



**Expressionsprofil der Tight-Junction-Proteine
bei Streptozocin-induzierter Polyneuropathie
bei Ratten**

**Expression profile of tight junction proteins
in streptozocin-induced polyneuropathy
in rats**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Carla Norwig

aus

Berlin

Würzburg 2021



Eingereicht am:.....

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

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

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini

3. Betreuerin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

4. Betreuerin: Dr. rer. nat. Reine-Solange Sauer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
I Einleitung.....	1
I.1 Diabetische Polyneuropathie.....	1
I.1.1 Risikofaktoren und Behandlung.....	2
I.1.2 Mechanismen der (schmerzhaften) DPN	3
I.1.3 Tiermodelle.....	4
I.2 Blut-Nerven-Barriere (BNB).....	7
I.2.1 Tight Junctions.....	8
I.2.2 Tight-Junction-Proteine	8
I.3 Veränderungen der BNB bei Neuropathie.....	10
I.3.1 Posttraumatischer neuropathischer Schmerz in Tiermodellen	10
I.3.2 Diabetische Polyneuropathie.....	10
I.4 Ziele und Fragestellungen.....	12
II Material und Methoden.....	13
II.1 Versuchstiere	13
II.1.1 Behandlung.....	13
II.1.2 Gewebeaufarbeitung.....	13
II.2 Geräte und Reagenzien	14
II.3 Permeabilitätstests der BNB.....	17
II.3.1 Gewebeaufarbeitung für Permeabilitätstests.....	17
II.3.2 Mikroskopische Bilderfassung.....	17
II.3.3 Quantitative Analyse	18
II.4 Immunhistochemie.....	19
II.4.1 Färbung	20
II.4.2 Mikroskopische Bilderfassung.....	20
II.5 mRNA-Expression.....	20
II.5.1 RNA-Extraktion	21
II.5.2 Reverse Transkription.....	22
II.5.3 Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)	23
II.5.4 Auswertung der RTQ-PCR.....	23
II.6 Lasermikrodissektion.....	23
II.6.1 Gewebeaufarbeitung.....	24
II.6.2 Durchführung der Lasermikrodissektion	25
II.6.3 RNA-Extraktion und reverse Transkription	26
II.6.4 RTQ-PCR.....	26
II.7 Statistische Auswertung.....	27

II.8	Software	27
III	Ergebnisse	28
III.1	Unveränderte Barrierefunktion der BNB für Makromoleküle bei STZ-induzierter diabetischer Polyneuropathie	28
III.2	Erhöhte Permeabilität der BNB für niedermolekulare Verbindung Fluorescein-Natrium.....	31
III.3	Keine verstärkte Infiltration CD68-positiver Zellen in Nervi ischiadici	34
III.4	Unveränderte Expression der Tight-Junction-Proteine in N. ischiadicus, DRG und SPC	35
III.5	Verminderte Expression von Cldn1 im Perineurium acht Wochen nach STZ-Gabe.....	35
IV	Diskussion	38
IV.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	38
IV.2	Methodendiskussion.....	39
IV.2.1	Permeabilitätstests.....	39
IV.2.2	mRNA-Expression.....	40
IV.2.3	LMD zur selektiven Analyse einzelner Kompartimente.....	41
IV.3	Ergebnisdiskussion.....	42
IV.3.1	Öffnung der BNB für niedermolekulare Verbindungen	42
IV.3.2	Neuroinflammation	44
IV.3.3	Relevanz der Tight-Junction-Proteine.....	45
IV.3.4	Möglichkeiten einer Modulation der Barrierefunktion.....	48
IV.3.5	Einfluss der Barriereöffnung auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen im Tiermodell	49
IV.4	Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen.....	49
IV.5	Fazit und Ausblick.....	50
V	Zusammenfassung	52
VI	Summary	53
Verzeichnisse		54
Literaturverzeichnis.....		54
Abbildungsverzeichnis		61
Tabellenverzeichnis.....		62
Danksagung.....		63
Publikation		64
Lebenslauf.....		65
Eidesstattliche Erklärung.....		66

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced Glycation Endproduct
AK	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
Cldn	Claudin
C _T	Grenzwert-Zyklus
DEPC	Diethyldicarbonat
DPN	Diabetische Polyneuropathie
DRG	Spinalganglion (dorsal root ganglion)
EBA	Evans blue Albumin
FI	Fluoreszenzintensität
HbA1c	Hämoglobin A1c
JAM-C	Junctional Adhesion Molecule C
KO	Gen-Knockout
LMD	Laser-Mikrodissektor
MARVEL	MAL [myelin and lymphocyte] and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
mRNA	Messenger-RNA
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus
Nn. ischiadici	Nervi ischiadici
Ocln	Occludin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDPN	Schmerzhafte diabetische Polyneuropathie
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RAGE	Receptor for AGE
ROI	Region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
RQ	Relatives Maß der Expression (relative quantification)
RT	Reverse Transkriptase
RTQ-PCR	Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion
SPC	Rückenmark (spinal cord)
STZ	Streptozotocin/Streptozocin (2-Desoxy-2-(3-methyl-3-nitroso-ureido)-D-glucoopyranose)
T1DM	Typ-I-Diabetes mellitus

T2DM	Typ-II-Diabetes mellitus
TAMP	Tight Junction assoziierte MARVEL-Proteine
<i>Tjp1/ZO-1</i>	Tight junction protein-1/Zonula occludens-1
Tric	Tricellulin
Vehicle	Trägersubstanz-/Lösungsmittelkontrolle (vehicle control)
vWF/ <i>Vwf</i>	Von-Willebrand-Faktor
Wo.	Woche
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1/ <i>Tjp1</i>	Zonula occludens-1/Tight junction protein-1

I Einleitung

I.1 Diabetische Polyneuropathie

463 Millionen Erwachsene weltweit waren im Jahr 2019 von Diabetes mellitus betroffen. Im Jahr 2045 wird diese Zahl bis auf 700 Millionen ansteigen (International Diabetes Federation, 2020). Unter den Begriff Diabetes mellitus fallen verschiedene metabolische Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine chronische Hyperglykämie ist.

Im Rahmen eines Typ-I-Diabetes mellitus (T1DM) führt eine meist immun-vermittelte Destruktion der pankreatischen β -Zellen zu einem absoluten Insulin-Mangel. Typ-II-Diabetes mellitus (T2DM) ist anfänglich von Insulinresistenz geprägt und führt erst im weiteren Krankheitsverlauf zum Ausfall der Insulinsekretion bei fortbestehender Insulinresistenz. T2DM ist mit dem metabolischen Syndrom eng assoziiert (Petersmann et al., 2019).

Die häufigste Komplikation bei Diabetes ist eine Neuropathie (Pop-Busui et al., 2017). Neuropathie ist definiert als eine Minderung der Funktion oder eine pathologische Veränderung peripherer Nerven (IASP, 2017). Diabetische Neuropathien lassen sich in drei Klassen einteilen: 1. diffuse Neuropathien (distal-symmetrische Polyneuropathie und autonome Neuropathie), 2. Mononeuropathien und 3. (Poly-)Radikulopathien (Pop-Busui et al., 2017). Die häufigste Form ist dabei die distal-symmetrische Polyneuropathie (DPN).

Klinische Zeichen der distal-symmetrischen DPN sind Sensibilitätsausfälle, Parästhesien, neuropathische Schmerzen und/oder muskuläre Schwäche. Betroffen sind vorwiegend die distalen Extremitäten. Sensibilitätsausfälle stehen im Vordergrund, wohingegen motorische Beeinträchtigungen seltener und im späteren Krankheitsverlauf auftreten (Callaghan et al., 2012a). Die Prävalenz in großen Studien beträgt ca. 28 % bezogen auf alle Patienten mit Diabetes (Tesfaye et al., 1996; Young et al., 1993) mit Streuungen zwischen 11 % (Wu et al., 2007) und 43 % (Barbosa et al., 2019; Van Acker et al., 2009).

Bei 21 % aller Patienten mit Diabetes mellitus tritt eine schmerzhaft Form der DPN auf (Abbott et al., 2011). Hierbei handelt es sich um neuropathischen Schmerz, der durch eine pathologische Veränderung oder eine Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems - in diesem Falle eine DPN- hervorgerufen wurde (IASP, 2017).

Paradoxerweise können Minussymptome (Sensibilitätsausfälle) und Plusssymptome (neuropathische Schmerzen) gemeinsam auftreten. Typische Schmerzcharakteristika sind dabei: spontan auftretend, brennend, elektrisch oder pochend. Auch Schmerz durch normalerweise nicht-schmerzhaft Reize (Allodynie) oder eine verstärkte Schmerzwahrnehmung (Hyperalgesie) sind typisch (Callaghan et al., 2012a). Neuropathische Schmerzen üben einen schwerwiegenden Effekt auf die Lebensqualität Betroffener aus und werden häufig unzureichend behandelt (Van Acker et al., 2009).

I.1.1 Risikofaktoren und Behandlung

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer DPN bei T1DM werden die Dauer des Diabetes mellitus und die Höhe des HbA1c-Wertes angegeben (Barbosa et al., 2019; Tesfaye et al., 2005). Bei T2DM stehen u. a. Faktoren des metabolischen Syndroms wie Adipositas und Dyslipidämie als Risikofaktoren im Vordergrund (Andersen et al., 2018). Eine optimale Blutglukoseeinstellung senkt bei Patienten mit T1DM die Wahrscheinlichkeit einer DPN. Die Datenlage für Patienten mit T2DM ist uneindeutig (Callaghan et al., 2012b; Nawroth et al., 2017). Hieraus wird gefolgert zwei Krankheitsentitäten zu unterscheiden.

Risikofaktoren für das Auftreten einer schmerzhaften Form der DPN sind ein weibliches Geschlecht, die Schwere der Neuropathie und thermale Hyposensibilität (Raputova et al., 2017) bzw. Hyposensibilität allgemein (Themistocleous et al., 2016). Zum Einfluss einer intensivierten Blutglukosekontrolle sowie der Zeit seit Erkrankungsbeginn auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen finden sich abweichende Angaben (Raputova et al., 2017; Themistocleous et al., 2016). Neuropathische Schmerzen können bereits vor Diagnosestellung eines Diabetes mellitus im Stadium der pathologischen Glukosetoleranz auftreten (Ziegler et al., 2009).

Die Behandlung der diabetischen Neuropathie beschränkt sich derzeit auf eine optimierte Blutglukoseeinstellung (besonders bei Patienten mit T1DM), Lebensstilmodifikationen (besonders bei Patienten mit T2DM) und eine symptomatische Behandlung neuropathischer Schmerzen (Feldman et al., 2019). Lediglich Alpha-Liponsäure und Benfotiamin sind als kausale Medikamente in einigen Ländern zugelassen. Daten zur Langzeitanwendung fehlen jedoch. Eine Verhinderung des Krankheitsfortschrittes konnte bislang nicht gezeigt werden (Ziegler et al., 2021).

I.1.2 Mechanismen der (schmerzhaften) DPN

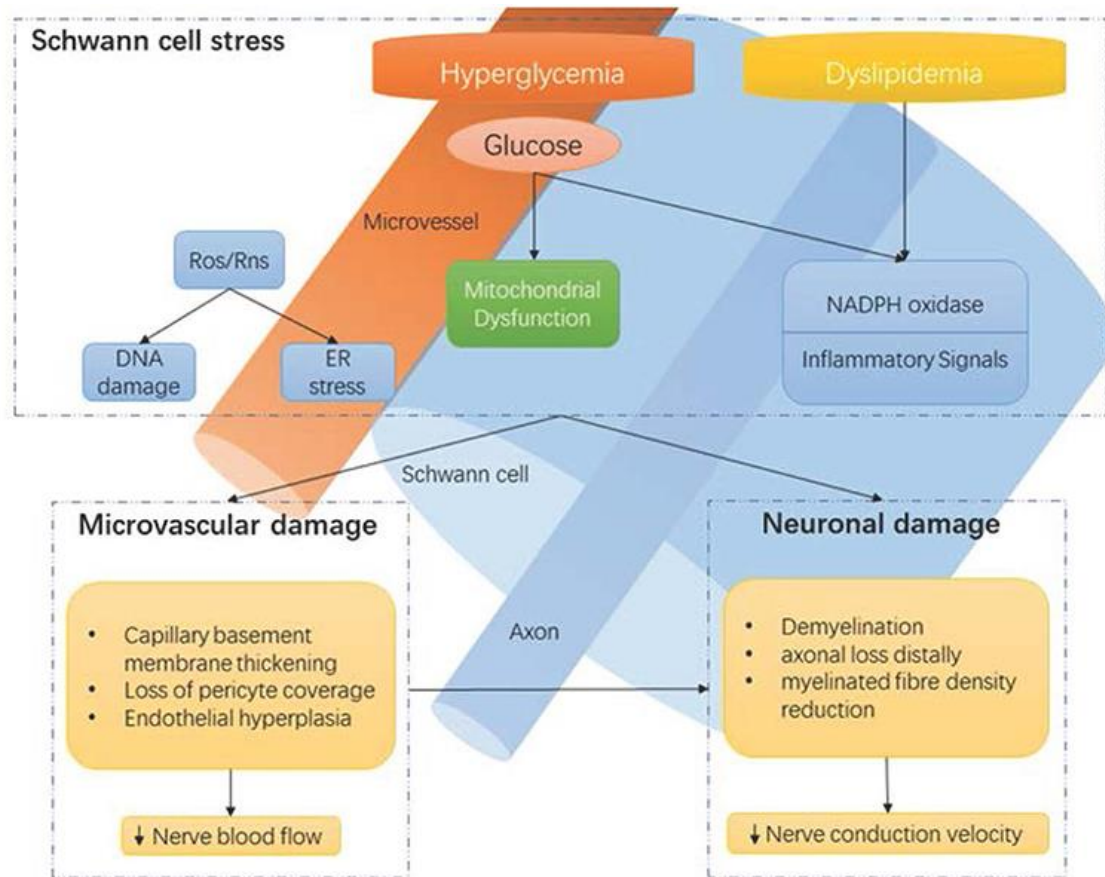


Abbildung 1: Pathomechanismen der DPN (Yang et al., 2020)

Eine direkte Schädigung der Neuronen entsteht durch metabolische Prozesse, die durch eine chronische Hyperglykämie ausgelöst werden. Indirekte Schädigung treffen Neurone durch pathologische Veränderungen der Gefäße und der Schwann-Zellen. ER – endoplasmatisches Retikulum, NADPH - Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, Rns – reaktive Stickstoffverbindungen, Ros - reaktive Sauerstoffverbindungen. Verwendung der Abbildung gemäß Creative Commons BY 4.0-Lizenz.

Die Pathogenese der DPN ist multifaktoriell. Metabolische, entzündliche und mikrovasculäre Prozesse spielen eine Rolle (siehe Abbildung 1) (Albers and Pop-Busui, 2014; Feldman et al., 2019; Richner et al., 2018; Yang et al., 2020).

Metabolische Änderungen betreffen den Polyolweg, die Hexosamin-Biosynthese sowie Signalwege, die durch Advanced Glycation Endproducts ausgelöst werden (Feldman et al., 2017). Entzündliche Signalwege werden zum einen durch die Aktivierung des Rezeptors für AGE (RAGE) durch glykierte Aminosäuren hervorgerufen. Zum anderen aktivieren freie Fettsäuren die systemische Freisetzung inflammatorischer Zytokine (Callaghan et al., 2012a). Diesen Mechanismen kommt insbesondere bei T2DM eine Bedeutung zu. Zu den mikroangiopathischen Veränderungen

endoneuraler Gefäße zählen eine Verdickung der Basalmembran (Powell et al., 1985) und die Degeneration von Perizyten (Giannini and Dyck, 1994).

Ob Schädigungen zuerst periphere Axone, die sie umgebenden Schwann-Zellen oder in den Spinalganglien liegende Perikaryen sensibler Neurone treffen, ist nicht abschließend geklärt (Feldman et al., 2019; Nawroth et al., 2017). Betroffen sind zu meist gleichermaßen A β -, A δ - und C-Fasern. Eine selektive Beteiligung der A β - oder C-Fasern im Rahmen Large- bzw. Small-Fiber-Neuropathie ist selten (Galosi et al., 2021).

Die Schmerzentstehung unterliegt einem komplexen Zusammenspiel aus Gen- und Umweltfaktoren. Zentrale und periphere Prozesse sind gleichermaßen beteiligt. Mechanismen sind z. B. eine Übererregbarkeit afferenter Neurone, eine Abschwächung der deszendierender Schmerzhemmung sowie Veränderungen der Schmerzverarbeitung im zentralen Nervensystem (Feldman et al., 2019). Übererregbarkeit peripherer Nozizeptoren kann durch Veränderungen spannungsabhängiger Natriumkanäle hervorgerufen werden. So werden genetisch seltene Nav 1.7-Varianten überproportional häufig in einer Gruppe von Patienten mit schmerzhafter DPN nachgewiesen (Blesneac et al., 2017). Auch der Glukosemetabolit Methylglyoxal führt über eine posttranslationale Modifikation von Nav 1.8 zur Übererregbarkeit peripherer Neurone (Bierhaus et al., 2012). Dies klärt die Pathogenese anteilsweise, da lediglich ein kleiner Teil der Patienten mit schmerzhafter DPN einen klinischen Phänotyp aufweist, der mit einer Übererregbarkeit sensibler peripherer Neurone in Verbindung gebracht werden kann (genannt „irritable nociceptor“-Profil) (Raputova et al., 2017). Ob zentrale Mechanismen, wie die Abschwächung deszendierender Schmerzhemmung und Veränderungen der Schmerzverarbeitung im Thalamus, eine Reaktion auf peripher ausgelöste Schmerzen oder primär für die Schmerzentstehung verantwortlich sind, ist noch unklar (Shillo et al., 2019).

In Abwesenheit kausaler Therapiemöglichkeiten bleibt Forschung auf dem Gebiet der schmerzhaften diabetischen Polyneuropathie hochgradig relevant. Das komplexe Zusammenspiel von peripheren und zentralen Mechanismen, sowie die Auswirkung von genetischen Varianten und metabolischen Faktoren lassen viele Fragen zu pathophysiologischen Abläufen offen.

I.1.3 Tiermodelle

Tiermodelle für Diabetes mellitus lassen sich nach Tierspezies, Erkrankungstyp (T1DM oder T2DM), Krankheitsinduktion (medikamentös, operativ, genetisch, etc.)

und abgebildeten Krankheitskomplikationen unterteilen. Diabetes mellitus bei Nagern wird über einen Blutglukosespiegel größer als 270 mg/dl bzw. 15 mM/l definiert. Diabetische Neuropathie liegt definitionsgemäß vor, wenn zwei von drei der folgenden Faktoren verändert sind: 1. Verhalten, das auf Sensibilitätsverluste oder Schmerzen hindeutet, 2. Leitfähigkeitsmessungen der sensiblen oder motorischen Nerven, 3. strukturelle Untersuchungen der Nerven (z.B. eine verminderte Dichte intraepithelialer Nervenfasern) (Biessels et al., 2014).

T1DM lässt sich experimentell durch die intraperitoneale oder intravenöse Gabe von Alloxan oder Streptozocin/Streptozotocin (STZ) induzieren. Durch ihre chemische Ähnlichkeit zu Glukose werden die Stoffe in β -Zellen des Pankreas aufgenommen und führen hier zu einer Zellschädigung. Ein absoluter Insulinmangel mit konsekutiver Hyperglykämie resultiert. Bei der Verwendung von STZ stehen zwei verschiedene Regime zur Auswahl. Werden an mehreren Tagen hintereinander kleinere Dosen des Stoffes appliziert, entsteht eine Autoimmunpankreatitis; eine Einmalgabe einer größeren Dosis führt zur rascheren Destruktion der β -Zellen (King, 2012).

In Modellen für T2DM wird die starke Assoziation zum metabolischen Syndrom genutzt. So kann T2DM zum einen durch eine hochkalorische, stark fetthaltige Fütterung ausgelöst werden. Monogenetische Modelle weisen einen Mangel des Sättigungshormons Leptin oder eine Leptinrezeptor-Defizienz auf, die wiederum zur Entstehung einer Adipositas führen (Lep-Maus, „Zucker fatty diabetic“-Ratte).

Die STZ-Gabe ist ein etabliertes Verfahren zur Induktion einer schmerzhaften DPN. Wenige Tage nach STZ-Gabe tritt eine Hyperglykämie auf, zwei Wochen danach eine mechanische Hyperalgesie als messbares Korrelat neuropathischer Schmerzen (siehe Abbildung 2). Das Schmerzverhalten der STZ-Tiere unterliegt zwei Phasen. In den ersten Wochen zeigen die Tiere eine Hypersensibilität bei mechanischen und thermischen Stimuli, gefolgt von einer Hyposensibilität im weiteren Krankheitsverlauf (Agarwal et al., 2018). Veränderungen der Nervenleitgeschwindigkeit können bereits zwei bis vier Wochen nach Diabetesinduktion festgestellt werden. Leichte strukturelle Änderungen der Nerven treten nach acht bis sechzehn Wochen auf (Biessels et al., 2014).

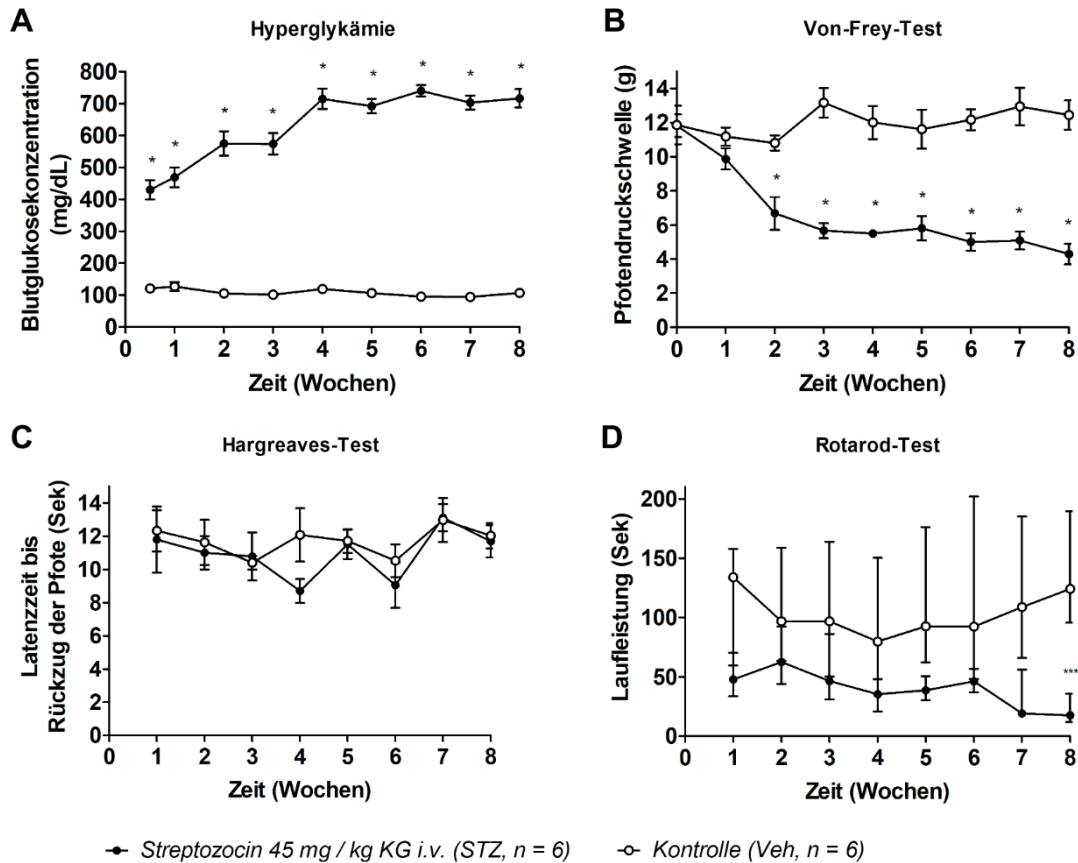


Abbildung 2: Hyperglykämie und Schmerzverhalten im STZ-Modell (Ben-Kraiem et al., 2021).

(A) Blutglukosekonzentration im zeitlichen Verlauf. Bereits nach drei Tagen wiesen Tiere der STZ-Gruppe eine signifikante Hyperglykämie auf. (B) Mechanische Hyperalgesie (von-Frey-Test) im frühen Krankheitsverlauf (C) Thermische Sensibilität (Hargreaves Test) (D) Verminderte motorische Aktivität im Rotarod-Test im späteren Krankheitsverlauf. Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posthoc-Test (A-C), Friedman-Test mit Dunn's Posthoc-Test (D). n = 6. * = p < 0,05. (Ben-Kraiem et al., 2021)

I.2 Blut-Nerven-Barriere (BNB)

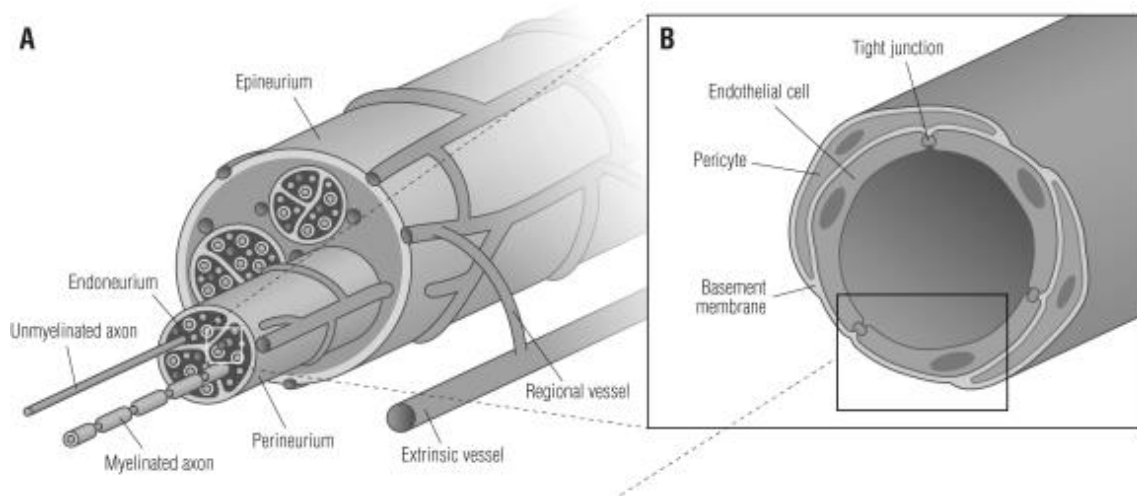


Abbildung 3: Blut-Nerven-Barriere (Richner et al., 2018)

(A) Schematischer Querschnitt durch einen peripheren Nerv, der von Epineurium umhüllt wird. Einzelne Nervenfaszikel werden von Perineurium umgeben. Im Endoneurium liegen myelinisierte und nicht-myelinisierte Axone. (B) Endoneurale Kapillare im schematischen Querschnitt. Endothelzellen werden von Perizyten und einer gemeinsamen Basalmembran umhüllt. Tight Junctions dichten das Lumen gegenüber dem Endoneurium ab. Bildausschnitt in Graustufen. Verwendung der Abbildung gemäß Creative Commons BY 4.0-Lizenz.

Nerven werden von zwei Hüllstrukturen, dem Epi- und Perineurium, umgeben (siehe Abbildung 3). Als Fortsetzung der Dura mater umgibt das Epineurium mono- und multifaszikuläre Nerven. Einzelne Nervenfaszikel werden von Perineurium umhüllt. Das Perineurium setzt sich aus einer äußeren Schicht (pars fibrosa), die mechanische Stützeigenschaften hat, sowie einer inneren Schicht (pars epitheloidea) zusammen. Die pars epitheloidea besteht aus kreisförmig angeordneten Perineuralzellen, die jeweils von einer Basallamina und Kollagenfibrillen getrennt werden. Als Endoneurium wird das Bindegewebe innerhalb des Perineuriums bezeichnet. Im endoneuralen Raum liegen myelinisierte und unmyelinisierte Axone, ihre begleitenden Schwann-Zellen sowie Gefäße (Lüllmann-Rauch, 2009; Reinhold and Rittner, 2017).

Für eine ungestörte Funktion der Nerven ist ein eng reguliertes Milieu erforderlich. Dieses wird von der Blut-Nerven-Barriere (BNB) aufrechterhalten. Die BNB setzt sich strukturell aus dem Perineurium (pars epitheloidea) und den endoneuralen Endothelzellen zusammen (Reinhold and Rittner, 2017). Durch Tight Junctions zwischen Perineuralzellen (Burkel, 1967) und zwischen endoneuralen Endothelzellen (Reinhold and Rittner, 2017) wird der parazelluläre Transport beschränkt. Auch die transzelluläre Transportrate ist in endoneuralen Endothelzellen im Vergleich zu epineuralen Endothelzellen stark reduziert. Darüber hinaus sind Gefäß-assoziierte

Makrophagen an der Aufrechterhaltung des endoneuralen Milieus beteiligt, in dem sie in das Endoneurium ausgetretenes Material in zweiter Instanz aufnehmen (Malong et al., 2019).

I.2.1 Tight Junctions

Tight Junctions sind apikale Bestandteile epithelialer Junktionskomplexe. Sie bilden gürtelförmige Zell-Zell-Kontakte. Die parazelluläre Passage (sogenannte „gate“-Funktion) wird durch sie maßgeblich beeinflusst. Sie erhalten zudem die apikobasale Orientierung der Zellen aufrecht („fence“-Funktion) (Zihni et al., 2016). Tight Junctions setzen sich aus Tight-Junction-Proteinen zusammen. Diese transmembranösen Proteine interagieren zum einen mit Tight-Junction-Proteinen benachbarter Zellen und stellen andererseits den Kontakt zum zelleigenen Aktin-Zytoskelett her.

I.2.2 Tight-Junction-Proteine

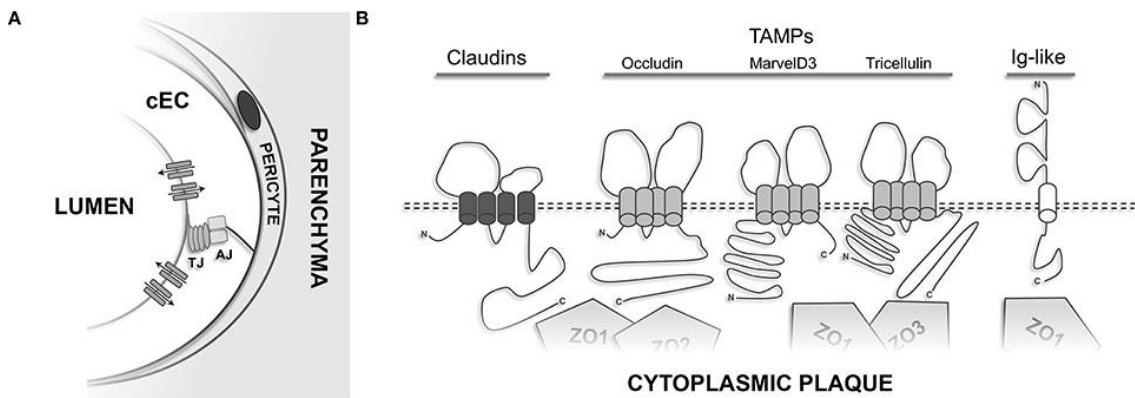


Abbildung 4: Transmembranäre Proteine der Tight Junctions (Bauer et al., 2014)

(A) Apikale Lage der Tight Junctions (TJ) innerhalb des Junktionskomplexes zwischen Endothelzellen (EC), Adhärenz Junction (AJ) (B) Schematische Darstellung der Klassen der Tight-Junction-Proteine. Verwendung der Abbildung gemäß Creative Commons BY 4.0-Lizenz.

Tight-Junction-Proteine lassen sich in mehrere Klassen einteilen (siehe Abbildung 4). Die größte Klasse bilden die vier Transmembrandomänen umfassenden Claudine (22-25 kDa). Claudine (Cldn) bestimmen den Grad der Durchlässigkeit von Endothelien und Epithelien wesentlich. Sie können nach ihren Permeabilitätseigenschaften in eine abdichtende und in eine porenformende Gruppe eingeteilt werden. Für die Ausbildung parazellulärer Poren sind extrazelluläre Schleifen der Proteine verantwortlich. Eine Anionenselektivität der Poren wird durch Cldn7, Cldn10a und Cldn17 hervorgerufen. Cldn2, Cldn10b und Cldn15 erzeugen eine Kationenselektivität. Vorwiegend abdichtende Eigenschaften haben die Cldn1, Cldn3, Cldn5 und

Cldn19. Intrazelluläre PDZ-Domänen ermöglichen eine Verankerung vieler Claudine mit zytoplasmatischen Tight-Junction-Proteinen (z. B. ZO-1). (Günzel and Yu, 2013). Ebenfalls vier Transmembrandomänen weist eine neu charakterisierte Gruppe der Tight-Junction-Proteine auf: TAMP (Tight Junction assoziierte MARVEL-Proteine). Sie besitzen eine MARVEL-Domäne (MAL [myelin and lymphocyte] and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) (Schulzke et al., 2012). Zu dieser Gruppe gehören Occludin (Ocln), Tricellulin (Tric) und MARVELD3. Ocln und Tric weisen eine wechselseitige funktionelle Redundanz in bizellulären Tight Junctions auf und sind am Aufbau trizellulärer Tight Junctions beteiligt (Krug et al., 2014). Sie bestimmen die Durchlässigkeit für Makromoleküle (Krug et al., 2014).

Junktionale Adhäsionsmoleküle (JAM), der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) und Anguline gehören zu den einfach membranspannenden Tight-Junction-Proteine. Ihnen ist eine Immunglobulin-ähnliche Domäne gemeinsam (Zihni et al., 2016). Diese Klasse scheint eher für den Aufbau der Tight-Junction-Stränge als für die unmittelbaren Permeabilitätseigenschaften der Tight Junctions verantwortlich zu sein (Schulzke et al., 2012).

An der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction konzentrieren sich Membrane-associated guanylate kinase-like homologues (MAGUKs). Zu ihnen gehören die Proteine ZO-1 (als Gen *Tight junction protein-1/Tjp1*), -2, und -3. Sie stellen eine Verbindung zwischen Claudinen, Ocln und dem Aktin-Zytoskelett her (Itoh et al., 1999). Wird in dieser Arbeit von Tight-Junction-Proteinen gesprochen, so schließt dies auch das zytoplasmatische Protein ZO-1 ein.

Die Zusammensetzung der Tight Junctions unterscheidet sich je nach Gewebe. Im Perineurium kommen Cldn1, Cldn3, Cldn19, Ocln, Tric und ZO-1 vor (Reinhold and Rittner, 2017). Cldn3 lässt sich jedoch nicht im Perineurium von Ratten nachweisen (Sauer et al., 2014). Endoneurale Endothelzellen weisen Cldn5, Ocln und ZO-1 auf (Reinhold and Rittner, 2017). JAM-C (als Gen *Jam3*) wird von Endothelzellen sowie in paranodalen Regionen von Schwannzellen exprimiert (Scheiermann et al., 2007). Cldn12 und Cldn19 sind Bestandteile der Myelinbarriere peripherer Nerven (Chen et al., 2019).

Zusammenfassend sind Cldn1, Cldn5, Cldn12, Cldn19, Ocln, JAM-C, Tric und ZO-1 essenzielle Bestandteile der BNB. Sie stehen im Fokus dieser Arbeit.

I.3 Veränderungen der BNB bei Neuropathie

I.3.1 Posttraumatischer neuropathischer Schmerz in Tiermodellen

Periphere Nervenläsionen zur Modellierung neuropathischer Schmerzen gehen mit einer raschen Öffnung der BNB für groß- und niedermolekulare Stoffe einher (Lim et al., 2014; Moreau et al., 2016). Die Öffnung korreliert mit einer Herabregulation (Lim et al., 2014; Moreau et al., 2016) und einer intrazellulären Umverteilung bzw. Internalisierung (Reinhold et al., 2018) abdichtender Tight-Junction-Proteine in der BNB. Es kommt zur vermehrten Einwanderung zirkulierender Makrophagen (Lim et al., 2014) und in geringerem Maße auch von Lymphozyten (Moreau et al., 2016).

Periphere Nervenverletzungen wirken sich darüber hinaus auf das ZNS aus. Sie führen zu einer Öffnung der Blut-Rückenmarks-Barriere in korrespondierenden Segmenten, die mit einer Herabregulation verschiedener Tight-Junction-Proteine korreliert (Echeverry et al., 2011; Sauer et al., 2017).

Nach peripherer Nervenverletzung werden proinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-1 β und TNF- α lokal vermehrt exprimiert (Lim et al., 2014; Okamoto et al., 2001). Etwas verzögert kommt es zu einem systemischen Anstieg der Zytokine (Wells et al., 1992). Wird Serum von Tieren mit traumatischer Nervenläsion gesunden Tieren intraneural injiziert, resultiert eine mechanische Allodynie (Lim et al., 2014). Eine alleinige Öffnung der BNB beispielsweise durch rtPA oder Cldn1-Peptidomimetics hingegen führt nicht zur Änderung der Schmerzschwelle (Reinhold et al., 2019; Sauer et al., 2014). Es lässt sich schlussfolgern, dass eine Öffnung der BNB in Kombination mit einem zweiten Ereignis, wie z.B. dem Eindringen inflammatorischer Substanzen, Immunzellen oder anderer algetischer Substanzen aus der Blutzirkulation neuropathische Schmerzen auslösen kann.

I.3.2 Diabetische Polyneuropathie

Strukturelle Auffälligkeiten der BNB bei Patienten mit DPN sind seit langem bekannt. Es kommt zu einer Verdickung der Basalmembran der endoneuralen Kapillaren sowie des Perineuriums (Powell et al., 1985). Begleitet wird dies von einer Degeneration der Perizyten (Giannini and Dyck, 1994). Auch die Mikrostruktur der Tight Junctions des Perineuriums ist pathologisch verändert (Beamish et al., 1991). Hinweise auf eine funktionelle Beeinträchtigung der BNB geben der gesteigerte endoneurale Gehalt an Albumin, IgG und IgM in Nervus-suralis-Biopsien von Patienten mit Diabetes (Poduslo et al., 1988). MRT-Untersuchungen des Nervus suralis belegen zudem ein endoneurales Ödem auf Sprunggelenkhöhe (Eaton et al., 1996).

Diese strukturellen und funktionellen Beeinträchtigungen der BNB waren Anlass für weiterreichende Untersuchungen im Tiermodell.

Hierzu werden Testsubstanzen mit einem Molekulargewicht von 12 – 70 kDa (Cytochrom c, Meerrettichperoxidase, Evans blue Albumin (EBA), radioaktiv markiertes Albumin) je nach Studie intravenös injiziert bzw. perineural appliziert. Die BNB zeigt sich für makromolekulare Substanzen intakt im STZ-Modell (Jakobsen et al., 1978; Kihara et al., 1991; Sima and Robertson, 1978), im Alloxan-Rattenmodell und im Mausmodell *Lepr^{db}* (Sima and Robertson, 1978), sowie nach Galaktose-Intoxikation im Rattenmodell (Malmgren et al., 1979). Jedoch ist die Studienlage hier nicht eindeutig. Eine gesteigerte Durchlässigkeit der BNB für EBA wird im Alloxan-Rattenmodell (Seneviratne, 1972) und im T2DM-Mausmodell *Lepr^{db}* (Chapouly et al., 2016) beschrieben. Die gesteigerte Permeabilität korreliert in letzterer Studie mit einer verminderten Expression des Tight-Junction-Proteins Cldn5.

Zur Integrität der BNB gegenüber niedermolekularen Substanzen wurden bislang weniger Studien veröffentlicht. Während die Permeabilität für radioaktiv markiertes Mannitol eine Woche nach Diabetesinduktion im STZ-Modell keine signifikante Änderung aufweist (Kalichman et al., 1995), zeigt sich nach neunmonatiger Diabetesdauer eine signifikante Steigerung (Rechthand et al., 1987). Zusammenfassend lässt sich eine gute Abdichtung gegenüber Makromolekülen vermuten, während die Permeabilität für niedermolekulare Substanzen vor allem im späteren Krankheitsverlauf gesteigert zu sein scheint.

Detaillierte Analysen zur Expression der Tight-Junction-Proteine in der BNB wurden im STZ-Modell bislang nicht durchgeführt. Kenntnisse hierzu sind von größter Bedeutung, um Rückschlüsse auf die Zusammensetzung und das Vorhandensein abdichtender Zell-Zell-Verbindungen treffen zu können. Expressionsanalysen liefern einen wichtigen Baustein, um einerseits die Funktionalität der BNB besser beurteilen zu können und andererseits zugrundeliegenden Mechanismen einer Störung nachzuvollziehen.

I.4 Ziele und Fragestellungen

Eine Öffnung der BNB kann in Kombination mit einem zweiten Ereignis, wie z.B. dem Eindringen proinflammatorischer Substanzen oder Immunzellen aus der Blutzirkulation neuropathischen Schmerz auslösen. Die Funktion der BNB bei diabetischer Polyneuropathie wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Auch die molekulare Zusammensetzung der BNB wurde in diesem Krankheitsbild bislang nicht eingehend erforscht. Makrophagen sind einerseits wichtige proalgetische Effektorzellen nach traumatischen Nervenläsionen (Lim et al., 2014) und andererseits an der physiologischen Aufrechterhaltung der BNB beteiligt (Malong et al., 2019). Ziel dieser Arbeit ist es, ein genaueres Verständnis der Funktionalität der BNB sowie der molekularen Zusammensetzung der Tight Junctions in einem etablierten Tiermodell für schmerzhafte diabetische Polyneuropathie zu erlangen. Hierzu sollen zu zwei Zeitpunkten jeweils folgende Fragen beantwortet werden:

Wie permeabel zeigt sich das Perineurium nach perineuraler Applikation der Testsubstanzen? Gibt es hier Unterschiede zwischen einer niedermolekularen und einer makromolekularen Substanz?

Wie permeabel sind endoneurale Gefäße gegenüber einer intravenös injizierten niedermolekularen bzw. makromolekularen Testsubstanz?

Kommt es zu einer Infiltration von Makrophagen in peripheren Nerven?

Werden abdichtende Tight-Junction-Proteine in Geweben der Schmerzbahn (peripherer Nerv, Spinalganglion und lumbales Rückenmark) regelhaft exprimiert?

Gibt es spezifische Veränderungen der Expression wichtiger Tight-Junction-Proteine im Perineurium bzw. in endoneuralen Gefäßen von Nervi ischiadici?

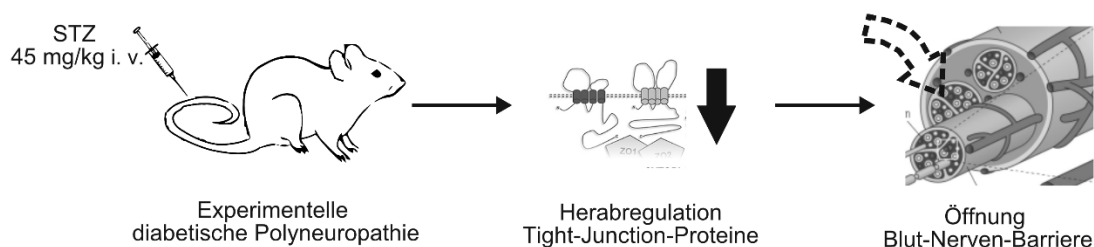


Abbildung 5: Hypothese

Durch intravenöse Gabe von Streptozocin (STZ 45 mg/kg Körpergewicht) wird eine schmerzhafte diabetische Polyneuropathie induziert. Aufgrund einer Minderexpression abdichtender Tight-Junction-Proteine kommt es zu einer Öffnung der Blut-Nerven-Barriere. Diese äußert sich in einer gesteigerten Permeabilität des Perineuriums bzw. der endoneuralen Gefäße.

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin (ZEMM), Zinklesweg 10, 97078 Würzburg, in Käfigen zu sechst in einem 12 h-Tag- und 12 h-Nachtrhythmus gehalten. Sie hatten unbeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Alle Versuche wurden durch die lokale Tierschutzbehörde unter dem Aktenzeichen 2-264 genehmigt und unter Einhaltung der ARRIVE Richtlinien durchgeführt. Die Behandlung der Versuchstiere, die Verhaltensexperimente und Gewebentnahmen wurden von Frau Dr. rer. nat. Reine Solange Sauer durchgeführt.

II.1.1 Behandlung

Zur Induktion der Hyperglykämie wurden den Versuchstieren 45 mg STZ/kg Körpergewicht einmalig in wässriger Zitrat-Lösung (= Vehicle, 0,1 mol/l, pH 4,5) intravenös injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine intravenöse Injektion der Trägerlösung (vehicle) ohne Wirksubstanz. Die Blutglukosekonzentration und das Körpergewicht der Tiere beider Versuchsgruppen wurden einmal wöchentlich aufgezeichnet. Tiere der STZ-Gruppe wiesen Blutzuckerwerte über 300 mg/dl auf. Eine Insulin-Behandlung wurde nicht durchgeführt. Für in vivo-Permeabilitätstests wurde eine niedermolekulare fluoreszierende Testsubstanz (Fluorescein-Natrium 10 % in PBS, 2 ml/kg KG) 30 min vor der Tötung der Tiere intravenös injiziert. Analog wurde mit einer makromolekularen Testsubstanz verfahren (EBA 2 % in PBS, bestehend aus 5 % BSA mit 1 % Evans blue, 0.8 mL/kg) (siehe Abschnitt II.3.1). Die Tötung der Versuchstiere wurde vier bzw. acht Wochen nach Diabetesinduktion mittels CO₂-Intoxikation durchgeführt. Anschließend wurden das Rückenmark, Spinalganglien der Lendenwirbelsegmente 4 – 6, sowie der rechte und linke Nervus ischiadicus entnommen.

II.1.2 Gewebeaufarbeitung

Unmittelbar nach der Entnahme wurden Proben für Western-Blot- und RTQ-PCR-Analysen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Proben für die Lasermikrodissektion sowie für die immunhistochemischen Färbungen wurden direkt in Einbettmedium gegeben und ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt. Die Handhabung der Proben für Permeabilitätstests wird in Absatz II.3 näher beschrieben.

II.2 Geräte und Reagenzien

Tabelle 1: Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller	
Echtzeit-Thermozykler	Applied biosystems	Step one plus real-time PCR system 27200 7446
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE	BZ-9000
Laser-Mikrodissektor	Leica	LMD DM 6000B
Mikro-Photometer	fisher scientific	Nanodrop-2000
Mikrotom	Leica	CM 3050S
Objektträger „Super-Frost Plus“	R. Langenbrinck GmbH	03-0060
PEN-Membran-Objektträger	Applied biosystems	LCM0522
Spektralphotometer	TECAN	sunrise
Thermozykler	Applied biosystems	2720 thermal cycler
Tissue-Lyser	Qiagen Retsch	85220
Zentrifuge	Eppendorf	5418R

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bestellnr.
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche	10 236 276 001
Aceton	Sigma Aldrich	W332615
Ammoniumperoxodisulfat	Roth	9592.3
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B0126
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich	D9542
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	D4540
Einbettmedium "Tissue-Tek O.C.T"	Sakura	4583
Eindeckmedium "Vectashield hard"	Vector Labs	H-1400
Ethanol	Th.Geyer	32205
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA	11280
Evans blue Albumin (EBA) = 5 % BSA, markiert mit 1 % Evans blue	Sigma Aldrich	E2129
Glycerol	invitrogen	11514011
Glycin	AppliChem	A1067,1000
HEPES	AppliChem	A3724,1000
Isopropanol	Sigma Aldrich	I9516
Luminol 97%	Sigma Aldrich	L23072
Milchpulver	AppliChem	A0830,1000

Reagenz	Hersteller	Bestellnr.
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	31434
Fluorescein-Natrium	Sigma Aldrich	
Natriumfluorid	Sigma Aldrich	S1504
Natriumhydroxid, 1 mol/L	Merck	1.09137.1000
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem	A3813,0500
p-Cumarsäure	Sigma Aldrich	C9008
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich	D8537-1L
QIAzol Lysereagenz	Qiagen	1023537
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	A2153
RNase away-Dekontaminationsreagenz	Sigma Aldrich	83931
RNase-freies Wasser	Invitrogen	AM9937
RNase-Inhibitor	Applied biosystems	N8080119
Salzsäure, 1 mol/L	Roth	K025.1
Saccharose	Sigma	S8501
Toluidinblau	Sigma	T0394
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth	5429.3
Triton X-100	Sigma Aldrich	X100
Tween-20	Sigma Aldrich	P1379
Wasser, destilliert	Braun	0082479E
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich	216763
Ziegenserum (NGS)	Vector Labs	S-1000
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250

Tabelle 3: KITS

Bezeichnung	Hersteller	Produktnr.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo scientific	4368814
miRNeasy micro Kit	Qiagen	217084
Power Up SYBR Green Master Mix	Applied biosystems	A25778
RNeasy micro Kit	Qiagen	74004
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Applied biosystems	4444557

Tabelle 4: TaqMan-Sonden

	Hersteller	Nr.	Kennung
<i>Cldn1</i>	ThermoFisher scientific	4331182	Rn00581740_m1
<i>Cldn5</i>	ThermoFisher scientific	4331182	Rn01753146_s1
<i>Gapdh</i>	ThermoFisher scientific	4331182	Rn01462662
Von-Willebrandt-Faktor (<i>Vwf</i>)	ThermoFisher scientific	4331182	Rn01492158_m1
<i>Tjp1</i>	ThermoFisher scientific	4331182	Rn02116071_s1

Tabelle 5: Primersequenzen für RTQ-PCR

	Forward primer	Reverse primer
<i>Cldn1</i>	5'- GGGACAACATCG TGACTGCT -3'	5'-CCACTAATGTCGCCAG AC- CTG-3'
<i>Cldn12</i>	5'- AACTGGCCAAGT GTCTGGTC-3'	5'- AGACCCCCTGAGCTA GCAAT-3'
<i>Cldn19</i>	5'- TGCTGAAGGACC CATCTG -3'	5'- TGTGCTTGCTGTGAG AACTG -3'
<i>Cldn5</i>	5'-AAATTCTGGGTCT GGTGCTG-3'	5'-GCCGGTCAAGGTAAC AAAGA-3'
<i>Gapdh</i>	5'- AGTCTACTGG CGTCTTCAC -3'	5'- TCATATTTCTCGTGG TTCAC -3'
<i>Jam3</i>	5'-TGCTGCTCTTCAG GGGCTGCGTGAT-3'	5'-AACACATCTGTGCCA CCGGCCAGGT-3'
<i>Ocln</i>	5'-TGGGCAGTCGGG TTGACT-3'	5-GGGCATCATGGT GTTTCATTG-3'
<i>Tric</i>	5'- TGA ATG GCC ACC AGT GAC CGA -3'	5'- AGT CAG GCA TTA CGA TGG GCT TAG -3'
<i>Tjp1</i>	5'-CACGATGCTCAGAGA CGAAGG -3'	5'- TTCTACATATGGAAG TTGGGGATC -3'

Tabelle 6: Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Hersteller	Produktnr.	Wirts- spezies	Verdünnung
Anti-CD68	Alexa Fluor 488	Bio-Rad	MCA341f	Maus	1:100

II.3 Permeabilitätstests der BNB

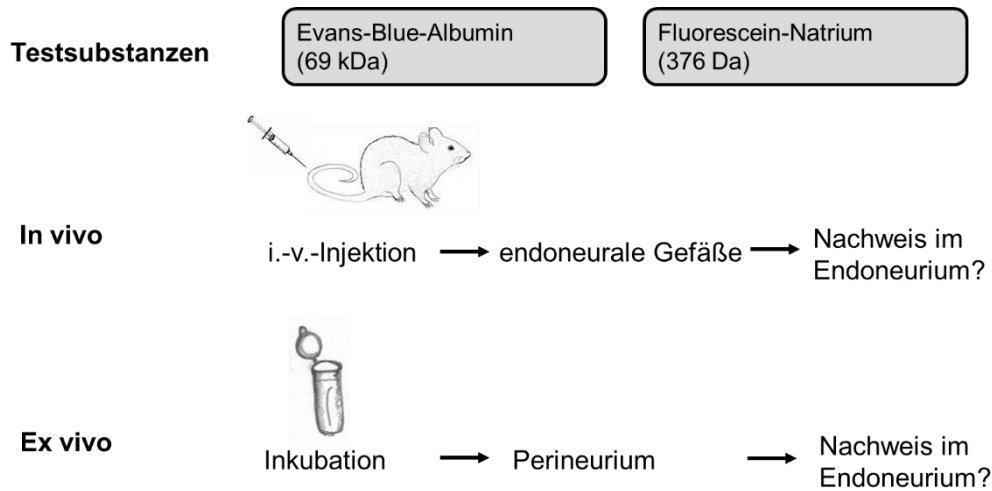


Abbildung 6: Permeabilitätstests der BNB

Zur Evaluation der Durchlässigkeit endoneuraler Kapillaren wurden fluoreszierende Testsubstanzen intravenös injiziert und deren Austritt ins Endoneurium anschließend quantifiziert. Zur Evaluation der Durchlässigkeit des Perineuriums wurden Präparate zunächst in einer der Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde der Eintritt der Fluoreszenzfarbstoffe ins Endoneurium quantifiziert. Als Testsubstanzen wurden in beiden Verfahren Fluorescein-Natrium (376 Da) oder Evans blue Albumin (EBA, 69 kDa) verwendet.

II.3.1 Gewebeaufarbeitung für Permeabilitätstests

Zur Evaluation der Permeabilität endoneuraler Kapillaren wurde eine niedermolekulare fluoreszierende Testsubstanz (Fluorescein-Natrium 10% in PBS, 2 ml/kg KG) 30 min vor der Tötung der Tiere intravenös injiziert. Analog wurde mit einer makromolekularen Testsubstanz verfahren (EBA 2% in PBS, bestehend aus 5% BSA mit 1% Evans blue, 0.8 mL/kg). Nach Entnahme wurden die Präparate einstündig in 4 % PFA (in PBS) postfixiert.

Zur Testung des Perineuriums wurden Nervenpräparate nach der Postfixierung in 2 ml EBA (5% BSA mit 1% Evans blue, 1 h) bzw. Fluorescein-Natrium (3% in Kochsalzlösung, 15min) inkubiert. Vor der Einbettung wurde das Gewebe in 10 % Saccharose (in PBS) über Nacht eingelegt. Die Gewebeaufarbeitung wurde von Fr. Dr. Reine-Solange Sauer durchgeführt.

II.3.2 Mikroskopische Bilderfassung

Aus eingebetteten Nerven wurden im Mikrotom 10- μ m-dünne Querschnitte bei -20°C erstellt. Diese wurden auf einen Objektträger gebracht. Die Schnittpräparate wurden zeitnah unter dem digitalen Fluoreszenzmikroskop (KAYENCE) betrachtet. Das Aufbringen eines Deckglases unter Verwendung von Deckmedium führte in Vorversuchen zur freien Verteilung der Farbstoffe im gesamten

Bildbereich und wurde deshalb umgangen. Pro Versuchstier wurden insgesamt neun Querschnitte analysiert. Pro Querschnitt wurde je ein Bild in dem entsprechenden Fluoreszenzkanal (grün bei Fluorescein-Natrium, rot bei EBA) und ein deckungsgleiches Hellfeldbild erstellt. Aufnahmeeinstellungen wie Belichtungszeit, Vergrößerung und Auflösung wurden für jedes Experiment einheitlich gewählt. Bei der Wahl der Belichtungszeit wurde konsequent darauf geachtet, saturierte Pixel zu vermeiden. Bilddateien wurden unverändert im TIFF-Format (RGB) gespeichert.

II.3.3 Quantitative Analyse

Die Auswertung der Bilddateien erfolgte mithilfe des open-source-Programmes FIJI (Schwabe, 2018). Gemessen wurde die Farbtiefe (mean grey value) als Maß der Fluoreszenzintensität (FI) des Präparates. Die Farbtiefe wird durch das Programm als Mittelwert pro analysierter Oberfläche ausgegeben. Während die Markierung des Endoneuriums bei in-vivo-Tests im Hellfeldbild erfolgte, konnte bei ex-vivo-Tests aufgrund der guten Abgrenzbarkeit des Endoneuriums die Markierung direkt im Fluoreszenzbild gesetzt werden. Nach Subtraktion der Farbtiefe des Hintergrundes von der Farbtiefe des Endoneuriums wurden die Ergebnisse von neun Nervenquerschnitten pro Versuchstier gemittelt. Die Werte wurden abschließend auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normalisiert.

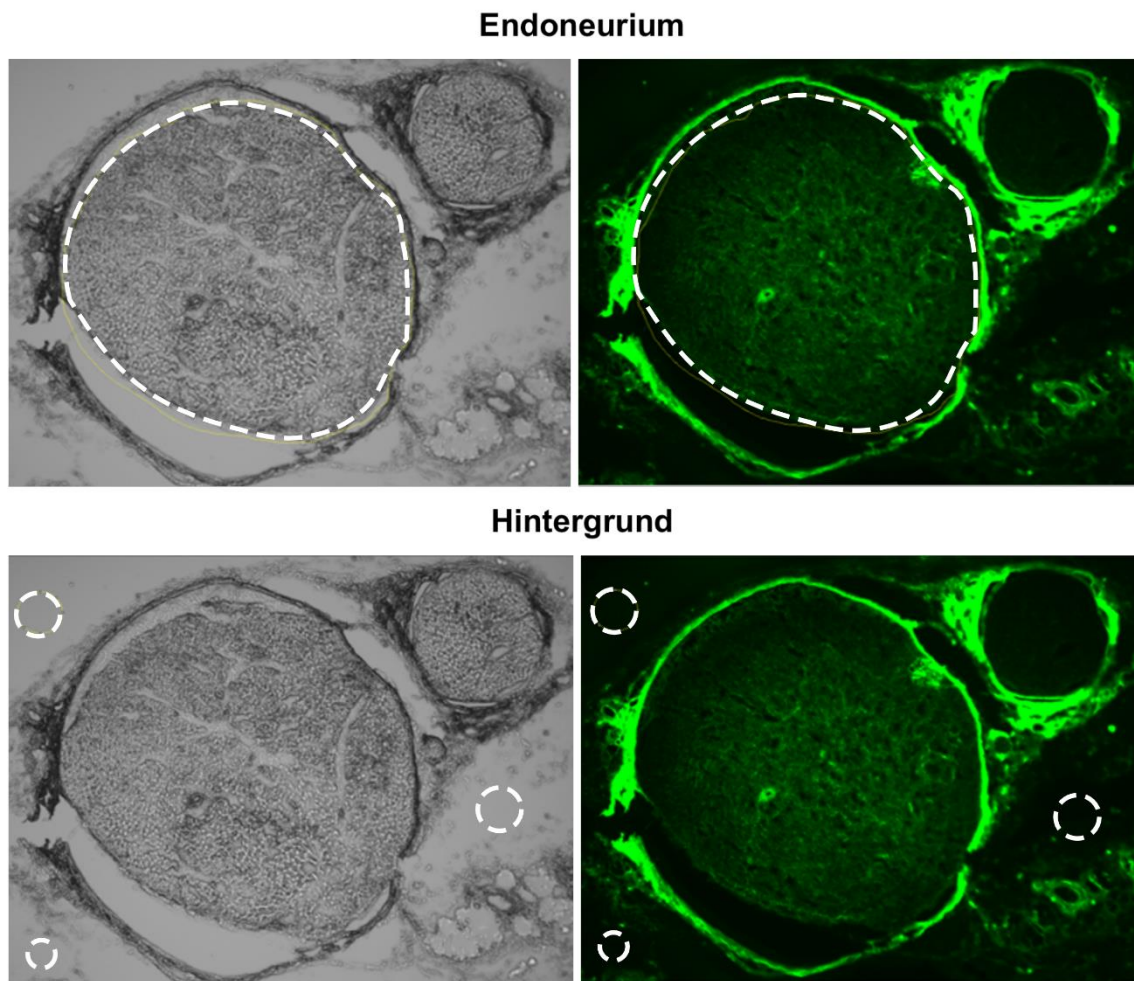


Abbildung 7: Quantifizierung eines Permeabilitätstests

Im Hellfeldbild (Bild links) wurde das Endoneurium als region of interest (ROI) umrandet. Die Markierung (hier weiß gestrichelt dargestellt) wurde auf das jeweils deckungsgleiche Fluoreszenzbild (Bild rechts) übertragen. In gleicher Weise wurden drei Regionen im Hintergrund ausgewählt.

Korrigierte FI = gemittelte Farbtiefe (ROI) – gemittelte Farbtiefe (Hintergrund)

Normalisierte FI = $\frac{\text{korrigierte FI}}{\text{korrigierte FI (Mittelwert der Kontrollen derselben Kohorte)}}$

II.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen es, qualitative und z.T. auch quantitative Rückschlüsse auf die räumliche Verteilung von Proteinen in Gewebe zu ziehen. Es handelt sich um eine indirekte Färbemethode, bei der Antigene mittels primärer Antikörper erkannt werden. Die primären Antikörper werden durch sekundäre Antikörper, die mit Fluorochromen gekoppelt sind, sichtbar gemacht.

II.4.1 Färbung

Gewebedünnschnitte (10 µm) auf Objektträgern wurden zunächst in Aceton fixiert (10 min, -20 °C), danach in PBS gewaschen (10 min, Raumtemperatur). Die Permeabilisation erfolgte mit Triton-X 100 (0,5 % in PBS, 2 h, Raumtemperatur). Anschließend wurde erneut in PBS gewaschen (2 x 10 min). Geblockt wurde 30 min lang in 3 % BSA 1 % NGS (in PBS) bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden mit dem ersten Antikörper (1:100 in PBS) in der Regel über eine Nacht, bei Anti-CD68-Antikörpern über zwei Nächte, bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 x 10 min in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:600 in PBS, 1 h, Raumtemperatur). Dieser Schritt entfiel bei der Verwendung des gekoppelten Antikörpers anti-CD68. Zur Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet (1:3000 in PBS, 10 min, Raumtemperatur). Nach dem Waschen (4 x 10 min in PBS) wurden die Präparate vorsichtig getrocknet und eingedeckt.

II.4.2 Mikroskopische Bilderfassung

Die Bildaufnahme erfolgte stets zeitnah nach Färbung und Trocknung. Für alle Schnitte einer Serie, d.h. für beide Versuchsgruppen wurden stets einheitliche Aufnahmebedingungen gewährleistet. Rückenmark wurde bei 40-facher Vergrößerung, Nerven bei 100-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (KEYENCE) begutachtet.

II.5 mRNA-Expression

Zur Messung der mRNA-Expression wurden Real-time quantitative Polymerasekettenreaktionen (RTQ-PCR) durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Präparaten isoliert, in cDNA transkribiert und eine RTQ-PCR angeschlossen. Prinzip der RTQ-PCR ist die Amplifikation genspezifischer Sequenzen der cDNA mithilfe bestimmter Primerpaare. Die Amplikons lagern sich zu Doppelsträngen zusammen, die durch ein fluoreszierendes Reagenz (SYBR green) markiert werden. Die Fluoreszenz steht in proportionalem Zusammenhang mit der Anzahl der Amplikons und wird stetig durch den Echtzeit-Thermostyzykler gemessen. Da die Amplifikation unter guten Reaktionsbedingungen einem exponentiellen Verlauf folgt, ist ein Rückschluss auf die anfängliche Menge der cDNA im Vergleich zu einem konstant exprimierten Kontrollgen möglich.

II.5.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion aus ganzem Gewebe wurde das miRNeasy-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Extraktion von RNA nach Lasermikrodissektion wurde mit dem RNeasy micro Kit durchgeführt. Die Kits verbinden die Methode der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit einer Aufreinigung der präzipitierten RNA auf Säulen.

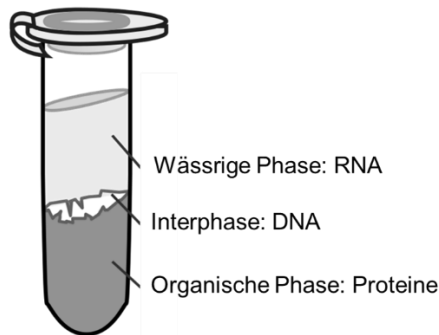


Abbildung 8: Phasentrennung während der RNA-Extraktion

Grundprinzip der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine Phasentrennung durch Zentrifugation des Zellysats in Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Lösung. Es entsteht eine obere RNA-reiche, wässrige Phase, eine DNA-reiche Interphase und eine proteinreiche organische Phase. Nach Phasentrennung kann RNA mit Ethanol ausgefällt werden. Modifizierte Abbildung nach (Wikipedia, 2020). Verwendung der Abbildung gemäß Creative Commons BY 4.0-Lizenz.

Die Proben wurden in je 700 µl Qiazol-Reaganz auf Eis aufgetaut und mithilfe einer gereinigten Schere zerkleinert. Die Homogenisierung erfolgte nach Zufügen einer gereinigten Stahlkugel im TissueLyser (4 min, Raumtemperatur, 20 bzw. 30 Hz). Nach einer ersten Inkubation (5 min, Raumtemperatur) wurde 140 µl Chloroform zugefügt. Die Proben wurden durchmischt (15 s) und ein zweites Mal inkubiert (2-3 min, Raumtemperatur). Nach der Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12.000*g) wurde die obere RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorfggefäß überführt, ohne die darunterliegende DNA-reiche Interphase zu berühren. Die abgenommene Phase wurde mit dem 1,5-fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt. Je 700 µl des mit Ethanol versetzten Überstandes wurden auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben und zentrifugiert (15 s, Raumtemperatur, 10.000 * g). Die auf die Säule gebundene RNA wurde in mehreren Schritten gewaschen, im vorletzten Schritt durch Zentrifugation getrocknet und schließlich mit nukleasefreiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde spektralphotometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt (Nanodrop-2000, Fisher scientific). Für weitere Versuche verwendete RNA wies ein Absorptionsverhältnis (260-/280-nm) zwischen 1,90 und 2,10 auf.

Tabelle 7: Waschschritte und Elution der RNA bei Verwendung des miRNeasy-Kits

Volu- men [μ l]	Auf Säulen gegebenes Reagenz	Relative Zent- rifugalbe- schleunigung [1000*g]	Tem- pera- tur [°C]	Zeit [min:s]	Bemerkungen
700	Überstand, mit Etha- nol ver- setzt	>8	18-22	00:15	Durchfluss verwerfen
700	RWT-Puf- fer	>8	18-22	00:15	Durchfluss verwerfen
500	RPE-Puffer	>8	18-22	00:15	Durchfluss verwerfen
500	Ethanol, 80%	>8	18-22	02:00	Säulen anschließend auf neues Röhrchen platziert
-	-	Maximal	18-22	05:00	Geöffneter Deckel, Sä- ulen danach auf neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß stecken
14	Wasser	Maximal	18-22	01:00	

II.5.2 Reverse Transkription

Für die Erstellung von cDNA wurde das „High-Capacity cDNA reverse transcription Kit“ laut Herstellerangaben verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 6,8 μ l RT-Mastermix, bestehend aus 2 μ l RT-Puffer, 0,8 μ l dNTP-Mix 100 mM, 2 μ l RT-Random Primer, 1 μ l RNase Inhibitor und 1 μ l Multiscribe reverse Transcriptase zu dem Volumenäquivalent von 500 ng RNA pipettiert und mit nukleasefreiem Wasser auf ein einheitliches Volumen von 20 μ l aufgefüllt. Die Konzentration und Qualität der cDNA wurde anschließend spektralphotometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt (Nanodrop-2000). Für weitere Versuche verwendete cDNA wies einen 260/280-Wert zwischen 1,80 und 1,87 auf.

Tabelle 8: Temperaturverlauf der reversen Transkription

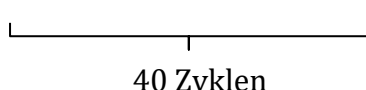
Temperatur [°C]	25	37	85	4	4
Dauer[min]	10	120	5	7	∞

II.5.3 Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)

Proben und Negativkontrollen wurden als Triplikate getestet. Pro Vertiefung der Platte wurden 20 μl des Master-Mix (12,5 μl Power Up SYBR Green Master Mix, 2 * 1,75 μl genspezifische Primer der Konzentration 10 pM, 4 μl nukleasefreies Wasser) sowie 5 μl der cDNA (200 ng/ μl) beziehungsweise nukleasefreies Wasser für die Negativkontrolle aufgetragen. Die Amplifikation lief über 40 Zyklen.

Tabelle 9: Temperaturverlauf der RTQ-PCR mit SYBR Green

	Denaturierung/ Primerhybridisierung			Elongation
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Zeit [min:s]	02:00	02:00	00:03	00:30



40 Zyklen

II.5.4 Auswertung der RTQ-PCR

In der Software StepOne (Version 2.3) wurden Experimente, die dasselbe Gen in gleichem Gewebe und zu gleichem Zeitpunkt testen, zu einer „Studie“ zusammengefasst. Dadurch konnten getrennt erfasste Daten unter gleichen Bedingungen ausgewertet werden. Fluoreszenz-Schwellenwerte werden durch das Programm automatisch in der exponentiellen Phase der Amplifikation gesetzt. Anhand des Schwellenwertes wird für jede Probe ein Grenzwert-Zyklus (C_T) ermittelt. C_T ist der Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig oberhalb des Schwellenwertes liegt. Die C_T der Triplikate wurden gemittelt und ausgehend davon ein relatives Maß der Expression (relative quantification, RQ) nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Schmittgen and Livak, 2008) errechnet. Als Kontrollprobe wurde eine Probe der Kontrollgruppe genutzt. GAPDH diente als Kontrollgen.

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

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

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

II.6 Lasermikrodissektion

Der Gebrauch eines Lasermikrodissektors ermöglicht es, spezifische Zell-Subpopulationen innerhalb eines Präparates zu untersuchen. Im Rahmen der Arbeit wurde

die Expression von Tight-Junction-Proteinen innerhalb der endoneuralen Gefäße bzw. innerhalb des Perineuriums untersucht. Hierzu wurden Nervenquerschnitte auf PEN-Membran-bespannte Objektträger gebracht, mit Toluidinblau eingefärbt und mikroskopiert. Mikroskopisch identifizierte Gefäße/Perineuria wurden anschließend mittels UV-Laser ausgeschnitten und in einem separaten Gefäß aufgefangen. Zur Messung der Genexpression wurden wiederum RTQ-PCRs durchgeführt, wobei das Protokoll aufgrund der sehr geringen Probenmenge teilweise von dem oben beschriebenen Verfahren abwich.

II.6.1 Gewebeaufarbeitung

Gewebedünnschnitte (20 µm) wurden am Mikrotom bei -20 °C erstellt. Jeweils ca. 10 Schnitte wurden auf einen Membran-bespannten Glasobjektträger gebracht. In 50 ml-Falkon-Röhrchen wurden die Gewebedünnschnitte maximal 10 Tage bei -80°C aufbewahrt. Die Objektträger wurden vor der Verwendung durch mehrstündige Inkubation mit RNase-away von Ribonukleasen befreit, zweimal mit RNase-freiem Wasser gespült und bei 40 °C getrocknet. Der Fixierung (70 % Ethanol, 2 min, 4°C) folgten zwei Waschschrte zur Entfernung des Einbettmediums (2 x 1 min RNase-freies Wasser) und die Trocknung (12 min, 40 °C). Zu diesem Zweck wurde destilliertes Wasser 24-h-lang mit 0,1 % DEPC inkubiert, anschließend mindestens 15-min-lang autoklaviert und somit von RNasen befreit.

Unmittelbar vor der Mikrodissektion wurden die Gewebedünnschnitte in einer 0,02%-igen Lösung aus Toluidinblau in nukleasefreiem Wasser eingefärbt und in einer Alkoholreihe getrocknet.

Tabelle 10: Färbeprotokoll

Reagenz	Zeit
75% Ethanol	< 5 s
95 % Ethanol	< 5 s
Ethanol, absolut	< 5 s
Ethanol, absolut	< 10 s
Toluidinblau 0,02%	1,5 min
RNase-freies Wasser	2 * 3 s
75% Ethanol	< 5 s
95 % Ethanol	< 5 s
Ethanol absolut	< 5 s
Ethanol absolut	< 10 s
40 °C Trockenschrank	< 30 s

II.6.2 Durchführung der Lasermikrodissektion

Ca. 15 Kapillaren pro Querschnitt wurden unter dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung morphologisch identifiziert und mittels UV-Laser aus dem umliegenden Gewebe herausgeschnitten. Die Auffanggefäße wurden mit jeweils 10 μ l RLT-Puffer (enthält 10 μ l β ME pro 1ml Puffer) aus dem RNA-Isolations-Kit vorgefüllt, um die RNA-Degradation während des weiteren Schneidevorganges zu verhindern. Anschließend wurde bei 5-facher Vergrößerung in einem weiteren Auffanggefäß das restliche endoneurale Gewebe gesammelt, sodass auf dem Objektträger nur noch das Perineurium übrigblieb. Dieses wurde in ein drittes Gefäß überführt.

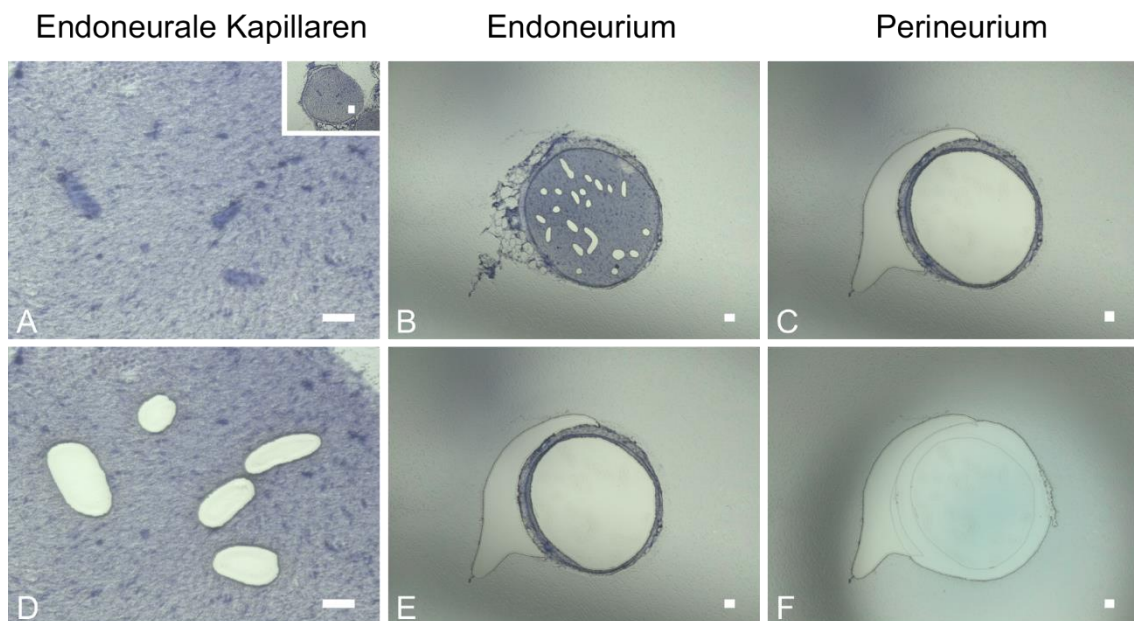


Abbildung 9: Ablauf der Lasermikrodissektion

N. ischiadicus in Toluidinblaufärbung. 20- μ m-Querschnitte auf PEN-Membran-Objektträgern. Messbalken = 100 μ m. (A) Nahaufnahme vor Selektion der Kapillaren mit eingeblender Übersichtsaufnahme (D) Dissektion endoneuraler Kapillaren (B) Übersichtsaufnahme nach Entfernung der Kapillaren (C, E) Aufnahme nach Dissektion des Epi- und Endoneuriums (F) nach Dissektion des Perineuriums

Tabelle 11: Lasereinstellungen

Lasereinstellungen	5-fach-Objektiv	20-fach-Objektiv
Power	60	30
Apertur	30	6
Speed	20	15
Specimen balance	12	13
Offset	63	100

II.6.3 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Mittels LMD ausgeschnittenes Gewebe wurde in RLT-Puffer (RNeasy micro Kit) aufgefangen. Zur RNA-Extraktion wurde das Volumen des RLT-Puffers auf 75 µl ergänzt. Zur Homogenisierung wurden die Dissekte 30 s im Puffer durchmischt und bis zur RNA-Isolation bei -80°C aufbewahrt. Die weitere Isolation wurde nach Herstellerangaben des RNeasy micro Kits durchgeführt.

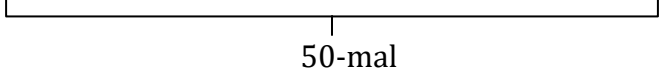
Da die RNA-Konzentration nach LMD nicht ausreichte, um eine photometrische Quantitäts- und Qualitätskontrolle durchzuführen, wurde das gesamte Elutionsvolumen (13 µl) in cDNA transkribiert. Für jede Probe wurde eine ähnliche Gewebemenge verwendet, sodass große Schwankungen im RNA-Gehalt nicht zu erwarten waren. Dies waren je Probe 8 bis 10 Querschnitte des Perineuriums bzw. 120 bis 150 Kapillaren. Die reverse Transkription erfolgte ansonsten analog zu Abschnitt II.5.2.

II.6.4 RTQ-PCR

Da im Rahmen der Laser-Mikrodissektion eine geringe Probenmenge anfiel, wurde die RTQ-PCR hier mit einer spezifischeren Methode durchgeführt. TaqMan-Sonden erkennen spezifische PCR-Produkte und erlauben so Aussagen selbst nach stärkerer Amplifikation. Sie tragen eine Farbstoffmarkierung am 5'-Ende, einen Minor Groove Binder sowie einen nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende. Erst wenn die DNA-Polymerisation eine TaqMan Sonde erreicht, wird der Farbstoff freigesetzt. In jedem PCR-Zyklus steigt somit das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des synthetisierten Amplikons (ThermoFisher, 2020).

Jede Probe wurde als Triplikat, die Negativkontrollen als Duplikate unter der Verwendung von TaqMan-Sonden getestet. Aufgrund der geringen Probenmenge wurde aus der erhaltenen cDNA lediglich eine 6,25-fache Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser erstellt. Pro Vertiefung der Platte wurden 15 µl des Master-Mix (10 µl TaqMan Fast Advanced Master Mix, 1 µl genspezifische Sonde, 4 µl nukleasefreies Wasser) sowie 5 µl der verdünnten cDNA beziehungsweise nukleasefreies Wasser für die Negativkontrolle aufgetragen. Die Amplifikation lief über 50 Zyklen.

Tabelle 12: Temperaturverlauf der RTQ-PCR mit TaqMan-Sonden

	Denaturierung	Primerhybridisierung	Elongation
Temperatur (°C)	95	95	60
Zeit (min:s)	00:20	00:01	00:20
	 50-mal		

II.7 Statistische Auswertung

Alle Datensätze wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Die normalverteilten Daten wurden mithilfe des T-Tests gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz getestet. Nicht-parametrische Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ definiert. In Graphen wurden individuelle Messwerte mit Median und Interquartilsabstand dargestellt.

II.8 Software

Die Erfassung der RTQ-PCR-Daten erfolgte mit der Software StepOne. Mikroskopische Aufnahmen wurden mithilfe des Programms BZ-II Analyzer akquiriert und mit FIJI quantifiziert. Rohdatensätze wurden anschließend in Excel importiert und geordnet. Die statistische Auswertung und die Graphen wurden in Graphpad Prism erstellt. Als Literaturverwaltungsprogramm diente Endnote.

Tabelle 13: Software

Programm	Version	
BZ-II Analyzer	2.1	
Endnote	X 8.2	
FIJI (ImageJ)	ImageJ 2.0.0-rc-65/1.52h	Java 1.8.0_172 [64-bit]
Microsoft Excel	2016	
StepOne	2.3	
GraphPad Prism	5.0	

III Ergebnisse

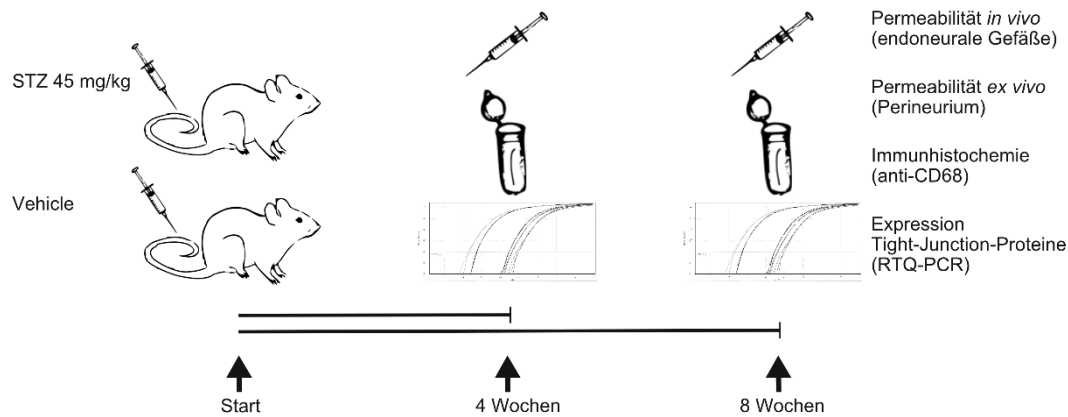


Abbildung 10: Versuchsplan

Zur Induktion einer experimentellen diabetischen Polyneuropathie wurde männlichen Wistar-Ratten Streptozocin (STZ, 45 mg/kg Körpergewicht) einmalig intravenös injiziert. Kontrolltiere erhielten eine Injektion der Trägerlösung (Vehicle). Untersuchungen zur Permeabilität der BNB, zum Nachweis endoneuraler Makrophagen sowie zur Expressionsanalyse wichtiger Tight-Junction-Proteine wurden jeweils nach vier und acht Wochen durchgeführt.

Wöchentliche Blutglukosemessungen bestätigten eine STZ-induzierte chronische Hyperglykämie. Mechanische Hyperalgesie als messbares Korrelat neuropathischer Schmerzen wurde im von-Frey-Test bereits nach zwei Wochen nachgewiesen. Zudem bestand eine verminderte motorische Aktivität (Rotarod-Test) nach acht Wochen bei STZ-diabetischen Tieren (Ben-Kraiem et al., 2021).

III.1 Unveränderte Barrierefunktion der BNB für Makromoleküle bei STZ-induzierter diabetischer Polyneuropathie

Zur Messung der Durchlässigkeit der perineuralen Barriere wurden Nervenpräparate in einer fluoreszierenden Testsubstanz (EBA, 69 kDa) inkubiert. Anschließend wurde der Eintritt der Substanz ins Endoneurium anhand der endoneuralen Fluoreszenzintensität quantifiziert. Die Bestandteile der Nerven ließen sich mikroskopisch sowohl im Hellfeldbild als auch im Fluoreszenzkanal gut identifizieren. Die Fluoreszenzintensität im Endoneurium unterschied sich zwischen beiden Versuchsgruppen zu beiden Testzeitpunkten nicht signifikant (siehe Abbildung 11). Somit zeigte sich eine intakte Barrierefunktion des Perineuriums für das Makromolekül EBA.

In einer Pilotstudie wurde auch die Durchlässigkeit endoneuraler Gefäße evaluiert. Dazu wurde EBA intravenös injiziert. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine

Anreicherung der Testsubstanz in endoneuralen Gefäßen und im Perineurium. Ein Austritt in den endoneuralen Raum wurde nicht beobachtet (siehe Abbildung 12). Die Barrierefunktion der endoneuralen Kapillaren für das Makromolekül EBA blieb in der Pilotstudie somit erhalten.

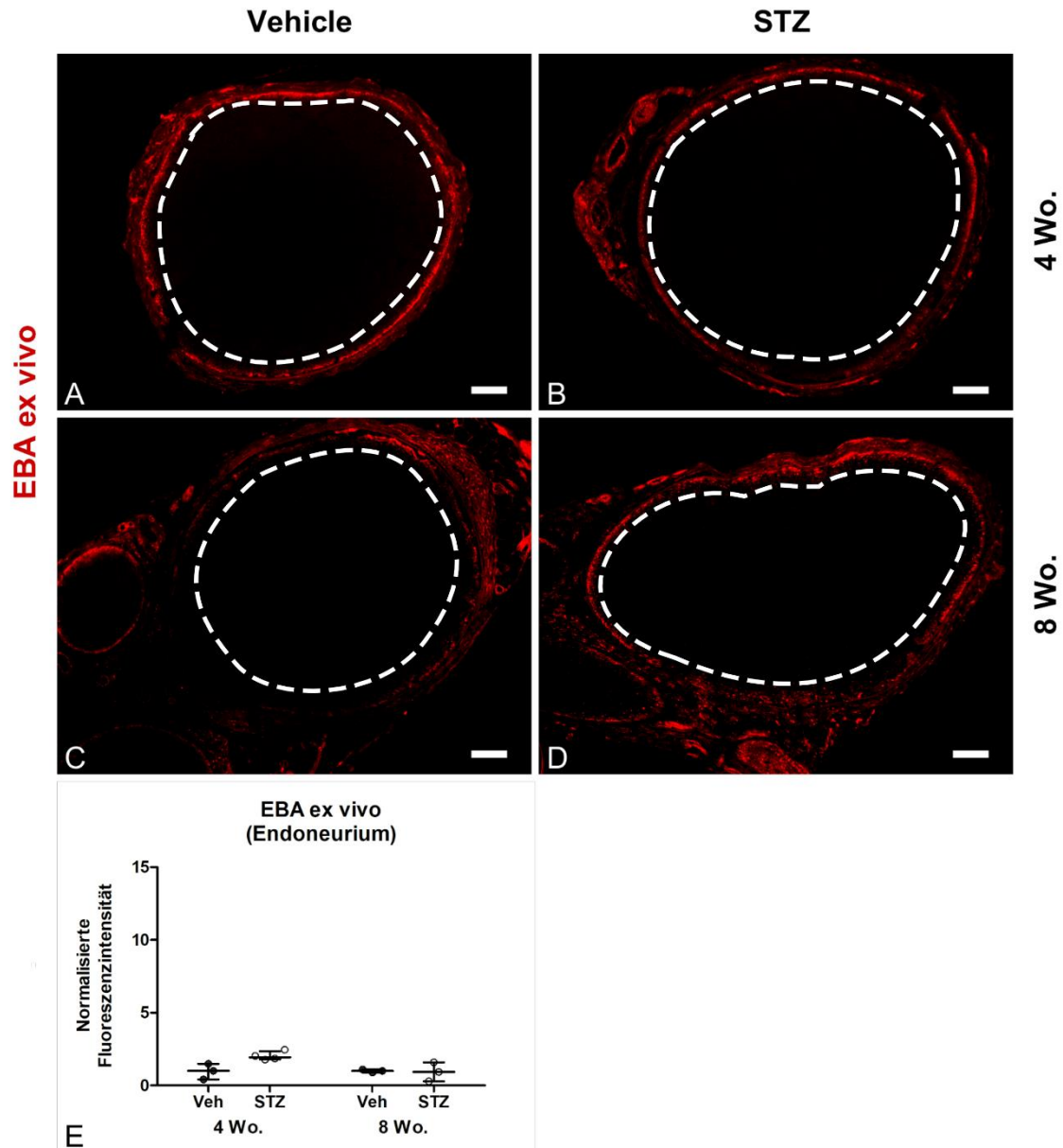


Abbildung 11: Perineurale BNB impermeabel für EBA (69 kDa)

N. ischiadicus nach Inkubation in EBA-Lösung (A - D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten (10 μm) des N. ischiadicus. Ein gesteigerter Austritt der fluoreszierenden Testsubstanz EBA (rot) in das Endoneurium (weiß-gestrichelt umrandet) wurde nicht beobachtet. Messbalken = 100 μm (E) Quantifizierung der endoneuralen Fluoreszenzintensität. Kein signifikanter Effekt zwischen der Gruppe mit STZ-induzierter Polyneuropathie (STZ) und der Kontrollgruppe (Vehicle/Veh). n = 3-4.

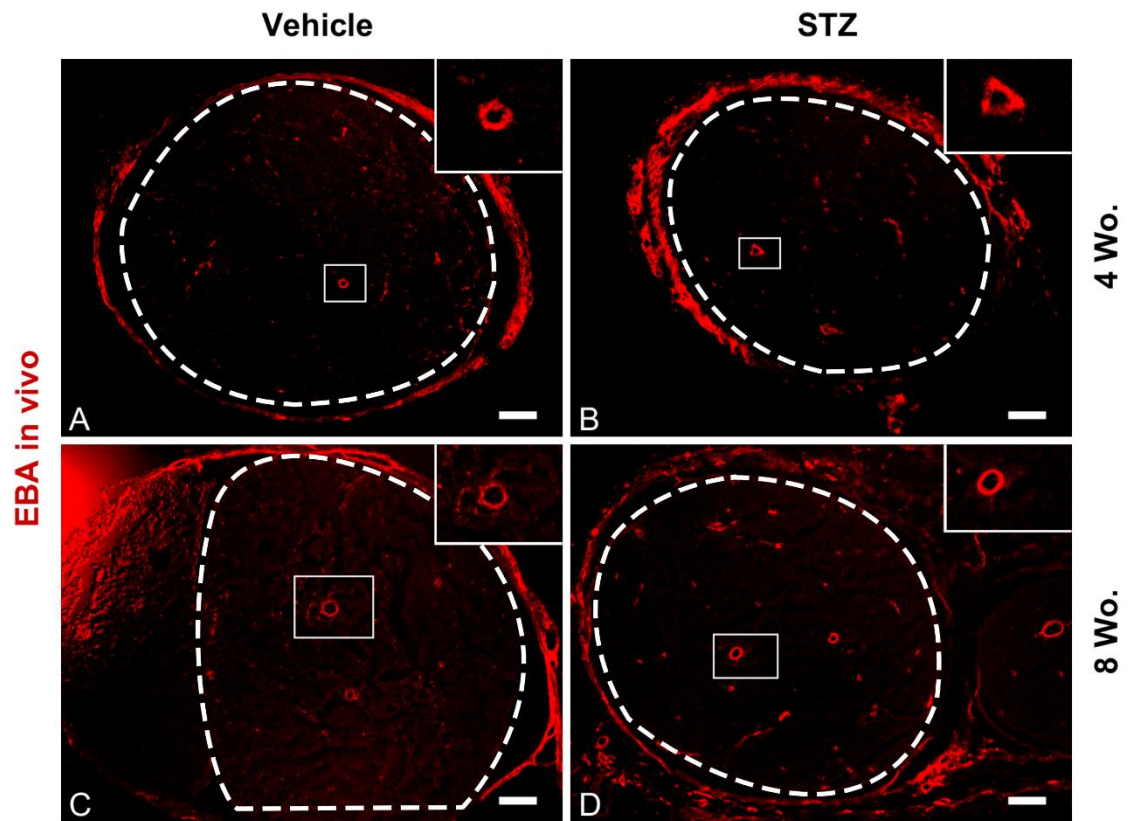


Abbildung 12: Endotheliale BNB impermeabel für EBA (69 kDa) in Pilotstudie
 N. ischiadicus nach intravenöser Injektion von EBA-Lösung (A - D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Querschnitten (10 μm) des N. ischiadicus. Ein Austritt der Testsubstanz aus den endoneurialen Kapillaren (Bildausschnitte) in das Endoneurium (weiß-gestrichelt umrandet) wurde in dieser Pilotstudie (n = 1) nicht beobachtet. Messbalken = 100 μm .

III.2 Erhöhte Permeabilität der BNB für niedermolekulare Verbindung Fluorescein-Natrium

Die Durchlässigkeit der perineuralen Barriere für niedermolekulare Stoffe wurde nach Inkubation der Nervenpräparate in Fluorescein-Natrium evaluiert. Der Eintritt der Testsubstanz ins Endoneurium wurde anhand der Fluoreszenzintensität quantifiziert. In einer Pilotstudie zeigte sich nach vier Wochen eine erhaltene Barrierefunktion. Zum Untersuchungszeitpunkt von acht Wochen bestand eine signifikant gesteigerte Fluoreszenz im Endoneurium der STZ-Gruppe (siehe Abbildung 13), die auf eine vermehrte Durchlässigkeit des Perineuriums für Fluorescein-Natrium hindeutet.

Die Durchlässigkeit endoneuraler Gefäße für eine niedermolekulare Verbindung wurde mittels intravenöser Injektion von Fluorescein-Natrium evaluiert. Eine verstärkte Fluoreszenzintensität des Endoneuriums fiel zum Zeitpunkt von vier Wochen nach Diabetesinduktion bereits auf. Ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität bestand nach acht Wochen (siehe Abbildung 14). Es kann zu diesem Zeitpunkt von einer Öffnung der endoneuralen Barriere für die niedermolekulare Verbindung Fluorescein-Natrium ausgegangen werden.

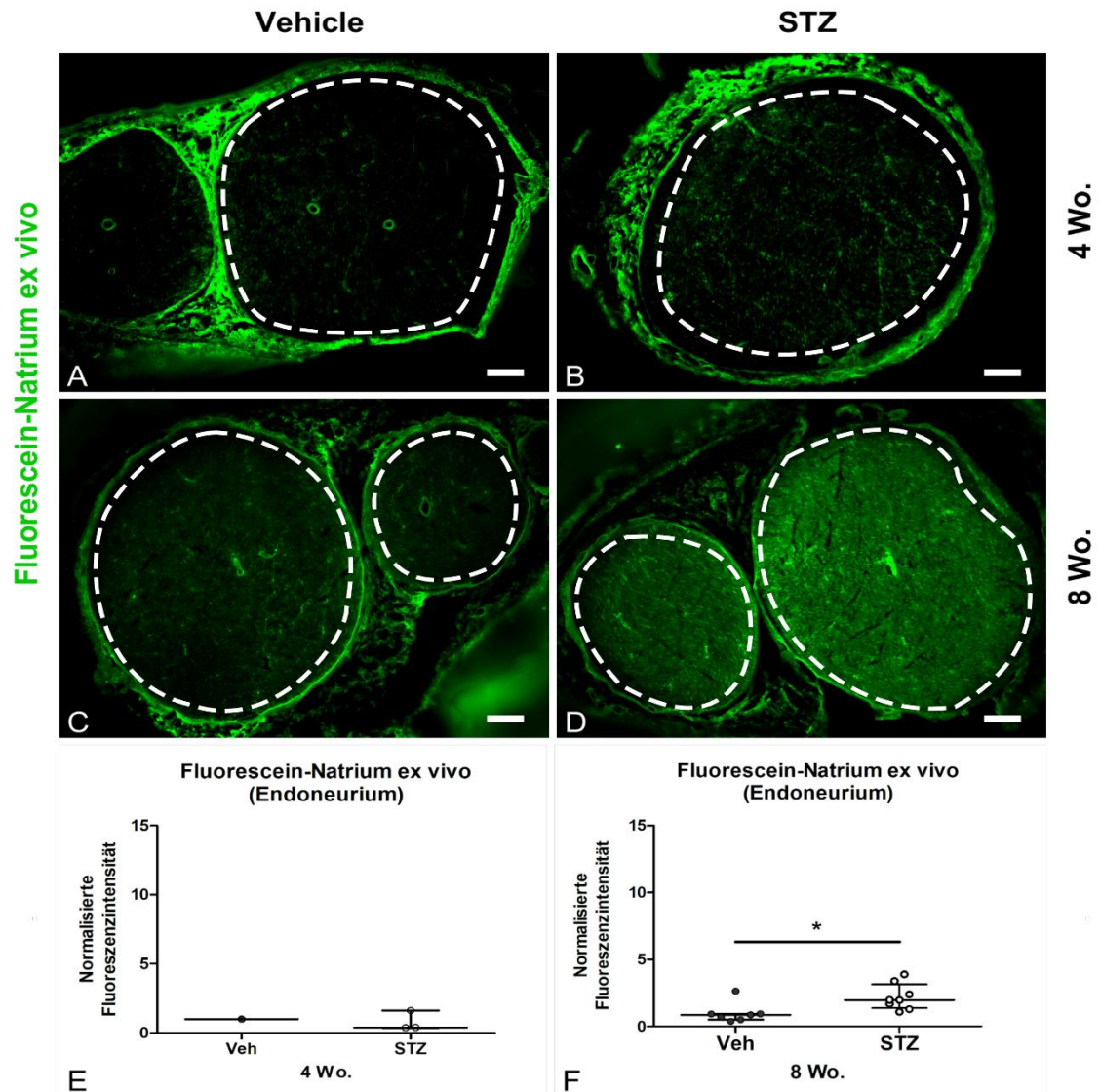


Abbildung 13: Erhöhte Permeabilität der perineuralen Barriere für Fluorescein-Natrium acht Wochen nach Diabetesinduktion

N. ischiadicus nach Inkubation in Fluorescein-Natrium-Lösung. (A - D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des N. ischiadicus. Messbalken = 100 μ m. (E) Gleichmäßige endoneurale Fluoreszenzintensität in der Pilotstudie vier Wochen nach Diabetesinduktion. n = 1/3 (F) Gesteigerte endoneurale Fluoreszenzintensität in der Gruppe der STZ-diabetischen Tiere nach acht Wochen gegenüber der Kontrollgruppe (Veh) n = 7-8. * p < 0,05, T-Test. Daten aus (F) wurden freundlicherweise von Adel Ben-Kraiem zur Verfügung gestellt.

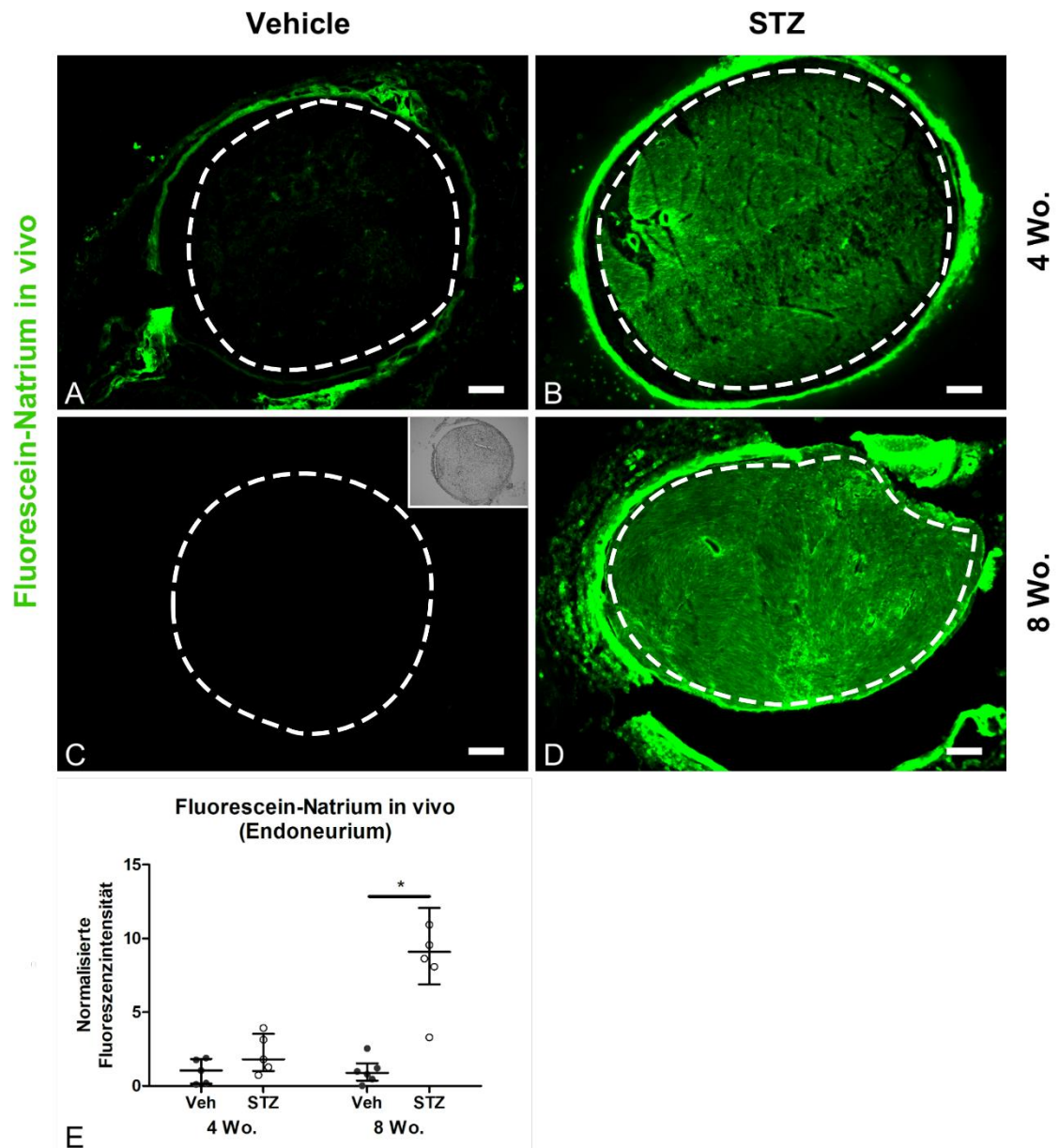


Abbildung 14: Endoneurale Anreicherung von Fluorescein-Natrium nach intravenöser Injektion bei STZ-induzierter Polyneuropathie nach acht Wochen

N. ischiadicus nach intravenöser Injektion von Fluorescein-Natrium. (A – D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nervenquerschnitte. Drastische Anreicherung im Endoneurium bei STZ-induzierter Polyneuropathie gegenüber der Kontrollgruppe (Vehicle). Messbalken = 100 μm . $n = 5-6$. (D) Perineurium präparationsbedingt unterbrochen. (E) Quantifizierung der endoneuralen Fluoreszenzintensität mit signifikantem Anstieg in der STZ-Gruppe nach acht Wochen. Gezeigt werden individuelle Messwerte mit Median und Interquartilsabstand. Mann-Whitney-U-Test, $*p < 0,05$.

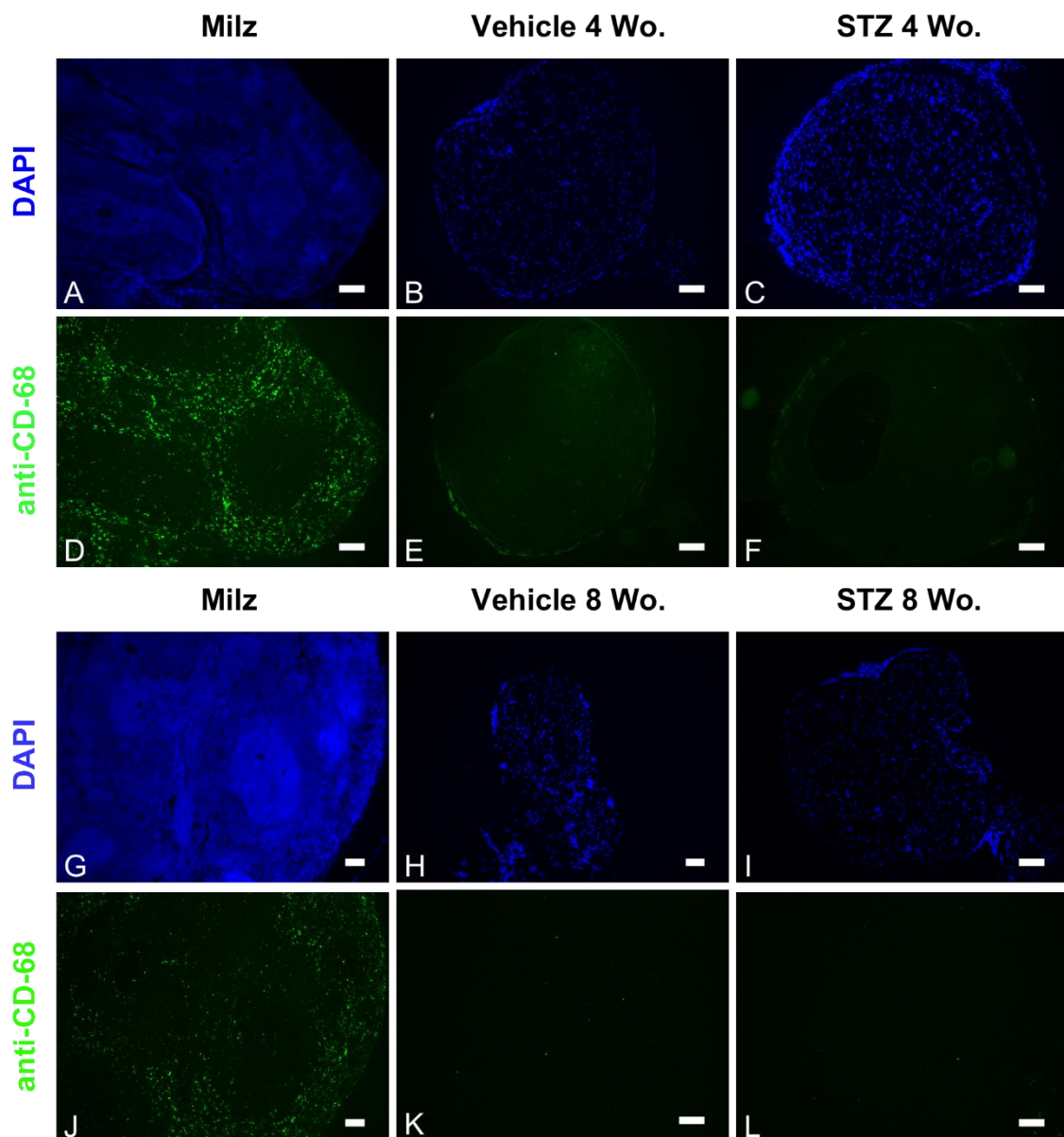


Abbildung 15: CD68-positive Zellen im N. ischiadicus STZ-diabetischer Ratten nicht verstärkt nachweisbar

Immunohistochemische Färbung der Makrophagen (anti-CD68). CD68-positive Zellen konnten in der Positivkontrolle (Milz) regelrecht angefärbt werden. Nervi ischiadici der STZ- und Kontroll-Gruppe wiesen ein spärliches Signal auf. Insbesondere wurden keine Anhäufungen von CD68-positiven Zellen beobachtet. (**blau**) Zellkernfärbung DAPI (**grün**) anti-CD68-Antikörper. Milz als Positivkontrolle. Messbalken = 100 μ m. Repräsentative 10- μ m-Querschnitte der Nn. ischiadici. n = 3.

III.3 Keine verstärkte Infiltration CD68-positiver Zellen in Nervi ischiadici

CD68-positive Zellen, wie z.B. Makrophagen, wurden in Nervi ischiadici nach vier und acht Wochen immunohistochemisch angefärbt. Als Positivkontrolle wurden in jedem Versuchsdurchlauf Querschnitte der Milz verwendet. Nerven beider

Versuchsgruppen wiesen insgesamt ein sehr spärliches Fluoreszenzsignal des anti-CD68-Antikörpers auf. Eine Anhäufung von CD68-positiven Zellen nach vier bzw. acht Wochen ließ sich nicht beobachten (siehe Abbildung 15).

III.4 Unveränderte Expression der Tight-Junction-Proteine in N. ischiadicus, DRG und SPC

Mittels RTQ-PCR wurde die Expression wichtiger Tight-Junction-Proteine im N. ischiadicus, in DRGs und im SPC untersucht. Im Gegensatz zur LMD-Methode wurde jeweils das gesamte entnommene Gewebe verarbeitet. Die Expression der Tight-Junction-Proteine unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen in den untersuchten Geweben vier und acht Wochen nach Diabetesinduktion nicht signifikant (siehe Abbildung 16). *Tjp1* jedoch wies eine signifikant verminderte Expression im SPC nach vier Wochen auf. Dies sollte vor dem Hintergrund einer breiteren Streuung der Ergebnisse im SPC betrachtet werden.

III.5 Verminderte Expression von *Cldn1* im Perineurium acht Wochen nach STZ-Gabe

Um die Expression der Tight-Junction-Proteine Kompartiment-spezifisch in endoneuralen Kapillaren bzw. im Perineurium betrachten zu können, wurden Laser-mikrodissektionen durchgeführt.

Endoneurale Gefäße wurden dabei histomorphologisch identifiziert. Um eventuelle Schwankungen der korrekten Auswahl der Gefäße auszuschließen, wurde die Expression des Gefäßmarkers *Vwf* getestet. Hier bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, sodass eine Normalisierung auf *Vwf* durchgeführt wurde.

Es zeigte sich eine signifikante Mindereexpression von *Cldn1* im Perineurium und von *Cldn5/Vwf* in endoneuralen Kapillaren bei STZ-induzierter Polyneuropathie nach acht Wochen (siehe Abbildung 17).

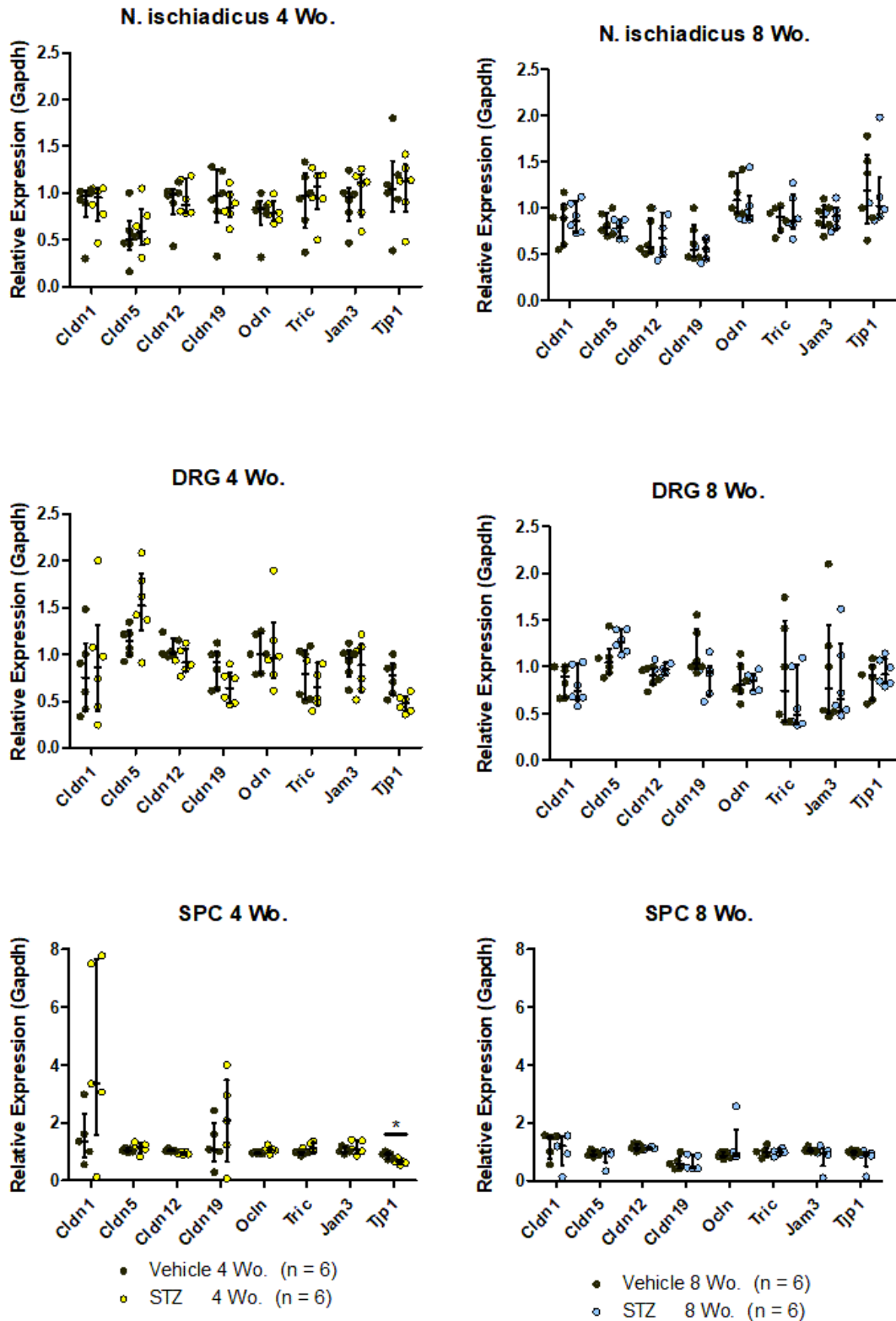


Abbildung 16: Unveränderte Expression der Tight-Junction-Proteine in N. ischiadicus, DRG und SPC

Relative Expression der Tight-Junction-Proteine in N. ischiadicus, DRG und im SPC (RTQ-PCR). Kontrollgen ist *Gapdh*. Graphisch dargestellt wurden individuelle Messergebnisse der diabetischen Gruppe (STZ) und der Kontrollgruppe (Vehicle) mit Median und Interquartilsabstand. T-Test mit Bonferroni-Korrektur/ Mann-Whitney-U-Test, * = $p < 0,05$. $n = 6$.

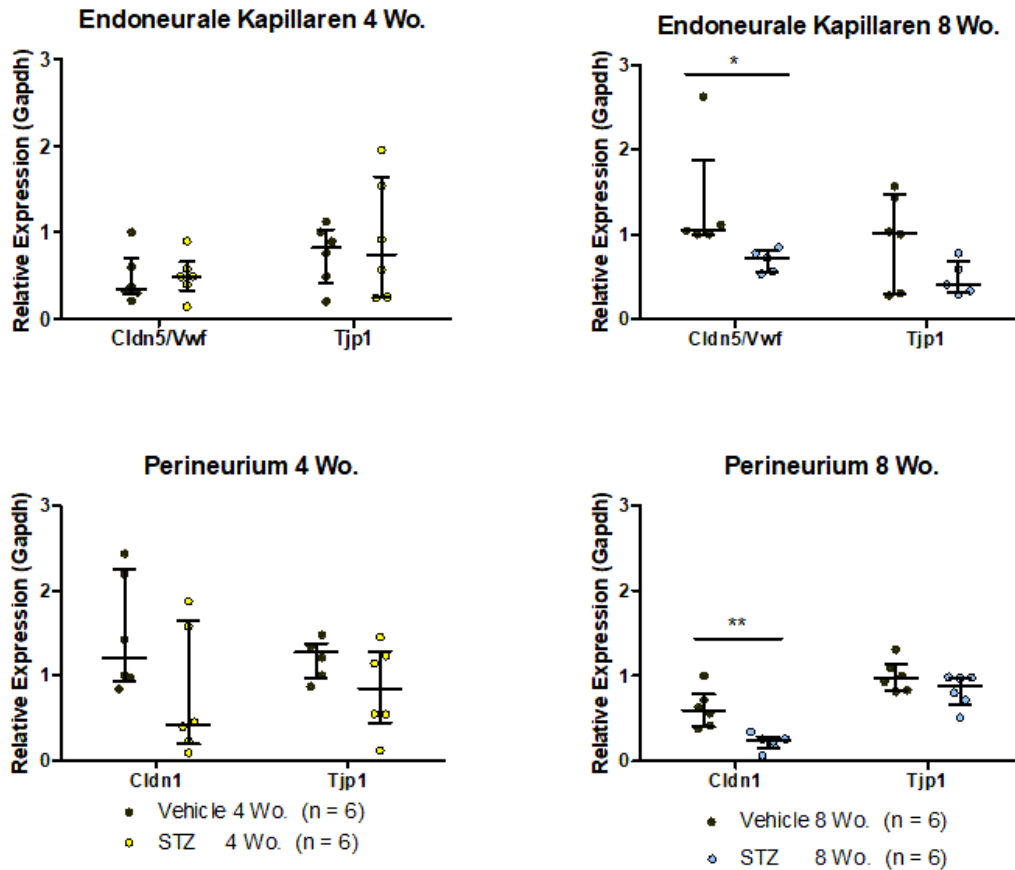


Abbildung 17: Verminderte Expression von *Cldn1* perineural und *Cldn5* in endoneuralen Kapillaren bei STZ-induzierter Polyneuropathie nach acht Wochen

Relative Expression der Tight-Junction-Proteine in seziierten endoneuralen Gefäßen bzw. Perineuria aus dem N. ischiadicus. RTQ-PCR-Daten. Kontrollgen = *Gapdh*. Die Expression der untersuchten Tight-Junction-Proteine wies keine signifikanten Änderungen nach vier Wochen auf. Graphisch dargestellt wurden individuelle Messergebnisse der diabetischen Gruppe (STZ) und der Kontrollgruppe (Vehicle) mit Median und Interquartilsabstand. T-Test mit Bonferroni-Korrektur/ Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. $n = 6$.

IV Diskussion

IV.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine experimentelle Form der schmerzhaften diabetischen Polyneuropathie bei Typ I Diabetes mellitus wurde durch STZ-Injektion in männlichen Wistar-Ratten modelliert. Kontrolltiere erhielten eine Injektion des Lösungsmittels (Vehicle). In der STZ-Gruppe manifestierte sich bereits nach zweiwöchiger Krankheitsdauer eine mechanische Hyperalgesie als messbares Korrelat neuropathischer Schmerzen. Hinweise auf eine Permeabilitätssteigerung der BNB für die makromolekulare Testsubstanz EBA (69 kDa) ergaben sich in Pilotstudien weder nach intravenöser Injektion noch nach perineuraler Applikation. Unter Verwendung der fluoreszierenden Testsubstanz Fluorescein-Natrium (376 Da) zeigte sich nach acht Wochen sowohl nach intravenöser Injektion als auch nach perineuraler Applikation eine signifikante Anreicherung im Endoneurium. Somit besteht bei STZ-induzierter Polyneuropathie eine selektive Permeabilitätssteigerung der BNB für niedermolekulare Verbindungen, die sich zeitlich deutlich nach dem Beginn der mechanischen Hyperalgesie manifestiert.

Ansammlungen von CD68-positiven Zellen im Sinne einer Makrophageninfiltration wurden in Nervenquerschnitten zu keinem Untersuchungszeitpunkt beobachtet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die molekulare Zusammensetzung der Tight Junctions in unterschiedlichen Geweben der Schmerzbahn evaluiert. So wurde im peripheren Nerv (N. ischiadicus), in lumbalen Spinalganglien und im Rückenmark mittels RTQ-PCR die Expression wichtiger abdichtender Tight-Junction-Proteine gemessen. Signifikante Änderungen wurden nicht nachgewiesen. Da geringfügige Expressionsänderungen, die sich Kompartiment-spezifisch (z.B. im Perineurium oder in endoneuralen Kapillaren) abspielen, in den vorigen Experimenten nur unzureichend erfasst wurden, wurde die Lasermikrodissektion etabliert. Hierdurch gelang es, die Expression essenzieller Tight-Junction-Proteinen spezifisch in endoneuralen Kapillaren und im Perineurium des N. ischiadicus zu quantifizieren. Nach acht Wochen bestand eine signifikante Expressionsreduktion von *Cldn1* im Perineurium und von *Cldn5/Vwf* in endoneuralen Kapillaren.

IV.2 Methodendiskussion

IV.2.1 Permeabilitätstests

Die Permeabilität der BNB wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die intravenöse Injektion bzw. nach perineuraler Applikation fluoreszierender Testsubstanzen bewertet. Die gewählten Methoden sind gut etabliert und erlauben gezielte Rückschlüsse auf die Funktionalität des Perineuriums (nach perineuraler Applikation) bzw. der endoneuralen Gefäße (nach intravenöser Injektion). Kritisch zu erwähnen ist die Abhängigkeit der endoneuralen Fluoreszenzintensität von der Zirkulationszeit und Dosierung der Testsubstanzen. Dieser Tatsache wurde durch eine einheitliche Zirkulationszeit und die Verwendung einer körperrgewichtsadaptierten Dosierung begegnet. Fluorochrome können unter Lichteinfall ausbleichen. Daher wurden Proben stets lichtgeschützt gelagert und zeitnah mikroskopisch erfasst. Nach perineuraler Applikation ist ein Eindringen der Testsubstanzen durch die beiden Präparationsenden des Nervs und ggf. durch präparationsbedingte Schädigungen des Perineuriums möglich. Aus diesem Grund wurde bei der Erstellung der Gewebedünnschnitte ein ausreichender Abstand zu den Präparaträndern gewählt. Die Gewebeschnitte wurden vor der Analyse auf die Intaktheit des Perineuriums geprüft. Ferner ist kritisch zu bewerten, dass die Analyse nach manueller Markierung des Endoneuriums und des Hintergrundes erfolgte. Um hierbei eine größtmögliche Objektivierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Markierungen im Hellfeldbild erstellt und erst in einem zweiten Schritt auf die Fluoreszenzbilder übertragen. Die gewählten Methoden erlauben einen Rückschluss auf parazelluläre Transportwege. Transzelluläre Transportwege werden aufgrund der kurzen Zirkulationszeit respektive der ex-vivo-Anwendung nicht ausreichend abgebildet.

Alternativ ist eine Prüfung der Funktionalität der BNB durch die Verwendung fluoreszierender Dextrane oder Meerrettichperoxidase möglich. Meerrettichperoxidase lässt sich lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch darstellen. Die Elektronenmikroskopie erlaubt Rückschlüsse auf transzelluläre Transportwege im Sinne eines Nachweises intrazellulärer Vesikel oder phagozytierter Partikel. Des Weiteren eignet sich auch eine immunhistochemische Anfärbung von Fibrinogen zur Überprüfung der Intaktheit der BNB. Fibrinogen als Gerinnungsfaktor ist im physiologischen Zustand endoneural nicht nachweisbar und daher als endogener Marker geeignet. Fibrinogen hat zudem eine proinflammatorische Funktion und löst nach intraneuraler Applikation eine mechanische Hyperalgesie aus (Lim et al., 2014). Der Nachweis von endoneuralem Fibrinogen erlaubt einen Rückschluss auf die Öffnung

der BNB, der unbeeinflusst von etwaigen Dosisschwankungen oder Zirkulationszeiten eines Tracers ist. Ein para- und transzellulärer Transport des Proteins ist denkbar und somit der Nachweis nicht spezifisch.

Beim Menschen lässt sich mittels MRT ein endoneurales Ödem als indirektes Korrelat einer Barrierestörung feststellen (Pham et al., 2011). Kontrastmittel-induzierte Signalverstärkungen nach Öffnungen der BNB können unter Verwendung von Gadofluorine beobachtet werden (Weise and Stoll, 2012).

Zusammenfassend bieten sich mehrere Möglichkeiten, die Permeabilität der BNB zu erfassen. Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der getesteten Molekulargröße, des Schwerpunktes auf trans- bzw. parazelluläre Transportwege sowie des Fokus auf das Perineurium bzw. auf die endoneuralen Gefäße. Idealerweise sollte eine Kombination mehrerer Verfahren durchgeführt werden, um eine differenzierte Darstellung der Permeabilität zu erlangen.

IV.2.2 mRNA-Expression

Die Genexpression der Tight Junction-Proteine wurde in dieser Arbeit mittels RTQ-PCR gemessen. Es handelt sich hierbei um eine sehr sensitive Methode, bei der bereits geringe Probenmengen für einen qualitativen Expressionsnachweis ausreichen. Durch die Verwendung gut designter Primer bzw. durch die Verwendung von Taqman-Sonden kann zudem eine hohe Spezifität erreicht werden. Eine unspezifische Amplifikation und die Bildung von Primerdimeren ließ sich mithilfe von Schmelzkurven ausschließen. Quantitative Aussagen lassen sich durch einen rechnerischen Vergleich zu konstant exprimierten Kontrollgenen treffen. Dies ist unter der Annahme gleicher Amplifikationsgeschwindigkeiten möglich. Zum Ausschluss der Amplifikation von genomischer DNA wurden entweder No-Reverse-Transkriptase-Kontrollen durchgeführt oder die Proben mit DNasen behandelt.

Die Methode wird unter der Annahme angewendet, dass die Anzahl der mRNA-Kopien einer Zelle mit der Anzahl der Proteinkopien korreliert. Neben der Transkription, der „Übersetzung“ von DNA in RNA-Sequenzen, sind aber noch weitere Prozesse an der Genexpression beteiligt. Im Wesentlichen sind dies: Prozessieren/Degradation der RNA, Translation und Prozessieren/Degradation von Proteinen. Laut Schwanhäusser et al. existiert ein Determinationskoeffizient von gut 40 % zwischen der Anzahl der mRNA-Kopien und der Anzahl der Protein-Kopien in einer murinen Zelllinie (Schwanhäusser et al., 2011). Obwohl dieser Koeffizient von Spezies und Methodenauswahl abhängt (Maier et al., 2009), unterstreicht er die Notwendigkeit

Expressionsmessungen mit Messungen der Proteinexpression zu untermauern. Hierfür kann in Folgeexperimenten beispielsweise auf die Methoden Western Blot oder auf immunhistochemische Färbungen zurückgegriffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich nach LMD eine verminderte *Cldn5*-mRNA-Expression in endoneuralen Kapillaren nachweisen. Die Proteinexpression im Western-Blot sowie in immunhistochemischen Färbungen war nicht signifikant verändert (Ben-Kraiem et al., 2021). Erklären ließen sich diese Differenzen zwischen mRNA- und Proteinexpression durch einen gesteigerten Proteinabbau, eine gesteigerte Sekretion in extrazelluläre Vesikel oder eine beginnende Minderexpression, die verzögert zu einer Änderung der Proteinexpression führt. Zur Klärung könnten Experimente im weiteren Krankheitsverlauf durchgeführt werden.

Die traditionelle RTQ-PCR erlaubt keine Aussage zur räumlichen Verteilung der Expression, weswegen die Lasermikrodissektion durchgeführt wurde. Alternativ wäre in dieser Hinsicht eine In-situ-Hybridisierung denkbar.

IV.2.3 LMD zur selektiven Analyse einzelner Kompartimente

LMD ermöglicht eine Kompartiment-spezifische Expressionsanalyse. Drei wesentliche Schritte der Methode sind das Erkennen der relevanten Strukturen, das Herausschneiden mittels UV-Laser und das Herauslösen aus dem umgebenden Gewebe (Espina et al., 2006). Hieraus ergeben sich Limitationen der Technik:

Die gewählte Färbemethode (Toluidinblau) ermöglicht die Auswahl von Perineurium und endoneuralen Kapillaren nach rein morphologischen Gesichtspunkten. Spezifischer wären immunhistochemische Färbemethoden mit einem Endothelmarker oder die Anfärbung mit Lektinen (Mojsilovic-Petrovic et al., 2004). Färbemethoden müssen jedoch schnell durchführbar sein, um signifikante RNA-Degradationen zu vermeiden, und mit dem RNA-Extraktionsverfahren kompatibel sein. Deshalb fiel die Wahl auf die im Partnerlabor bereits etablierte Färbemethode mit Toluidinblau. Um eine ähnliche Trefferquote in beiden Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurde die Expression des Endothelmarkers vWF bestimmt. Die Expression von vWF wies keine signifikanten Änderungen zwischen den Versuchsgruppen auf, sodass von einer akkuraten Auswahl der Kapillaren ausgegangen werden konnte und eine Normalisierung auf *Vwf* durchgeführt wurde.

Prinzipiell muss damit gerechnet werden, dass Zellen, die sich unmittelbar im Strahl des Lasers befinden, geschädigt werden. Um die relevanten Strukturen zu schonen, wurde beim Herausschneiden immer ein kleiner Sicherheitsabstand eingehalten.

Trotz großer Sorgfalt ließen sich nicht ausnahmslos alle ausgeschnittenen Strukturen vom Objektträger lösen. Dies bedeutet eine vernachlässigbare Fehlerquelle, da der Effekt selten und in beiden Versuchsgruppen gleichmäßig auftrat.

Der gesamte Prozess gestaltet sich insgesamt aufwendig und erbringt geringe RNA-Mengen. Trotz größter Sorgfalt bei der Probengewinnung und einer gezielten Anpassung der RTQ-PCR-Methode (Verwendung von TaqMan-Sonden) sollte dies bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Eine Kompartiment-spezifische Expressionsanalyse der Proteine ließe sich durch immunhistochemische Färbungen realisieren.

IV.3 Ergebnisdiskussion

IV.3.1 Öffnung der BNB für niedermolekulare Verbindungen

Periphere Nervenläsionen zur Modellierung neuropathischer Schmerzen gehen mit einer raschen Öffnung der BNB für groß- und niedermolekulare Stoffe einher (Lim et al., 2014; Moreau et al., 2016). Im Gegensatz dazu besteht im STZ-Modell eine selektive Öffnung für niedermolekulare Verbindungen, die erst im späteren Krankheitsverlauf auftritt.

Eine Öffnung der BNB für Makromoleküle konnte in einer Pilotstudie unter Verwendung von EBA bei STZ-induzierter Polyneuropathie nicht nachgewiesen werden. Weitere Experimente der Arbeitsgruppe konnten diese Beobachtung durch immunhistochemische Färbungen von Fibrinogen bestätigen (Ben-Kraiem et al., 2021). In dieser Hinsicht besteht weitestgehend Übereinstimmung mit Ergebnissen der Literatur in Modellen für T1DM. Eine gesteigerte Durchlässigkeit der BNB für EBA wurde im Alloxan-Rattenmodell (Seneviratne, 1972) einmalig beschrieben, ließ sich jedoch in Folgeexperimenten nicht reproduzieren. Beispielhaft seien hier Studien im STZ-Modell (Jakobsen et al., 1978; Kihara et al., 1991; Sima and Robertson, 1978), im Alloxan-Rattenmodell und nach Galaktose-Intoxikation im Rattenmodell (Malmgren et al., 1979) genannt. Heterogener ist die Studienlage bei Modellen für T2DM (Chapouly et al., 2016; Sima and Robertson, 1978). Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Tabelle 14: Studien zur Permeabilität der BNB bei DPN

In dieser Arbeit zitierte Werke, die sich mit der Permeabilität der BNB in verschiedenen Modellen für diabetische Polyneuropathie beschäftigen, werden hier übersichtsweise dargestellt.

Studie	Modell	Verwendete Testsubstanz	Testzeitpunkt (nach Diabetesinduktion)	Ergebnis
(Jakobsen et al., 1978)	STZ (40-45 mg/kg KG i.v.) Wistar-Ratten	EBA (70 kDa) i.v. Meerrettichperoxidase (40 kDa) i.v. Cytochrom C (12 kDa) i.v.	4 - 20 Wochen	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Kihara et al., 1991)	STZ (65 mg/kg KG i.p.) Sprague-Dawley Ratten	¹²⁵ I-markiertes Albumin i.v.	8, 16 Wochen	Keine Änderung des Permeabilitäts-Oberflächen-Koeffizienten
(Sima and Robertson, 1978)	STZ (45 und 60 mg/kg KG) Wistar-Ratten	Meerrettichperoxidase i.v./perineural	19 Wo.	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Sima and Robertson, 1978)	Alloxan (45 mg/kg KG) Wistar-Ratten	Meerrettichperoxidase i.v./perineural	19, 56 Wo.	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Sima and Robertson, 1978)	Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse	EBA	20, 28 Wo.	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Sima and Robertson, 1978)	Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse	Meerrettichperoxidase i.v./perineural	10 Wo.	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Malmgren et al., 1979)	Fütterung mit 40 % Galaktose Wistar-Ratten	Meerrettichperoxidase (40 kDa) i.v.	4, 22 Wo.	Kein Nachweis der Testsubstanz im Endoneurium
(Seneviratne, 1972)	Alloxanmonohydrat (150 mg/kg KG) Ratten	EBA i.v. und perineural	> 4 Wochen	Gesteigerte Extravasation/Penetration in das Endoneurium
(Rechthand et al., 1987)	STZ (65 mg/kg KG i.v.) Sprague-Dawley Ratten	[¹⁴ C]Mannitol (182 Da) i.v.	9 Monate	Signifikante Steigerung des Permeabilitäts-Koeffizienten in der STZ-Gruppe

Eigene Ergebnisse belegen eine signifikant erhöhte Permeabilität der BNB für die niedermolekulare Testsubstanz Fluorescein-Natrium nach achtwöchiger Krankheitsdauer in vivo und ex vivo. Nach vier Wochen bestand kein statistisch signifikanter Effekt im in vivo Versuch. Auch die Pilotstudie nach vier Wochen zeigte ex vivo keine verstärkte endoneurale Anreicherung. Eine Öffnung für Mannitol (182 Da) wird nach 9-monatiger Krankheitsdauer im STZ-Modell beschrieben (Rechthand et al., 1987). Diese Ergebnisse sprechen für eine selektive Störung der BNB im STZ-Modell, die auf niedermolekulare Substanzen beschränkt ist und längere Zeit nach Diabetesinduktion auftritt.

Diese selektive Öffnung der endoneuralen Kapillaren und des Perineuriums tritt zu einem vergleichsweise späten Zeitpunkt auf – einige Wochen nach dem Beginn mechanischer Hyperalgesie. Hieraus lässt sich folgern, dass die Öffnung der BNB keine direkte Ursache für das Auftreten neuropathischer Schmerzen ist. Vielmehr könnte sie an der Aufrechterhaltung eines gestörten endoneuralen Milieus beteiligt sein, zur Schädigung der Nervenfasern beitragen und somit eher für eine Aufrechterhaltung der Schmerzen verantwortlich sein.

IV.3.2 Neuroinflammation

Die Rollen endoneuraler Makrophagen im gesunden und im erkrankten Nervensystem sind vielfältig. Zum einen werden sie als pathologische Effektorzellen bei immun-vermittelten Neuropathien angesehen (Klein and Martini, 2016). Sie fungieren hier als Antigen-präsentierende Zellen und können eine direkte Demyelinisierung hervorrufen. Die diabetische Polyneuropathie ist keine klassische immun-vermittelte Neuropathie. Eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen im N. ischiadicus konnte im Rahmen meiner Arbeit im STZ-Modell zu keinem Untersuchungszeitpunkt beobachtet werden. Dies deckt sich mit Daten aus humanen Proben. Eine Infiltration von Makrophagen lässt sich sehr selten bei Patienten mit DPN nachweisen, regelhaft jedoch bei Patienten mit diabetischen Radikulo- oder Plexopathien (Said et al., 2003). Letztere gehören zu den selteneren Formen der diabetischen Neuropathien, weisen immun-vermittelte Aspekte auf und sollten in der Forschung gesondert betrachtet werden. Im STZ-Modell führt eine systemische Makrophagen-Depletion zu einem verspäteten Auftreten von mechanischer Allodynie. Zeitgleich wird eine verminderte Schädigung der β -Zellen im Pankreas beobachtet (Mert et al., 2009). Ob die Makrophagendepletion einen direkten Einfluss auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen hat oder ob ein indirekter Einfluss vermittelt durch die verminderte Hyperglykämie im Vordergrund steht, bleibt bei dieser Studie offen.

Nach peripheren Nervenverletzungen initiieren Makrophagen den physiologischen Reparaturprozess, indem sie Myelinfragmente entfernen (Klein and Martini, 2016). Nach STZ-Gabe sinkt die Anzahl endoneuraler Makrophagen vorübergehend, erreicht 13 Wochen nach Diabetesinduktion jedoch wieder physiologische Werte (Hidmark et al., 2017). Dies könnte mit einer verminderten regenerativen Kapazität einhergehen. Eine weitere positive Rolle üben Gefäß-assoziierte Makrophagen aus. Sie halten das endoneurale Milieu aufrecht, in dem sie durch die BNB getretene Substanzen in sekundärer Instanz aufnehmen (Malong et al., 2019). Im STZ-Modell werden signifikant weniger Gefäß-assoziierte Makrophagen beobachtet, was mit der gesteigerten Extravasation von Fluoreszein-Natrium zeitlich korreliert (Ben-Kraiem et al., 2021). Dies deutet auf eine protektive Funktion Gefäß-assoziiierter Makrophagen hin. Der Effekt einer Makrophagendepletion auf die Barrierefunktion und die Expression der Tight-Junction-Proteine wäre ein spannender Ansatz für zukünftige Versuche.

IV.3.3 Relevanz der Tight-Junction-Proteine

Cldn1 wird im Perineurium von Menschen (Pummi et al., 2004) und Ratten (Sauer et al., 2014) exprimiert. Im chronic-constriction-Modell für neuropathischen Schmerz zeigen sich quantitative und qualitative Veränderungen von *Cldn1* im peripheren Nerv (Reinhold et al., 2018). Eine gezielte Ausschaltung des Proteins via Peptidomimetikum führt zur Öffnung der perineuralen BNB (Sauer et al., 2014). Dabei werden weder nozizeptives Verhalten (mechanische oder thermische Hypersensibilität) noch inflammatorische Reaktion im Sinne einer Makrophageninvasion ausgelöst. Epidermale Tight Junctions in einem *Cldn1*-KO-Modell sind für einen mittelgroßen Tracer (600 Da) durchlässig (Furuse et al., 2002).

Cldn1 ist sowohl für die Intaktheit der epidermalen Barriere als auch des Perineuriums essenziell. Im ganzen Nerv STZ-diabetischer Ratten zeigte sich keine Veränderungen der *Cldn1*-Expression. Da *Cldn1* auch von Schwannzellen und endoneuralen Gefäßen exprimiert wird (Reinhold and Rittner, 2017), wurde die spezifische Expression im Perineurium mittels LMD untersucht. Eine Herabregulation von *Cldn1* acht Wochen nach STZ-Gabe konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Eine verminderte Proteinexpression im Perineurium untermauerte diese Beobachtung und könnte ursächlich für die gesteigerte Permeabilität des Perineuriums im späteren Krankheitsverlauf nach STZ-Induktion sein (Ben-Kraiem et al., 2021).

Cldn1 kann durch rekombinanten gewebsspezifischen Plasminogenaktivator via LRP-1 und micro-RNA-183 (Yang et al., 2016) oder durch

Matrixmetalloproteinase 9 via LRP-1 (Hackel et al., 2012) herabreguliert werden. Glykogen-Synthase-Kinase-3-Inhibitor führt via wnt-Signalweg zu einer verstärkten Expression (Sauer et al., 2014). Eine Therapieversuch mit Glykogen-Synthase-Kinase-3 oder micro-RNA-183-Antagomir bei STZ-induzierter Polyneuropathie wäre denkbar.

Cldn5 kommt spezifisch in Tight Junctions der Endothelien vor (Morita et al., 1999) und gehört zu den abdichtenden Claudinen (Günzel and Yu, 2013). In *Cldn5*-KO-Mäusen wird eine selektive Öffnung der Blut-Hirn-Schranke für Proteine < 800 Da beobachtet (Nitta et al., 2003). Die Öffnung der BNB in einem Modell für T2DM geht mit einer verminderten Expression von *Cldn5* einher (Chapouly et al., 2016). Ähnliche Effekte ließen sich im STZ-Modell im kompletten N. ischiadicus nicht nachweisen. In der gezielten Analyse endoneuraler Kapillaren mittels Lasermikrodissektion wurde jedoch eine verminderte Expression von *Cldn5* gezeigt. Die Proteinexpression blieb dabei unverändert (Ben-Kraiem et al., 2021). Ob es sich somit um eine Gegenregulation bei gesteigertem Umsatz des *Cldn5*-Proteins oder um eine beginnende Minderexpression, die sich im weiteren Krankheitsverlauf manifestiert, handelt, bleibt offen. Eine Aktivierung des Hedgehog-Signalweges durch Smoothened Agonist führt in einem T2DM-Modell zur verstärkten Expression von *Cldn5* (Chapouly et al., 2016). Ein Therapieversuch mit Sonic-Hedgehog-IgG-Fusionsprotein wurde bei STZ-induzierter Polyneuropathie bereits erfolgreich durchgeführt (Calcutt et al., 2003).

Cldn12 wird von Schwannzellen im Bereich der Schmidt-Lantermann-Einkerbungen (Reinhold and Rittner, 2017) und geringfügig im Perineurium (Chen et al., 2019) exprimiert. Knockout des Gens resultiert in einer Öffnung der perineuralen Barriere und der Myelinbarriere für große Moleküle (EBA 69 kDa/FITC Dextran 70 kDa) bei männlichen Mäusen. *Cldn12* erhält die Dichtigkeit gegenüber größeren Molekülen (> 800 Da) unter *Cldn5*-KO aufrecht (Nitta et al., 2003). *Cldn12*-KO führt zu einer geschlechtsabhängigen Steigerung von nozizeptivem Verhalten (Chen et al., 2019).

Im STZ-Modell zeigten sich nach vier- oder achtwöchiger Krankheitsdauer keine signifikanten Änderungen von *Cldn12*. Dies untermauert die Beobachtung einer intakten Barrierefunktion für Makromoleküle.

Cldn19 wird von Schwannzellen in der paranodalen Region und im Mesaxon exprimiert (Reinhold and Rittner, 2017). Es übt eine abdichtende Funktion aus (Günzel and Yu, 2013). *Cldn19*-KO führt zu motorischen Defiziten, die einer peripheren

Neuropathie ähneln (Reinhold and Rittner, 2017). Die Expression von *Cldn19* erwies sich in der STZ-Gruppe nicht als beeinflusst.

Ocln ist ein transmembranäres Tight-Junction-Protein, das unter anderem im Perineurium (Pummi et al., 2004) und in endoneuralen Kapillaren (Hirase et al., 1997) vertreten ist. *Ocln*-KO führt im Mausmodell nicht zu einer Änderung der Ionenpermeabilität, sodass von einer funktionellen Redundanz oder einer untergeordneten Rolle des Proteins in Bezug auf die Organisation der Tight Junctions ausgegangen wird (Schulzke et al., 2005). *Ocln* ist vor allem für die Dichtigkeit gegenüber Makromolekülen verantwortlich (Al-Sadi et al., 2011). Die erhaltene Expression von *Ocln* nach STZ-Gabe passt zur Intaktheit der BNB für Makromoleküle.

JAM-C/Jam3 wird von Endothelzellen, in Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und in der paranodalen Region von Schwannzellen exprimiert (Avari et al., 2012; Scheiermann et al., 2007). Es ist für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Myelinscheiden relevant. *Jam3*-KO führt zu reduzierter Nervenleitfähigkeit und muskulärer Schwäche als Zeichen einer vorrangigen Beteiligung myelinisierter Fasern (Scheiermann et al., 2007). Eine verminderte Expression von JAM-C tritt bei peripheren Nervenläsionen im Tiermodell (Avari et al., 2012; Reinhold et al., 2019) und bei Patienten mit CIDP (Scheiermann et al., 2007) auf. Die *Jam3*-Expression bei STZ-induzierter Polyneuropathie war nicht-signifikant verändert im ganzen N. ischiadicus nach vier oder acht Wochen. Da Demyelinisierungen und motorische Ausfälle erst relativ spät im Krankheitsverlauf der DPN auftreten wären hier Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt von Interesse.

Ähnlich wie *Cldn19* wird **Tric** von Schwannzellen und zusätzlich im Perineurium exprimiert (Reinhold and Rittner, 2017). Es ist wesentlicher Bestandteil trizellulärer Tight Junctions (Krug et al., 2014). In funktioneller Redundanz mit *Ocln* dichtet es parazelluläre Wege für Makromoleküle ab (Krug et al., 2014). Die stabile Expression bei STZ passt gut mit der erhaltenen BNB-Funktion gegenüber EBA zusammen.

ZO-1/Tjp1 ist ein zytoplasmatisches Ankerprotein. Es bestimmt mit ZO-2 den Ort der Claudin-Polymerisation (Umeda et al., 2006). In der BNB findet sich ZO-1 im Perineurium, in endoneuralen Kapillaren und in den Myelinscheiden (Reinhold and Rittner, 2017). Nach experimentellen peripheren Nervenläsionen (Reinhold et al., 2018) und bei CIDP (Kanda et al., 2004) weist ZO-1 ein pathologisches Verteilungsmuster auf. Bei STZ-induzierter Polyneuropathie zeigte sich eine normale *Tjp1*-Expression.

Bei STZ-induzierter Polyneuropathie bestand eine Kompartiment-spezifische *Cldn1*-Minderexpression im Perineurium, die mit einer Öffnung der perineuralen Barriere für eine niedermolekulare Testsubstanz zeitlich korrelierte. *Cldn5*-mRNA war vermindert nachweisbar, die Proteinexpression blieb jedoch erhalten. Die Expression der TJP, die in Myelinscheiden lokalisiert sind (*Cldn12*, *Cldn19*, *JAM-C*, *ZO-1*), war nicht signifikant verändert. Ebenso wenig zeigte sich eine signifikante Reduktion der TJP, die eine abdichtende Funktion für Makromoleküle besitzen (*Cldn12*, *Ocln*, *Tric*).

IV.3.4 Möglichkeiten einer Modulation der Barrierefunktion

Neben einer Herabregulation abdichtender Tight-Junction-Proteine ist eine pathologische Umstrukturierung, Internalisation oder Sekretion dieser Proteine als Ursache einer Barriereöffnung zu bedenken. Nach peripherer Nervenläsion zeigt sich neben einer Minderexpression von *Cldn1* und *Tjp1* auch eine pathologische Verteilung beider Proteine (Reinhold et al., 2018). Hinweise auf eine strukturelle Beeinträchtigung der BNB im Rahmen der DPN gibt eine elektronenmikroskopische Analyse der Tight Junctions des Perineuriums in Nervus-suralis-Biopsien von Patienten (Beamish et al., 1991). Eine pathologische Umverteilung von *Cldn5* und *Ocln* kann in zerebralen Kapillaren eines STZ-Mausmodells gezeigt werden (Rom et al., 2020). Rom et al. postulieren, dass eine gesteigerte Sekretion dieser Tight-Junction-Proteine in extrazellulären Vesikeln eine Modulationsmöglichkeit der Barrierefunktion sei.

Neben parazellulären spielen auch transzelluläre Transportwege eine Rolle bei der Überwindung endothelialer Barrieren (Bazzoni, 2006). Die Permeabilität der BNB für glykiertes Albumin, Nerve growth factor und Immunglobulin-G im Vergleich zu den jeweiligen nicht-glykierten Proteinen ist gesteigert (Poduslo and Curran, 1992; Poduslo and Curran, 1994). Eine verstärkte endozytotische Aufnahme glykierter Plasmaproteine wird als Erklärung hierfür diskutiert (Mizisin and Weerasuriya, 2011).

Im STZ-Modell korreliert eine perineurale Minderexpression von *Cldn1* und die Verminderung Gefäß-assoziiierter Makrophagen mit der gesteigerten Permeabilität. Aufgrund der Literaturlage erscheint darüber hinaus ein Zusammenspiel gestörter parazellulärer und transzellulärer Transportwege wahrscheinlich.

IV.3.5 Einfluss der Barriereöffnung auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen im Tiermodell

Eine alleinige Öffnung der BNB führt nicht zur Entstehung neuropathischer Schmerzen (Reinhold et al., 2019; Sauer et al., 2014). In Kombination mit einem zweiten Ereignis, wie z.B. dem Eindringen algetischer Substanzen aus der Blutzirkulation, spielt die Öffnung der BNB eine zentrale Rolle in der Schmerzentstehung (Lim et al., 2014). Bei der Übertragung auf das STZ-Modell sind jedoch wesentliche Unterschiede im Zeitverlauf und der Art der Barriereöffnung zu beachten.

Die Öffnung der BNB nach peripheren Nervenläsionen ist ein Phänomen der ersten Stunden bis Tage nach der Verletzung (Lim et al., 2014; Moreau et al., 2016). Mechanische Allodynie tritt in einem ähnlichen Zeitraum auf. Im STZ-Modell sprechen die zeitliche Differenz zwischen dem ersten Auftreten mechanischer Allodynie und der erhöhten Permeabilität der BNB gegen einen direkten kausalen Zusammenhang. Vielmehr könnte die Störung der Barrierefunktion das Schmerzverhalten aufrechterhalten und/oder zur weiteren Schädigung sensorischer Neurone beitragen. Um gezieltere Aussagen treffen zu können, wäre einerseits die Verwendung eines Tiermodelles mit einer schmerzlosen Form der diabetischen Polyneuropathie als Kontrolle wünschenswert. Zum anderen wäre ein Therapieversuch mit Modulatoren der Cldn-1-Expression denkbar.

IV.4 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen

Die STZ-induzierte Polyneuropathie ist ein gut etabliertes Modell der schmerzhaften diabetischen Polyneuropathie bei T1DM. Vor der Übertragung der Forschungsergebnisse auf den Menschen müssen der Diabetes-Typ, die Nachweismethoden neuropathischer Schmerzen im Tiermodell, sowie die experimentelle Induktion der Hyperglykämie beachtet werden.

Die Effektivität einer strikten Blutglukosekontrolle zur Prävention einer DPN bei T1DM ist wissenschaftlich gut belegt. Die Datenlage bei T2DM ist weniger eindeutig (Callaghan et al., 2012b). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei Krankheitsentitäten handelt. Risikofaktoren wie Adipositas oder Dyslipidämie, die bei T2DM mit der Entstehung einer DPN korrelieren (Andersen et al., 2018), werden im STZ-Modell nicht abgebildet. Mit einer Prävalenz von 85 % ist T2DM jedoch bei Menschen die vorherrschende Untergruppe (Forouhi and Wareham, 2019). Daher wäre weitere Forschung mit T2DM-Modellen wünschenswert.

Spontan auftretende brennende, elektrische oder einschießende Schmerzen sind ein typisches Merkmal der schmerzhaften DPN (Callaghan et al., 2012a). Daneben treten auch evozierte Schmerzen auf. Im Tiermodell lässt sich evoziertes Schmerzverhalten, wie mechanische Allodynie oder thermische Hypersensibilität, leichter als spontane Schmerzen erfassen. STZ-Tiere weisen in der ersten Phase nach Induktion mechanische und teilweise thermische Hypersensibilität auf. Später folgt eine Phase der Hyposensibilität (Agarwal et al., 2018). Messmethoden für spontanen Schmerz im Tiermodell werden zunehmend entwickelt und genutzt. Beispiele hierfür sind Ganganalysen und Verhaltensänderungen der Tiere (Deuis et al., 2017). Es gibt Hinweise auf spontane Schmerzen in beiden Phasen der Erkrankung (Agarwal et al., 2018). Unter STZ-induzierter Hyperglykämie treten zudem pathologische Veränderungen des kortikospinalen Traktes und eine Verminderung der Repräsentationsfelder der unteren Extremitäten im primär-motorischen Kortex auf (Muramatsu et al., 2018). Eine primäre Beeinträchtigung motorischer Bahnen sollte bei der Interpretation von Verhaltenstests berücksichtigt werden. Insgesamt wird der bei Patienten vorherrschende Schmerzphänotyp jedoch ausreichend abgebildet.

Eine direkte neurotoxische Wirkung von STZ unter Auslösung einer thermischen Hyperalgesie wird diskutiert (Hidmark et al., 2017). Demgegenüber wird die progressive Entwicklung der STZ-induzierten Neuropathie betont, die nicht mit dem Verlauf einer akuten Neurotoxizität vereinbar sei (Biessels et al., 2014). Eine Verminderung der Immunzellen und insbesondere der Makrophagen im N. ischiadicus tritt bis zu drei Wochen nach Induktion der Hyperglykämie auf (Hidmark et al., 2017). In dieser Arbeit wurden STZ-Ratten zum Zeitpunkt von vier bzw. acht Wochen nach STZ-Gabe untersucht. In diesem Zeitraum kann ein möglicher direkter Einfluss von STZ auf das Schmerzverhalten als geringfügig angesehen werden.

IV.5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit beleuchtet Veränderungen der BNB bei STZ-induzierter schmerzhafter Polyneuropathie in einem funktionellen und translationalen Aspekt. Mittels Laser-mikrodissektion wurde die Expression essenzieller Tight-Junction-Proteine in endoneuralen Kapillaren und im Perineurium erstmals Kompartiment-spezifisch untersucht. Im Rahmen der STZ-induzierten DPN besteht eine selektive Öffnung der BNB für niedermolekulare Substanzen, die erst im späteren Krankheitsverlauf auftritt. Die Öffnung korreliert mit einer perineuralen Minderexpression von *Cldn1* und einer Verminderung gefäß-assoziiertes Makrophagen. Die Ergebnisse lassen klare Differenzen zu traumatischen Modellen für neuropathischen Schmerz erkennen.

Diese betreffen das Ausmaß und den zeitlichen Verlauf der Barriereöffnung sowie die inflammatorische Reaktion. Die Modulation der BNB zur Therapie der DPN bleibt ein spannender Ansatz für künftige Forschungen. Denkbar wäre hier beispielsweise die Modulation von micro-RNA-183, des wnt-Signalweges oder des Hedgehog-Signalweges.

Die große Frage, welche Patienten mit DPN neuropathische Schmerzen entwickeln und welche nicht, bleibt nach wie vor ungelöst. In neuen Studien gelingt es zunehmend, Patienten aufgrund bestimmter Merkmale in Subgruppen einzuteilen. Der bei diabetischer Polyneuropathie vorherrschende Phänotyp ist geprägt von Hyposensibilität („*deafferentation profile*“). Nur wenige Patienten weisen eine erhaltene Funktion unmyelinisierter Fasern mit gleichzeitiger Hyperalgesie auf („*irritable nociceptor profile*“) (Raputova et al., 2017; Themistocleous et al., 2016). Es wird postuliert, dass je nach Subgruppe spezifische pathophysiologische Vorgänge zur Schmerzentstehung führen (Baron et al., 2017). Ein bedeutendes Ziel für die Zukunft ist es, Patientengruppen zu definieren, die von spezifischen Therapieformen am meisten profitieren könnten.

V Zusammenfassung

Diabetische Polyneuropathie ist die häufigste Folgeerkrankung eines Diabetes mellitus. Bei ca. 20 % der betroffenen Patienten tritt eine schmerzhafte Form der Polyneuropathie auf. Neuropathische Schmerzen mindern die Lebensqualität Betroffener signifikant. Krankheitsmodifizierende Therapieansätze existieren bislang nicht.

Eine intakte Blut-Nerven-Barriere hält im Endoneurium ein spezifisches Milieu aufrecht. Die Dichtigkeit der Blut-Nerven-Barriere (BNB) wird durch Tight Junctions im Perineurium und in endoneuralen Kapillaren hergestellt und durch Gefäß-assoziierte Makrophagen unterstützt. Eine Öffnung der BNB in Kombination mit einem weiteren Stimulus (z.B. dem Eindringen algetischer Substanzen oder einer Neuroinflammation) ist ein wesentlicher Mechanismus der Entstehung neuropathischer Schmerzen in traumatischen Tiermodellen. Über den Stellenwert von Störungen der BNB bei diabetischer Polyneuropathie wird kontrovers diskutiert. Diese Arbeit soll Änderungen der BNB in einem funktionellen und translationalen Aspekt beleuchten.

Nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken und unter Einhaltung der ARRIVE-Richtlinien wurde eine experimentelle diabetische Polyneuropathie in Wistar-Ratten durch einmalige intravenöse Gabe von Streptozocin (STZ) induziert. Zwei Wochen nach Diabetesinduktion trat eine mechanische Allodynie (von-Frey-Test) als Korrelat neuropathischer Schmerzen auf. Nach acht Wochen war eine selektive Öffnung der BNB für die niedermolekulare Verbindung Natrium-Fluoreszein (376 Da) *in vivo* und *ex vivo* nachweisbar. Für die makromolekulare Testsubstanz Evans blue Albumin (69 kDa) erwies sich die BNB als intakt. Eine verstärkte endoneurale Ansammlung von Makrophagen wurde immunhistochemisch nicht beobachtet. Die Expression wichtiger Tight-Junction-Proteine in ganzem peripherem Nerv, in Spinalganglien und im Rückenmark wies keine signifikanten Änderungen in der quantitativen Echtzeit-PCR auf. Eine selektive Analyse durch Lasermikrodissektion zeigte jedoch eine Minderexpression von *Cldn5* endoneural und *Cldn1* perineural nach acht Wochen.

Bei STZ-induzierter Polyneuropathie tritt somit eine selektive Öffnung der BNB für niedermolekulare Verbindungen auf, die sich zeitlich deutlich nach dem Beginn mechanischer Allodynie manifestiert. Die Öffnung korreliert mit einer Minderexpression von *Cldn1* perineural. In der multifaktoriellen Pathophysiologie der diabetischen Polyneuropathie kann die Öffnung der BNB als weiterer schädigender Kofaktor betrachtet werden, der zur Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen beiträgt.

VI Summary

Diabetic polyneuropathy is the most common complication in diabetes mellitus. Quality of life is severely affected if neuropathic pain occurs. Currently there is no disease-modifying treatment available.

An intact blood nerve barrier (BNB) protects nerves and creates an immune-privileged space inside the endoneurium. Built up by tight junction complexes sealing endoneurial endothelial and perineurial cells, the BNB's most important components are tight junction proteins. Vessel-associated macrophages further strengthen the BNB. An opening of the BNB with a concomitant stimulus, for example penetration of algogenic substances or neuroinflammation, is an important mechanism of neuropathic pain.

The relevance of vascular changes and BNB derangements in DPN remains a controversial debate. This project aims to further characterize the BNB in a model of painful diabetic neuropathy in a functional and translational way.

All animal experiments were approved by the Regierung von Unterfranken and were conducted according to ARRIVE guidelines. Intravenous injection of STZ in male Wistar rats elicited high blood glucose levels and mechanical allodynia modeling painful diabetic neuropathy. Using micromolecular sodium fluorescein either intravenously (*in vivo*) or perineurally (*ex vivo*) the BNB tightness was decreased at eight weeks resulting in endoneurial accumulation of the tracer. There was no observable change in barrier tightness after application of Evans blue albumin *in vivo* nor *ex vivo*. The expression of important sealing tight junction proteins did not differ significantly in whole sciatic nerve, dorsal root ganglion nor spinal cord. Endoneurial macrophage infiltration was not observed. However, laser-assisted microdissection of endoneurial capillaries and perineurium showed decreased levels of *Cldn1* in perineurium and *Cldn5* in endoneurial capillaries after 8 weeks.

Differences between STZ model and traumatic models of neuropathic pain exist regarding the degree of BNB opening and the involvement of immune cells. In STZ-induced neuropathy a size-selective opening of the BNB occurs several weeks after first signs of mechanical allodynia started. Opening of the BNB correlated with an expression decrease of important tight junction proteins. Despite the time lapse an opening of the BNB could be a pathological factor contributing to the upholding of nerve damage and neuropathic pain.

Verzeichnisse

Literaturverzeichnis

- Abbott, C.A., Malik, R.A., van Ross, E.R., Kulkarni, J., and Boulton, A.J. (2011). Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care* 34, 2220-2224.
- Agarwal, N., Helmstadter, J., Rojas, D.R., Bali, K.K., Gangadharan, V., and Kuner, R. (2018). Evoked hypoalgesia is accompanied by tonic pain and immune cell infiltration in the dorsal root ganglia at late stages of diabetic neuropathy in mice. *Mol Pain* 14, 1744806918817975.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., and Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G1054-1064.
- Albers, J.W., and Pop-Busui, R. (2014). Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, and Subtypes. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 473.
- Andersen, S.T., Witte, D.R., Dalsgaard, E.-M., Andersen, H., Nawroth, P., Fleming, T., Jensen, T.M., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., and Lauritzen, T. (2018). Risk factors for incident diabetic polyneuropathy in a cohort with screen-detected type 2 diabetes followed for 13 years: ADDITION-Denmark. *Diabetes Care* 41, 1068-1075.
- Avari, P., Huang, W., Averill, S., Colom, B., Imhof, B.A., Nourshargh, S., and Priestley, J.V. (2012). The spatiotemporal localization of JAM-C following sciatic nerve crush in adult rats. *Brain and behavior* 2, 402-414.
- Barbosa, M., Saavedra, A., Oliveira, S., Reis, L., Rodrigues, F., Severo, M., Sittl, R., Maier, C., and Carvalho, D.M. (2019). Prevalence and Determinants of Painful and Painless Neuropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10.
- Baron, R., Maier, C., Attal, N., Binder, A., Bouhassira, D., Cruccu, G., Finnerup, N.B., Haanpaa, M., Hansson, P., Hulleman, P., Jensen, T.S., Freynhagen, R., Kennedy, J.D., Magerl, W., Mainka, T., Reimer, M., Rice, A.S., Segerdahl, M., Serra, J., Sindrup, S., Sommer, C., Tolle, T., Vollert, J., and Treede, R.D. (2017). Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *Pain* 158, 261-272.
- Bauer, H.-C., Krizbai, I.A., Bauer, H., and Traweger, A. (2014). "You Shall Not Pass"—tight junctions of the blood brain barrier. *Front Neurosci* 8.
- Bazzoni, G. (2006). Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost* 95, 36-42.
- Beamish, N.G., Stolinski, C., Thomas, P.K., and King, R.H. (1991). Freeze-fracture observations on normal and abnormal human perineurial tight junctions: alterations in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 81, 269-279.
- Ben-Kraiem, A., Sauer, R.-S., Norwig, C., Popp, M., Bettenhausen, A.-L., Atalla, M.S., Brack, A., Blum, R., Doppler, K., and Rittner, H.L. (2021). Selective blood-nerve barrier leakiness with claudin-1 and vessel-associated macrophage loss in diabetic polyneuropathy. *J Mol Med* 99, 1237–1250.
- Bierhaus, A., Fleming, T., Stoyanov, S., Leffler, A., Babes, A., Neacsu, C., Sauer, S.K., Eberhardt, M., Schnölzer, M., Lasitschka, F., Neuhuber, W.L., Kichko, T.I., Konrade, I., Elvert, R., Mier, W., Pirags, V., Lukic, I.K., Morcos, M., Dehmer, T., Rabbani, N., Thornalley, P.J., Edelstein, D., Nau, C., Forbes, J., Humpert, P.M., Schwaninger, M., Ziegler, D., Stern, D.M., Cooper, M.E., Haberkorn, U., Brownlee, M., Reeh, P.W., and Nawroth, P.P. (2012). Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med* 18, 926.

- Biessels, G.J., Bril, V., Calcutt, N.A., Cameron, N.E., Cotter, M.A., Dobrowsky, R., Feldman, E.L., Fernyhough, P., Jakobsen, J., Malik, R.A., Mizisin, A.P., Oates, P.J., Obrosova, I.G., Pop-Busui, R., Russell, J.W., Sima, A.A., Stevens, M.J., Schmidt, R.E., Tesfaye, S., Veves, A., Vinik, A.I., Wright, D.E., Yagihashi, S., Yorek, M.A., Ziegler, D., and Zochodne, D.W. (2014). Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). *J Peripher Nerv Syst* *19*, 77-87.
- Blesneac, I., Themistocleous, A.C., Fratter, C., Conrad, L.J., Ramirez, J.D., Cox, J.J., Tesfaye, S., Shillo, P.R., Rice, A.S.C., Tucker, S.J., and Bennett, D.L.H. (2017). Rare Nav1.7 variants associated with painful diabetic peripheral neuropathy. *Pain*.
- Burkel, W.E. (1967). The histological fine structure of perineurium. *The Anatomical Record* *158*, 177-189.
- Calcutt, N.A., Allendoerfer, K.L., Mizisin, A.P., Middlemas, A., Freshwater, J.D., Burgers, M., Ranciato, R., Delcroix, J.-D., Taylor, F.R., and Shapiro, R. (2003). Therapeutic efficacy of sonic hedgehog protein in experimental diabetic neuropathy. *The Journal of clinical investigation* *111*, 507-514.
- Callaghan, B.C., Cheng, H.T., Stables, C.L., Smith, A.L., and Feldman, E.L. (2012a). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology* *11*, 521-534.
- Callaghan, B.C., Little, A.A., Feldman, E.L., and Hughes, R.A. (2012b). Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Chapouly, C., Yao, Q., Vandierdonck, S., Larrieu-Lahargue, F., Mariani, J.N., Gadeau, A.P., and Renault, M.A. (2016). Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc Res* *109*, 217-227.
- Chen, J.T.-C., Hu, X., Doppler, K., Breitzkreuz-Korff, O., Otto, I.U., Schwabe, J., Reinhold, A.-K., Günzel, D., Dithmer, S., and Hankir, M.K. (2019). Claudin-12 deficiency causes nerve barrier breakdown, mechanical hypersensitivity and painful neuropathy. *bioRxiv*, 768267.
- Deuis, J.R., Dvorakova, L.S., and Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* *10*.
- Eaton, R., Qualls, C., Bicknell, J., Sibbitt, W., King, M., and Griffey, R. (1996). Structure-function relationships within peripheral nerves in diabetic neuropathy: the hydration hypothesis. *Diabetologia* *39*, 439-446.
- Echeverry, S., Shi, X.Q., Rivest, S., and Zhang, J. (2011). Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci* *31*, 10819-10828.
- Espina, V., Wulfkühle, J.D., Calvert, V.S., VanMeter, A., Zhou, W., Coukos, G., Geho, D.H., Petricoin Iii, E.F., and Liotta, L.A. (2006). Laser-capture microdissection. *Nat Protoc* *1*, 586.
- Feldman, E.L., Callaghan, B.C., Pop-Busui, R., Zochodne, D.W., Wright, D.E., Bennett, D.L., Bril, V., Russell, J.W., and Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers* *5*, 1-18.
- Feldman, E.L., Nave, K.A., Jensen, T.S., and Bennett, D.L.H. (2017). New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron* *93*, 1296-1313.
- Forouhi, N.G., and Wareham, N.J. (2019). Epidemiology of diabetes. *Medicine* *47*, 22-27.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier : a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* *156*, 1099-1111.

- Galosi, E., Di Pietro, G., La Cesa, S., Di Stefano, G., Leone, C., Fasolino, A., Di Lionardo, A., Leonetti, F., Buzzetti, R., and Mollica, C. (2021). Differential involvement of myelinated and unmyelinated nerve fibers in painful diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 63, 68-74.
- Giannini, C., and Dyck, P.J. (1994). Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 36, 408-415.
- Günzel, D., and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93, 525-569.
- Hackel, D., Krug, S.M., Sauer, R.-S., Mousa, S.A., Böcker, A., Pflücke, D., Wrede, E.-J., Kistner, K., Hoffmann, T., Niedermirtl, B., Sommer, C., Bloch, L., Huber, O., Blasig, I.E., Amasheh, S., Reeh, P.W., Fromm, M., Brack, A., and Rittner, H.L. (2012). Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2018-E2027.
- Hidmark, A.S., Nawroth, P.P., and Fleming, T. (2017). STZ causes depletion of immune cells in sciatic nerve and dorsal root ganglion in experimental diabetes. *J Neuroimmunol* 306, 76-82.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110, 1603-1613.
- IASP. <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>. Aufgerufen am: 27.01.2020.
- International Diabetes Federation. <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>. Aufgerufen am: 23.01.2020.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147, 1351-1363.
- Jakobsen, J., Malmgren, L., and Olsson, Y. (1978). Permeability of the blood-nerve barrier in the streptozotocin-diabetic rat. *Exp Neurol* 60, 277-285.
- Kalichman, M.W., Powell, H.C., Calcutt, N.A., and Mizisin, A.P. (1995). Mast cell degranulation and blood-nerve barrier permeability in rat sciatic nerve after 7 days of hyperglycemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 268, H740-H748.
- Kanda, T., Numata, Y., and Mizusawa, H. (2004). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 765-769.
- Kihara, M., Schmelzer, J.D., Poduslo, J.F., Curran, G.L., Nickander, K.K., and Low, P.A. (1991). Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 6107-6111.
- King, A.J.F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166, 877-894.
- Klein, D., and Martini, R. (2016). Myelin and macrophages in the PNS: an intimate relationship in trauma and disease. *Brain Res* 1641, 130-138.
- Krug, S.M., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. Paper presented at: *Semin Cell Dev Biol* (Elsevier).
- Lim, T.K., Shi, X.Q., Martin, H.C., Huang, H., Luheshi, G., Rivest, S., and Zhang, J. (2014). Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. *Pain* 155, 954-967.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*, 3. edn (Stuttgart: Thieme).

- Maier, T., Guell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583, 3966-3973.
- Malmgren, L.T., Jakobsen, J., and Olsson, Y. (1979). Permeability of blood-nerve barrier in galactose-fed rats. *Exp Neurol* 66, 758-770.
- Malong, L., Napoli, I., White, I.J., Stierli, S., Bossio, A., and Lloyd, A.C. (2019). Macrophages enforce the blood nerve barrier. *bioRxiv*, 493494.
- Mert, T., Gunay, I., Ocal, I., Guzel, A.I., Inal, T.C., Sencar, L., and Polat, S. (2009). Macrophage depletion delays progression of neuropathic pain in diabetic animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379, 445-452.
- Mizisin, A.P., and Weerasuriya, A. (2011). Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol* 121, 291-312.
- Mojsilovic-Petrovic, J., Nesic, M., Pen, A., Zhang, W., and Stanimirovic, D. (2004). Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. *J Neurosci Methods* 133, 39-48.
- Moreau, N., Mauborgne, A., Bourgoin, S., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B.B., Villanueva, L., Pohl, M., and Boucher, Y. (2016). 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* 157, 827-839.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 147, 185-194.
- Muramatsu, K., Ikutomo, M., Tamaki, T., Shimo, S., and Niwa, M. (2018). Effect of streptozotocin-induced diabetes on motor representations in the motor cortex and corticospinal tract in rats. *Brain Res* 1680, 115-126.
- Nawroth, P.P., Bendszus, M., Pham, M., Jende, J., Heiland, S., Ries, S., Schumann, C., Schmelz, M., Schuh-Hofer, S., Treede, R.D., Kuner, R., Oikonomou, D., Groener, J.B., and Kopf, S. (2017). The quest for more research on painful diabetic neuropathy. *Neuroscience*.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660.
- Okamoto, K., Martin, D.P., Schmelzer, J.D., Mitsui, Y., and Low, P.A. (2001). Pro- and Anti-inflammatory Cytokine Gene Expression in Rat Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain. *Exp Neurol* 169, 386-391.
- Petersmann, A., Muller-Wieland, D., Muller, U.A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., and Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 127, S1-S7.
- Pham, M., Oikonomou, D., Bäumer, P., Bierhaus, A., Heiland, S., Humpert, P.M., Nawroth, P.P., and Bendszus, M. (2011). Proximal Neuropathic Lesions in Distal Symmetric Diabetic Polyneuropathy. Findings of high-resolution magnetic resonance neurography 34, 721-723.
- Poduslo, J.F., and Curran, G.L. (1992). Increased permeability across the blood-nerve barrier of albumin glycated in vitro and in vivo from patients with diabetic polyneuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 2218-2222.
- Poduslo, J.F., and Curran, G.L. (1994). Glycation increases the permeability of proteins across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Brain Res Mol Brain Res* 23, 157-162.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L., and Dyck, P.J. (1988). Increase in albumin, IgG, and IgM blood-nerve barrier indices in human diabetic neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 4879-4883.

- Pop-Busui, R., Boulton, A.J.M., Feldman, E.L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R.A., Sosenko, J.M., and Ziegler, D. (2017). Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40, 136-154.
- Powell, H.C., Rosoff, J., and Myers, R.R. (1985). Microangiopathy in human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 68, 295-305.
- Pummi, K.P., Heape, A.M., Grenman, R.A., Peltonen, J.T., and Peltonen, S.A. (2004). Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* 52, 1037-1046.
- Raputova, J., Srotova, I., Vlckova, E., Sommer, C., Uceyler, N., Birklein, F., Rittner, H.L., Rebhorn, C., Adamova, B., Kovalova, I., Kralickova Nekvapilova, E., Forer, L., Belobradkova, J., Olsovsky, J., Weber, P., Dusek, L., Jarkovsky, J., and Bednarik, J. (2017). Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study. *Pain* 158, 2340-2353.
- Rechthand, E., Smith, Q.R., Latker, C.H., and Rapoport, S.I. (1987). Altered blood-nerve barrier permeability to small molecules in experimental diabetes mellitus. *J Neuropathol Exp Neurol* 46, 302-314.
- Reinhold, A.-K., Yang, S., Chen, J.T.-C., Hu, L., Sauer, R.-S., Krug, S.M., Mambretti, E.M., Fromm, M., Brack, A., and Rittner, H.L. (2019). Tissue plasminogen activator and neuropathy open the blood-nerve barrier with upregulation of microRNA-155-5p in male rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865, 1160-1169.
- Reinhold, A.K., and Rittner, H.L. (2017). Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Pflugers Arch* 469, 123-134.
- Reinhold, A.K., Schwabe, J., Lux, T.J., Salvador, E., and Rittner, H.L. (2018). Quantitative and Microstructural Changes of the Blood-Nerve Barrier in Peripheral Neuropathy. *Front Neurosci* 12, 936-936.
- Richner, M., Ferreira, N., Dudele, A., Jensen, T.S., Vaegter, C.B., and Goncalves, N.P. (2018). Functional and Structural Changes of the Blood-Nerve-Barrier in Diabetic Neuropathy. *Front Neurosci* 12, 1038.
- Rom, S., Heldt, N.A., Gajghate, S., Seliga, A., Reichenbach, N.L., and Persidsky, Y. (2020). Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles. *Sci Rep* 10, 1-14.
- Said, G., Lacroix, C., Lozeron, P., Ropert, A., Plante, V., and Adams, D. (2003). Inflammatory vasculopathy in multifocal diabetic neuropathy. *Brain* 126, 376-385.
- Sauer, R.-S., Krug, S.M., Hackel, D., Staat, C., Konasin, N., Yang, S., Niedermirtl, B., Bosten, J., Günther, R., Dabrowski, S., Doppler, K., Sommer, C., Blasig, I.E., Brack, A., and Rittner, H.L. (2014). Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release* 185, 88-98.
- Sauer, R.S., Kirchner, J., Yang, S., Hu, L., Leinders, M., Sommer, C., Brack, A., and Rittner, H.L. (2017). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1405, 71-88.
- Scheiermann, C., Meda, P., Aurrand-Lions, M., Madani, R., Yiangou, Y., Coffey, P., Salt, T.E., Ducrest-Gay, D., Caille, D., Howell, O., Reynolds, R., Lobrinus, A., Adams, R.H., Yu, A.S., Anand, P., Imhof, B.A., and Nourshargh, S. (2007). Expression and function of junctional adhesion molecule-C in myelinated peripheral nerves. *Science* 318, 1472-1475.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108.
- Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., and Fromm, M. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1669, 34-42.

- Schulzke, J.D., Günzel, D., John, L.J., and Fromm, M. (2012). Perspectives on tight junction research. *Ann N Y Acad Sci* 1257, 1-19.
- Schwabe, J. (2018). Tight Junction Proteine in schmerzhaften Neuropathien (Würzburg).
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337.
- Seneviratne, K.N. (1972). Permeability of blood nerve barriers in the diabetic rat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 35, 156-162.
- Shillo, P., Sloan, G., Greig, M., Hunt, L., Selvarajah, D., Elliott, J., Gandhi, R., Wilkinson, I.D., and Tesfaye, S. (2019). Painful and Painless Diabetic Neuropathies: What Is the Difference? *Curr Diab Rep* 19, 32.
- Sima, A.A.F., and Robertson, D.M. (1978). The perineurial and blood-nerve barriers in experimental diabetes. *Acta Neuropathol* 44, 189-195.
- Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, S.E., Ward, J.D., Manes, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Witte, D.R., and Fuller, J.H. (2005). Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 352, 341-350.
- Tesfaye, S., Stevens, L.K., Stephenson, J.M., Fuller, J.H., Plater, M., Ionescu-Tirgoviste, C., Nuber, A., Pozza, G., and Ward, J.D. (1996). Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 39, 1377-1384.
- Themistocleous, A.C., Ramirez, J.D., Shillo, P.R., Lees, J.G., Selvarajah, D., Orengo, C., Tesfaye, S., Rice, A.S., and Bennett, D.L. (2016). The Pain in Neuropathy Study (PiNS): a cross-sectional observational study determining the somatosensory phenotype of painful and painless diabetic neuropathy. *Pain* 157, 1132-1145.
- ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>. Aufgerufen am: 01.04.2020.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741-754.
- Van Acker, K., Bouhassira, D., De Bacquer, D., Weiss, S., Matthys, K., Raemen, H., Mathieu, C., and Colin, I.M. (2009). Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes Metab* 35, 206-213.
- Weise, G., and Stoll, G. (2012). Magnetic Resonance Imaging of Blood Brain/Nerve Barrier Dysfunction and Leukocyte Infiltration: Closely Related or Discordant? *Front Neurol* 3.
- Wells, M.R., Racis, S.P., and vaidya, U. (1992). Changes in plasma cytokines associated with peripheral nerve injury. *J Neuroimmunol* 39, 261-268.
- Wikipedia (2020). RNA-Extraktion.
- Wu, E.Q., Borton, J., Said, G., Le, T.K., Monz, B., Rosilio, M., and Avoinet, S. (2007). Estimated prevalence of peripheral neuropathy and associated pain in adults with diabetes in France. *Curr Med Res Opin* 23, 2035-2042.
- Yang, H., Sloan, G., Ye, Y., Wang, S., Duan, B., Tesfaye, S., and Gao, L. (2020). New Perspective in Diabetic Neuropathy: From the Periphery to the Brain, a Call for Early Detection, and Precision Medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 929.
- Yang, S., Krug, S.M., Heitmann, J., Hu, L., Reinhold, A.K., Sauer, S., Bosten, J., Sommer, C., Fromm, M., Brack, A., and Rittner, H.L. (2016). Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier. *Biomaterials* 82, 20-33.

- Young, M.J., Boulton, A.J., MacLeod, A.F., Williams, D.R., and Sonksen, P.H. (1993). A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 36, 150-154.
- Ziegler, D., Papanas, N., Schnell, O., Nguyen, B.D.T., Nguyen, K.T., Kulkantrakorn, K., and Deerochanawong, C. (2021). Current concepts in the management of diabetic polyneuropathy. *Journal of Diabetes Investigation* 12, 464-475.
- Ziegler, D., Rathmann, W., Dickhaus, T., Meisinger, C., and Mielck, A. (2009). Neuropathic Pain in Diabetes, Prediabetes and Normal Glucose Tolerance: The MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Pain Med* 10, 393-400.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 564.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Pathomechanismen der DPN (Yang et al., 2020)	3
Abbildung 2:	Hyperglykämie und Schmerzverhalten im STZ-Modell (Ben-Kraiem et al., 2021).....	6
Abbildung 3:	Blut-Nerven-Barriere (Richner et al., 2018)	7
Abbildung 4:	Transmembranäre Proteine der Tight Junctions (Bauer et al., 2014)	8
Abbildung 5:	Hypothese.....	12
Abbildung 6:	Permeabilitätstests der BNB.....	17
Abbildung 7:	Quantifizierung eines Permeabilitätstests.....	19
Abbildung 8:	Phasentrennung während der RNA-Extraktion	21
Abbildung 9:	Ablauf der Lasermikrodissektion	25
Abbildung 10:	Versuchsplan.....	28
Abbildung 11:	Perineurale BNB impermeabel für EBA (69 kDa).....	29
Abbildung 12:	Endotheliale BNB impermeabel für EBA (69 kDa) in Pilotstudie	30
Abbildung 13:	Erhöhte Permeabilität der perineuralen Barriere für Fluorescein-Natrium acht Wochen nach Diabetesinduktion.....	32
Abbildung 14:	Endoneurale Anreicherung von Fluorescein-Natrium nach intravenöser Injektion bei STZ-induzierter Polyneuropathie nach acht Wochen.....	33
Abbildung 15:	CD68-positive Zellen im N. ischiadicus STZ-diabetischer Ratten nicht verstärkt nachweisbar	34
Abbildung 16:	Unveränderte Expression der Tight-Junction-Proteine in N. ischiadicus, DRG und SPC.....	36
Abbildung 17:	Verminderte Expression von <i>Cldn1</i> perineural und <i>Cldn5</i> in endoneuralen Kapillaren bei STZ-induzierter Polyneuropathie nach acht Wochen.....	37

Abbildungen, die gemäß Creative Commons BY 4.0-Lizenz verwendet werden:

Link zur Lizenz:	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Abbildung 1:	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00929/full
Abbildung 3	(Bildausschnitt und Umwandlung in Graustufen): https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00929/full
Abbildung 4:	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00392- /full#h12
Abbildung 8	(modifizierter Bildausschnitt): https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PhOH-CHCl3_extraction.svg

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte und Materialien	14
Tabelle 2:	Reagenzien	14
Tabelle 3:	KITs	15
Tabelle 4:	TaqMan-Sonden	16
Tabelle 5:	Primersequenzen für RTQ-PCR	16
Tabelle 6:	Antikörper	16
Tabelle 7:	Waschschritte und Elution der RNA bei Verwendung des miRNeasy-Kits	22
Tabelle 8:	Temperaturverlauf der reversen Transkription	22
Tabelle 9:	Temperaturverlauf der RTQ-PCR mit SYBR Green.....	23
Tabelle 10:	Färbeprotokoll.....	24
Tabelle 11:	Lasereinstellungen.....	25
Tabelle 12:	Temperaturverlauf der RTQ-PCR mit TaqMan-Sonden	27
Tabelle 13:	Software	27
Tabelle 14:	Studien zur Permeabilität der BNB bei DPN	43

Danksagung

Allem voran möchte ich Frau Prof. Heike Rittner für die Förderung und herausragende Betreuung danken. Durch ihre Begeisterung, zeitweilige (Heraus-)Forderung und stets konstruktive Kritik machte sie diese Arbeit erst möglich und brachte mir wissenschaftliches Denken und Arbeiten nahe.

Ein ebenso großer Dank geht an Frau Dr. Reine-Solange Sauer für Betreuung, stete Unterstützung und die vielen praktischen Hilfestellungen. Sie führte zudem die Gewebeentnahmen sowie die Verhaltensexperimente durch, auf deren Ergebnisse ich in dieser Arbeit zurückgreifen durfte.

Adel Ben-Kraiem danke ich für wertvolle inhaltliche Diskussionen sowie für die stets angenehme und kooperative Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung danke ich für die sehr angenehme produktive Arbeitsatmosphäre sowie den hilfreichen inhaltlichen und methodischen Austausch.

Dr. Cora Rüdts-von Collenberg aus der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Robert Blum ermöglichte die Lasermikrodissektion durch eine wunderbare Einführung und die Beantwortung vieler Fragen. Danke!

Mein Dank gilt den weiteren Mitgliedern des Promotionskomitees, Frau Prof. Stefanie Hahner und Herrn Prof. Rudolf Martini, für wertvolle Rückfragen und vor allem für die Zeit, die sie in diese Arbeit investierten.

Für finanzielle Unterstützung und das strukturierte Rahmenprogramm danke ich der Graduate School of Life Sciences. Inhaltlich profitierte ich sehr von der Juniorakademie der deutschen Schmerzgesellschaft, der ich ebenfalls danken möchte.

Insbesondere danke ich meiner Familie für Unterstützung, Rückhalt und stete Motivation.

Publikation

Ben-Kraiem, A., Sauer, R.-S., **Norwig, C.**, Popp, M., Bettenhausen, A.-L., Atalla, M.S., Brack, A., Blum, R., Doppler, K., and Rittner, H.L. (2021). Selective blood-nerve barrier leakiness with claudin-1 and vessel-associated macrophage loss in diabetic polyneuropathy. *J Mol Med* 99, 1237–1250.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Expressionsprofil der Tight-Junction-Proteine bei Streptozocin-induzierter Polyneuropathie bei Ratten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort	Datum
Unterschrift	

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Expression profile of tight junction proteins in streptozocin-induced polyneuropathy in rats” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place	Date
Signature	