabelle 3: Zusammensetzung TAE

10x TAE
48,5 g Tris
11,4 ml Essigsäure
20 ml 0,5 mM EDTA

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Probenentnahme und Aufbereitung des Spinalganglions und des Nervus ischiadicus

Die Gewebeentnahme und -vorbereitung erfolgte durch Dr. Jeremy Chen, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie in Würzburg. Nach der Entnahme des Nervus ischiadicus (4-6 mm) wurde dieser vorsichtig von seinem umgebenden Gewebe befreit. Der Nerv wurde der Länge nach in ein mit Tissue-Tek® O.C.T.™ gefülltes zylindrisches Plastikgefäß eingebettet und anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Entnahme der Spinalganglien erfolgte auf dieselbe Art und Weise. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -20 °C. Zur Durchführung der Versuche wurden am Mikrotom 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Proben auf „Super Frost Plus“ Objektträger übertragen und bis zur abschließenden Färbung erneut bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Mit Hilfe der Immunhistochemie können durch Farbstoff gekoppelte Antikörper die gesuchten Gewebeabschnitte sichtbar gemacht werden. Diese Methode dient dazu, eine Aussage über die qualitative und zum Teil auch quantitative Verteilung der Proteine im Gewebe zu treffen. Bei der Immunhistochemie wird zwischen einer direkten und einer indirekten Untersuchungsmethode unterschieden. Dafür werden bei der indirekten Färbemethode die angefertigten Gewebeschnitte zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch gegen das Antigen des gesuchten Proteins gerichtet ist. Um diesen Komplex sichtbar zu machen, wird in einem zweiten Schritt ein fluoreszierender Sekundärantikörper eingesetzt. Da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, wird das Signal durch diese Vorgehensweise verstärkt.

2.3.3 Protokoll des Färbevorgangs

Die Fixierung der Schnitte erfolgte bei -20 °C für 10 min in 100% Aceton. Danach wurde das fixierte Gewebe bei Raumtemperatur für 10 min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend zur Blockierung der endogenen Peroxidasen für 10 min in 0,3% Wasserstoffperoxid inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang über 20 min mit PBS wurde das Gewebe mit 10% Esel Serum geblockt (*Tabelle 4*). Daraufhin erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem Primärantikörper (*Tabelle 18*). Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte für 30 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper behandelt (*Tabelle 19*). Dem schloss sich ein Waschvorgang für 20 min mit PBS an. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 10 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang für 60 min mit PBS und abschließend für 10 min mit Wasser. Zuletzt wurden die Nervenquerschnitte mit Mounting Medium eingedeckt, getrocknet und bei 4 °C gelagert. Die abschließende Begutachtung der Nervenquerschnitte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops KEYENCE BZ-9000 wurde zeitnah nach deren Färbung durchgeführt (genaues Vorgehen siehe Kapitel 2.5 Bildanalyse).

Tabelle 4: Zusammensetzung Blockierlösung

Claudin-1, Claudin-19, Occludin, CGRP, NF200	ZO-1, Claudin-5, IB4
10% Esel Serum 0,3% Triton-X-100	10% Esel Serum PBS

2.4 Permeabilitätstest

2.4.1 Prinzip der Permeabilitätstests

Zur Untersuchung der Durchlässigkeit der BNS sowie der MB des Ischiasnerven werden Permeabilitätstests mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Dextran und Evans Blue Albumin (EBA) durchgeführt. Hierbei sollen die Penetration des Farbstoffs EBA in den Endoneuralraum sowie die Penetration des Farbstoffes

FITC-Dextran in die Nervenfasern aufschließen über die Integrität der Perineuralbarriere und der MB geben.

2.4.2 Permeabilitätstest des Perineuriums

Zur Beurteilung der Permeabilität der Perineuralbarriere wurde der Nervus ischiadicus direkt nach dessen Entnahme für 1 h in EBA inkubiert. Die Herstellung von EBA erfolgte aus 1% Evans Blue Farbstoff und 5% Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS. Anschließend wurde der Nerv für 24 h in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Daraufhin wurde das Gewebe in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound kryokonserviert und mit Hilfe des Mikrotoms wurden 10 µm breite Nervenquerschnitte angefertigt. Die Objekt- und Kammer Temperatur des Mikrotoms war dabei auf -20 °C eingestellt. Danach wurden die Proben auf Objektträger übertragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurde der Eintritt von EBA über das Perineurium in den endoneurialen Raum beurteilt (genaues Vorgehen siehe Kapitel 2.5 Bildanalyse).

2.4.3 Permeabilitätstest der Myelin-Barriere

Um eine Aussage über die Permeabilität der MB zu treffen, wurden die Enden des entnommenen Ischiasnerven mit Vaseline versiegelt. Anschließend wurde der Nerv für 1 h bei 37 °C in einer künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (cCSF) (Tabelle 5), welche 5 mg/ml FITC-Dextran enthält, inkubiert. Daraufhin wurde der Nerv für 5 min bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert. Zur Beurteilung der Durchlässigkeit der MB liegt das Augenmerk auf den Myelinscheiden der einzelnen Nervenfasern. Dazu wird der Nerv unter einem Präpariermikroskop mittels Pinzette in seine einzelnen Fasern aufgetrennt. Diese werden auf Objektträger übertragen und für 5 min in PBS und 1 min in Wasser gewaschen. Zuletzt werden die Nervenfasern mit Mounting Medium eingedeckt. Bei diesem Versuchsaufbau wird der Eintritt des grünen Fluoreszenzfarbstoffes über die Myelinscheide in die Nervenfasern beurteilt. Die anschließende Begutachtung der Zupfpräparate erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (genaues Vorgehen siehe Kapitel 2.5 Bildanalyse).

Tabelle 5: künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF)

Reagenz	Stoffmengenkonzentration	Verdünnung
HEPES	1 M	1:100
NaCl	1,1 M	1:10
NaHCO ₃	178 mM	1:10
MgSO ₄	400 mM	1:100
KCl	390 mM	1:100
KH ₂ PO ₄	300 mM	1:100
CaCl ₂	120 mM	1:100
Dextrose	0,0198 g/l	

2.5 Bildanalyse

2.5.1 Bilderfassung

Die Begutachtung der Nervenquerschnitte, der Zupfpräparate und der Spinalganglion-Schnitte erfolgte mit Hilfe des digitalen Fluoreszenzmikroskops (Biorevo BZ-9000-E, Keyence). Das Mikroskop verfügt über drei verschiedene Fluoreszenzkanäle (Rot – 555 nm, Grün – 488 nm, Blau – 408 nm), welche getrennt und simultan betrachtet werden können. Für die anschließende quantitative Auswertung wurden Aufnahmen mit identischer Vergrößerung, Belichtungszeit und Auflösung angefertigt. Um die Aufnahmen miteinander vergleichen zu können, wurden pro Versuchsaufbau jeweils dieselben Einstellungen am Mikroskop vorgenommen. Die angefertigten Aufnahmen wurden unverändert im RGB 8-bit Tagged Image File Format gespeichert.

2.5.2 Quantitative Analyse der Aufnahmen der Nervenquerschnitte und Zupfpräparate

Für die quantitative Analyse der Bilder von Nervenquerschnitten sowie von Zupfpräparaten ist die Stärke des emittierten Fluoreszenzsignals von Bedeutung. Dieses Signal wird in der Farbtiefe jedes Pixels festgelegt. Die Pixel sind somit Messungen des von einer Probe emittierten Lichts. Bei 8-bit Bildern ergibt sich

pro Farbkanal pro Pixel eine Farbtiefe von insgesamt 2^8 (=256) Abstufungen. Bei den zu analysierenden Bilddateien reichen die ermittelten Werte für die Farbstärke von 0 bis 255. Je niedriger der angegebene Wert ist, desto geringer ist die Signalstärke und somit die Fluoreszenzintensität des Bildes. Durch die festgelegten Werte pro Pixel ist es möglich, die Aufnahmen miteinander zu vergleichen und quantitative Messungen durchzuführen. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Software Fiji, einem auf ImageJ basierenden Bildbearbeitungsprogramm. Da die untersuchten TJP an verschiedenen Stellen im Ischiasnerven exprimiert sind, wurden für die Auswertung jeweils spezifische Bereiche im Nerven festgelegt (*Tabelle 6*). Die Fluoreszenzintensität wurde über die Formel für die korrigierte totale Fluoreszenz (CTCF) ermittelt. Für alle Aufnahmen einer Versuchsgruppe wurde ein zu analysierender Bereich mit identischer Größe (area) festgelegt. Über die Funktion „Messen“ wurde der Mittelwert der Farbdichte im markierten Bereich sowie die Intensitätsdichte (IntDen) bestimmt. Die Stärke des Hintergrundsignals wurde in drei Bereichen außerhalb des Nerv gemessen und anschließend der Mittelwert dieser drei Messungen (mean IntDen) gebildet. Der gemittelte Hintergrundmesswert wurde mit der Größe des zu analysierenden Bereichs multipliziert und daraufhin von der gemessenen Intensitätsdichte subtrahiert.

Folgende Formel wurde für die Berechnung von CTCF benutzt:

$$\text{CTCF} = \text{IntDen} - (\text{area} \times \text{mean IntDen})$$

Tabelle 6: Quantifizierung der Tight Junction Proteine

Tight Junction Protein	Quantifizierter Bereich
ZO-1	Perineurium
Claudin-1	Perineurium
Claudin-5	Endoneurium
Claudin-19	Zupfpräparat – paranodaler Bereich
Occludin	Perineurium

Tabelle 7: Quantifizierung des Permeabilitätstests

Permeabilitätstest	Quantifizierter Bereich
EBA	Endoneuralraum
FITC-Dextran	Nervenfasern

(EBA = Evans Blue Albumin, FITC = Fluoresceinisothiocyanat)

2.6 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

2.6.1 Prinzip der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die Anwendung der reversen Transkription mit nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion dient dem Nachweis spezifischer TJP-mRNA im Ischiasnerv weiblicher Mäuse. Durch die vorangeschaltete reverse Transkription wird die vorhandene mRNA in cDNA umgeschrieben. In einer nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion findet die Vervielfältigung der cDNA statt. Bei dem folgenden Versuchsaufbau wird zwischen einer quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) mit SYBRGreen und TaqMan-Sonde unterschieden. Bei SYBRGreen handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an doppelsträngige DNA anlagert und dabei fluoresziert. Bei einem Reaktionsansatz mit TaqMan-Sonde wird hingegen neben den Primern eine spezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sequenz hinzugefügt. Dieses Oligonukleotid enthält am 5'Ende einen Fluoreszenzreporter sowie am 3'Ende einen Quencher. Solange diese Sequenz intakt ist, wird das Fluoreszenzsignal durch den Quencher blockiert. Während des Amplifikationsvorgangs wird jedoch das Nukleotid durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut und so das Fluoreszenzsignal freigesetzt. Die grundsätzliche Idee hinter beiden Versuchsansätzen ist die gleiche, da sowohl bei der Verwendung von SYBRGreen als auch von der TaqMan-Sonde die Fluoreszenz proportional mit der Menge der entstandenen DNA zunimmt. Bei jedem Zyklus erfolgt nun die Messung der Fluoreszenz. Dadurch kann auf die Menge der zuvor vorhandenen mRNA rückgeschlossen werden.

2.6.2 Protokoll der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

SYBRGreen bzw. die TaqMan-Sonde sowie die cDNA und die Primer wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gelagert. Von der cDNA und den Primern wurde jeweils eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 angefertigt. Anschließend wurde der Mastermix für die qRT-PCR, wie in *Tabelle 8* und *Tabelle 9* aufgeführt, hergestellt. Dabei wurde zwischen einer PCR mit SYBRGreen und TaqMan-Sonde unterschieden.

Tabelle 8: Mastermix SYBRGreen

Reagenz	Stoffmenge	Verdünnung
SYBRGreen	5 µl	1:1
Forward Primer	0,5 µl	1:10
Reverse Primer	0,5 µl	1:10
Wasser	2 µl	1:1

Tabelle 9: Mastermix TaqMan

Reagenz	Stoffmenge	Verdünnung
TaqMan Fast Advanced	5 µl	1:1
TaqMan-Sonde	0,5 µl	1:1
Wasser	2 µl	1:1

Anschließend wurde pro Vertiefung der 96-well Platte 8 µl des SYBRGreen Mastermixes bzw. 7,5 µl des TaqMan Mastermixes sowie 2 µl der cDNA pipettiert. Von jeder Probe sowie Negativkontrolle wurden Triplikate gemessen, deren Mittelwerte für weitere Analysen verwendet wurden. Nachdem der Pipettiervorgang abgeschlossen wurde, wurde die 96-well Platte mit einer Folie verschlossen und für eine Minute zentrifugiert. Daraufhin wurde die Platte in den Echtzeit-Thermozykler eingelegt und die Versuchsparameter festgelegt (*Tabelle 10*).

Tabelle 10: Einstellung Versuchsparameter qRT-PCR

SYBRGreen	Vorgang	Anzahl Zyklen	Dauer Zyklen	Temperatur
	Aktivierung der DNA-Polymerase	1	2 min	95 °C
	Denaturierung	50	15 sec	95 °C
	Amplifizierung	50	1 min	60 °C
TaqMan Sonde	Vorgang	Anzahl Zyklen	Dauer Zyklen	Temperatur
	Aktivierung der DNA-Polymerase	1	20 sec	95 °C
	Denaturierung	40	1 sec	95 °C
	Amplifizierung	40	20 sec	60 °C

2.6.3 Auswertung der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die Auswertung der Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Hilfe der Software StepOne. Um auf die ursprünglich vorhandene Menge cDNA in der Probe rückschließen zu können, wurde bei der qRT-PCR der Schwellenwert-Zyklus (C_T) ermittelt. Unter C_T versteht man den PCR-Zyklus bei dem der Schwellenwert überschritten wurde, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Das durchgeführte Berechnungsschema setzt voraus, dass bei C_T in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu amplifizierter cDNA vorliegt. Für weitere Berechnungen wurde der C_T Mittelwert, der für jedes Target in den drei Ansätzen gemessen wurde, verwendet. Ausgehend von diesem C_T -Wert kann über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode die Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes (RQ) erfolgen. Hierbei wurde zunächst für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Kontrollgens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Im zweiten Schritt wurde vom ΔC_T -Wert der Probe der ΔC_T -Wert der Kontrolle abgezogen. Der relative Expressionsunterschied (RQ) einer Probe zwischen der zu untersuchenden Probe und der Kontrolle, normalisiert zum Kontrollgen und bezogen auf eine Kontrollprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Kontrollgen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Kontrollprobe})$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Zur Normalisierung wurde das Housekeeping Gen 18S, eine ribosomale Untereinheit, herangezogen. Die amplifizierte Menge wurde in jeder Probe individuell bestimmt und zur Normalisierung herangezogen.

2.7 Western Blot

2.7.1 Prinzip des Western Blots

Beim Western Blot wird ein Proteingemisch zunächst durch Gelelektrophorese nach der molekularen Größe aufgetrennt. Durch die Anlagerung von Natriumlaurylsulfat (SDS) an die Proteine wird eine einheitliche Ladungsdichte erreicht. Hierdurch ist eine Trennung nach molarer Masse im elektrischen Feld möglich. Im zweiten Schritt werden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgt mittels Immundetektion der Nachweis der Proteine. Das gesuchte Protein wird durch einen spezifischen Primärantikörper markiert, an den wiederum ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper bindet. Dadurch wird eine Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst und die gesuchte Position des Proteins wird auf der Membran sichtbar.

2.7.2 Protokoll des Western Blots

Probenaufbereitung und Proteinbestimmung

Um bei der Gelelektrophorese eine definierte Proteinmenge aufzutragen, muss zuvor der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden. Dies erfolgte durch Frau Xiawei Hu, PhD Studentin der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, mittels BCA-Test. Die von Frau Hu ermittelten Werte wurden zur Durchführung des Western Blots übernommen.

SDS-Gelelektrophorese

Das lysierte Protein (20 µg) wurde mit SDS-haltigem Puffer gemischt, der 1x Laemmli-Puffer und 6% β-Mercaptoethanol enthielt. Das entstandene Gemisch wurde zur Denaturierung der Proteine für 3 min bei 50 °C erhitzt. Sammel- und Trenngel wurden, wie in *Tabelle 11* aufgelistet, angemischt. Zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm wurde das Trenngel 6 cm hoch eingegossen. Anschließend erfolgte das Gießen des Sammelgels in einer Höhe von 2 cm auf das auspolymerisierte Trenngel. Daraufhin wurden mittels Plastikamm 10 Geltaschen geformt. Bei diesem Versuchsaufbau handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem feinporigen Trenngel und einem grobporigen Sammelgel. Zunächst wurden die Proben im Sammelgel konzentriert bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden. Das hergestellte Gel wurde in eine mit Elektrophoresepuffer (*Tabelle 12*) gefüllte Kammer eingespannt. Nach der Spülung der Geltaschen mit Elektrophoresepuffer, wurde die erste Tasche des Gels mit einem Bandenmarker (Page Ruler Plus Prest) beladen und die weiteren Taschen mit jeweils 25 µl des denaturierten Proteingemisches befüllt. Daraufhin lief die Elektrophorese für etwa 20 min bei 90 V bis die Lauffront die Grenze zwischen Trenngel und Sammelgel erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V hochgeregelt, bis die unterste Bande des Markers das Ende der Kammer erreicht hatte.

Tabelle 11: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel

Reagenz	Trenngel 12%	Sammelgel 12%
H ₂ O	3350 µl	13900 µl
Acrylamid/Bis 30%	4000 µl	3400 µl
3M Tris pH8,8	2500 µl	-
1M Tris pH6,8	-	2500 µl
10% SDS	100 µl	200 µl
10% APS	100 µl	200 µl
TEMED	6 µl	20 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung Elektrophoresepuffer

Elektrophoresepuffer 10X Stock
25 mM Tris
250 mM Glycine
0,1% SDS

Proteintransfer durch Western Blot

Beim Transfer werden die zuvor aufgetrennten Proteine durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für diesen Vorgang werden zwei Schwämme, zwei Whatman-Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel nach dem folgenden Schema zusammengesetzt:

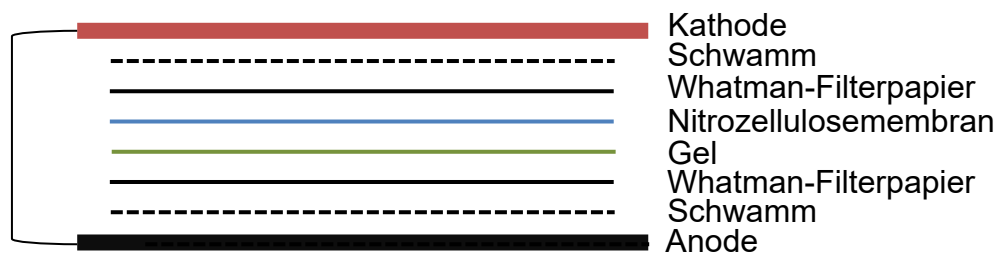


Abbildung 3: Schemazeichnung des Proteintransfers durch Western Blot

Bei dem Zusammenbau des Systems ist darauf zu achten, dass zwischen den Schichten keine Luftblasen entstehen, da diese den Proteintransfer stören würden. Um dies zu verhindern, wurden die Schwämme, die Whatman-Filterpapiere und die Membran zuvor für 2 min in Towbin-Transferpuffer (Tabelle 13) getränkt. Nachdem das System, wie beschrieben, zusammengesetzt wurde, wurde dieses in den Transferkasten eingebracht und bis zur Hälfte mit Towbin-Tankblottpuffer übergossen. Der Transfer wurde über Nacht bei einer angelegten elektrischen Spannung von 40 V pro Gel durchgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung Towbin-Tankblottpuffer**Towbin-Tankblottpuffer**

6,08 g Tris 28,83 g Glycin 400 ml Methanol 7,5 ml SDS 10% für 2l H ₂ O

Immundetektion

Bei der Immundetektion werden die beim Membrantransfer übertragenen Proteinbanden sichtbar gemacht. Hierfür wurde die Membran zunächst zweimal für jeweils 5 min in PBS-Tween (*Tabelle 14*) gewaschen und anschließend mit Blockierlösung (*Tabelle 15*) geblockt. Dem schloss sich ein erneuter zweimaliger Waschvorgang für jeweils 5 min in PBS-Tween an. Daraufhin erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem Primärantikörper (*Tabelle 18*). Nachdem die Membran am nächsten Tag dreimal für jeweils 10 min in PBS-Tween gewaschen wurde, wurde diese mit dem Sekundärantikörper (*Tabelle 19*) inkubiert. Ein darauffolgender dreimaliger Waschvorgang für 10 min mit PBS-Tween diente dazu, ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung aus ECL I und ECL II (*Tabelle 16*) (1:1) für 2 min auf dem Rüttler inkubiert. Die Darstellung der Banden ist durch die katalytische Wirkung des Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers möglich. Dieser wurde mit 1% BSA in PBS verdünnt. Durch HRP wird Luminol, das in ECL I enthalten ist, oxidiert. Damit die Redoxreaktion vollständig ablaufen kann, ist zusätzlich H₂O₂ in ECL II erforderlich. Die lumineszierenden Banden wurden daraufhin fotografiert (FluorChem FC2 Imaging systems, MultiImage II; Alpha Innotech). Um eine quantitative Aussage über die Proteinkonzentration treffen zu können, wurde als Ladekontrolle β -Actin verwendet. Dazu wurden die Arbeitsschritte der Immundetektion für eine weitere Kombination aus Primär- und Sekundärantikörper wiederholt.

Tabelle 14: Zusammensetzung PBS-Tween 0,1%

PBS-Tween 0,1%
1 l PBS
1 ml Tween

Tabelle 15: Zusammensetzung der Blockierlösung

Blockierlösung
1 l PBS
50 g Milchpulver

Tabelle 16: Zusammensetzung ECL

ECL I	ECL II
25 ml 1 M Tris pH8.8	2 ml 1 M Tris pH 8.8
1 cap Luminol	160 µl H ₂ O ₂
1 cap PCA	auf 250 ml H ₂ O auffüllen
auf 250 ml H ₂ O auffüllen	

Densitometrie

Die Analyse des Western Blots erfolgte mittels Densitometrie. Dabei wurde mit Hilfe der Software Fiji, die ebenfalls zur Bewertung der immunhistologischen Bilder verwendet wurde, die optische Dichte (IntDen) der Proteinbanden bestimmt. Das Intensitätsverhältnis der Bande des untersuchten Proteins (IntDen (Protein X)) wurde in Verhältnis zu der zugehörigen Ladekontrolle (IntDen (Ladekontrolle)) gesetzt. Für diese Berechnung wurde folgendes Schema verwendet:

$$\frac{\text{IntDen (Protein X)}}{\text{IntDen (Ladekontrolle)}}$$

2.8 Statistik und Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Programme IBM SPSS Statistics 25, Microsoft Excel 2016 und Fiji. Zur grafischen Darstellung der erhobenen Daten wurde das Programm Origin verwendet. In den abgebildeten Grafiken wurden jeweils Mittelwert und Standardfehler angegeben.

Zur Versuchsauswertung zweier voneinander unabhängiger Gruppen wurde bei erfüllter Normalverteilung und Varianzgleichheit der t-Test für zwei unverbundene Stichproben durchgeführt. Die statistische Auswertung der Spinalganglion-

Schnitte erfolgte mittels two-way Anova. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet.

2.9 Verwendete Chemikalien, Antikörper und Primer/TaqMan Proben

Folgende aufgelistete Chemikalien, Antikörper und Primer/TaqMan Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 17: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem	A3724,1000
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics	10 236 276 001
5X Green Go Taq®Reaction Buffer	Promega	M791A
Aceton	Sigma Aldrich	W332615
Acrylamid/Bis 30%	Roth	A3574
Agarose	Sigma Aldrich	A9539-500G
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich	A3878-100G
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich	A2153
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B0126
Calciumchlorid	Merck	TA470582 840
Desoxydenucleotide Mix (dNTP)	Sigma Aldrich	D7295-2ML
Dextrose	Meck	K34340042 511
Donkey Serum	Sigma Aldrich	32205-LL
Evans Blue Albumin (EBA)	Sigma Aldrich	E2129
Fluoreszin isothiocyanate-dextran 70kDa	Sigma Aldrich	FD70-250MG
Gene Ruler 100bp Plus	Peqlab	203458
Glycerin	Invitrogen	15514-011
Glycin	AppliChem	A1067,1000
Go Taq®G₂DNA Polymerase	Promega	M784B
Kaliumchlorid	Merck	TA662035 001

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	A3620,1000
Lumi-Light	Roche Diagnostics	12015196001
Luminol	Sigma	123072
Magnesiumchlorid	Thermo Scientific	00628454
Magnesiumsulfat	Merck	A462986
Methanol	Sigma Aldrich	32213-1L-M
Milchpulver	AppliChem	A0830,1000
Mounting Medium	Vectashield	Lot ZEO926
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich	T9281-100ML
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	31434-1KG-R
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich	S5761-500G
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem	A3813,1000
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich	D8537-1L
Proteinase K	Sigma Aldrich	003115836001
RNase away	Sigma Aldrich	83931-250ML
RNase freies Wasser	Ambion	AM9937
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	AppliChem	A1112,1000
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M3148-25ML
SYBR[®] Safe DNA gel stain	Invitrogen	S33102
SYPR Green Master Mix	Applied Biosystems	100029284
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	4444554
Thermo Scientific[™] PageRuler[™] Plus	Thermo	26619
Tissue Tek Compound	Sakura	4583
Tris	Roth	5429.3
Triton-X 100	Sigma Aldrich	T8787
Tween	Sigma Aldrich	P1379
Wasser	Braun	387875
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich	H1009

Tabelle 18: Primärantikörper

Primär-antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller	Referenznummer
CGRP	Kaninchen	1:100	ImmunoStar	AIBN 617907
Claudin-1	Kaninchen	1:100	Invitrogen	51-9000
Claudin-19	Kaninchen	1:100	Alpha Diagnostics Intl. Inc.	CLDN191-A
Claudin-5 Alexa Fluor 488	—	1:100	Invitrogen	352588
Claudin-12	Kaninchen	1:20	IBL	18801
IB4-FITC	—	1:100	Sigma-Aldrich	L2895
NF200	Huhn	1:100	Merck	AB5539
Occludin	Maus	1:100	Invitrogen	33-1500
SHh	Maus	1:100	DSHB	AB-2188307
β-Actin	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich	A3854
ZO-1 Alexa Fluor 488	—	1:100	Thermo Fischer	339188

(CGRP = Calcitonin Gene-Related Peptide, IB4 = Isolectin B4, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, NF200 = Neurofilament 200, SHh = Sonic Hedgehog, ZO-1 = Zona occludens 1)

Tabelle 19: Sekundärantikörper

Sekundär-antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller	Referenznummer
Anti-Hase Alexa Fluor 488	Esel	1:1000	Invitrogen	A21206
Anti-Hase Alexa Fluor 555	Esel	1:1000	Invitrogen	A31572
Anti-Huhn Cyanine Cy2	Esel	1:1000	Jackson ImmunoResearch	AB2340365
Anti-Maus Alexa Fluor 555	Esel	1:1000	Invitrogen	A31570

Tabelle 20: Primer

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Claudin-12 WT	5'-GZZACACATTCCAATCAGGCAGAGTAG-3'	5'-CTTABCCACAGAAGTGCTAGGATTGC-3'
Claudin-12 KO	5'-GCAGCCTCTGTTCCACATACACTT-3'	5'-CCCCATCTGAAACCAATGAAGAAGCC-3'

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Krox20	5'-GCCCCTTTGACCAGATGAAC-3'	5'-GGAGAATTTGCCCATGTAAGTG-3'
Mbp	5'-AGAGTCCGACGAGCTTCAGA-3'	5'-CAGGTACTTGGATCGCTGTG-3'
Occludin	5'-TGGGCAGTCGGGTTGACT-3'	5'-GGGCATCATGGTGTTTCATTG-3'
PMP22	5'-GGGATCCTGTTCTGCACAT-3'	5'-TGCCAGAGATCAGTCGTGTGT-3'
Sox10	5'-GCCACGAGGTAATGTCCAACA-3'	5'-TGGTCCAGCTCAGTCACATCA-3'

(Mbp = Myelin basisches Protein, PMP22 = peripheres Myelinprotein 22)

Tabelle 21: TaqMan-Proben

Gen	TaqMan Assay ID	Referenzsequenzen
SHh	Mm00436528_m1	NM_009170.3

(SHh = Sonic Hedgehog)

2.10 Verwendete Geräte, Materialien und Softwareprogramme

Die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten Geräte, Materialien und Softwareprogramme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tabelle 22: Materialien

Materialien	Hersteller
96-Well Fast Green Reaction Plade	life technologies
Deckglas	A. Hartenstein (Laborversand)
Elektrophoresekammer	peqlab Biotechnologie GmbH
Flies	A. Hartenstein
Gießstand	BioRad
Glasplatte	BioRad
Low Profile Microtome Blades	Leica
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life science
Objektträger "Super Frost Plus"	R. Langenbrinck GmbH
Optical Adhesive film	Thermo Fisher Scientific
Plastikkamm	BioRad
Schüttelgerät S20	Marienfeld Superior
Transferkammer	peqlab Biotechnologie GmbH
Whatman-Filterpapier	Whatman

Tabelle 23: Geräte

Gerät	Hersteller	Referenznummer
Blockthermostat	Techne	DRI-Block DB 2A
Electrophoresis Power Supply	Consort	E385
Fluoreszenzmikroskop	Keyence	BZ-9000
Kryostat	Leica	CM 3050S
Microplate Centrifuge	Peqlab	C1000-PEQ-230EU
Reagenzglasmixer	Labinco	L46
Step One Plus Real Time PCR	Thermo Fischer Scientific	27200746
Thermozykler	Applied Biosystems	2720
Tischzentrifuge	A. Hartenstein	MC-6400-Centrifuge

Tabelle 24: Softwareprogramme

Softwareprogramm	Herausgeber
BZ-II Analyzer 2.1	Keyence
Endnote	Thomson Reuters
Fiji/Image Version: 1.52q	Open Source
IBM SPSS Statistics 25	IBM
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft Word 2016	Microsoft
Origin	Firma MicroCal Inc
Step One™ Software v2.3	Applied Biosystems

3 Ergebnisse

3.1 Intakte Blut-Nerven-Schranke bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen

3.1.1 Das Ausschalten von *Cldn12* hat keine Auswirkung auf die Barriere des Perineuriums

3.1.1.1 Unveränderte Permeabilität des Perineuriums bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen

Um die Barrierefunktion des Perineuriums zu analysieren, wurde die Permeabilität der perineuralen Barriere von weiblichen WT Mäusen und *Cldn12*-KO Mäusen untersucht. Die quantitative Auswertung der Mikroskopaufnahmen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Farbintensität von EBA im Endoneuralraum zwischen der KO Gruppe und der WT Gruppe (*Abbildung 4*).

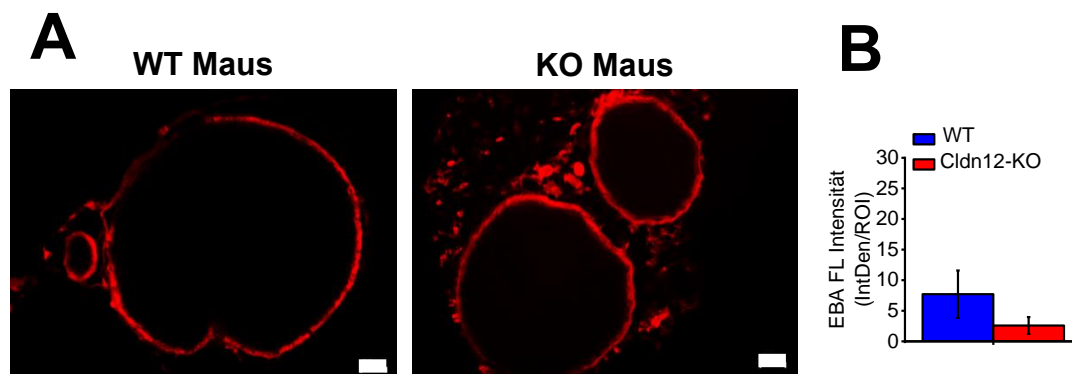


Abbildung 4: Unveränderte Permeabilität des Perineuriums bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen

(A) Nervenquerschnitte von naiven weiblichen WT Mäusen (links) und KO Mäusen (rechts) wurden mit EBA gefärbt, dargestellt sind zwei repräsentative Bilder, Messbalken = 50µm (B) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals als Maß für die perineurale Permeabilität der BNS, Auswertung der Nervenquerschnitte mit Hilfe von ImageJ, Abbildung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzintensität \pm SEM ($p > 0,05$, t-Test, $n = 6$, EBA = Evans Blue Albumin, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, FL = Fluoreszenz, IntDen = Intensitätsdichte, ROI = quantifizierter Bereich)

3.1.1.2 Immunreaktivität und Verteilungsmuster von Tight Junction Proteinen im Perineurium

Claudin-1

Im peripheren Nerv ist Claudin-1 (Cldn) hauptsächlich im Perineurium lokalisiert und übernimmt eine wichtige abdichtende Aufgabe bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten (48). Dies zeigte sich auch in den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen. In beiden Versuchsgruppen war Cldn1 homogen über das Perineurium verteilt und dort in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Bezüglich dieses Verteilungs- und Strukturmusters konnten keine Unterschiede zwischen weiblichen WT Mäusen und *Cldn12*-KO Mäusen beobachtet werden (*Abbildung 5A*). Die quantitative Auswertung der Immunreaktivität von Cldn1 unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (*Abbildung 5B*).

ZO-1

ZO-1, ein TJ-assoziiertes Protein, ist bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion im peripheren Nerv von Bedeutung, da es die Zusammensetzung der TJP organisiert (49). Beim Vergleich der Anordnung der perineuralen ZO-1 Färbung wurde eine feine Zick-Zack-Linie, die Zell-Zell-Kontakte anzeigt, in den Nervenquerschnitten von weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen und WT Mäusen beobachtet. Ein solches Strukturmuster war bei beiden Versuchsgruppen zu erkennen und unterschied sich nicht voneinander (*Abbildung 5A*). Vergleicht man die Immunreaktivität des TJ-assoziierten Proteins ZO-1 bei weiblichen WT Mäusen und *Cldn12*-KO Mäusen ist keine Veränderung im Verteilungsmuster zu erkennen. Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den genetisch veränderten Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der Immunreaktivität (*Abbildung 5B*).

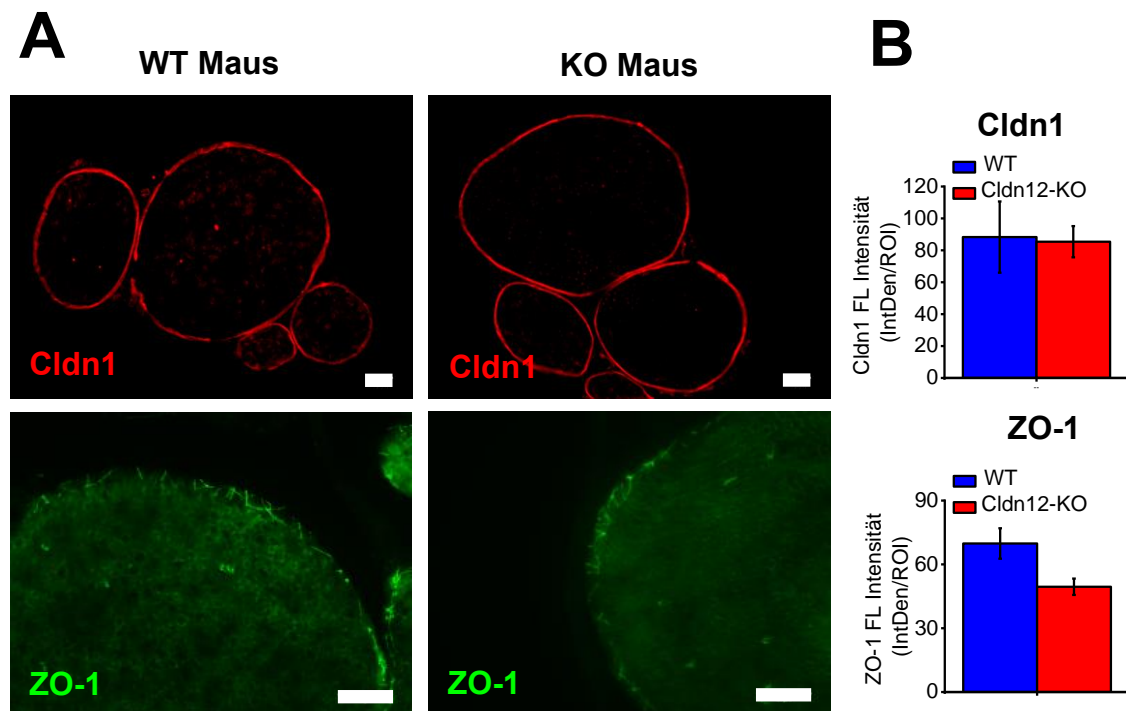


Abbildung 5: Das Fehlen von *Cldn12* wirkt sich nicht auf die TJP Claudin-1 und ZO-1 im Perineurium aus

(A) Beispiele einer Immunfluoreszenzfärbung mit *Cldn1* (oben) und ZO-1 (unten) von Querschnitten des Nervus ischiadicus bei weiblichen WT Mäusen (links) und KO Mäusen (rechts), Messbalken = 50 μm (B) Quantitative Auswertung der Immunreaktivität der Nervenquerschnitte mit Hilfe von ImageJ, Abbildung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzintensität \pm SEM ($p > 0,05$, t-Test, $n = 5$, *Cldn* = Claudin, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, FL = Fluoreszenz, IntDen = Intensitätsdichte, ROI = quantifizierter Bereich)

Occludin

In den Nervenquerschnitten des Ischiasnerven konnte Occludin (*Ocln*) im Perineurium nachgewiesen werden. Hierbei scheint die perineurale Verteilung von *Ocln* in den weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen und den WT Mäusen identisch zu sein. Um den Bereich des Perineuriums in den Querschnitten eindeutig zu kennzeichnen, wurde eine Doppelfärbung mit *Cldn1* durchgeführt (Abbildung 6A). *Cldn1* fungierte hier als Marker für das Perineurium. Die quantitative Auswertung der Immunreaktivität ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der WT Gruppe und der *Cldn12*-KO Gruppe (Abbildung 6B). Mittels qRT-PCR wurde zudem nachgewiesen, dass die mRNA Konzentration von *Ocln*

in beiden Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied zeigt (Abbildung 6C).

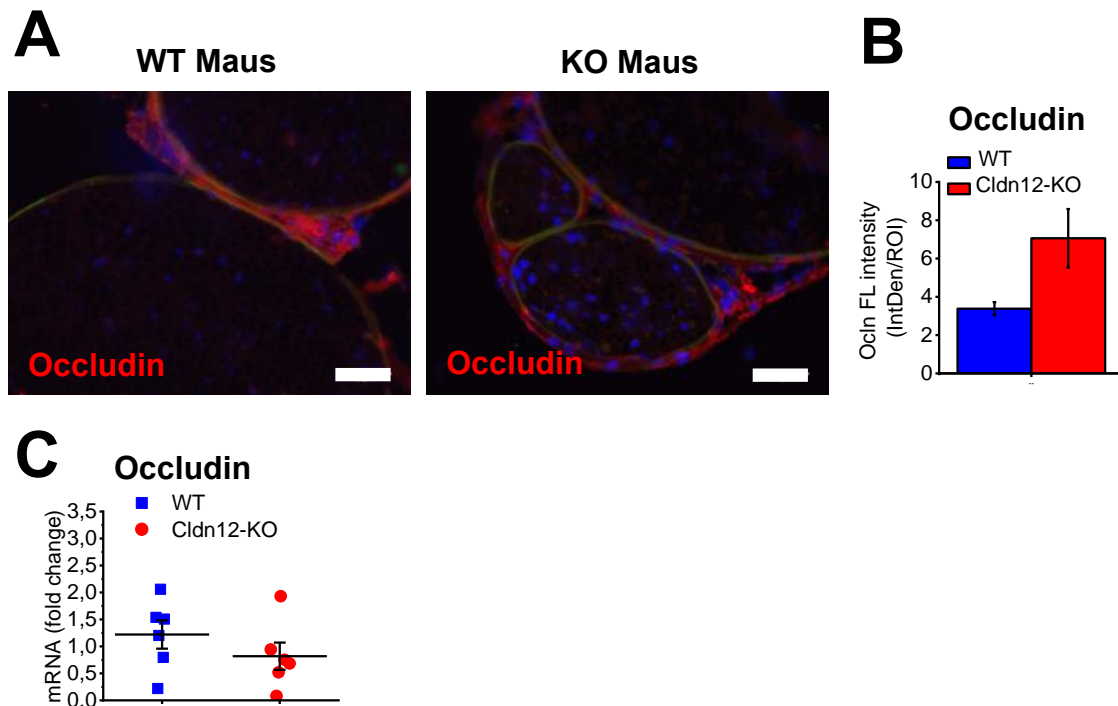


Abbildung 6: Unveränderte Expression von *Occludin* bei *Cldn12*-KO Mäusen

(A) Abbildungen der Querschnitte des Nervus ischiadicus bei weiblichen WT Mäusen (links) und KO Mäusen (rechts) einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung mit *Ocln* (rot), *Cldn1* (grün). Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (blau) verwendet. Messbalken = 50µm (B) Messung und Auswertung der perineuralen Signalintensität mit Hilfe von ImageJ, Abbildung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzintensität ± SEM (C) mRNA Expression von *Ocln* im Ischiasnerv weiblicher WT Mäuse und KO Mäuse ($p > 0,05$, *t*-Test, $n = 4$, *Cldn* = Claudin, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, *Ocln* = Occludin, FL = Fluoreszenz, IntDen = Intensitätsdichte, ROI = quantifizierter Bereich)

3.1.2 Keine Veränderung in der Immunreaktivität von *Cldn5* als Hinweis auf die intakte Barriere der endoneurialen Gefäße

Im peripheren Nerv ist *Cldn5* in den Endothelzellen der endoneurialen Gefäße zu finden (43). In den angefärbten Schnittpräparaten der WT Gruppe als auch der *Cldn12*-KO Gruppe bestätigte sich dies. *Cldn5* konnte in den Kapillaren des Endoneuriums nachgewiesen werden. Zwischen beiden Versuchsgruppen konnte kein Unterschied in der Verteilung und im Strukturmuster festgestellt

werden (Abbildung 7A). Auch bei der quantitativen Auswertung der Fluoreszenzbilder konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 7B).

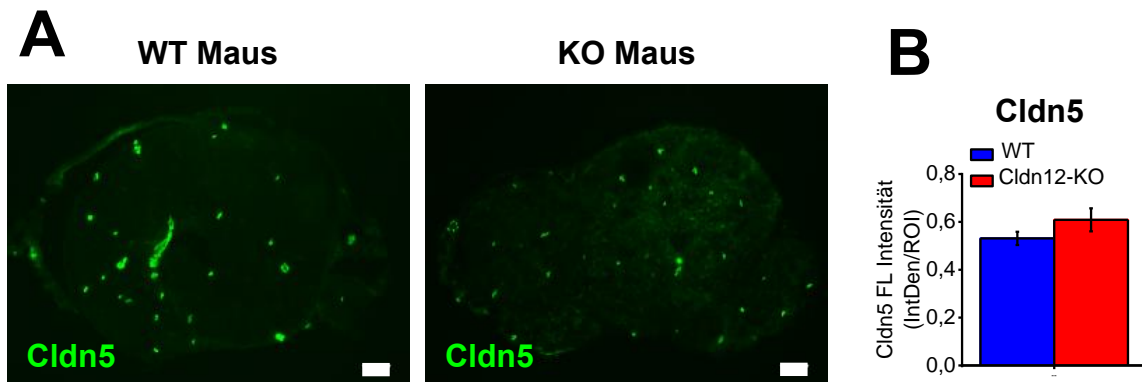


Abbildung 7: Keine Divergenzen in der Immunreaktivität von Cldn5 in den endoneurialen Kapillaren

(A) Repräsentative Mikroskopaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen mit Cldn5 von Nervenquerschnitten bei weiblichen WT Mäusen (links) und KO Mäusen (rechts), Messbalken = 50µm (B) Quantitative Auswertung der Immunreaktivität der im Endoneurium lokalisierten Blutgefäße mit Hilfe von ImageJ, grafische Darstellung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzintensität \pm SEM ($p > 0,05$, t-Test, $n = 5$, Cldn = Claudin, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, FL = Fluoreszenz, IntDen = Intensitätsdichte, ROI = quantifizierter Bereich)

3.2 Normale Funktion der Myelin-Barriere trotz des Fehlens von Cldn12 bei weiblichen Mäusen

3.2.1 Ähnliche Permeabilität der Myelin-Barriere bei beiden Versuchsgruppen

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde untersucht, ob das Ausschalten von Cldn12 bei weiblichen Mäusen die Permeabilität der MB beeinflusst. Nach Auswertung der Zupfpräparate des Ischiasnerven der weiblichen Mäuse, konnte keine erhöhte Intensität des grünen Fluoreszenzfarbstoffes in der KO Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 8B). Bei Betrachtung der Zupfpräparate konnte allerdings vereinzelt ein Eintritt des Farbstoffs FITC-Dextran beobachtet werden (Abbildung 8A). Der Eintritt des Farbstoffs stellt sich in einer erhöhten grünen Fluoreszenz im Inneren der

Nervenfasern dar. Diese trat sowohl bei der *Cldn12*-KO Gruppe als auch bei der WT Gruppe auf und ist darauf zurückzuführen, dass die MB beim Erstellen der Zupfpräparate beschädigt wurde.

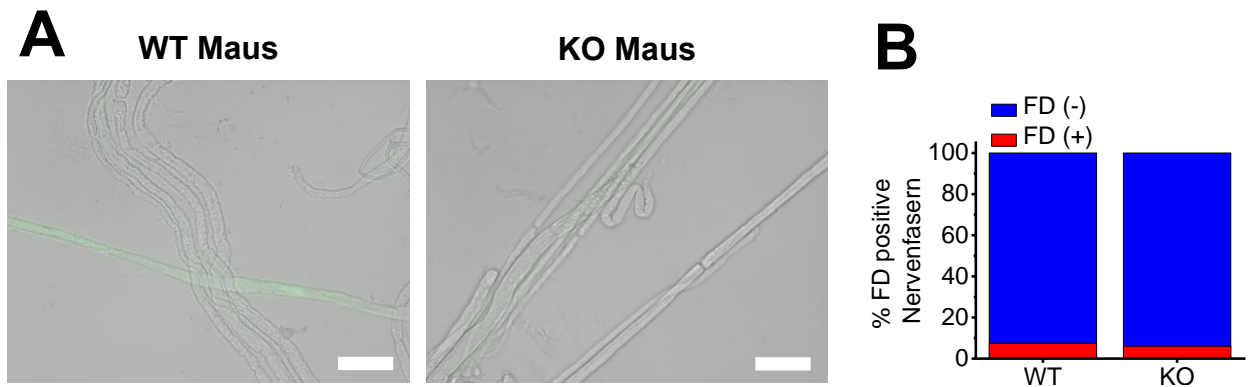


Abbildung 8: Intakte Permeabilität der MB im peripheren Nerv

(A) Abbildung von Zupfpräparaten bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen (rechts) und WT Mäusen (links). Die Permeabilität der MB wurde anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals von FD innerhalb der Nervenfasern beurteilt, Messbalken 50µm (B) Auswertung des prozentualen Anteils der FD positiven (rote Balken) und negativen (blaue Balken) Fasern im Ischiassnerv. ($p > 0,05$, t-Test, $n = 6$, EBA = Evans Blue Albumin, FD = FITC-Dextran, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out)

3.2.2 Keine Unterschiede in der Immunreaktivität von *Cldn19* zwischen der WT Gruppe und der *Cldn12*-KO Gruppe

In den Zupfpräparaten konnte *Cldn19* paranodal sowohl in der weiblichen WT Maus als auch in der weiblichen *Cldn12*-KO Maus nachgewiesen werden. Dies resultierte in einem roten punktförmigen Fluoreszenzsignal beidseitig des Ranvier-Schnürrings. Im Verteilungs- und Strukturmuster von *Cldn19* ist bei den WT Mäusen und den *Cldn12*-KO Mäusen kein Unterschied festzustellen (Abbildung 9A). Auch die quantitative Auswertung der Präparate zeigte keine Differenzen in der Immunreaktivität zwischen beiden Versuchsgruppen (Abbildung 9B).

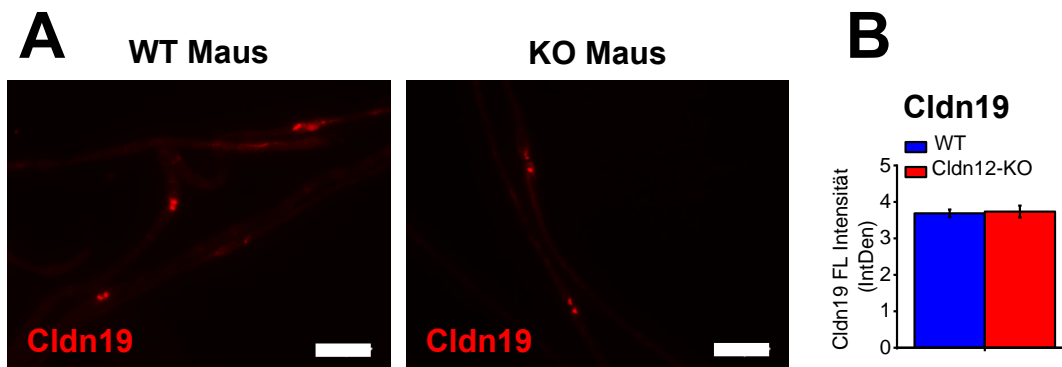


Abbildung 9: Ähnliches Verteilungsmuster und Immunreaktivität von Cldn19 bei WT Mäusen und Cldn12-KO Mäusen

(A) Immunhistologische Färbungen von Zupfpräparaten mit Cldn19, Messbalken = 50µm
 (B) Quantitative Auswertung und Vergleich der Immunreaktivität des paranodalen Bereichs mit Hilfe von ImageJ, Abbildung der Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzintensität \pm SEM ($p > 0,05$, t-Test, $n = 5$, Cldn = Claudin, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, FL = Fluoreszenz, IntDen = Intensitätsdichte)

3.2.3 Das Fehlen von Cldn12 hat keine signifikante Auswirkung auf die Expression Myelin-spezifischer Proteine

Um zu zeigen, dass das Ausschalten von Cldn12 keinen Effekt auf die MB des Ischiasnerven hat, wurde zusätzlich die mRNA Expression Myelin-spezifischer Proteine untersucht. Hierbei wurde speziell MBP, ein hydrophiles Protein, das durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipiden des Myelins interagiert (50), untersucht. Zusätzlich wurde die mRNA Expression von Pmp22 im Ischiasnerv analysiert. Im peripheren Nerv spielt PMP22 eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung und Bildung des kompakten Myelins (51). Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von Cldn12 bei weiblichen Mäusen die mRNA Expression von Mbp sowie von Pmp22 nicht beeinflusst. Zwischen der WT Gruppe und der Cldn12-KO Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abbildung 10A/B).

3.2.4 Das Ausschalten von *Cldn12* wirkt sich nicht auf die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren von Schwanzzellen aus

Neben Myelin-spezifischen Proteinen, die für den Aufbau der MB wichtig sind, wurde ebenfalls die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren von Schwanzzellen untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Faktoren Sox10 und Krox20 geworfen, die bei der Entwicklung der Schwanzzellen von großer Bedeutung sind (52). Die mRNA Expression von Sox10 ist bei *Cldn12*-KO Mäusen im Vergleich zur WT Gruppe unverändert (Abbildung 10C). Hingegen hat das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen einen geringen signifikanten Effekt auf die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors *Krox20*. Dies resultiert in einer minimalen Erhöhung der mRNA Expression von *Krox20* in der *Cldn12*-KO Gruppe (Abbildung 10D).

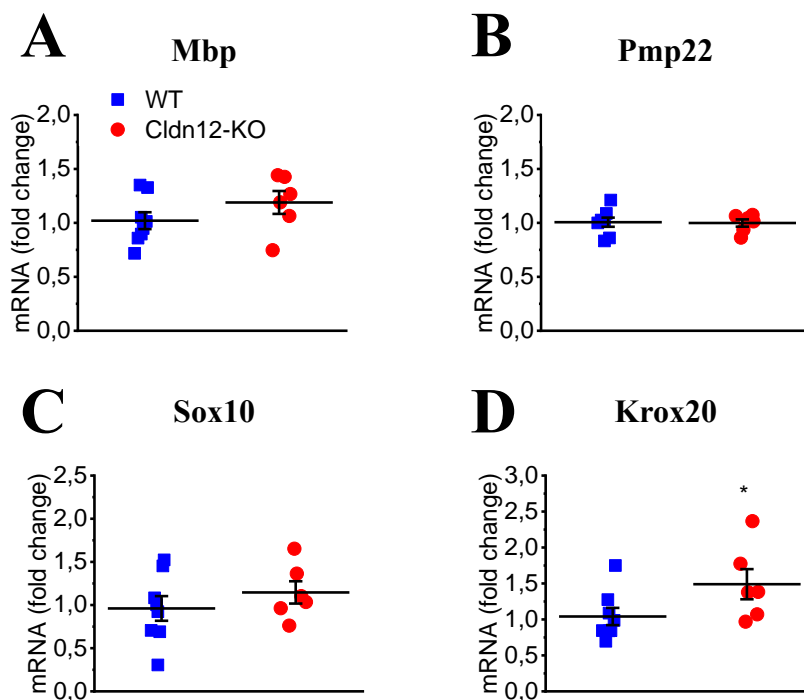


Abbildung 10: Unveränderte mRNA Expression Myelin-spezifischer Proteine und für die Schwanzzell Entwicklung wichtiger Transkriptionsfaktoren durch das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen

mRNA Expression von *Mbp* (A), *Pmp22* (B), *Sox10* (C) und *Krox20* (D) im Ischiasnerv bei weiblichen WT Mäusen und KO Mäusen, grafische Darstellung der normalisierten mRNA Werte sowie des Mittelwerts \pm SEM ($p < 0,05$, *t*-Test, $n = 6$, *Mbp* = Myelin

basisches Protein, Pmp22 = peripheres Myelinprotein 22, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out)

3.3 Unveränderte Expression des Zell-Barrieren-Stabilisators *Shh* bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen

Die mRNA Expression von *Shh*, das für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion wichtig ist (44, 53), wurde im Ischiasnerv weiblicher Mäuse durch das Ausschalten von *Cldn12* nicht beeinflusst. Dies bestätigte sich durch die Auswertung der qPCR Daten. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der WT Gruppe und *Cldn12*-KO Gruppe festgestellt werden (Abbildung 11B). Dass das Ausschalten von *Cldn12* keinen Einfluss auf die Bildung von SHh bei weiblichen Mäusen hat, bestätigte sich ebenfalls in den Ergebnissen des durchgeführten Western Blots. In der Auswertung der erhobenen Daten zeigte sich, dass die Konzentration von SHh in der WT Gruppe und der *Cldn12*-KO Gruppe nicht signifikant voneinander abweichen (Abbildung 11A).

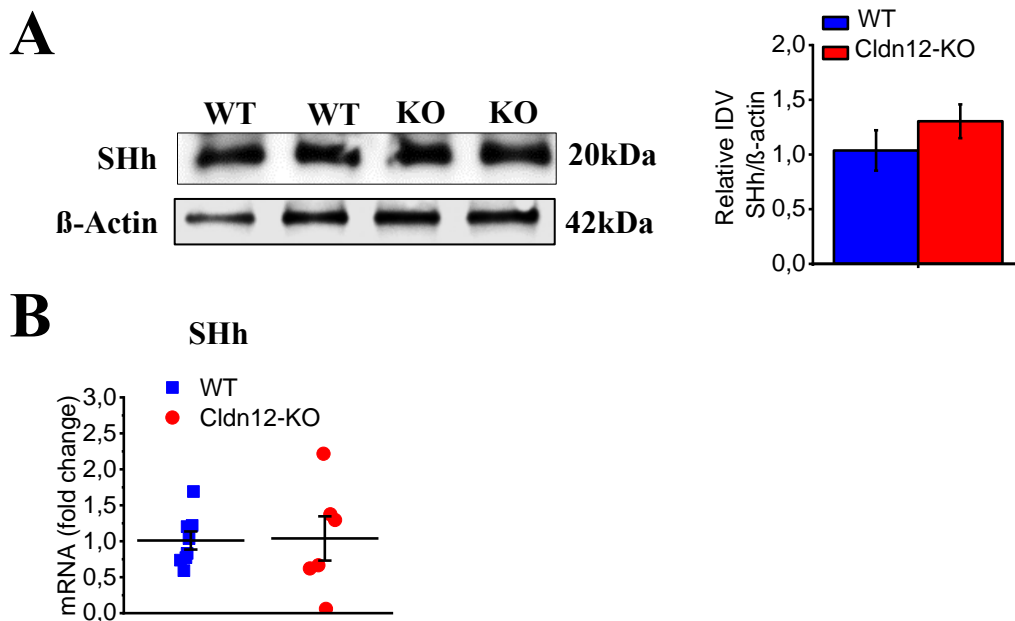


Abbildung 11: Keine Auswirkung des Ausschaltens von *Cldn12* auf die Bildung von SHh im Ischiasnerv

(A) Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots von SHh im Ischiasnerv weiblicher WT Mäuse und KO Mäuse (links), β -Actin wurde als Ladekontrolle eingesetzt, Auswertung des Western Blots durch ImageJ, Abbildung der Mittelwerte der relativen

integrierten Intensitätsdichte (IDV) \pm SEM ($p < 0,05$, t-Test, $n=6$, WT= Wildtyp, KO= Claudin-12 knock-out) **(B)** mRNA Expression von Shh im Nervus ischiadicus weiblicher WT und KO Mäuse, grafische Darstellung der normalisierten mRNA Werte sowie des Mittelwerts \pm SEM ($p > 0,05$, t-Test, $n = 6$, SHh = Sonic Hedgehog, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out)

3.4 Gleiche neuronale Zusammensetzung des Spinalganglions bei männlichen WT Mäusen und *Cldn12*-KO Mäusen

Die Analyse der neuronalen Verteilung von NF200, IB4 und CGRP im Spinalganglion männlicher Mäuse soll ausschließen, dass eine veränderte Zusammensetzung der Neurone für die mechanische Hypersensitivität der männlichen *Cldn12*-KO Mäuse verantwortlich ist. Ausgehend von der Gesamtanzahl der Neurone wurde hierzu der prozentuale Anteil von NF200, IB4 sowie CGRP bei männlichen WT Mäusen und männlichen *Cldn12*-KO Mäusen bestimmt. Nach Auswertung der Daten konnte zwischen der männlichen WT Gruppe und der männlichen *Cldn12*-KO Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (*Abbildung 12B*).

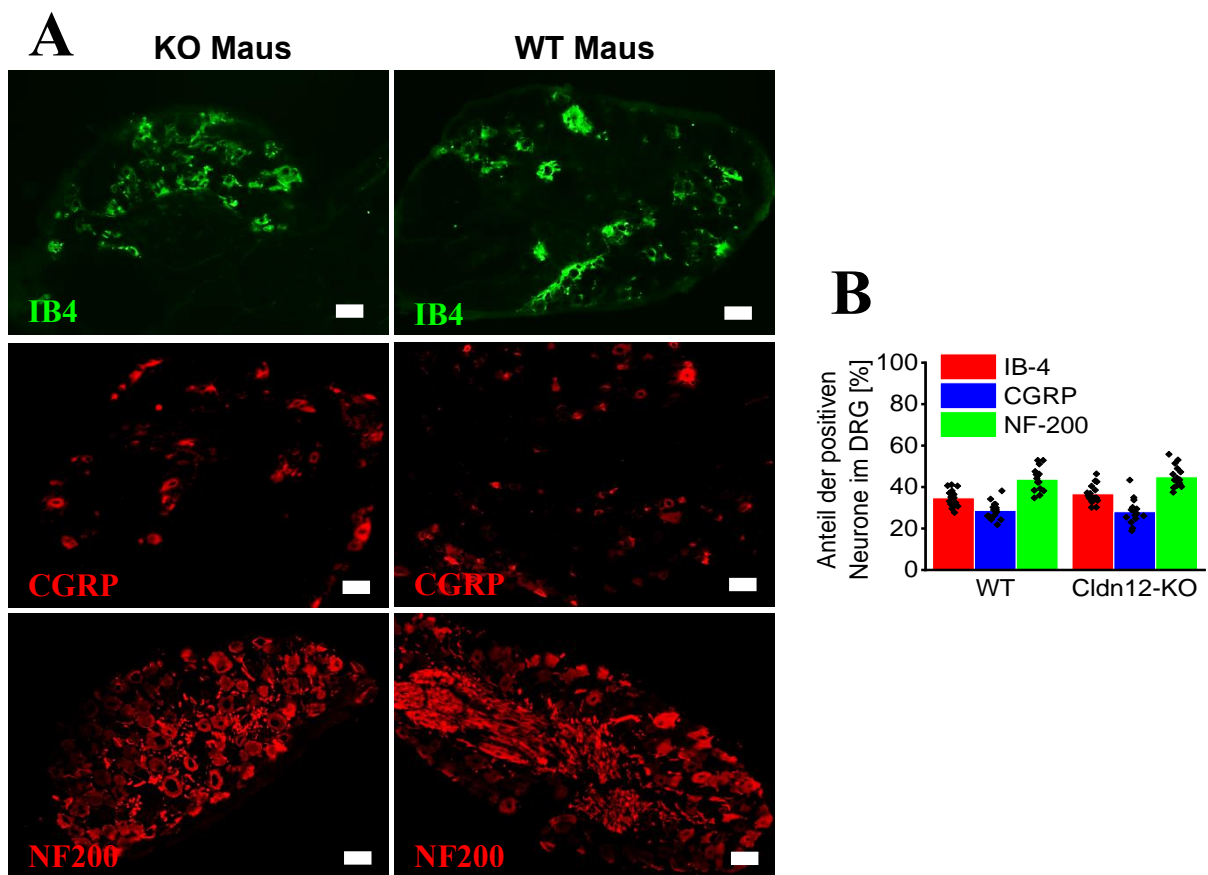


Abbildung 12: Unveränderte neuronale Zusammensetzung des Spinalganglions bei männlichen *Cldn12*-KO Mäusen

(A) Immunhistologische Bilder von Querschnitten des Spinalganglions bei männlichen WT Mäusen und KO Mäusen mit Anfärbung folgender positiver Neurone: IB4 (oben), CGRP (mittig), NF200 (unten), Messbalken = 50µm (B) Quantitative Auswertung der Querschnitte mit ImageJ, Abbildung der Mittelwerte des prozentualen Anteils der Neurone am gesamten Spinalganglion und der Einzelwerte eines Spinalganglions, pro Tier wurden 4 Spinalganglien ausgewertet ($p > 0,05$, 2-way ANOVA, $n = 4$, IB4 = Isolectin B4, CGRP = Calcitonin Gene-Related Protein, NF200 = Neurofilament 200, WT = Wildtyp, KO = Claudin-12 knock-out, DRG = Spinalganglion)

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In vorherigen Schmerzverhaltensexperimenten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass weibliche *Cldn12*-KO Mäuse kein erhöhtes Schmerzempfinden auf mechanische Reize zeigen (47). Dies ist ein entscheidender Unterschied zu den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen, welche Veränderungen der peripheren Barrieren aufwiesen, und daher auf mechanische Reize mit Hypersensitivität reagierten (47). Aus diesem Grund postulierten wir, dass weibliche *Cldn12*-KO Mäuse im Gegensatz zu männlichen *Cldn12*-KO Mäusen keine Veränderungen der BNS und der MB aufweisen. Daher war es Ziel dieser Studie, weibliche *Cldn12*-KO Mäuse zu charakterisieren und zu untersuchen, welche Auswirkungen das Ausschalten von *Cldn12* auf die Barrierefunktion des peripheren Nerven hat.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *Cldn12* bei den weiblichen Versuchstieren keine Auswirkung auf die Permeabilität der Perineuralbarriere und der MB hat. Im Kontrast hierzu stehen die Ergebnisse der männlichen *Cldn12*-KO Mäuse. Bei diesen konnte sowohl eine erhöhte Permeabilität der Perineuralbarriere als auch der MB nachgewiesen werden (47). In einem weiteren Versuchsaufbau wurde mittels Immunhistochemie gezeigt, dass TJP, die mit Neuropathie assoziiert werden, in der BNS und der MB der weiblichen *Cldn12*-KO Mäuse unverändert exprimiert sind. Bei den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen ist hingegen die Immunreaktivität von Cldn1 im Perineurium und die Immunreaktivität von Cldn19 in der MB signifikant reduziert (47). Zudem war die Expression Myelin-spezifischer Transkriptionsfaktoren sowie die Expression Myelin-spezifischer Proteine bei den weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen im Vergleich zu den weiblichen WT Mäusen unverändert. Das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen beeinflusste ebenfalls nicht die Bildung des Zell-Barrieren-Stabilisators SHh. Bei den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen konnte allerdings eine signifikante Reduktion des Zell-Barrieren-Stabilisators SHh nachgewiesen werden (47). Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor aufgestellte Hypothese,

dass trotz des Fehlens von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen die peripheren Barrierefunktionen intakt sind. Hierdurch lässt sich auch das geschlechterspezifische Schmerzverhalten der *Cldn12*-KO Mäuse auf mechanische Reize erklären. So konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bei männlichen *Cldn12*-KO Mäusen, die mit Hypersensitivität auf mechanische Reize reagierten, bereits einige Veränderungen in der BNS und MB nachgewiesen werden (47). Um zu bekräftigen, dass diese Veränderungen der peripheren Barrieren für das erhöhte Schmerzempfinden der Tiere verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit die unveränderte neuronale Zusammensetzung von NF200, IB4 und CGRP im Spinalganglion der männlichen Mäuse nachgewiesen.

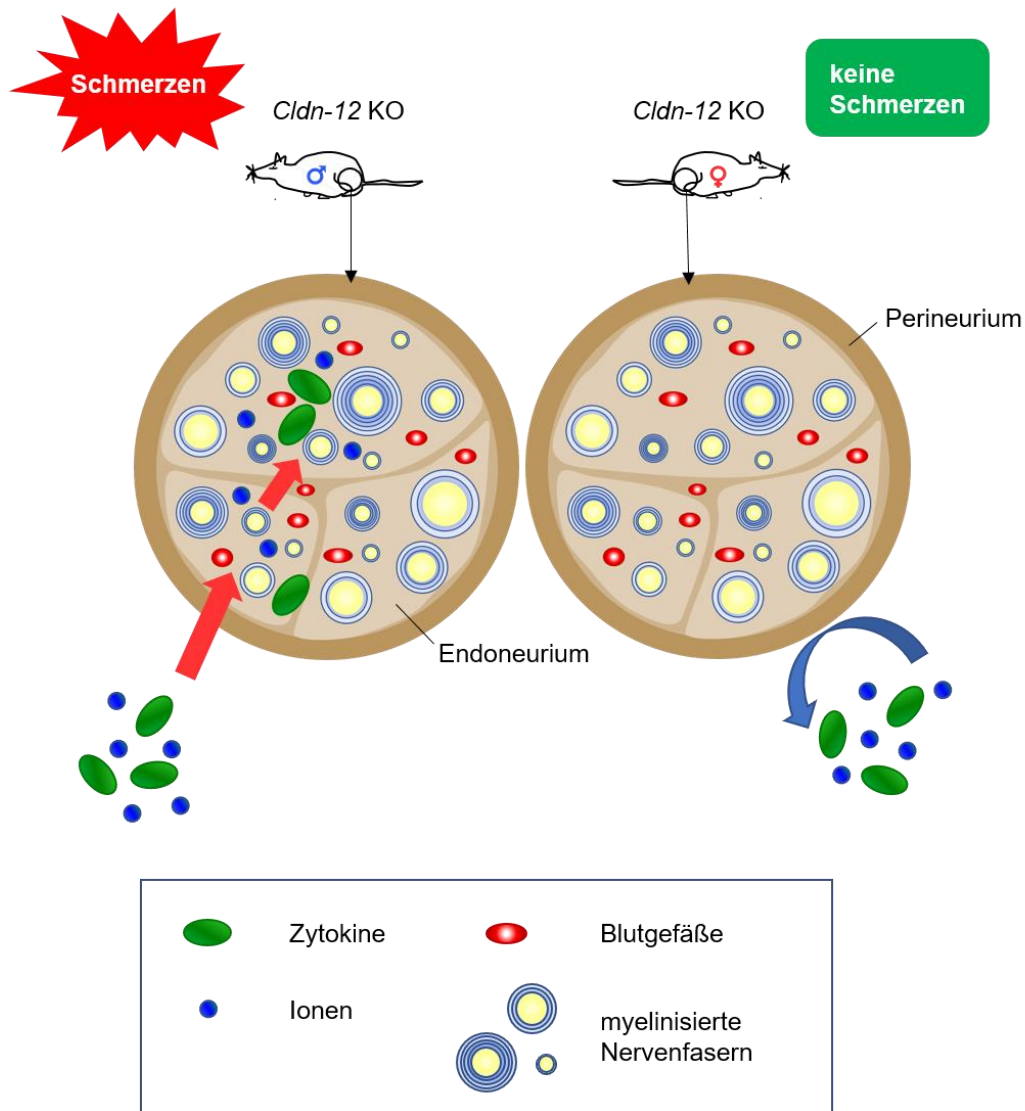


Abbildung 13: Geschlechterspezifisches Schmerzverhalten und Barrierefunktion bei *Cldn12*-KO Mäusen

Das Ausschalten von *Cldn12* im PNS weiblicher Mäuse führt bei den Versuchstieren, im Gegensatz zu den männlichen Versuchstieren, zu keiner mechanischen Hypersensitivität sowie zu keiner Veränderung der Permeabilität der BNS und der MB

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Immunhistochemie

Die indirekte Immunhistochemie dient dem Nachweis von Antigenen (54, 55). Ein Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz gegenüber der direkten Variante ist, dass durch die Verwendung zweier Antikörper das Fluoreszenzsignal verstärkt

wird. Zudem kann neben dem Vorhandensein der Proteine bei entsprechender Qualität und Färbung der Schnitte auch eine Aussage über die Lokalisation der TJP getroffen werden. Bereits 2004 nutzten Pummi et al. die indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung von TJP in der BNS (56).

4.2.2 Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der PCR wurde 1987 erstmals von Mullis und Faloona vorgestellt (57). Durch diese Technik ist es möglich millionenfache Kopien bestimmter Nucleotidsequenzen herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Schritt hat den Vorteil, auch eine geringe Menge an vorhandener DNA zu analysieren und nachzuweisen. Nachteilig ist hingegen, dass mittels PCR lediglich auf die Menge der DNA bzw. der mRNA rückgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund kann nicht mit eindeutiger Sicherheit festgestellt werden, ob das entsprechende Protein, für das sie codieren, synthetisiert wurde.

Für die Durchführung der PCR stehen generell zwei Methoden zur Verfügung: die konventionelle PCR sowie die RT-PCR. Ein Vorteil der RT-PCR gegenüber der konventionellen PCR besteht darin, dass die Auswertung der RT-PCR ohne Durchführung einer Gelelektrophorese erfolgt. Durch diese Vorgehensweise ist die Durchführungszeit des Versuchs verkürzt. Da die Durchführung der Reaktion und die Auswertung der Daten zudem in einem geschlossenen System stattfinden, werden außerdem die Kontaminationsmöglichkeiten verringert. Die Detektion der PCR-Produkte in Echtzeit ist dadurch möglich, dass dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzmolekül hinzugefügt wird. Durch diesen Zusatz wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, das proportional zur Menge der amplifizierten DNA steigt. Dabei werden zwei Arten von Fluoreszenzchemikalien unterschieden: DNA-bindende Farbstoffe (SYBRGreen) und fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Primer/ Sonden (TaqMan). Die RT-PCR mit SYBRGreen ist eine kostengünstige und einfache Methode, um einen Überblick über den RNA-Gehalt der Probe zu erhalten. Ein Vorteil von SYBRGreen ist, dass es bei jeder Amplifikation einer Zielsequenz verwendet werden kann. Im Vergleich zur TaqMan RT-PCR ist keine spezifische Sonde

notwendig. Dadurch sind die Kosten und der Optimierungsaufwand bei einer PCR mit SYBRGreen deutlich geringer. Nachteilig an einer PCR mit SYBRGreen ist hingegen, dass der Fluoreszenzfarbstoff an jede beliebige Doppelstrang-DNA bindet, hierzu zählen auch unspezifische PCR-Produkte sowie Primer-Dimere. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass unspezifische Produkte und Primer-Dimere amplifiziert werden und so das Messergebnis verfälscht wird.

4.2.3 Western Blot

Um die Quantifizierung der mRNA Expression von *Shh* mittels PCR zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Western Blot Analyse durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z.B. dem Northern Blot oder der In-Situ-Hybridisierung, bei denen die mRNA nachgewiesen wird, wird mittels Western Blot das agierende Protein selbst nachgewiesen. Der Vorteil des Protein Nachweises gegenüber dem Nachweis der mRNA ist, dass mittels Western Blot bestätigt werden kann, ob das entsprechende Genprodukt (das Protein) auch synthetisiert wurde. Da die Methode des Western Blots anfällig für Fehlerquellen ist, sollen im folgenden mögliche Einflussfaktoren auf die Resultate diskutiert werden. Eine mögliche Ursache für die Aufhellung in einem Teilbereich der SHH-Bande ist die Bildung von kleinen Blasen beim Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulosemembran. Zudem können geringe unterschiedliche Intensitäten der Banden darauf zurückzuführen sein, dass keine definierten Proteinemengen gegeneinander aufgetragen wurden (Abbildung 11A).

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Wichtige Aufgabe der peripheren Barrieren beim Schutz vor neuropathischen Schmerzen

Die bedeutendsten Barrieren im peripheren Nerv sind die MB und die BNS. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, übernehmen diese eine wichtige Aufgabe beim Schutz des Nerven und der Aufrechterhaltung der nervalen Homöostase. Dabei sind TJPs zwischen den benachbarten Endothelzellen des peripheren

Nerven für die Barrierefunktion verantwortlich (58, 59). Zu den TJP, die in diesen Bereichen vorkommen, zählen *Cldn1*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Cldn19*, ZO-1 und *Ocln* (12). In einigen veröffentlichten Studien wurde bereits nachgewiesen, dass manche Erkrankungen oder Verletzungen mit einem Abbau dieser Barrieren einhergehen. So wurde bei Ratten nach Chronic Constriction Injury (CCI; Ligation des Ischiasnerven, die neuropathische Schmerzen verursacht) bereits 6 h nach dieser Operation eine erhöhte Permeabilität der BNS beobachtet (44). Ebenfalls gibt es erste Hinweise darauf, dass entzündliche Neuropathien bei Patienten sowie in präklinischen Modellen häufig eine veränderte Permeabilität der BNS aufweisen (60). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an weiblichen Mäusen konnten allerdings keine Veränderungen in der Permeabilität der BNS und der MB sowie in der Expression der TJP nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass das Ausschalten von *Cldn12* bei den weiblichen Mäusen keine pathologischen Auswirkungen auf die Barrieren des PNS hat und nicht mit der Entstehung neuropathischer Schmerzen assoziiert werden kann. Tatsächlich wird eine Unterbrechung der Barriere mit nachfolgendem endoneurialen Ödem (60) als Schlüsselkomponente für die Entstehung autoimmuner Polyneuropathien angesehen. Zu den autoimmunen Polyneuropathien werden unter anderem das akute Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und die chronisch entzündliche demyelinisierende Polyradiculoneuropathie (CIDP) gezählt (61). In Biopsien von CIDP-Patienten haben Kanda et al. eine Herunterregulierung und eine veränderte Lokalisierung von TJP beobachtet (62). Durch den Abbau dieser TJP in der BNS können Antimyelin-Antikörper und verschiedene Zytokine in das periphere Nervengewebe eindringen. Dies verstärkt die periphere Nervenschädigung bei entzündlichen Neuropathien. Bei männlichen *Cldn12*-KO Mäusen wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ebenfalls eine erhöhte Permeabilität der peripheren Barrieren sowie eine Herunterregulierung von TJP nachgewiesen (47). Da die männlichen *Cldn12*-KO Mäuse im Vergleich zu den weiblichen Versuchstieren auf mechanische Reize ein Schmerzverhalten zeigten, bestätigte dies die Annahme, dass die peripheren Barrieren beim Schutz vor neuropathischen Schmerzen eine wichtige Aufgabe übernehmen.

4.3.2 Periphere Veränderungen durch das Ausschalten von TJP

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ein Ausschalten von TJP die Expression anderer TJP beeinflussen kann. 2012 fanden Forscher in Kanada heraus, dass durch das Fehlen von *Cldn4* die Expression von *Cldn1*, *Cldn9* und *Cldn12* in den Nierenzellen eines Opossums verringert ist. Es konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, wie das Ausschalten von *Cldn4* die Expression anderer TJP beeinflusst (63). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls, dass bei männlichen *Cldn12*-KO Mäusen die mRNA Expression von *Cldn1* und *Cldn19* im Ischiasnerv reduziert ist (47). Bei weiblichen Mäusen bestätigten sich diese Ergebnisse allerdings nicht. Sowohl bei den weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen als auch bei den WT Mäusen war die Expression der TJP im PNS unverändert. Für die Nozizeption im PNS sind neben der veränderten Expression von TJP auch das Fehlen bestimmter TJP von entscheidender Bedeutung. Zum Beispiel zeigten Mäuse mit einer Deletion des Junctional Adhäsionsmoleküls-C (JAM-C) im Vergleich zu WT-Kontrollen elektrophysiologische Defekte, Muskelschwäche und Überempfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen (64). Da JAM-C den TJP-Zusammenbau und die Versiegelung der Epithelien reguliert (65), ist es wahrscheinlich, dass die mechanische Allodynie auf eine veränderte TJP-Zusammensetzung im Ischiasnerv zurückzuführen ist. Dies erklärt auch, dass männliche *Cldn12*-KO Mäuse, die eine veränderte Expression von TJP im PNS aufweisen, auf mechanische Reize mit Hypersensitivitäten reagierten (47). Weibliche *Cldn12*-KO Mäuse hingegen, deren TJP-Expression unverändert war, zeigten keine Hypersensitivitäten auf mechanische Reize. Mögliche Ursachen für die geschlechterspezifischen Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.3.3 Bedeutung von SHh für die Barrierefunktion des peripheren Nerven

Es ist bekannt, dass der Hedgehog-Signalweg an der embryonalen Morphogenese, der neuronalen Steuerung und der Angiogenese beteiligt ist (66,

67). In adulten Geweben ist diese Signalkaskade für die Proliferation, Differenzierung und Reparatur von Gewebe mit verantwortlich (68-70). Besonders ZNS- und PNS-morphogene Ereignisse stehen in Zusammenhang mit dem SHh-Signalweg. Man weiß bereits, dass das Signalmolekül SHh die Dichtheit der Barrieren in der BHS (71) als auch in der BNS (44) reguliert. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass SHh auch für die geschlechterspezifische Permeabilität der peripheren Barrieren verantwortlich ist. Ausgeschüttetes SHh bindet und inaktiviert den Rezeptor Tached (Ptch-1) und ermöglicht die Aktivierung von Smoothened (Smo). Smo wiederum induziert über Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie die Zielgene. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass SHh die Expression von *Cldn5* und *Ocln* in Neuronen erhöht (71, 72). In der BNS ist nach einer Nervenverletzung SHh als Kompensationsmechanismus erhöht. Es wurde nachgewiesen, dass in den ersten Stunden nach CCI die *Shh* mRNA Expression hochreguliert ist und dann schrittweise bis zum Ende des Experiments auf den Ausgangswert zurückgeht (44). Die Blockierung des SHh/smo-Signalweges über den Smo-Rezeptor Antagonisten Cyclopamin vermindert die Expression von *Cldn5* mRNA und *Ocln* mRNA im Ischiasnerv. Dies löst bei den Versuchstieren mechanische Überempfindlichkeiten aus (43, 44, 53). Andere neu identifizierte SHh-Zielgene, wie *Pmp22*, spielen eine bedeutende Rolle bei der Myelinisierung im PNS (73). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass SHh auch noch andere TJP im PNS reguliert. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass das Fehlen von *Cldn12* ausschließlich bei männlichen Mäusen zu einer reduzierten SHh Bildung führte (47). Bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen hingegen wurde keine Veränderung in der SHh Produktion festgestellt. In Magenkrebszellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch Östrogen die *Shh* Expression stimuliert werden kann (74). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Östrogenproduktion der weiblichen *Cldn12*-KO Mäuse für die unveränderte SHh Produktion verantwortlich ist. Nach einer Nervenverletzung fördert Östrogen zudem die Nervenregeneration und das Gefäßwachstum. Die dadurch bedingten Veränderungen scheinen sich als Folge des hochregulierten Hedgehog-Signals zu entwickeln (75). In einigen Studien konnte somit bereits dargelegt werden,

dass die mRNA Expression des Zell-Barrieren-Stabilisators *Shh* durch Östrogen verändert werden kann (74, 75). Dies erklärt, dass die *Shh* Expression der weiblichen *Cldn12*-KO Mäuse im Gegensatz zu der *Shh* Expression der männlichen Versuchstiere nicht herunterreguliert ist.

4.3.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Schmerz

Die Mehrheit der an chronischen Schmerzen leidenden Patienten sind Frauen. Epidemiologische Studien zeigten, dass die Prävalenz von chronischen Schmerzen bei Frauen gegenüber Männern um 6% höher ist (76, 77). Die Analyse des unterschiedlichen Schmerzempfindens von Frauen und Männern wird durch den weiblichen hormonellen Zyklus erschwert. In vergangenen Studien konnte bereits ein variierendes weibliches Schmerzverhalten über den Zyklus hinweg nachgewiesen werden. Eine Metaanalyse experimenteller Arbeiten ergab, dass Frauen während der Follikelphase eine höhere Schmerztoleranz aufweisen (78). Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass in den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe weibliche *Cldn12*-KO Mäuse, im Vergleich zu den männlichen Versuchstieren, mehr Schmerz tolerierten und daher keine Hypersensitivitäten auf mechanische Reize zeigten. Eine weitere bis heute nicht eindeutig geklärte Frage ist, wie Sexualhormone das Schmerzverhalten beeinflussen. Angesichts der weitreichenden Auswirkungen der weiblichen Geschlechtshormone auf das Immunsystem (79), ist es sehr wahrscheinlich, dass Immunzellen direkt zu den geschlechtsspezifischen Schmerzunterschieden beitragen. So spielen aus Immunzellen freigesetzte entzündungshemmende Zytokine eine wichtige Rolle bei der Schmerzlinderung (80). Dies kann eine weitere Ursache dafür sein, dass weibliche *Cldn12*-KO Mäuse im Gegensatz zu männlichen *Cldn12*-KO Mäusen keine Schmerzen auf mechanische Reize zeigen. Das weibliche Geschlechtshormon Östrogen kann direkt auf Immunzellen wirken und deren Funktion verändern. Zu den Immunzellen, die über einen Östrogen-Rezeptor verfügen, gehören Makrophagen, Natural Killer Zellen, Dendritische Zellen und T-Zellen (79). Mit Östrogen behandelte Mikroglia zeigte eine verringerte Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine (81). Weiterhin ist die Wirkung von Östrogen auf

die Zytokinausschüttung durch T-Zellen biphasisch. Bei einer niedrigen Östrogen Dosis kommt es zu einer vermehrten Sekretion des Tumornekrosefaktors (TNF- α), wobei eine hohe Östrogen Dosis mit einer Hemmung von TNF- α einhergeht (82). In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 hemmen (83). Zudem verhinderte eine Behandlung von kultivierten Astrozyten mit 17 β -Östradiol die Freisetzung von LPS-induziertem proinflammatorischen IL-1 β , TNF- α und MMP-9 (84). Dies zeigt, dass Östrogen über verschiedene Wege eine entzündungshemmende Wirkung hat, die auch bei der Schmerzreduktion von Bedeutung ist. Eine vor wenigen Jahren erschienene Studie zeigte zudem, dass weibliche Mäuse, die mit Östradiol behandelt wurden, im Vergleich zu Vehikel-Mäusen eine verringerte Astrozytenanzahl nach einer Nervenverletzung besitzen. Parallel zur Schmerzlinderung der behandelten Mäuse zeigten die Tiere eine funktionelle Verbesserung der verletzten Extremität, einen schnelleren Regenerationsprozess der peripheren Nerven und eine verminderte Neuropathie induzierte Gliose (85). Diese Ergebnisse weisen auf eine vorteilhafte Wirkung von 17 β -Östradiol auf neuropathische Schmerzen und die neuronale Regeneration hin. Die aufgeführten Studien deuten darauf hin, dass das weibliche Gonadenhormon Östrogen für das unterschiedliche Schmerzverhalten der weiblichen und männlichen Versuchstiere verantwortlich sein könnte. Neben Östrogen hat auch Progesteron eine Auswirkung auf das Immunsystem. So verringert eine Behandlung mit Progesteron nach einer traumatischen Hirnverletzung die Bildung proinflammatorischer Zytokine IL-1 β , TNF- α (86). Nach einer Verletzung des Rückenmarks hat die Gabe von Progesteron zudem einen antiinflammatorischen Effekt, indem es die Proliferation und die Aktivierung von Mikroglia verhindert (87). Darüber hinaus verbessert die Vorbehandlung mit Progesteron die klinischen Symptome einer Enzephalomyelitis und verringert den Verlust von *Mbp* (88). In den vorliegenden Ergebnissen wurde auch die Expression von *Mbp* bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen untersucht. Nach Auswertung der Daten zeigte sich, dass *Mbp* sowohl bei der Versuchsgruppe als auch bei der Kontrollgruppe unverändert exprimiert ist. Ob dies allerdings durch

das Sexualhormon Progesteron bedingt ist, bedarf weiterer Analysen. Zudem werden die entzündungsfördernden Mediatoren TLR4 und TNF- α im Rückenmark nach Gabe von Progesteron reduziert (88). Tiere mit einer Verletzung des Ischiasnerven, die eine Gabe von 16 mg/kg Progesteron erhielten, entwickelten keine mechanische Allodynie und zeigten eine signifikant geringere Anzahl schmerzhafter Reaktionen auf eine Kältestimulation (89). Somit konnte in einigen Studien bereits dargelegt werden, dass die weiblichen Sexualhormone Östrogen und Progesteron eine schmerzreduzierende Wirkung haben. Dies würde erklären, dass weibliche *Cldn12*-KO Mäuse keine Schmerzen auf mechanische Reize zeigten, männliche Mäuse hingegen auf mechanische Stimulation der Hinterpfote mit Hypersensibilitäten reagierten.

4.4 Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Bei unseren Untersuchungen hatte das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen keine Auswirkung auf die Permeabilität der BNS sowie auf die Expression der TJP. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich jedoch, dass bei den männlichen Versuchstieren sowohl die Expression der TJP als auch die Permeabilität der BNS und der MB verändert waren. Aus diesem Grund soll in weiteren Experimenten untersucht werden, wodurch diese Differenzen bedingt sind. Ein erstes vielversprechendes Ergebnis zeigt, dass die Produktion von SHh bei den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen herunterreguliert ist, bei den weiblichen Mäusen hingegen nicht. Da bereits aus der Literatur bekannt ist, dass SHh ein Zell-Barrieren-Stabilisator ist, kann dies ein Hinweis für die geschlechterspezifischen Unterschiede sein. Allerdings ist es auch denkbar, dass der hormonelle Einfluss der Versuchstiere eine entscheidende Rolle spielt. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wären Folge-Experimente nötig. Bereits 2010 konnten Burek et al. zeigen, dass Östrogen die Expression von *Cldn5* in Hirnendothel und Herzendothel beeinflusst (90). Daher wäre es ebenfalls denkbar, dass Östrogen für die veränderte Expression von TJP im PNS verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, müsste in einem weiteren Versuchsaufbau weiblichen Mäusen in einer Operation das Ovar entfernt werden. Durch die Ovariectomie soll die Östrogenproduktion der Tiere

signifikant gesenkt werden. Im weiteren Verlauf der Experimente kann den Tieren dann eine definierte Menge an Östrogen verabreicht werden und anschließend untersucht werden, wie dies die Expression der TJP im PNS beeinflusst. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, ob in diesem Versuchsaufbau ebenfalls die Bildung von SHh im PNS durch Östrogen dosisabhängig verändert ist. Abschließend lässt sich sagen, dass weitere Versuche nötig sind, um die geschlechterspezifische mechanische Allodynie bei *Cldn12*-KO Mäusen zu erforschen. Sollte sich herausstellen, dass die periphere Barrierefunktion der Tiere durch den Hedgehog-Signalweg beeinflussbar ist, wäre dies ein möglicher Ansatz bei der Therapie neuropathischer Schmerzen. Über die Aktivierung von *smo*, einem Schlüsselschritt des Hedgehog-Signalweges, mit SAG bzw. die Inhibierung dieses Weges durch GDC-0449 (Vismodegib) wäre es möglich die periphere Barrierefunktion therapeutisch zu beeinflussen (91).

5 Zusammenfassung

Die wichtigsten Barrieren im peripheren Nerv sind die MB und die BNS. Sie übernehmen eine bedeutende Aufgabe bei dem Schutz des Nerven vor externen Einflüssen, dem Bewahren der nervalen Homöostase und der Aufrechterhaltung der Nervenleitungsgeschwindigkeit. Eine Öffnung der peripheren Barriere wird oft mit neuropathischen Schmerzen assoziiert. Dabei sind TJP zwischen den benachbarten Endothelzellen des peripheren Nerven für die Barrierefunktion verantwortlich. Zu den in diesem Bereich lokalisierten TJP zählen *Cldn1*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Cldn19*, ZO-1 und *Ocln*.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von *Cldn12* bei männlichen Mäusen mit einer Hypersensitivität auf mechanische Reize verbunden ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass bei diesen Versuchstieren die peripheren Barrieren undicht sind und die mRNA Expression der TJP *Cldn1* und *Cldn19* verringert ist. Bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen wurde allerdings kein verändertes Schmerzverhalten auf mechanische Reize festgestellt (47). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Barrierefunktion des PNS bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen analysiert werden.

Mittels Permeabilitätstest konnte zunächst gezeigt werden, dass das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen die Permeabilität der Perineuralbarriere und der MB nicht beeinflusst. Sowohl bei den WT Mäusen als auch bei den *Cldn12*-KO Mäusen konnte eine intakte Barrierefunktion des peripheren Nerven nachgewiesen werden. Anschließend immunhistologische Untersuchungen, der in diesem Bereich lokalisierten TJP, zeigten auch hier keine Unterschiede zwischen der WT Gruppe und *Cldn12*-KO Gruppe. Weitere Analysen mittels Western Blot und qRT-PCR konnten nachweisen, dass Myelin-spezifische Transkriptionsfaktoren und Proteine sowohl bei weiblichen *Cldn12*-KO Mäusen als auch bei WT Mäusen unverändert exprimiert sind. Zudem beeinflusste das Ausschalten von *Cldn12* bei weiblichen Mäusen nicht die Bildung des Zell-Barrieren-Stabilisators SHh. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Fehlen von *Cldn12* im PNS weiblicher Mäuse die periphere Barrierefunktion der Tiere nicht beeinflusst. Dies erklärt, dass die weiblichen

Versuchstiere im Gegensatz zu den männlichen *Cldn12*-KO Mäusen keine Hypersensitivität auf mechanische Reize entwickeln. Um die Ursache für das geschlechterabhängige Schmerzverhalten der Tiere herauszufinden, bedarf es weiterer Untersuchungen. Erste Ergebnisse lassen vermuten, dass die Produktion des Zell-Barrieren-Stabilisators SHh für die geschlechterspezifische Schmerzwahrnehmung der Tiere mitverantwortlich ist. Um dies zu verifizieren müssen jedoch weitere Analysen durchgeführt werden. Bestätigen sich diese Vermutungen, wäre dies ein möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung und Prävention neuropathischer Schmerzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, and Priestley JV. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 1995;7(7):1484-94.
2. Molliver DC, Radeke MJ, Feinstein SC, and Snider WD. Presence or absence of TrkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. *J Comp Neurol.* 1995;361(3):404-16.
3. Perry MJ, Lawson SN, and Robertson J. Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. *J Neurocytol.* 1991;20(9):746-58.
4. Akert K, Sandri C, Weibel ER, Peper K, and Moor H. The fine structure of the perineural endothelium. *Cell Tissue Res.* 1976;165(3):281-95.
5. Haller FR, and Low FN. The fine structure of the peripheral nerve root sheath in the subarachnoid space in the rat and other laboratory animals. *Am J Anat.* 1971;131(1):1-19.
6. Schünke M, Schulte E, and Schumacher U. *Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie ; 115 Tabellen.* Thieme; 2009.
7. Weerasuriya A, and Mizisin AP. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol.* 2011;686:149-73.
8. Hashimoto M, Ishii K, Nakamura Y, Watabe K, Kohsaka S, and Akazawa C. Neuroprotective effect of sonic hedgehog up-regulated in Schwann cells following sciatic nerve injury. *J Neurochem.* 2008;107(4):918-27.
9. Reina MA, Lopez A, Villanueva MC, de Andres JA, and Leon GI. [Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2000;47(10):464-75.
10. Reina MA, Lopez A, Villanueva MC, De Andres JA, and Maches F. [The blood-nerve barrier in peripheral nerves]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2003;50(2):80-6.
11. Kristensson K, and Olsson Y. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. Differences between mature and immature animals. *Acta Neuropathol.* 1971;17(2):127-38.
12. Reinhold AK, and Rittner HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Pflugers Arch.* 2017;469(1):123-34.
13. Farquhar MG, and Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17:375-412.
14. Staehelin LA, Mukherjee TM, and Williams AW. Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma.* 1969;67(2):165-84.

15. Chalcraft JP, and Bullivant S. An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. *J Cell Biol.* 1970;47(1):49-60.
16. Claude P, and Goodenough DA. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol.* 1973;58(2):390-400.
17. Fromter E, and Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol.* 1972;235(53):9-13.
18. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, and Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 1986;103(3):755-66.
19. Jesaitis LA, and Goodenough DA. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol.* 1994;124(6):949-61.
20. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, and Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.* 1998;141(1):199-208.
21. Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, and Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature.* 1988;333(6170):272-6.
22. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
23. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998;141(2):397-408.
24. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, and Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1998;143(2):391-401.
25. Gunzel D, and Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525-69.
26. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011;585(4):606-12.
27. Thompson PD, Tipney H, Brass A, Noyes H, Kemp S, Naessens J, et al. Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis. *PLoS One.* 2010;5(9).
28. Tsukita S, Furuse M, and Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(4):285-93.

29. Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, et al. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am J Pathol.* 2008;172(4):905-15.
30. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003;161(3):653-60.
31. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):1912-21.
32. Martinez-Palomo A, Erlij D, and Bracho H. Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium. *J Cell Biol.* 1971;50(2):277-87.
33. Whittembury G, and Rawlins FA. Evidence of a paracellular pathway for ion flow in the kidney proximal tubule. Electromicroscopic demonstration of lanthanum precipitate in the tight junction. *Pflugers Arch.* 1971;330(4):302-9.
34. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 2001;153(2):263-72.
35. Zihni C, Mills C, Matter K, and Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2016;17:564.
36. Larre I, Ponce A, Franco M, and Cereijido M. The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:149-56.
37. Yu AS. Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(1):11-9.
38. Yu AS, Cheng MH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, Schneeberger EE, et al. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol.* 2009;133(1):111-27.
39. Lingaraju A, Long TM, Wang Y, Austin JR, 2nd, and Turner JR. Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;42:13-21.
40. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, and Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):264.
41. Yamazaki Y, and Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
42. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, and Andjelkovic AV. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers.* 2016;4(1):e1154641.

43. Moreau N, Dieb W, Mauborgne A, Bourgoïn S, Villanueva L, Pohl M, et al. Hedgehog Pathway-Mediated Vascular Alterations Following Trigeminal Nerve Injury. *J Dent Res*. 2017;96(4):450-7.
44. Moreau N, Mauborgne A, Bourgoïn S, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, et al. Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development. *Pain*. 2016;157(4):827-39.
45. Lim TK, Shi XQ, Martin HC, Huang H, Luheshi G, Rivest S, et al. Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. *Pain*. 2014;155(5):954-67.
46. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 2005;169(3):527-38.
47. Chen JT-C, Hu X, Doppler K, Breitzkreuz-Korff O, Otto IUC, Schwabe J, et al. Claudin-12 deficiency causes nerve barrier breakdown, mechanical hypersensitivity and painful neuropathy. *bioRxiv*. 2019:768267.
48. Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, et al. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release*. 2014;185:88-98.
49. Reinhold AK, Yang S, Chen JT, Hu L, Sauer RS, Krug SM, et al. Tissue plasminogen activator and neuropathy open the blood-nerve barrier with upregulation of microRNA-155-5p in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(6):1160-9.
50. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(17):1945-61.
51. Notterpek L, Roux KJ, Amici SA, Yazdanpour A, Rahner C, and Fletcher BS. Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14404-9.
52. Quintes S, and Brinkmann BG. Transcriptional inhibition in Schwann cell development and nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2017;12(8):1241-6.
53. Moreau N, Mauborgne A, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Villanueva L, et al. Could an endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/beta-catenin and Sonic Hedgehog pathways underlie the early disruption of the infra-orbital blood-nerve barrier following chronic constriction injury? *Mol Pain*. 2017;13:1744806917727625.

54. Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, and Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970;18(5):315-33.
55. DeLellis RA, Sternberger LA, Mann RB, Banks PM, and Nakane PK. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *Am J Clin Pathol.* 1979;71(5):483-8.
56. Pummi KP, Heape AM, Grenman RA, Peltonen JT, and Peltonen SA. Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(8):1037-46.
57. Mullis KB, and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
58. Bell MA, and Weddell AG. A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain.* 1984;107 (Pt 3):871-98.
59. Latker CH, Wadhvani KC, Balbo A, and Rapoport SI. Blood-nerve barrier in the frog during wallerian degeneration: are axons necessary for maintenance of barrier function? *J Comp Neurol.* 1991;308(4):650-64.
60. Uceyler N, Necula G, Wagemann E, Toyka KV, and Sommer C. Endoneurial edema in sural nerve may indicate recent onset inflammatory neuropathy. *Muscle Nerve.* 2016;53(5):705-10.
61. Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, et al. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res.* 2011;36(5):849-55.
62. Kanda T, Numata Y, and Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(5):765-9.
63. Borovac J, Barker RS, Rievaj J, Rasmussen A, Pan W, Wevrick R, et al. Claudin-4 forms a paracellular barrier, revealing the interdependence of claudin expression in the loose epithelial cell culture model opossum kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303(12):C1278-91.
64. Colom B, Poitelon Y, Huang W, Woodfin A, Averill S, Del Carro U, et al. Schwann cell-specific JAM-C-deficient mice reveal novel expression and functions for JAM-C in peripheral nerves. *Faseb j.* 2012;26(3):1064-76.
65. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 13):2363-74.
66. Fuccillo M, Joyner AL, and Fishell G. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(10):772-83.

67. Nagase T, Nagase M, Machida M, and Fujita T. Hedgehog signalling in vascular development. *Angiogenesis*. 2008;11(1):71-7.
68. Kanda S, Mochizuki Y, Suematsu T, Miyata Y, Nomata K, and Kanetake H. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8244-9.
69. Hochman E, Castiel A, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, and Izraeli S. Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling. *J Biol Chem*. 2006;281(45):33860-70.
70. Byrd N, and Grabel L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14(8):308-13.
71. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011;334(6063):1727-31.
72. Brilha S, Ong CWM, Weksler B, Romero N, Couraud PO, and Friedland JS. Author Correction: Matrix metalloproteinase-9 activity and a downregulated Hedgehog pathway impair blood-brain barrier function in an in vitro model of CNS tuberculosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):13956.
73. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, and Wainwright BJ. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene*. 2002;21(53):8196-205.
74. Kameda C, Nakamura M, Tanaka H, Yamasaki A, Kubo M, Tanaka M, et al. Oestrogen receptor-alpha contributes to the regulation of the hedgehog signalling pathway in ERalpha-positive gastric cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(4):738-47.
75. Sekiguchi H, Li M, Jujo K, Renault MA, Thorne T, Clarke T, et al. Estradiol triggers sonic-hedgehog-induced angiogenesis during peripheral nerve regeneration by downregulating hedgehog-interacting protein. *Lab Invest*. 2012;92(4):532-42.
76. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, and Riley JL, 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 2009;10(5):447-85.
77. Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(12):859-66.
78. Riley JL, 3rd, Robinson ME, Wise EA, and Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain*. 1999;81(3):225-35.
79. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. 2015;294(2):63-9.
80. Rosen S, Ham B, and Mogil JS. Sex differences in neuroimmunity and pain. *J Neurosci Res*. 2017;95(1-2):500-8.

81. Smith JA, Das A, Butler JT, Ray SK, and Banik NL. Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death. *Neurochem Res.* 2011;36(9):1587-93.
82. Gilmore W, Weiner LP, and Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol.* 1997;158(1):446-51.
83. Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, and Arevalo MA. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia.* 2010;58(1):93-102.
84. Lewis DK, Johnson AB, Stohlgren S, Harms A, and Sohrabji F. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol.* 2008;195(1-2):47-59.
85. Vacca V, Marinelli S, Pieroni L, Urbani A, Luvisetto S, and Pavone F. 17beta-estradiol counteracts neuropathic pain: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. *Sci Rep.* 2016;6:18980.
86. He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, and Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2004;189(2):404-12.
87. Labombarda F, Gonzalez S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, et al. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2011;231(1):135-46.
88. Garay LI, Gonzalez Deniselle MC, Brocca ME, Lima A, Roig P, and De Nicola AF. Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience.* 2012;226:40-50.
89. Coronel MF, Labombarda F, Roig P, Villar MJ, De Nicola AF, and Gonzalez SL. Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats. *Pain Med.* 2011;12(8):1249-61.
90. Burek M, Arias-Loza PA, Roewer N, and Forster CY. Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):298-304.
91. Guo J, Wang L, Zhang Y, Wu J, Arpag S, Hu B, et al. Abnormal junctions and permeability of myelin in PMP22-deficient nerves. *Ann Neurol.* 2014;75(2):255-65.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau des peripheren Nerven*	2
Abbildung 2:	Aufbau von Claudinen	7
Abbildung 3:	Schemazeichnung des Proteintransfers durch Western Blot	24
Abbildung 4:	Unveränderte Permeabilität des Perineuriums bei weiblichen <i>Cldn12</i> -KO Mäusen.....	32
Abbildung 5:	Das Fehlen von <i>Cldn12</i> wirkt sich nicht auf die TJP Claudin-1 und ZO-1 im Perineurium aus	34
Abbildung 6:	Unveränderte Expression von <i>Occludin</i> bei <i>Cldn12</i> -KO Mäusen.....	35
Abbildung 7:	Keine Divergenzen in der Immunreaktivität von <i>Cldn5</i> in den endoneurialen Kapillaren	36
Abbildung 8:	Intakte Permeabilität der MB im peripheren Nerv	37
Abbildung 9:	Ähnliches Verteilungsmuster und Immunreaktivität von <i>Cldn19</i> bei WT Mäusen und <i>Cldn12</i> -KO Mäusen	38
Abbildung 10:	Unveränderte mRNA Expression Myelin-spezifischer Proteine und für die Schwannzell Entwicklung wichtiger Transkriptionsfaktoren durch das Ausschalten von <i>Cldn12</i> bei weiblichen Mäusen	39
Abbildung 11:	Keine Auswirkung des Ausschaltens von <i>Cldn12</i> auf die Bildung von SHh im Ischiasnerv	40
Abbildung 12:	Unveränderte neuronale Zusammensetzung des Spinalganglions bei männlichen <i>Cldn12</i> -KO Mäusen	42
Abbildung 13:	Geschlechterspezifisches Schmerzverhalten und Barrierefunktion bei <i>Cldn12</i> -KO Mäusen	45

* Abdruckgenehmigung wurde eingeholt

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung Lysepuffer.....	12
Tabelle 2:	Mastermix zur Genotypisierung von WT Mäusen und <i>Cldn12</i> -KO Mäusen	13
Tabelle 3:	Zusammensetzung TAE	13
Tabelle 4:	Zusammensetzung Blockierlösung	15
Tabelle 5:	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF).....	17
Tabelle 6:	Quantifizierung der Tight Junction Proteine.....	18
Tabelle 7:	Quantifizierung des Permeabilitätstests.....	19
Tabelle 8:	Mastermix SYBRGreen	20
Tabelle 9:	Mastermix TaqMan	20
Tabelle 10:	Einstellung Versuchsparameter qRT-PCR	21
Tabelle 11:	Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel	23
Tabelle 12:	Zusammensetzung Elektrophoresepuffer	24
Tabelle 13:	Zusammensetzung Towbin-Tankblottpuffer.....	25
Tabelle 14:	Zusammensetzung PBS-Tween 0,1%	26
Tabelle 15:	Zusammensetzung der Blockierlösung.....	26
Tabelle 16:	Zusammensetzung ECL	26
Tabelle 17:	Chemikalien	27
Tabelle 18:	Primärantikörper	29
Tabelle 19:	Sekundärantikörper	29
Tabelle 20:	Primer	29
Tabelle 21:	TaqMan-Proben.....	30
Tabelle 22:	Materialien	30
Tabelle 23:	Geräte.....	31
Tabelle 24:	Softwareprogramme	31

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aCSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNS	Blut-Nerven-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CCI	Chronic constriction injury
CIDP	Chronisch entzündliche demyelinisierende Polyradiculoneuropathie
Cldn	Claudin
Crb3	Crumbs Protein Homolog 3
C _T	Schwellenwert-Zyklus
CTCF	korrigierte totale Fluoreszenz
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBA	Evans-Blue Albumin
ECL	Extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
IB4	Isolectin B4
IL	Interleukin
IntDen	Intensitätsdichte
JAM	Junctional Adhäsion Molecular
KO	Knock-out
MB	Myelin-Barriere
MBP	Myelin basisches Protein
MMP	Matrix-Metalloprotease
NF200	Nitrofilament 200
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd

Abkürzung	Bedeutung
PMP22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	Peripheres Nervensystem
Ptch-1	Rezeptor Tached
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RQ	Expressionsunterschied
SDS	Natriumlaurylsulfat
SHh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAMP	Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine
TJ	Tight-Junction
TJP	Tight-Junction-Proteine
TLR	Toll-like Rezeptoren
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens 1

10 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Chen JT-C, Hu X, Doppler K, Breitzkreuz-Korff O, **Otto IUC**, Schwabe J, et al. Claudin-12 deficiency causes nerve barrier breakdown, mechanical hypersensitivity and painful neuropathy. *bioRxiv*. 2019:768267.

Danksagung

Frau Professor Heike Rittner gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte fachliche Beratung und Unterstützung, durch die ich viele positive Erkenntnisse im Bereich der experimentellen Forschung gewinnen konnte.

Frau Professor Kathleen Wermke danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens. In dem von ihr geleiteten Doktorandenseminar hat sie mir die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jeremy Chen für die Einarbeitung in die Methodik und die Betreuung im Labor. Zudem möchte ich Ihm für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen praktischen Fragen sowie für die Entnahme der Gewebeproben danken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe molekulare Schmerzforschung, die mich während meiner Dissertation begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Annemarie Aue für ihre freundlichen und sachkundigen Ratschläge.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir mein Studium und die Promotion ermöglicht haben und mich in meinen Plänen stets unterstützt haben.