

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und  
Schmerztherapie  
des Universitätsklinikums Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm

Einfluss der peripheren Entzündung auf die Permeabilität des Perineuriums  
im *N. ischiadicus* sowie auf das lokale Hinterpfotengewebe im FCA-Ent-  
zündungsmodell

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Würzburg  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Natalia Leopold  
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2022

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Heike Rittner

Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Beisert

Berichtserstattung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat, Klaus Brehm

Tag des Promotionskolloquiums: 02.03.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Perineurium als Diffusionsbarriere .....	1
1.1.1	Der Aufbau peripherer Nerven.....	1
1.1.2	Bestandteile und Funktionen der Blut-Nerven-Schranke.....	5
1.1.2.1	Endoneurale Endothelzellen der Blut-Nerven-Schranke .....	6
1.1.2.2	Perineurale Barriere.....	6
1.1.3	Myelinbarriere .....	7
1.1.4	Tight-Junction-Proteine im Nervensystem.....	8
1.1.5	Claudine.....	10
1.1.5.1	Struktureller Aufbau der Claudine .....	10
1.1.5.2	Claudin-1 .....	13
1.1.5.3	Claudin-19.....	14
1.1.6	$\beta$ -Catenin und der Wnt-Signalweg .....	15
1.2	Einfluss der Entzündung auf die Permeabilität der BNS .....	18
1.2.1	Entzündung.....	18
1.2.2	Einfluss der Entzündung auf die Permeabilität der BNS .....	19
1.2.3	FCA-Entzündungsmodell .....	20
1.3	Fragestellungen der Dissertation .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1	Versuchstiere .....	22
2.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	22
2.3	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	23
2.4	Intraplantare Injektion .....	24
2.5	Intraperitoneale Injektion von GSK $\beta$ -Inhibitoren .....	24
2.6	<i>Western Blot</i> .....	24
2.6.1	Probenaufarbeitung.....	26
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bicinchoninsäure-Assay) .....	26
2.6.3	SDS-Gelelektrophorese .....	28
2.6.4	Proteintransfer durch <i>Western Blot</i> .....	30
2.6.5	Coomassie-Färbung.....	31
2.6.6	Immundetektion.....	32

2.6.7	Densitometrie.....	35
2.7	EBA-Permeabilitätstest .....	36
2.8	Immunfluoreszenzfärbung.....	36
2.8.1	Aufbereitung der Proben .....	36
2.8.2	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz .....	37
2.8.3	Protokoll der Claudin-1-Färbung.....	38
2.8.4	Fotodokumentation der immunhistochemischen Färbungen.....	38
2.9	Software.....	39
2.10	Statistische Auswertung .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Expression der TJ-Proteine (Claudin-1 und Claudin-19) am Ort der peripheren Entzündung nach FCA-Behandlung im Zeitverlauf.....	40
3.1.1	Expression von Claudin-1 am Ort der peripheren Entzündung.....	40
3.1.2	Expression von Claudin-19 am Ort der peripheren Entzündung.....	41
3.2	Expression der TJ-Proteine (Claudin-1 und Claudin-19) im Perineurium des <i>N. ischiadicus</i> nach FCA-Behandlung im Zeitverlauf .....	42
3.2.1	Expression von Claudin-1 im Perineurium des <i>N. ischiadicus</i> .....	43
3.2.2	Expression von Claudin-19 im Perineurium des <i>N. ischiadicus</i> .....	44
3.3	Immunhistochemie für Claudin-1 beim <i>N. ischiadicus</i> im Zeitverlauf.....	45
3.4	Veränderung der Permeabilität des Perineuriums über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 h während der intraplantaren Entzündung .....	46
3.5	Einfluss der peripheren Entzündung auf die Expression des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges .....	47
3.5.1	Zeitabhängige Herabregulation des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges im entzündeten Pfotengewebe nach der FCA-Behandlung .....	48
3.5.2	Veränderung des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges im Perineurium des <i>N. ischiadicus</i> im Zeitverlauf nach der FCA-Behandlung .....	49
3.6	Einsatz eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors .....	50
3.6.1	Zusammenhang zwischen der Claudin-1-Expression im Hinterpfotengewebe nach FCA-Injektion und der Injektion eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors .....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1	Wirkung von FCA nach intraplantarer Injektion in den Ort der Entzündung..	53

4.2	Zeitlicher Verlauf der Expression von Claudin-1 und Claudin-19 am Ort der Entzündung.....	56
4.3	Wirkung der FCA-induzierten und peripheren Entzündung in der Hinterpfote auf das Perineurium des versorgenden und proximal liegenden <i>N. ischiadicus</i> .....	57
4.4	Möglicher Mechanismus der veränderten Expression bzw. Regulation der TJ-Proteine .....	60
4.5	Übersicht über weitere mögliche Mechanismen der Regulation der Claudin-1-Expression.....	61
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>83</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Perineurium als Diffusionsbarriere

Neuronale Axone sind von einem stromalen Bindegewebsgerüst umgeben, das sich aus drei Schichten zusammensetzt (Menorca et al. 2013). Diese Schichten erfüllen mechanische und molekular-homöostatische Aufgaben, wobei dem Perineurium als Diffusionsbarriere ein besonderer Stellenwert zukommt (Neuhuber 2016). Im Folgenden werden der Aufbau und die Funktion der Perineuralzellen näher erläutert. Diese sind über sog. *tight junctions* (TJs) miteinander verbunden und gelten als wichtige Komponente der Blut-Nerven-Schranke (BNS) zur Abwehr von Toxinen, Infektionen etc. (Kucenas 2015).

### 1.1.1 Der Aufbau peripherer Nerven

Das Nervensystem setzt sich aus zwei Segmenten zusammen, die zwar anatomisch voneinander getrennt sind, funktionell jedoch eine Einheit bilden. In Abhängigkeit von der Lage der Nervenbahnen im Körper wird es in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) unterteilt. Dabei wird das ZNS vom Gehirn und Rückenmark gebildet, während das PNS alle anderen Anteile des Nervensystems umfasst. Das PNS besteht aus Hirnnerven, Spinalnerven sowie außerhalb des ZNS liegenden Ganglien und dient als Rezeptor- und Effektororgan des ZNS. Es leitet dem ZNS die afferenten und sensiblen Informationen aus der Peripherie zu und überträgt die ausgearbeiteten, efferenten und motorischen Impulse zu den entsprechenden Erfolgsorganen. Der makroskopisch sichtbare periphere Nerv ist dabei die Summe aller efferenten und afferenten Informationen und besteht aus Bündeln (Faszikeln) myelinisierter und nichtmyelinisierter Axone. Der periphere Nerv besteht aus drei anatomischen Kompartimenten, die von außen nach innen wie folgt angeordnet sind:

- Epineurium
- Perineurium
- Endoneurium (siehe Abb. 1)

Der Aufbau dieser Kompartimente ist eng mit deren Funktion als Barriere für impulsleitende Elemente verbunden. Das Epineurium umgibt den gesamten Nerv und seine einzelnen Faszikel und besteht wie die das ZNS umschließende *Dura mater* aus dicken und

dichten Bindegewebsschichten. Es sorgt als äußerste Schicht des peripheren Nervs für dessen Einbettung in die Umgebung und trägt zur Zugfestigkeit des Nervs bei, bildet aber keine Barriere. Deshalb bietet das Injizieren von Lokalanästhetika für die Regionalanästhesie in den perineuralen Raum keinen Vorteil gegenüber der Injektion in den extraneuralen Raum. Das Perineurium umhüllt die einzelnen Nervenfaszikel und ist eine Fortsetzung der Leptomeningen des Rückenmarks, die sich über das gesamte periphere Nervensystem erstrecken und dieses abdecken. Es wird in einen äußeren, mechanisch stabilisierenden *Pars fibrosa* und einen inneren, diffusionsbegrenzenden *Pars epitheloidea* unterteilt. Der zuletzt genannte Teil besteht aus dünnen und konzentrisch angeordneten Schichten von flachen Epithelzellen, dem sogenannten Perineuralepithel (Kucenas, Takada et al. 2008, Binari, Lewis et al. 2013).

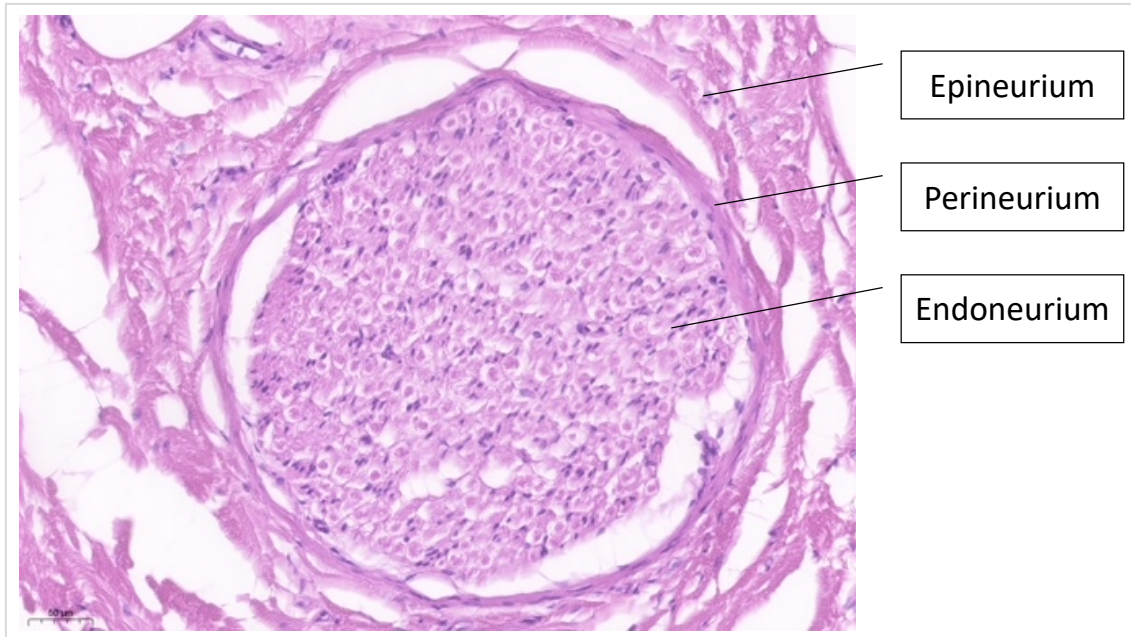
Der Entwicklungsursprung von Perineuralzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei den perineuralen Zellen wegen ihrer Form um spezialisierte und aus dem Mesoderm stammende Fibroblasten handelt (Bunge, Wood et al. 1989). Jüngste Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass zumindest das motorische Nervenperineurium aus Gliazellen besteht, die vom ZNS stammen. Deshalb können die Perineuralzellen heute auch als Perineuralglia verstanden werden (Kucenas, Takada et al. 2008, Binari, Lewis et al. 2013).

Wegen der embryologischen Abstammung des Perineuriums verhält sich dieses elastisch und beständig gegenüber einer mechanischen Beanspruchung. Die Zahl der perineuralen Zellschichten variiert in Abhängigkeit von der Anzahl und der Größe der Faszikel im Nerv und nimmt zur Nervenperipherie hin ab. Die Nervenfaszikel des *N. ischiadicus* gehören zu den größten im Menschen vorkommenden. Sie bestehen aus bis zu 15 Zellschichten, während die kleinsten lediglich eine bis zwei Schichten umfassen (Mizisin and Weerasuriya 2011). Das Perineurium geht an der Grenze zum ZNS in das subdurale Neurothel über. Jede perineurale Zellschicht ist von einer kontinuierlichen Basallamina umgeben, die bei größeren Nerven bis zu 500 nm dick sein und als eine zusätzliche molekulare Barriere dienen kann (Gamble and Eames 1964, Pia-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008). Die perineuralen Zellen sind durch ausgedehnte TJs miteinander verknüpft, wodurch eine Hauptdiffusionsbarriere zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Faszikel gebildet wird, die als Perineuralscheide bezeichnet wird. Die zwischen den einzelnen Reihen der Perineural-Epithelzellen eingebauten, fibrillären und mikrofibrillären Kollagene und das

Fibronektin ermöglichen eine Verstärkung des Perineuriums. Außerdem verleihen sie diesem die Fähigkeit, externe Dehnungskräfte modulieren und so den endoneuralen Druck regulieren zu können (Peltonen, Jaakkola et al. 1990). Einzelne perineurale Schichten begleiten durchdringende Gefäße, die in das Endoneurium eintreten. Sie bilden fokale Kontinuitäten zwischen dem epineuralen und dem endoneuralen Raum (Burkel 1967). Der Innenraum, der vom Perineurium umgebenen Nervenfaszikel wird, wird als Endoneuralraum bezeichnet. Das darin befindliche lockere Bindegewebe heißt Endoneurium. Der Endoneuralraum des peripheren Nervensystems erstreckt sich von den proximalen Wurzelansatzzonen der Hirn- und Spinalnerven bis zu den distalen sensorischen und motorischen Endorganen (Mizisin and Weerasuriya 2011). Das Endoneurium besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern, die von Schwann-Zellen, endoneuralen und fibroblastenähnlichen Zellen produziert werden (Richard, Topilko et al. 2012).

Diese Kollagenfasern formen für jedes Axon echte Tunnel und sind in kreisförmigen, longitudinalen und schrägen Bündeln angeordnet. Das Endoneurium ist direkt über punktuelle Lücken, die sogenannten Ranvier-Schnürringe, mit den Axonen verbunden. Es ist kapillarisiert und die Endothelzellen der Kapillaren sind über TJs verbunden, wodurch es einen Teil der BNS bildet. Im Unterschied zu den meisten extrazellulären Gewebsräumen weist das Endoneurium keinen Lymphkreislauf auf (Mizisin and Weerasuriya 2011). Die endoneurale Mikroumgebung macht 20–25 % der gesamten endoneuralen Fläche aus und im Unterschied zu anderen extrazellulären Bindegewebsräumen steht das Endoneurium unter einem positiven hydrostatischen Druck (10 mm Hg im Rückenmark gegenüber 2–3 mm Hg im peripheren Nerv). Der konvektive und endoneurale Flüssigkeitsfluss wird durch einen proximodistalen hydrostatischen Druckgradienten angetrieben. Die endoneurale Flüssigkeit hat zudem eine andere Elektrolytzusammensetzung als das umgebende Gewebe und Blut. Sie wird durch die BNS aufrechterhalten und ist für die axonale Erregbarkeit unabdingbar. Darüber hinaus ist sie für die physiologische Signalübertragung zum und vom Zentralnervensystem durch myelinisierte und nichtmyelinisierte Axone wesentlich.

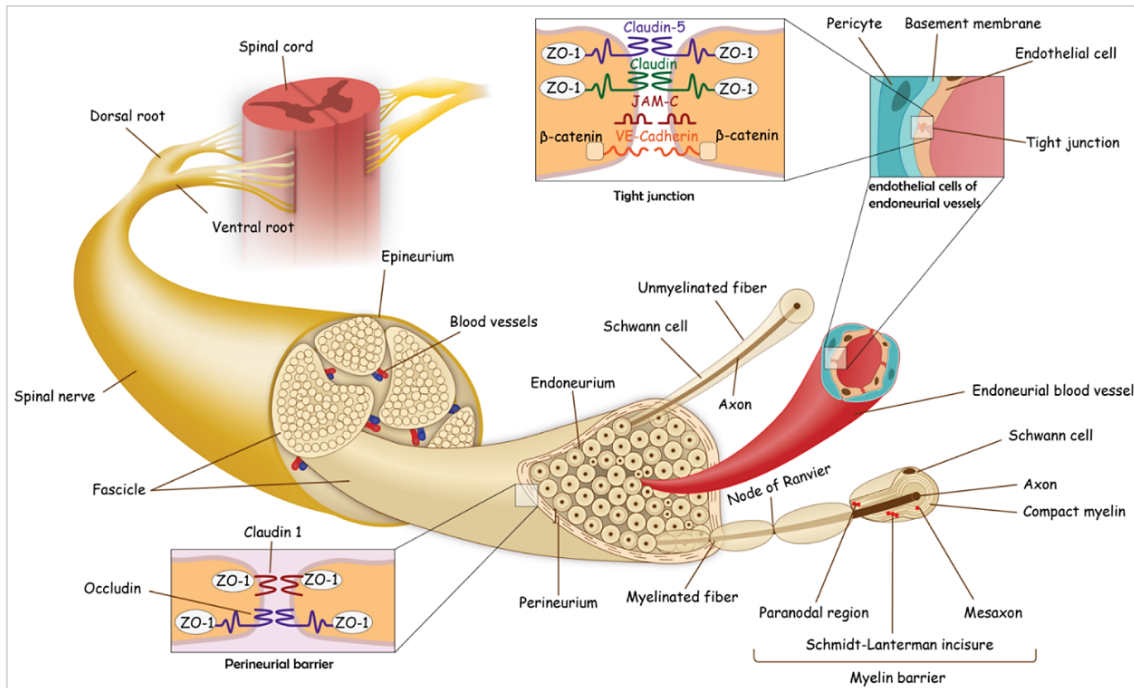




**Abbildung 1: Humaner *N. tibialis*, HE-Färbung. Drei anatomische Kompartimente: Epineurium, Perineurium und Endoneurium.** Danke für die Bereitstellung des Bildmaterials an Herrn Dr. Florian Kurz (Institut für Pathologie der Universität Würzburg).

Es gibt zudem zwei Arten von Nervenfasern: die myelinisierten und die nichtmyelinisierten. Dabei bestehen die myelinisierten Nervenfasern aus Schichten von Schwann-Zellmembranen (Myelin), die als Internodien bezeichnet werden und konzentrisch in Segmenten um die Axone gewickelt sind (Suter and Scherer 2003). Die Segmente sind durch Ranvier-Schnürringe getrennt. Myelinisierte Nervenfasern sind durch das Endoneurium voneinander getrennt. Diese Schicht verhindert als Teil der BNS, dass Moleküle aus dem Blut in die Endoneuralflüssigkeit gelangen können. Die nichtmyelinisierten Nervenfasern, die auch als C-Fasern bezeichnet werden, sind zahlreich und verlaufen entlang der myelinisierten Axone. Ebendiese werden von einer Schicht Schwann-Zellen umgeben, ohne Myelin zu bilden. Diese nichtmyelinisierten Axone werden zu einem sogenannten Remak-Bündel zusammengefasst. Die Isolierschicht mit Myelin und Ranvier-Schnürringen ermöglicht den myelinisierten Nervenfasern eine sprunghafte (saltatorische) Weiterleitung von Aktionspotenzialen von einem Schnürring zum nächsten. Dadurch kann die Geschwindigkeit der Reizleitung gegenüber nichtmyelinisierten Axonen um einen erheblichen Faktor gesteigert werden. Die metabolische Energie für die Entstehung von Aktionspotenzialen kann gemindert und durch die Reduktion des Axon-Durchmessers kann Platz im Nervensystem eingespart werden. Die Leitungsgeschwindigkeit myelinisierter

Nervenfasern beträgt 5–120 m/s. Nichtmyelinisierte Axone kommen bei typischen menschlichen Nerven etwa im Verhältnis 2:1 gegenüber myelinisierten Axonen vor. Krankheiten im Bereich des PNS können die Nervenfunktion stören, indem sie entweder zu einem Myelinverlust oder einer axonalen Verletzung führen.



**Abbildung 2: Die makro- und mikroskopische Grundstruktur eines peripheren Nerven.** Das Perineurium umgibt das Endoneurium peripherer Nerven. Neben myelinisierten (MF) und nichtmyelinisierten (UMF) Nervenfasern sind weitere Bestandteile in das Endoneurium eingebettet, wie endoneurale Gefäße und Fibroblasten. Der Auszug oben rechts zeigt die Lokalisation der TJ-Proteine (TJP) in den Endothelzellen der endoneuralen Gefäße. Rechts unten wird die Myelinbarriere dargestellt. Der linke Auszug zeigt schematisch den strukturellen Aufbau von TJs zwischen benachbarten Perineurialzellen (Reinhold and Rittner, 2017). Die Abbildung bezieht sich auf Fig.1. Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review (Reinhold and Rittner 2017). Eigene Abbildung.

### 1.1.2 Bestandteile und Funktionen der Blut-Nerven-Schranke

Die BNS kann als doppelte Grenzfläche charakterisiert werden (Abb. 2), die aus dem Endothel endoneuraler Kapillaren innerhalb des Nervenfaszikel und aus einer mehrschichtigen zellulären Umhüllung eines Nervenfaszikel im Perineurium besteht. Diese Segmente erfüllen unterschiedliche physiologische Anforderungen. Wegen des Mangels an Astrozyten unterscheidet sich die BNS im Vergleich signifikant von der Blut-Hirn-Schranke (BHS), wobei die BNS als durchlässiger angesehen wird (Kanda 2013). Das

Fehlen einer Lymphdrainage im endoneuralen Raum betont die Schutzwirkung der BNS. Der endoneurale Raum ist dabei neben der zerebralen Mikroumgebung der einzige physiologische Raum, von dem bekannt ist, dass er keine Lymphdrainage aufweist (Sunderland 1978). Die Untersuchungen im Zuge dieser Arbeit konzentrieren sich auf das Perineurium als den zentralen Teil der BNS.

#### **1.1.2.1 Endoneurale Endothelzellen der Blut-Nerven-Schranke**

Endoneuralgefäße umfassen ein spärlich verteiltes Netzwerk von Arteriolen, Kapillaren und Venolen, die etwa 1 % der Endoneuralfläche einnehmen (Mizisin and Weerasuriya 2011). Die Endothelzellen der endoneuralen Kapillaren sind durch TJ-Moleküle fest miteinander verbunden und dabei durchlässiger als das Perineurium. Die bei der Geburt relativ durchlässigen endoneuralen TJs entwickeln sich langsam und ziehen sich nur allmählich zusammen (Kristensson and Olsson 1971, Pummi, Heape et al. 2004). Selbst adulte endoneurale Kapillaren sind für radioaktiv markiertes Albumin durchlässig. Albumin gehört mit einer molaren Größe von etwa 66 000 Da zu den großen Molekülen und kann somit nicht oder schwer in die Kapillarwände eindringen. Die endoneurale Basalmembran ist nicht fenestriert, wodurch enge und stark regulierte Grenzflächen gebildet werden. Das führt dazu, dass das Endoneurium zum einen vom zirkulierenden Blut isoliert wird, wodurch ein unkontrolliertes Austreten von Molekülen und Ionen aus dem Kreislaufsystem in den peripheren Nerv verhindert werden kann. Zum anderen wird ein kontrollierter Blut-Nerven-Austausch ermöglicht, um das Nervengewebe und anderes Gewebe versorgen zu können (Peltonen, Alanne et al. 2013). Hier besteht demnach eine Analogie zur BHS. Endoneurale Endothelzellen der BNS exprimieren eine Vielzahl von Transportern sowohl auf der luminalen als auch auf der abluminalen Seite. Die Expression von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, dem  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Aminosäuretransporter-1 vom L-Typ, Kreatintransporter, Monocarboxylattransporter-1, Glucosetransporter-1 sowie von alkalischen Phosphatasen und dem P-Glycoprotein konnte durch *polychain reaction* (PCR), *Western Blot* oder Immunodetektion in kultivierten Endothelzellen der BNS nachgewiesen werden (Yosef and Ubogu 2013).

#### **1.1.2.2 Perineurale Barriere**

Das Perineurium bildet eine Barriere gegen den Durchtritt von größeren Molekülen oder Toxinen in den Endoneuralraum, der innerhalb des Perineuriums liegt. Außerdem dient

es der Aufrechterhaltung der Homöostase des Endoneuriums einschließlich des konstanten intrafaszikulären Drucks. Die perineurale Barriere besteht aus drei strukturellen und funktionellen Komponenten: (1) Basalmembranen, die jede perineurale Zellschicht umgeben, (2) TJs zwischen den benachbarten perineuralen Zellen und (3) einem aktiven transcytotischen Transport durch die perineuralen Zellen (Peltonen, Alanne et al. 2013). Maßgeblich für die Barrierefunktion der BNS verantwortlich sind auch hier die TJs als abdichtende Verbindungen zwischen den Perineuralzellen des Perineuriums und zwischen den Endothelzellen und Pericyten der endoneuralen Blutgefäße.

Das Perineurium regelt außerdem über Transportsysteme z. B. den Glucosetransporter-1, die neuronale Homöostase, die Transcytose und die Durchlässigkeit der TJ-Barriere. Es konnte festgestellt werden, dass Perineuralzellen pinocytotische Vesikel enthalten und dadurch einen aktiven transcytotischen Transport vermitteln können (Oldfors 1981, Peltonen, Alanne et al. 2013). Zudem verhindert die TJ-Barriere die Exposition der Nervenfasern gegenüber Komponenten des Immunsystems und potenziellen Noxen (Pia-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008).

Die Funktion des Perineuriums besteht zusammenfassend in der Modulation der auf den Nerv wirkenden Zugkräfte, der Aufrechterhaltung eines konstanten intrafaszikulären Drucks und der Ausbildung einer Barriere.

### **1.1.3 Myelinbarriere**

Neben der BNS gibt es eine weitere Barriere, die den peripheren Nerv schützt: die sogenannte Myelinbarriere. Sie befindet sich im Paranode und im Mesaxon der Schwann-Zellen (Alanne, Pummi et al. 2009) und besteht aus myelinisierenden Schwann-Zellen, wobei die Nervenfasern in mehreren Schichten von Gliazellen ummantelt werden. Dadurch werden die Paranode, das Mesaxon und die Schmidt-Lantermann-Inzisuren abgedichtet und es legt sich eine schützende, isolierende Schicht um die Nervenfasern. Diese gehört zu der weniger gut untersuchten Barriere der BNS.

### 1.1.4 Tight-Junction-Proteine im Nervensystem

Die BNS in endoneuralen Gefäßen und die perineurale Barriere beschränken gemeinsam den Materialaustausch zwischen dem endoneuralen Raum und dem umgebenden extrazellulären Raum. Dadurch tragen sie zur Stabilität der neuralen Mikroumgebung bei. Diese physikalischen Barrieren basieren auf zellulären Verbindungsproteinen, insbesondere den TJ-Proteinen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

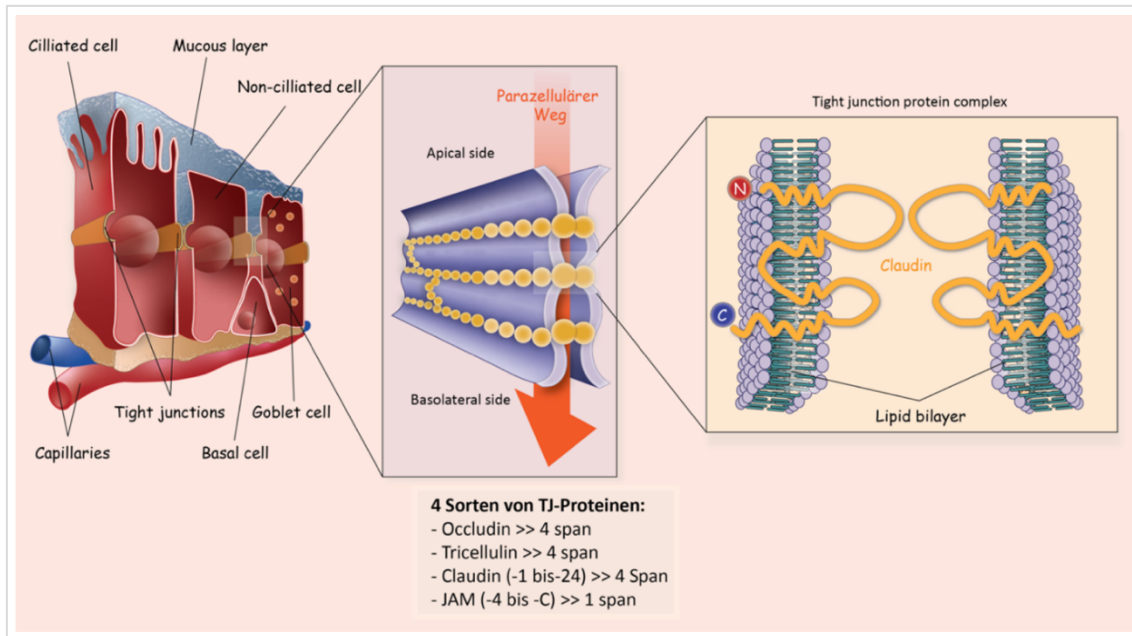
Die TJ, die auch als *Zonulae occludentes* bezeichnet werden, sind apikale Teile des Zellbindungskomplexes von benachbarten epithelialen oder endothelialen Zellen, die gürtelförmig um die gesamte Zelle angeordnet sind. Diese Zellverbindungen haben zwei wesentliche Funktionen: Sie bilden eine selektive Barriere gegenüber dem parazellulären Transport von Ionen und Molekülen, indem sie den Interzellularraum abdichten und einen Interzellularspalt von weniger als 1 nm belassen, der auch als Gate-Funktion bezeichnet wird (Anderson 2001). Diese Diffusionsbarriere basiert darauf, dass die extreme Annäherung der beiden benachbarten Membranen im Bereich der TJs zur Ausbildung von sog. Verschlussnähten führt, die auch als *kissing points* bezeichnet werden. Solche TJs finden sich daher überall dort, wo Körperinneres gegen Körperäußeres abgedichtet werden muss, z. B. im Darmepithel oder an den Stellen, an denen besonders sensible Organe geschützt werden müssen, etwa die Endothelien der BHS und die BNS im Perineurium. Durch die zuvor beschriebenen Verschlussnähte bilden die TJs eine Grenze zwischen den apikalen und basolateralen Zelloberflächendomänen in den polarisierten Epithelien. Mit der so entstandenen intramembranösen Diffusionsbarriere sorgen sie für eine Aufrechterhaltung der Zellpolarität, indem sie die Vermischung von apikalen und basolateralen Transmembrankomponenten (von Kanälen, Carriern und Rezeptoren) einschränken, was auch als Fence-Funktion bezeichnet wird (Schneeberger and Lynch 1992, Gumbiner 1993, Anderson 2001). Neben ihrer mechanischen Festigkeit, der Aufrechterhaltung der Polarität und der parazellulären Bewegung können die TJ-Proteine Signalproteine für zelluläre Prozesse rekrutieren (Krause, Winkler et al. 2008).

Zu den integralen Membranbestandteilen der TJs gehören die Proteine aus der Familie der TJ-assoziierten Marvel-Proteine (TAMPs), zu denen u. a. Occludin und Tricellulin, die Familie der Claudine und die *junctional adhesion molecules* (JAMs) zählen (siehe Abb. 3). Es wird angenommen, dass Claudine dabei einen Hauptbestandteil der TJ-

Stränge bilden (Tsukita and Furuse 1999, Tsukita, Furuse et al. 2001, Turksen and Troy 2004).

In der vorliegenden Arbeit spielen die TJs vor allem als Bestandteil der perineuralen Barriere eine wichtige Rolle. Die TJ-Proteine im Perineurium umfassen Zona-occludens-1 (ZO-1), Claudin-1, Claudin-3 und Occludin (Pummi, Heape et al. 2004) sowie Claudin-19 und Tricellulin (Hirakawa, Okajima et al. 2003, Pummi, Heape et al. 2004, Sauer, Krug et al. 2014). Darüber hinaus sind die Claudine 1, 2 und 5 sowie ZO-1 in autotypischen Übergängen von myelinisierenden Schwann-Zellen vorhanden (Poliak, Matlis et al. 2002).

Zona-occludens-1 (ZO-1, 220 kDa), auch als TJ-Protein 1 (TJP1) bezeichnet, ist ein intrazelluläres TJ-Protein, das TJs organisiert und Proteine wie Claudine, Occludin oder JAMs mit dem kortikalen Aktin-Cytoskelett verbindet (Guenzel 2017). Es gehört zu den Multi-Domain-Gerüstproteinen der Familie der peripheren und membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK). Somit ist es ein integraler Bestandteil der BNS-Funktion, der sowohl in endoneuralen Gefäßen als auch im Perineurium exprimiert wird. Ein TJP1-Knockout ist tödlich und Störungen wurden mit neurologischen Schädigungen in Verbindung gebracht (Katsuno, Umeda et al. 2008). ZO-1 wird hauptsächlich im Perineurium (Alanne, Pummi et al. 2009), in Gefäßen und in myelinisierten Schwann-Zellen in den Ischiasnerven von Menschen (Alanne, Pummi et al. 2009) und Mäusen (Morita, Furuse et al. 1999) exprimiert.



**Abbildung 3: Aufbau der TJs.** TJs bilden ein gürtelartiges Netzwerk aus TJ-Strängen um Epithelzellen. Claudine (gelb) bilden dabei das Rückgrat dieser TJ-Stränge (Eigene Abbildung in Anlehnung an: [https://klinphys.charite.de/for721/f\\_summary\\_d.htm](https://klinphys.charite.de/for721/f_summary_d.htm)).

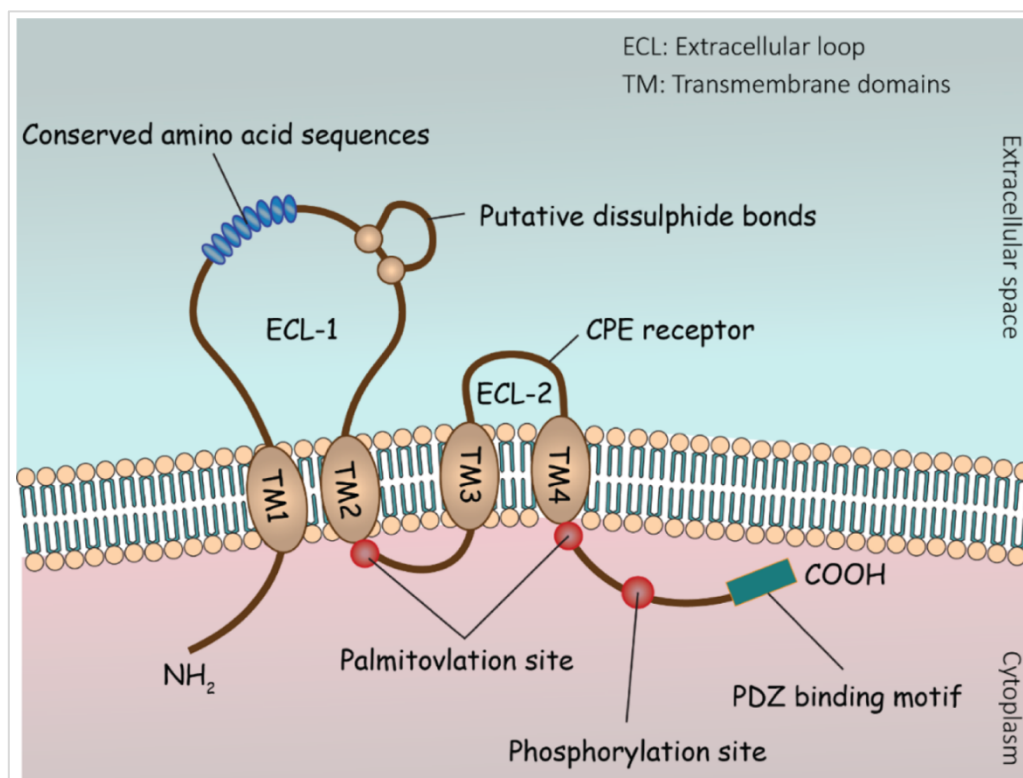
### 1.1.5 Claudine

Die Bezeichnung *Claudine* leitet sich ab vom lateinischen Verb *claudere* (*schließen*) ab und bezeichnet eine Familie der Transmembranproteine, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von TJs und der Bildung der TJ-Barriere spielen. Entdeckt wurden die ersten beiden Claudine, Claudin-1 und Claudin-2, in der Leber des Huhns durch die Arbeitsgruppe Furuse im Jahr 1998 (Furuse, Fujita et al. 1998, Mineta, Yamamoto et al. 2011). Mittlerweile konnten 27 unterschiedliche Claudine in der Maus und im Menschen mit molekularen Massen von 20 bis 34 kDa identifiziert werden (Alshbool and Mohan 2014).

#### 1.1.5.1 Struktureller Aufbau der Claudine

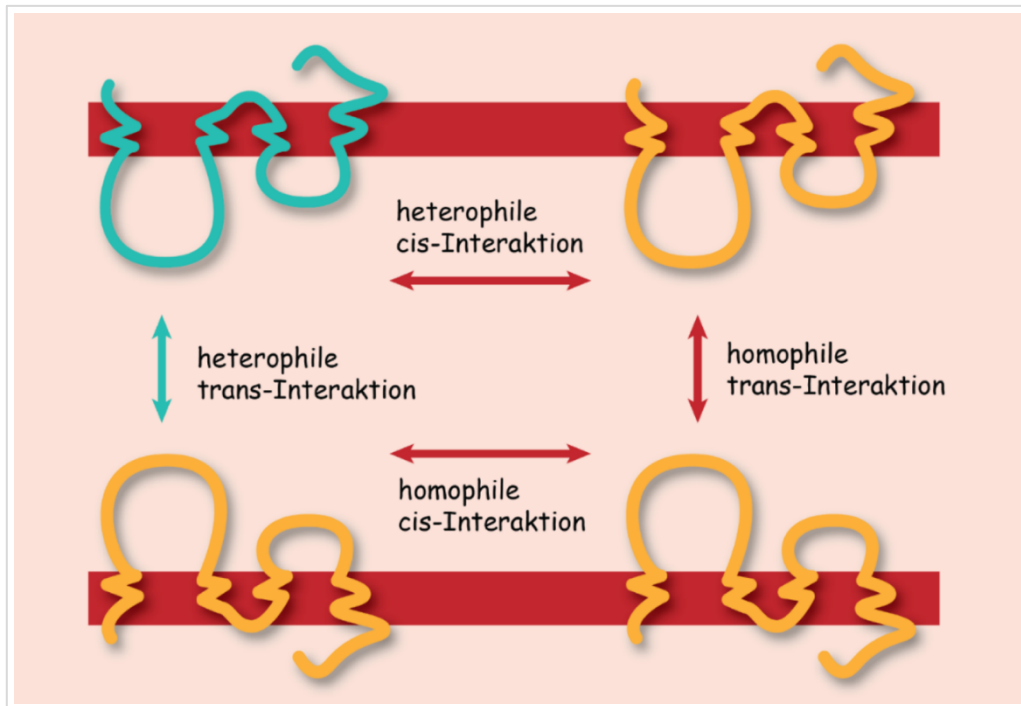
Strukturell bestehen Claudine aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen, einer kurzen intrazellulären Schleife sowie cytosolischen Amino- und Carboxytermini. In Abbildung 4 wird schematisch die Struktur der Claudine dargestellt (Alshbool and Mohan 2014). Während die Aminosäuresequenz der ersten und vierten Transmembran-Domäne unter den einzelnen Claudinen hochkonserviert ist, verhält es sich bei der zweiten und dritten Domäne nicht so (Alshbool and Mohan 2014). Durch die Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen werden die TJs gebildet. Dabei besitzt die erste extrazelluläre Schleife (ECL1) ein hochkonserviertes Signaturmotiv

[Gly-Leu-Trp-x-x-Cys-(8–10aa)-Cys] und in Abhängigkeit vom jeweiligen Claudin unterschiedlich geladene Reste, die die Ladungselektivität der TJ-Barriere bestimmen (Colegio, Van Itallie et al. 2002, Colegio, Itallie et al. 2003, Angelow, Ahlstrom et al. 2008). Die zweite extrazelluläre Schleife (ECL2) ist für die Vermittlung der Interaktionen zwischen den Claudinen entlang der Plasmamembran derselben Zelle (cis-Interaktion) oder von benachbarten Zellen (trans-Interaktion) zuständig (Krause, Winkler et al. 2008) (Abb. 4). Darüber hinaus wird zwischen der homophilen Interaktion (zwischen gleichen Claudinen) und der heterophilen Interaktion (zwischen verschiedenen Claudinen) unterschieden (Abb. 5). Es sind allerdings nicht alle Claudine miteinander kompatibel. So gibt es beispielsweise keine Kombinationen von Claudin-1 mit Claudin-2 (Furuse, Fujita et al. 1998).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Claudin-Struktur.** Claudine bestehen aus vier Transmembran(TM)-Domänen (I, II, III und IV), zwei extrazellulären Schleifen (ECL1 und ECL2), einer kurzen intrazellulären Schleife sowie cytosolischen Amino- und Carboxytermini. Zudem liegt auf ECL2 die Bindestelle für das Clostridium-perfringens-Enterotoxin (CPE) (Alshbool and Mohan 2014).





**Abbildung 5: Mögliche Interaktionsformen zwischen Claudinen.** Interaktionen zwischen benachbarten Claudinen derselben Zelle werden als cis-Interaktionen oder Oligomerisation bezeichnet, Interaktionen mit der Nachbarzelle als trans-Interaktionen. Homophile Interaktionen finden zwischen gleichen Claudinen statt, heterophilen Interaktionen zwischen unterschiedlichen.

Außerdem wird zwischen porenbildenden (*pore forming*) und abdichtenden (*sealing*) Claudinen differenziert. Zu ersteren zählen beispielsweise die Claudine 1, 3–9 und 11. Claudin-14 ist ein Beispiel für ein abdichtendes Claudin (Günzel and Fromm 2012). An den C-terminalen Positionen weisen die meisten Claudine ein PDZ-Bindungsmotiv (*post-synaptic density 95/disc large/zona occludens-1*) auf, das als Interaktionsdomäne für *Zonula-occludens*-Proteine fungiert und die Claudine am Cytoskelett verankert (Itoh, Furuse et al. 1999). Über posttranslationale Modifikationen und eine Phosphorylierung der Transmembran-Domänen können der Zusammenbau und die Interaktion der Claudine innerhalb der TJs sowie deren Barrierefunktion reguliert werden (González-Mariscal, Garay et al. 2010).

Die Claudin-Zusammensetzung der TJs ist von wesentlicher Bedeutung für die Permeabilität des jeweiligen Epithels. Einige Claudine sind charakteristisch für bestimmte Gewebearten, z. B. Claudin-16 für den aufsteigenden Teil der Henle-Schleife in der Niere (Simon, Lu et al. 1999). Andere Claudine treten wiederum in vielen verschiedenen Ge-

weben auf, z. B. Claudin-5 in den Endothelzellen der Blutgefäße von BHS und BNS sowie in einer Vielzahl von Geweben in Lunge, Herz, Darm und den Skelettmuskeln. Mutationen in den Claudin-Genen werden daher auch mit menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Beispielsweise sind Claudin-14-Mutationen für die erbliche Taubheit des Menschen verantwortlich (Wilcox, Burton et al. 2001). Mutationen im Claudin-16-Gen führen zu einer rezessiven Hypomagnesiämie, bei der der parazelluläre Fluss im aufsteigenden Glied der Henle-Schleife blockiert wird, was wiederum zu einer Beeinträchtigung der Resorption von  $Mg^{2+}$ -Ionen führt (Simon, Lu et al. 1999).

### 1.1.5.2 Claudin-1

Claudin-1 wurde erstmals 1998 beschrieben (Furuse, Fujita et al. 1998). Es hat eine molekulare Masse von 22 kDa, ist aus 211 Aminosäuren aufgebaut und wird in den meisten Geweben ubiquitär exprimiert (Krause, Winkler et al. 2008). Hierzu zählen unter anderem der Darm, die Milz, die Leber, die Niere und die Hoden (Morita, Furuse et al. 1999). Darüber hinaus wird es sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert. In Studien an peripheren Nerven zeigte sich eine hohe Expression von Claudin-1 im Perineurium und in einem geringeren Maße auch in endoneuralen Gefäßen, im Mesaxon, in Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und in paranodalen Schleifen myelinisierter Schwann-Zellen (Poliak, Matlis et al. 2002, Pummi, Heape et al. 2004, Alanne, Pummi et al. 2009).

Claudin-1 ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktionen beteiligt, was an den Auswirkungen von Mutationen im Claudin-1-Gen deutlich wird. So führt eine solche Mutation beim Menschen zum neonatalen Ichthyose-sklerosierenden-Cholangitis-Syndrom (NISCH). Dabei handelt es sich um eine seltene familiäre Erkrankung, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Durch eine Mutation im Claudin-1-Gen (3q28-q29) können Ichthyose, Alopezie, spärlicher Wuchs von Wimpern und Augenbrauen sowie Zahnprobleme und sklerosierende Cholangitis auftreten (Hadj-Rabia, Baala et al. 2004, Feldmeyer, Huber et al. 2006). An diesem Syndrom zeigt sich die pleiotrope Wirkung einer Claudin-1-Genmutation auf Leber und Haut.

Bei Mäusen fällt der Verlust von Claudin-1 deutlich gravierender aus und führt innerhalb weniger Stunden nach der Geburt zu einem letalen Verlust der Hautbarriere und zum Tod durch Dehydratation. Dies kann damit begründet werden, dass Claudin-1 bei Mäusen eine Schlüsselkomponente der epidermalen Barriere im *Stratum granulosum* bildet, wie es

Furuse et al. 2002 bei Claudin-1-Knockout-Mäusen nachweisen konnten (Furuse, Hata et al. 2002).

Eine verminderte Claudin-1-Expression verändert den Schweregrad der atopischen Dermatitis und die Hautbarrierefunktion (Tokumasu, Yamaga et al. 2016). In vielen Studien zeigte sich eine veränderte Ausschüttung bei der Entwicklung und beim Fortschreiten mehrerer Krebsarten (Übersicht bei Morin 2005). So konnte etwa eine Überexpression bei Dickdarm-, Nasopharynx-, Ovarial- und oralen Plattenepithelkarzinomen beobachtet werden (Dhawan, Singh et al. 2005, Singh, Sharma et al. 2010, Kwon 2013). Bei einigen Krebsarten spielt Claudin-1 dagegen eine entgegengesetzte Rolle, wenn – wie es z. B. bei Brustkrebs der Fall ist – die verminderte Expression von Claudin-1 mit dem Fortschreiten, der Invasion und der Entwicklung des metastasierten Phänotyps verbunden ist (Zhou, Moodie et al. 2015). Eine verminderte Expression von Claudin-1 korreliert außerdem beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit dem Rezidivstatus (Miyamoto, Kusumi et al. 2008). Auch bei der Aufrechterhaltung der BNS spielt es eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang konnten Studien an Ratten nach einer Verletzung des Ischiasnervs eine Verringerung der Claudin-1-mRNA-Expression und einen damit verbundenen verminderten Proteinspiegel nachweisen (Hirakawa, Okajima et al. 2003, Moreau, Mauborgne et al. 2016). Einschlägige Untersuchungen ergaben weiterhin, dass Claudin-1 die Hauptversiegelungskomponente der Perineuralbarriere ist (Hackel, Brack et al. 2012).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass das Claudin-1-Gen eines der durch  $\beta$ -Catenin im Wnt-Signalweg regulierten Gene ist. Da in der vorliegenden Arbeit die Expression von  $\beta$ -Catenin unter entzündlichen Bedingungen untersucht wird, wird auf den Wnt-Signalweg in Kapitel 1.1.6 näher eingegangen.

Claudin-1 bindet an die PDZ-Domäne des zellulären Aktin-Cytoskeletts über das ZO-1. Aktin ist ein cytoplasmatisches Mehrdomänen-Gerüstprotein (Itoh, Furuse et al. 1999).

### **1.1.5.3 Claudin-19**

Claudin-19 ist ein Transmembranprotein von 23 kDa, das die Permeabilität und Semiselektivität von TJs bestimmt und im peripheren Nervensystem, in der Niere und im retinalen Pigmentepithel exprimiert wird, aber nicht im ZNS (Günzel and Yu 2013). In peripheren Nerven ist Claudin-19 an den interlamellaren Übergängen der Myelinscheiden

lokalisiert und wird in myelinisierenden Gliazellen im PNS exprimiert (Miyamoto, Morita et al. 2005).

Die Bildung von TJs in myelinisierenden Zellen ist ohne Claudin-19 gestört (Günzel and Yu 2013). Claudin-19-defiziente Mäuse zeigen ein abnormes Verhalten und eine periphere Neuropathie mit motorischen Defekten, die durch eine komplette Auflösung der TJs im inneren und äußeren Mesaxon der Schwann-Zellen erklärt werden kann (Miyamoto, Morita et al. 2005). Mutationen in Claudin-19 sind für eine Form von *Familial primary hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis* (FHHNC) verantwortlich, die mit schweren Augendefekten assoziiert ist (Konrad, Schaller et al. 2006). Darüber hinaus wurde ein Mangel von Claudin-19 in den TJs bei der polyzystischen Nierenerkrankung nachgewiesen (Lee, Tong et al. 2006). Claudin-19 reguliert zusammen mit Claudin-16 als Na<sup>+</sup>-Kanal die parazelluläre Ionenresorption in TJs, z. B. in der Niere. Claudin-19 in Schweine-Nierenepithelzellen fungiert als Cl<sup>-</sup>-Blocker, während Claudin-16 als Na<sup>+</sup>-Kanal wirkt (Hou, Renigunta et al. 2008).

### 1.1.6 $\beta$ -Catenin und der Wnt-Signalweg

#### *$\beta$ -Catenin*

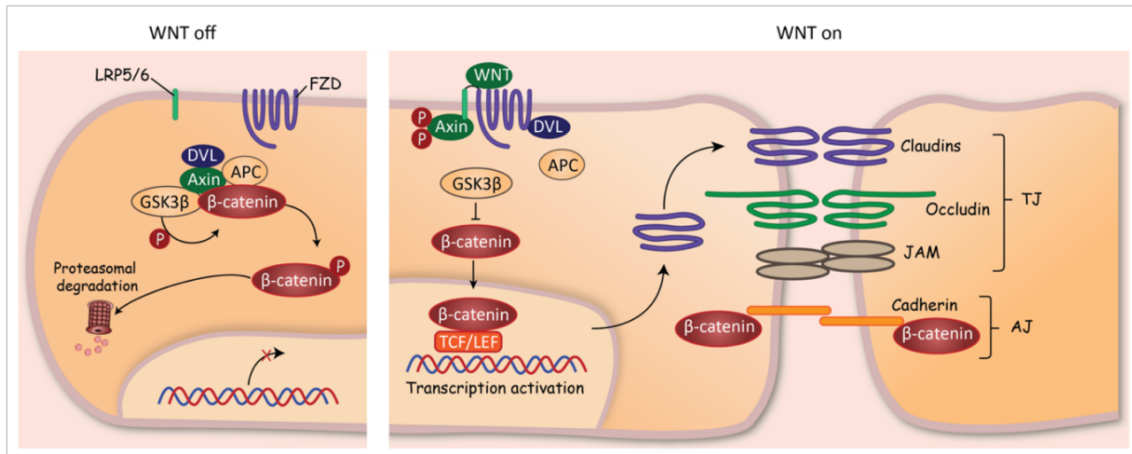
$\beta$ -Catenin ist ein aus 781 Aminosäuren aufgebautes Protein, das vom CTNNB1-Gen (Catenin-Beta-1-Gen) kodiert wird. Es hat zwei Hauptfunktionen: Zum einen spielt es durch seine Wechselwirkung mit Cadherinen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion zwischen verschiedenen Zellen (Brembeck, Rosário et al. 2006) und zum anderen ist es ein Co-Transkriptionsfaktor sowie der Schlüsselfaktor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges (Kikuchi 2013).

#### *Wnt-Signalweg*

Der Name *Wnt* ist eine Verbindung der Begriffe *wingless* (Segmentpolaritätsgen in *Drosophila*) und *INT-1* (Proto-Onkogen der Maus). Der Wingless-Signalweg wurde erstmals bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Sharma and Chopra 1976). Der Wnt-Signalweg vermittelt durch Effektorproteine extrazelluläre Signale an den Zellkern und reguliert so die Expression verschiedener Gene. Dabei gibt es zwei Signalwege, die im weiteren Verlauf durch den Wnt-Signalweg aktiviert werden. Der erste ist der kanonische Wnt-Weg, der auch als Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bekannt ist. Der zweite ist der

nichtkanonische Wnt-Weg, der wiederum in einen Wnt-/planaren Zellpolaritäts- und einen Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Nutzungsweg unterteilt wird (Oliva, Vargas et al. 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf den klassischen bzw. kanonischen Wnt-Signalweg, weshalb im Folgenden auch nur dieser erläutert wird.

Er wurden erstmals im Jahre 2004 humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) beschrieben (Etheridge, Spencer et al. 2004). Die kanonische Wnt-Signalübertragung beinhaltet die Bindung des Wnt-Liganden an den Frizzled (Fzd) Rezeptor und den Co-Rezeptor *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP5/6). Bei der Bindung wird der cytoplasmatische Schwanz von LRP5/6 phosphoryliert. Die Bindung des Wnt-Liganden initiiert das Andocken von *Dishelved* (Dvl) an Fzd und die weitere Rekrutierung des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes, der aus GSK-3 $\beta$  (Glykogensynthasekinase-3 $\beta$ ), *Adenomatous polyposis coli* (APC) (Tumorsuppressor-Protein) sowie den Proteinen Axin-1 und CK-1 (*casein kinase 1*) besteht, an die Plasmamembran. Im inaktiven Zustand befindet sich der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex im Cytosol, in dem er  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und dieses so für den Abbau im Proteasom markiert. Die Rekrutierung des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes in die Plasmamembran führt nach der Wnt-Aktivierung zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin. Die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel im Cytosol bewirken eine Translokation in den Kern, in dem es dann zu einer Modellierung der Transkription des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgens kommt (Nelson and Nusse 2004, Gordon and Nusse 2006, Mikels and Nusse 2006, Polakis 2008, Valkenburg, Graveel et al. 2011, Kikuchi 2013).



**Abbildung 6: Wnt-Signalweg.** Darstellung der Hauptbestandteile der TJ und der *adherens junction* (AJ) an der Grenzfläche zwischen den Endothelzellplasma-Membranen. Die Aktivierung der Wnt-Rezeptoren Fzd und LRP5 und 6 hemmt GSK3, um  $\beta$ -Catenin zu stabilisieren, das wiederum in den Kern gelangt, um die vom T-Zellfaktor (TCF) abhängige Transkription zu aktivieren. Dies treibt die Claudin-Genaktivierung entweder direkt oder indirekt an (gestrichelter Pfeil) und das daraus resultierende Claudin-Protein verstärkt die enge Verbindung (JAM = Verbindungsadhäsionsmolekül) (Abbildung in Anlehnung an Polakis 2008).

Erste Hinweise auf die Bedeutung des Wnt-Signalweges für die Regulation von Proteinen der TJ lieferte die Identifizierung von Claudin-1 als möglichem Zielgen der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Signaltransduktion (Miwa, Furuse et al. 2001). Miwa und seine Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Expression von Claudin-1 als eine Reaktion auf die Reduktion von intrazellulärem  $\beta$ -Catenin durch einen mit Adenovirus vermittelten Transfer von Wildtyp-APC in die APC-defizienten Dickdarmkrebszellen signifikant abnahm.

Darüber hinaus ist die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalübertragung für die Entwicklung der BHS wichtig und auch unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen an deren Abbau beteiligt (Laksitorini, Yathindranath et al. 2019). Ein Beleg dafür sind Studien, die den Verlust der endothelialen  $\beta$ -Catenin-Aktivität in einem erwachsenen Tiermodell mit Anfällen und einer Depletion von Claudin-1 in den Mikrogefäßen des Gehirns in Verbindung gebracht haben (Tran, Zhang et al. 2016). Die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und in den Kernen wird häufig bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet, die beispielsweise im Dickdarm, in der Leber, im Uterus oder im Gehirn auftreten.

## 1.2 Einfluss der Entzündung auf die Permeabilität der BNS

### 1.2.1 Entzündung

Bei einer Entzündung handelt es sich um eine Immunantwort, die das Überleben während einer Infektion oder Verletzung ermöglicht und eine Gewebehomöostase unter einer Vielzahl von schädlichen Bedingungen aufrechterhalten soll. Eine Entzündung führt zu einer vorübergehenden Verschlechterung der Gewebefunktion, die wiederum zu einer Pathogenese von Krankheiten mit veränderter Homöostase beitragen kann (Medzhitov 2010). Als die vier wichtigsten Anzeichen einer Entzündung treten Rötung, Schwellung, Hitze und Schmerz am Entzündungsort in Erscheinung (Medzhitov 2010). Als physiologische Ursache dieser Symptome konnten die Leukocyten-Migration aus den Blutgefäßen und andere Gefäßveränderungen nachgewiesen werden, die für eine akute Entzündungsreaktion charakteristisch sind. Bei der Analyse von vitalem Gewebe unter dem Mikroskop wurde ein Austreten von Plasma, verbunden mit einer Migration von Leukocyten aus den Blutgefäßen in das umgebende Gewebe beobachtet (Majno and Joris 2004, Medzhitov 2010). Als fünftes Kardinalzeichen wurde schließlich die *functio laesa* identifiziert, die die Störung der Funktion eines Gewebes, Körperteils oder Organs darstellt (Medzhitov 2010).

Die typische Entzündungsreaktion wird auf vier Komponenten zurückgeführt, welche die Entzündungsinduktoren, die sie erfassenden Sensoren, die von den Sensoren induzierten Entzündungsmediatoren und das von den Entzündungsmediatoren betroffene Zielgewebe sind. Jede dieser Komponente kommt in unterschiedlichen Formen vor und ihre Kombinationen führen zu verschiedenen Entzündungswegen.

Wichtige intrazelluläre Mediatoren für Entzündungen sind die Transkriptionsfaktoren STAT3, Kernfaktor-kappaB (NF- $\kappa$ B), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und das Aktivatorprotein 1 (AP-1). Allerdings sind diese intrazellulären Faktoren nicht einfach zu messen (Roe 2021). Leichter bestimmbare Biomarker für Entzündungen sind die Cytokine sowie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) einschließlich Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Roe 2021).

Die Entzündungsmediatoren wirken auf das Zielgewebe und die lokalen Blutgefäße, um eine Vasodilatation – also eine Extravasation von Neutrophilen und das Austreten von Plasma in das infizierte Gewebe – zu induzieren. Durch das Aufgebot von rekrutierten

Neutrophilen, gewebsresidenten Makrophagen und Mastzellen werden eindringende Krankheitserreger identifiziert und zerstört. Dieser Prozess wird durch Plasmakomponenten einschließlich der Antikörper und Komplementfaktoren unterstützt. Zusätzlich können IL-1, TNF und IL-6 systemische Wirkungen haben, wenn sie in ausreichenden Mengen sekretiert werden (Medzhitov 2010).

Das Entzündungssystem von Wirbeltieren setzt sich aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem zusammen. Das angeborene Immunsystem besteht aus Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und vielen weiteren Komponenten. Seine Hauptfunktion besteht darin, Bakterien, Viren und Fremdkörper im Organismus zu erkennen, daraufhin das adaptive Immunsystem zu aktivieren und Kaskaden zu ergänzen. Das adaptive Immunsystem ist hochspezifisch und hat sich im Laufe unseres Lebens entwickelt. Es besteht aus T- und B-Lymphocyten, bei denen Mustererkennungsrezeptoren einschließlich Toll-artiger Rezeptoren zusammen mit der Induktion von Cytokinen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spielen. Cytokine, die aus kleinen Proteinen bestehen, werden von einer Vielzahl von Zellen einschließlich der T- und B-Lymphocyten produziert. Sie können entzündungsfördernd oder entzündungshemmend sein und als Auslöser für die Freisetzung anderer Cytokine wirken. (Roe 2021)

### **1.2.2 Einfluss der Entzündung auf die Permeabilität der BNS**

Im Zuge einschlägiger Studien konnte nachgewiesen werden, dass Entzündungszustände zu einem Mangel bei der perineuralen Barriere und/oder einer erhöhten Permeabilität der endoneuralen Kapillaren führen (De la Motte, Hall et al. 1975, Guy and Rao 1984, Rechthand and Rapoport 1987, Bockman, Buchler et al. 1988). Antonijevic et al. konnten zeigen, dass durch eine FCA-induzierte Entzündung die Permeabilität der Nerven am Entzündungsort zunimmt. Die Opiode können aufgrund der gestörten perineuralen Barriere der Opioidrezeptoren auf den sensorischen Nerven am Entzündungsort ihre Wirkung entfalten (Antonijevic, Mousa et al. 1995). Unter normalen Umständen, d. h. ohne eine Entzündung, können die hydrophilen Opioidpeptide die Perineuralbarriere nicht überwinden. Deshalb bleiben die innerhalb des Endoneuriums liegenden Opioidrezeptoren für die Opiode unzugänglich, sodass diese keine Antinozizeption auslösen können. Durch eine regionale Opioidapplikation am *N. ischiadicus* der Ratte kann auf diese Weise demnach kein analgetischer Effekt erzielt werden (Grant, Vermeulen et al. 2001).



Ähnlich wie in der Studie von Antonijevic wurde auch in anderen Untersuchungen beschrieben, dass es in entzündeten Geweben zu einer Erhöhung der Permeabilität des Perineuriums kommt (De la Motte, Hall et al. 1975, Guy and Rao 1984, Rechthand and Rapoport 1987, Bockman, Buchler et al. 1988, Olsson 1990). Darüber hinaus führen periphere Nervenverletzungen und entzündliche Polyneuropathien zu einer höheren Permeabilität der BNS, was bei Erkrankungen des ZNS – z. B. der Amyotrophen Lateralsklerose, der Multiplen Sklerose, bei einer Rückenmarksverletzung oder der Alzheimer-Krankheit – durch Störungen der Barrierefunktion ein Fortschreiten und eine Verschlechterung der Erkrankung begünstigen kann. Eine Arbeitsgruppe berichtete bei inflammatorischen und demyelinisierenden Neuropathien von einer vaskulären Permeabilitätserhöhung und dem Zusammenbruch der BNS, was durch Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) induziert wird (Creange, Lefaucheur et al. 1998).

### **1.2.3 FCA-Entzündungsmodell**

Das von Jules T. Freund und Katherine McDermot entwickelte *Freund's Complete Adjuvans* (FCA) (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland) enthält 0,1 % hitzegetötetes und getrocknetes *Mycobacterium butyricum* in 85 % Marcol-52 und 15 % Aracel-A-Mannidmonooleat-Emulgator (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland).

Für die Experimente wurde das Modell der einseitigen Entzündung in der Hinterpfote der Ratte gewählt. Diese Methode zählt zu den etablierten und gut erforschten Modellen (Stein, Millan et al. 1988) und wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits in zahlreichen Studien eingesetzt, um die Prozessabläufe der Entzündung sowie die periphere und durch Opiode vermittelte Antinozizeption zu untersuchen.

Die intraplantare Injektion von FCA führt an der Pfote in der Regel zu offensichtlichen Anzeichen einer Entzündung: Rötung, Schwellung, lokale Überwärmung und Hyperalgesie.

## **1.3 Fragestellungen der Dissertation**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wirkt sich eine durch das FCA induzierte lokale Entzündung in der Hinterpfote auf die Permeabilität des Perineuriums im weiter proximal liegenden *N. ischiadicus* und an den sensiblen Nerven in der Dermis bei der lokalen Entzündung aus?
- Zu welchen Veränderungen der TJP-Expression (Claudin-1 und Claudin-19) kommt es dabei im Perineurium des *N. ischiadicus* und der lokalen peripheren Nerven?
- Zu welchem Zeitpunkt der durch das Freund-Adjuvans induzierten Entzündung zeigen sich maximale Effekte – sofern es zu Änderungen der TJP-Expression kommt?
- Welche möglichen Signalwege sind in diese Prozesse involviert? Spielt dabei das  $\beta$ -Catenin als ein Bestandteil des Wnt-Signalweges eine Rolle?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

Für die Behandlung der Versuchstiere wurde die Genehmigung von der zuständigen Tier-schutzbehörde der Regierung von Unterfranken (Protokollnummer/Aktenzeichen 55.2-2531.01-3/13) erteilt. Sie erfolgte im Einklang mit den Richtlinien der *International Association for the Study of Pain* Zur Untersuchung der ausgewählten Fragestellungen wurden adulte, männliche Wistar-Ratten (Harlan Laboratories) mit einer Gewichtsspanne von 150–220 g betrachtet. Die Haltung der Ratten erfolgte unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall des Zentrums für operative Medizin in der Oberdürrbacher Straße 6 in 97080 Würzburg. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um die benötigte Anzahl an Versuchstieren und deren Leiden so gering wie möglich zu halten. Alle invasiven Eingriffe erfolgten unter Kurznarkose mit Isofluran.

### 2.2 Verwendete Geräte und Materialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Kryostat CM3050S	Leica
Ultraschall-Homogenisator HD 3080	Bandelin
Zentrifuge 5418R	Eppendorf
Power Supply Peqpower E300	Peqlab
Mikrowellplatten (96 well)	Nunc
Blotkammer Fast Blot B44	Biometra
Blottingpapier	Whatman
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman
Varipette	Eppendorf
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise	Tecan
Objekträger Histo Bond	Marienfeld

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Standardlösung	Thermo Scientific
Complete Mini-Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten	Roche
BCA-Proteinassayreagenz A+B	Pierce
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol	Sigma-Aldrich
Formaldehyd, 37-prozentige Lösung	Merck
Lumi Light Plus Western Blotting Kit	Roche
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Steriles Wasser Aqua	B. Braun
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Tissue Tek O. C. T. Compound	Sakura
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

### 2.3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

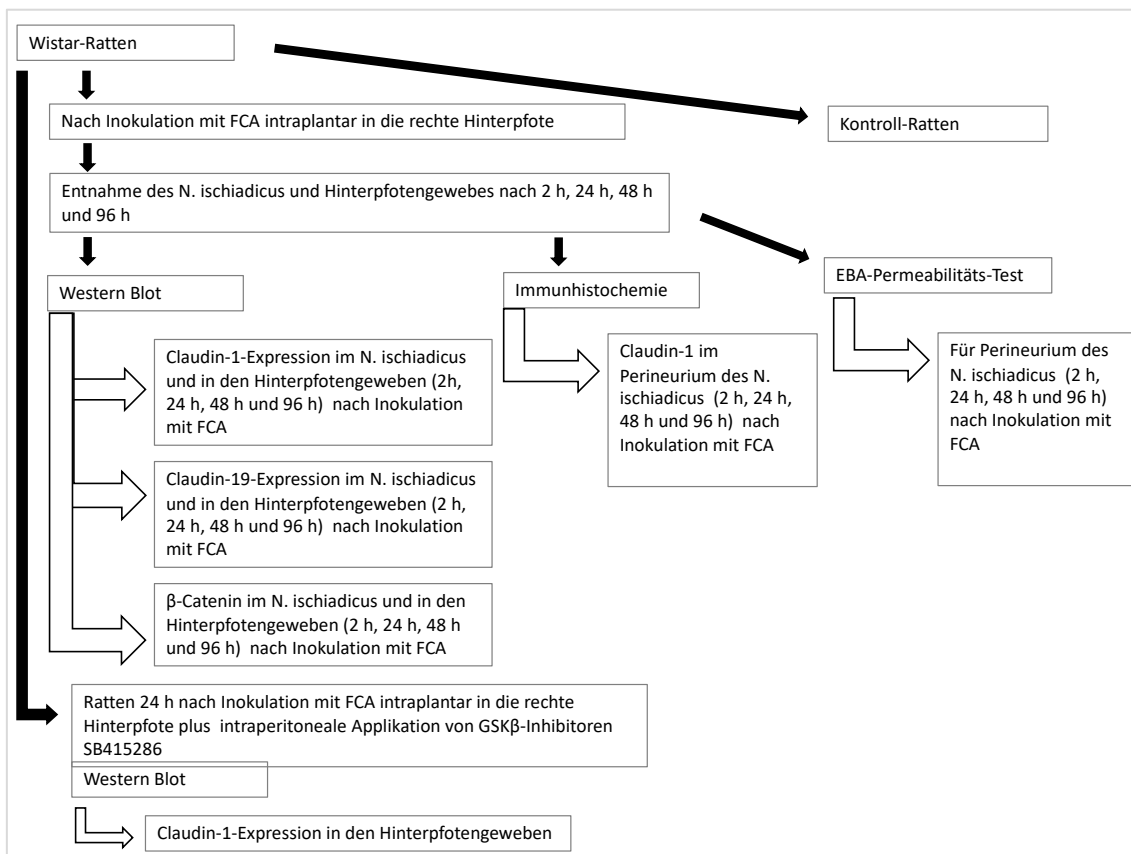


Abbildung 7: Schematische Übersicht über die Versuche.

## 2.4 Intraplantare Injektion

In dem verwendeten Entzündungsmodell wird zur Induktion der lokalen Entzündung das bereits in Kapitel 1.2.3 beschriebene FCA (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Es enthält 0,1 % hitzegetötetes und getrocknetes *Mycobacterium butyricum* in 85 % Marcol-52 und 15 % Aracel-A-Mannidmonooleat-Emulgator (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland). Die 150 µl FCA werden unter Isoflurangas-Anästhesie mit 5 % Isofluran in die Plantaroberfläche der rechten Hinterpfote einer Wistar-Ratte injiziert. Die linke Hinterpfote bleibt unbehandelt und dient als interne individuelle Kontrolle.

Die nachfolgend erläuterten Untersuchungen erfolgten in einem Zeitraum von 2 bis 96 Stunden nach der FCA-Injektion. Der Grund für dieses gewählte Zeitintervall ist die Tatsache, dass die größtmöglichen Entzündungseffekte nach diesem kurzen Zeitabschnitt erreicht werden.

An zuvor festgelegten Zeitpunkten (2 h, 24 h, 48 h und 96 h) nach der erfolgten intraplantaren Injektion von FCA wurde den Tieren unter Verwendung der Isoflurangas-Anästhesie 300 µl T61 injiziert (MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland). Dabei handelt es sich um eine letale Kombination aus Embutramid, Mebezonium und Tetracain. Anschließend erfolgte die Entnahme des *N. ischiadicus* und der Plantaroberflächen sowohl aus den ipsi- als auch aus den kontralateralen Extremitäten.

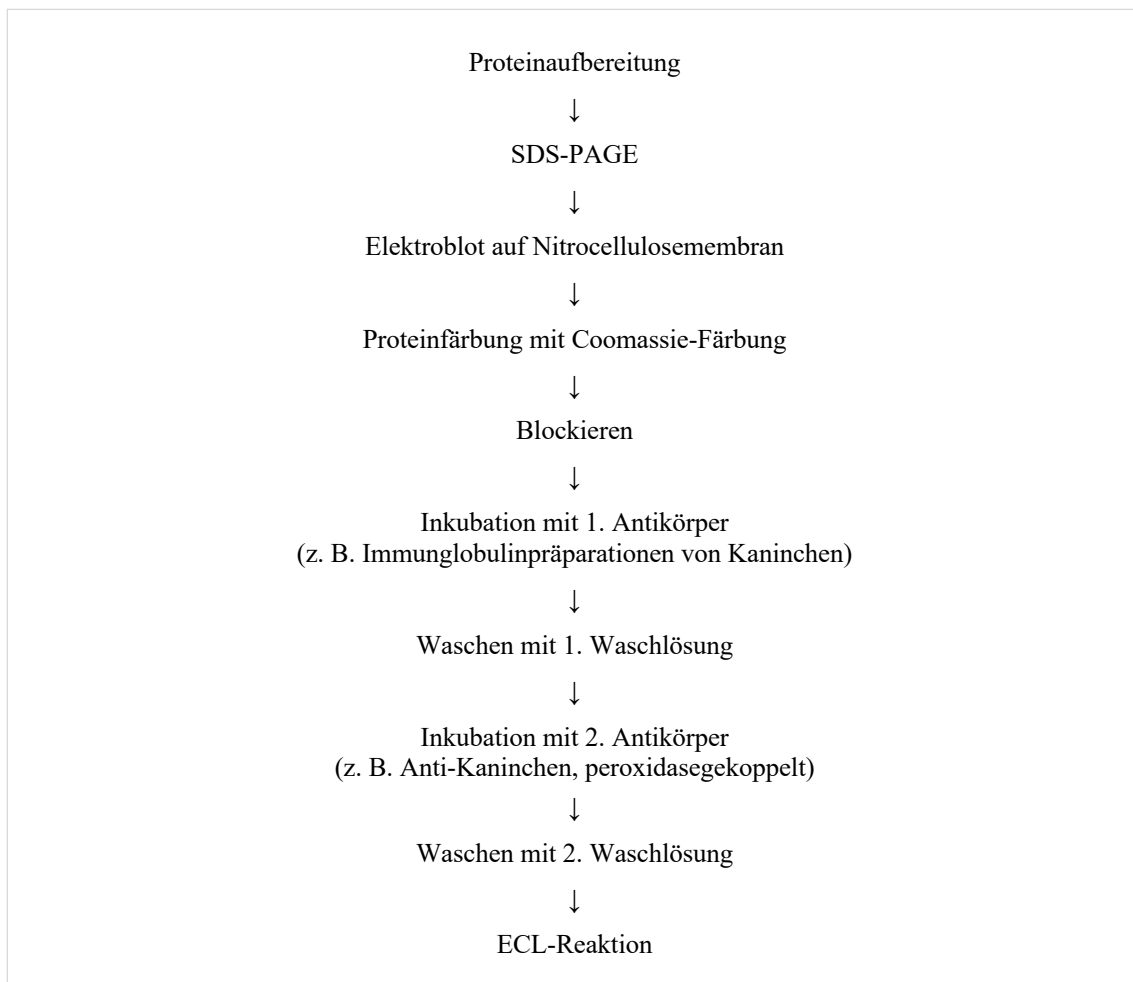
## 2.5 Intraperitoneale Injektion von GSK $\beta$ -Inhibitoren

In einem Teil der Experimente wurden die Ratten täglich intraperitoneal (i. p.) mit dem GSK $\beta$ -Inhibitor SB415286 behandelt (0,1–1 mg/kg Körpergewicht, Sigma Aldrich). 24 Stunden nach der intraplantaren Injektion von FCA wurde den Tieren der Inhibitor appliziert. Im Anschluss wurden ihnen jeweils 300 µl T61 injiziert und Hinterpfotengewebe wurde zur weiteren Analyse entnommen.

## 2.6 Western Blot

Beim *Western Blot* handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, das zur Detektion von Proteinen in einem Proteingemisch eingesetzt wird und im Wesentlichen aus

drei Arbeitsschritten besteht. Im ersten Schritt werden die Proteine durch eine Gelelektrophorese in einer Trägermatrix (SDS-PAGE, Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) anhand ihrer molekularen Größe in einzelne Proteinbanden getrennt. Im zweiten Schritt werden die getrennten Proteinbanden durch ein weiteres elektrisches Feld aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Vorgang wird als Blotting bezeichnet. Im letzten Schritt werden die gesuchten Proteine über eine Immundetektion visualisiert, wofür zwei Antikörper verwendet werden. Der Primärantikörper ist dabei gegen ein Antigen des gesuchten Proteins gerichtet. An diesen Komplex bindet ein enzymmarkierter Sekundärantikörper, der wiederum gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieser Prozess katalysiert dann eine Chemilumineszenz-Reaktion, wodurch die markierten Banden sichtbar werden. Einzelheiten zu den Arbeitsschritten werden in den jeweiligen Kapiteln erläutert. Eine schematische Darstellung des Vorgehens findet sich in Abbildung 8.



**Abbildung 8:** Schema des *Western Blots*.

### 2.6.1 Probenaufarbeitung

#### *Aufbereitung der Nervenproben*

Den Versuchstieren, welche ausschließlich die FCA-Injektionen erhalten hatten, wurden nach der Behandlung die Ischiasnerven entnommen. Diese wurden direkt nach der Entnahme in 500 µl Cytosol-Lysepuffer mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail gegeben, anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Unmittelbar vor der weiteren Aufbereitung wurden die Proben aufgetaut. Die Cytosolfractionen aus den Proben wurden durch Zerkleinerung mit einem Mini-Pistill und durch Homogenisierung mittels Ultraschallbehandlung ( $3 \times 5\text{ s} / 3\text{ s}$  Pause) gewonnen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (bei  $4\text{ °C}$ ) bei  $4500 \times g$  für 10 min und eine weitere Zentrifugation des verbleibenden Überstandes bei  $16900 \times g$  für 80 min. Das Cytosol wurde entnommen und die in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen verbleibenden Pellets wurden mit 50 µl Ripa-Puffer mit Complete versetzt.

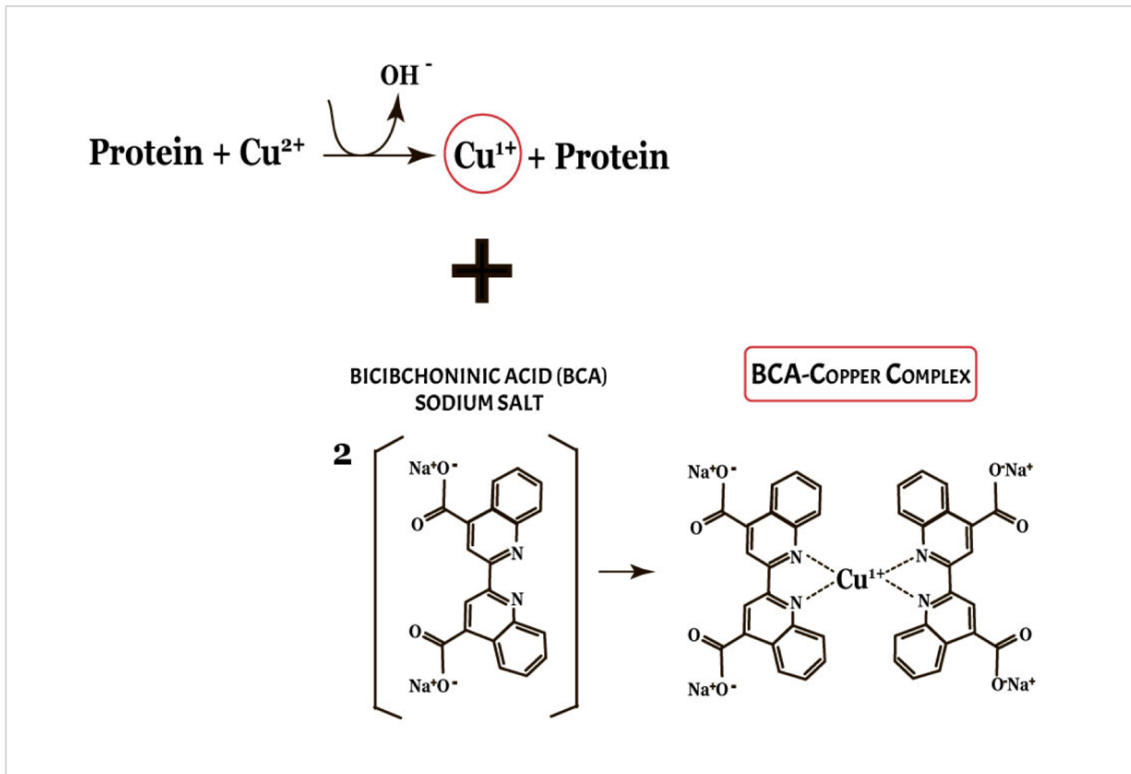
#### *Aufbereitung der Hinterpfotengewebe*

Vor der Entnahme des Hinterpfotengewebes wurde darauf geachtet, dass die das Hinterpfotengewebe umgebende Haut sorgfältig abgetrennt und verworfen wurde, um das Ergebnis durch in der Haut enthaltenes Claudin-1 nicht zu verfälschen. Zur weiteren Aufbereitung wurde das Gewebematerial geschnitten und mit 250 µl SDS-Lysepuffer versetzt. Danach wurden die Gewebeproben für eine Dauer von 3 min mit einer Frequenz von 30 s homogenisiert und anschließend mit  $10000 \times g$  für 10 min (bei  $4\text{ °C}$ ) zentrifugiert.

### 2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bicinchoninsäure-Assay)

Bei der Proteinquantifizierung mit Bicinchoninsäure (BCA) handelt es sich um eine Kombination aus einer Biuret- und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA. Im ersten Reaktionsschritt, der sog. Biuret-Reaktion, bildet das Protein mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex mit anschließender Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen. Diese Reduktion der Kupfer-Ionen wird hauptsächlich durch vier Aminosäurereste einschließlich Cystein bzw. Cystin, Tyrosin und Tryptophan verursacht, die in Proteinmolekülen vorkommen. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Im zweiten Reaktionsschritt bilden die  $\text{Cu}^+$ -

Ionen mit der BCA einen violetten Chelat-Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm (siehe Abb. 9). Dadurch kann die Probe spektralphotometrisch analysiert werden. Der BCA-Proteinassay wird zur Quantifizierung des Gesamtproteins in einer Probe verwendet, wodurch der Konzentrationsverlauf von bestimmten Eiweißmolekülen beurteilt werden kann.



**Abbildung 9: Prinzip des BCA-Assays.**  $\text{Cu}^{2+}$  wird unter alkalischen Bedingungen durch Proteine, die Cystin-, Cystein-, Tyrosin- und/oder Tryptophan-Reste enthalten, zu  $\text{Cu}^+$  reduziert.  $\text{Cu}^+$  interagiert mit BCA und bildet einen violetten BCA-Kupfer-Komplex.

### Protokoll

Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der aufgearbeiteten Proteinproben (1:10 in SDS-Lysepuffer verdünnt) wurden auf eine 96-well-Mikrotiterplatte als Triplikate in je drei nebeneinanderliegende Kavitäten aufgetragen und mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung versetzt (Reagenz A zu Reagenz B im Verhältnis 50:1). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration konnte anhand des Mittelwerts der Einzelmessungen bestimmt werden.



### 2.6.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine für die *Western-Blot*-Analysen wurde mittels SDS-PAGE nach der Methode der diskontinuierlichen vertikalen Elektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode werden die gebildeten SDS-Proteinkomplexe in einem restriktiven Polyacrylamidgel nach den Molmassen getrennt.

#### *Physikalisch-chemisches Prinzip*

SDS-PAGE wurde im Jahre 1967 von Shapiro und seinen Mitarbeitern entwickelt (Shapiro, Viñuela et al. 1967) und gehört heute zu den Standardmethoden in der Proteinanalytik. Die Abkürzung *SDS* steht für *sodium dodecyl sulfate* (*Natriumdodecylsulfat*), bei dem es sich um ein starkes anionisches Detergens handelt, mit dem fast alle Proteine – auch stark hydrophobe – in Lösung gebracht werden können.

Zu diesem Zweck wird es dem Probenpuffer im Überschuss zugegeben. Um die Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten aufzuspalten, werden dem Puffer reduzierende Thiolverbindungen zugesetzt, z. B.  $\beta$ -Mercaptoethanol. Durch diesen Vorgang lösen sich Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen im Protein auf, was zu einer Aufspaltung der Quartärstruktur des Proteins in denaturierte Untereinheiten führt. Beim Kontakt der SDS-Ionen mit dem Protein bilden sich Micellen aus und es entsteht ein SDS-Proteinkomplex. Dabei kommt es zu einer Anlagerung der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten an die hydrophoben Proteindomänen und zu einer Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Sulfatgruppen und dem umgebenden Hydratwasser. Die kationischen Gruppen der Proteine werden durch ihre Wechselwirkung mit den Sulfatgruppen des SDS abgeschirmt. Die entstandenen SDS-Proteinkomplexe weisen folglich eine negative Gesamtladung auf und können sich daher im elektrischen Feld nur in anodischer Richtung bewegen. SDS bindet in einem festen Verhältnis an die Proteine (ein Molekül SDS auf zwei Aminosäurereste, pro 1 g Protein binden ca. 1,4 g SDS), sodass alle Proteine ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis aufweisen. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel und damit auch die Trennung der Proteine hängen primär von ihrer Größe ab. Durch einen Vergleich mit SDS-denaturierten Proteinen bekannter Größe können Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der denaturierten Proteine bzw. Proteinuntereinheiten unbekannter Größe gezogen werden. Als Trennmedium wird bei dieser Methode ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet.

*Protokoll der SDS-Gelelektrophorese*

Die zu analysierenden Proben wurden mit Lämmli-Auftragspuffer (5 x) versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden sie kurz zentrifugiert. Die Polyacrylamidgele, die aus Trenn- und Sammelgel bestehen, wurden frisch angesetzt. Ihre Zusammensetzung wird in Tabelle 3 angegeben. Zum Gießen des Gels wurde eine speziell dafür vorgesehene Gelgießkammer verwendet. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten, die zuvor mit 70-prozentigem Ethanol gereinigt worden waren, mithilfe einer Pipette eingefüllt und unmittelbar danach vorsichtig mit Wasser überschichtet. So wurde eine gleichmäßige Polymerisation sichergestellt und es wurden damit eine scharfe Grenze des auspolymerisierten Gels und eine glatte Oberfläche ermöglicht. Ohne diese Überschichtung mit Wasser würde sich ein konkaver Meniskus ausbilden, was zu verzogenen Proteinbanden führen würde.

Das überschichtete Wasser wurde nach erfolgter Polymerisation abgegossen und die verbliebenen Wasserreste wurden mit Filterpapier abgesaugt. Danach wurde das Sammelgel vorsichtig über das Trenngel geschichtet und zur Ausformung von Ladetaschen wurde luftblasenfrei ein Kunststoffkamm in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Nach dem Einsetzen der fertigen Gele in die Elektrophoresekammer und dem Auffüllen der Pufferbank mit Laufpuffer (1 x) wurde der Kunststoffkamm aus dem Gel entfernt und jede Geltasche zur Reinigung und zur Entfernung von Gelresten vorsichtig mit Kathodenpuffer gespült. Danach wurden die Proteinproben in gleichen Volumina (10–20 µl pro Geltasche) in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche wurden dabei stets 4 µl eines Proteinmolekulargewichts-Markers gegeben, um später das Molekulargewicht der detektierten Proteine bestimmen zu können. Die Elektrophorese erfolgte im SDS-PAGE-Laufpuffer zunächst für 30 min bei 50 V und anschließend für weitere 150 min bei 150 V, bis die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht war. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Elektrophoresegels**

Material	Trenngel 12 %	Material	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,35 ml	H <sub>2</sub> O	2,35 ml
3 M TRIS, pH 8,8	2,5 ml	0,5 TRIS pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	50 µl
Acrylamid/Bis (30:2)	4 ml	Acrylamid/Bis (30:2)	850 µl

10 % APS*	100 µl	10 % APS*	50 µl
TEMED*	5 µl	TEMED*	5 µl

\* TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) müssen unmittelbar, bevor das Gel gegossen wird, zugegeben werden, da diese beiden Komponenten die Polymerisation starten.

**Tabelle 4: Elektrophoresepuffer und Ladepuffer**

Elektrophoresepuffer	Ladepuffer (5x)
25 mM Tris	62,5 mM Tris, pH 6,8
192 mM Glycin	2 % SDS
0,1 % SDS	10 % Glycerol
	1 % MSH
	1 % Bromphenolblau

#### 2.6.4 Proteintransfer durch *Western Blot*

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblothing und den Einsatz einer Semi-Dry-Transferapparatur bandengetreu auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Beim Elektroblothing wandern die Proteinbanden durch das Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels aus dem Gel auf eine Membran, auf der sie gebunden werden. Die Nitrozellulosemembranen und die für den Blothingvorgang benötigten Whatman-Papiere werden dazu in etwa auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und anschließend für 5 min mit einem Semi-Dry-Puffer (siehe Tabelle 5) äquilibriert. Auf der Anodenseite der Blothingkassette werden, wie es in Abbildung 10 dargestellt ist, das SDS-Gel und die Membran aufeinandergelegt und luftblasenfrei zwischen jeweils zwei Semi-Dry-Puffer-äquilibrierte Filterpapiere (Whatman-Papier) gebettet.

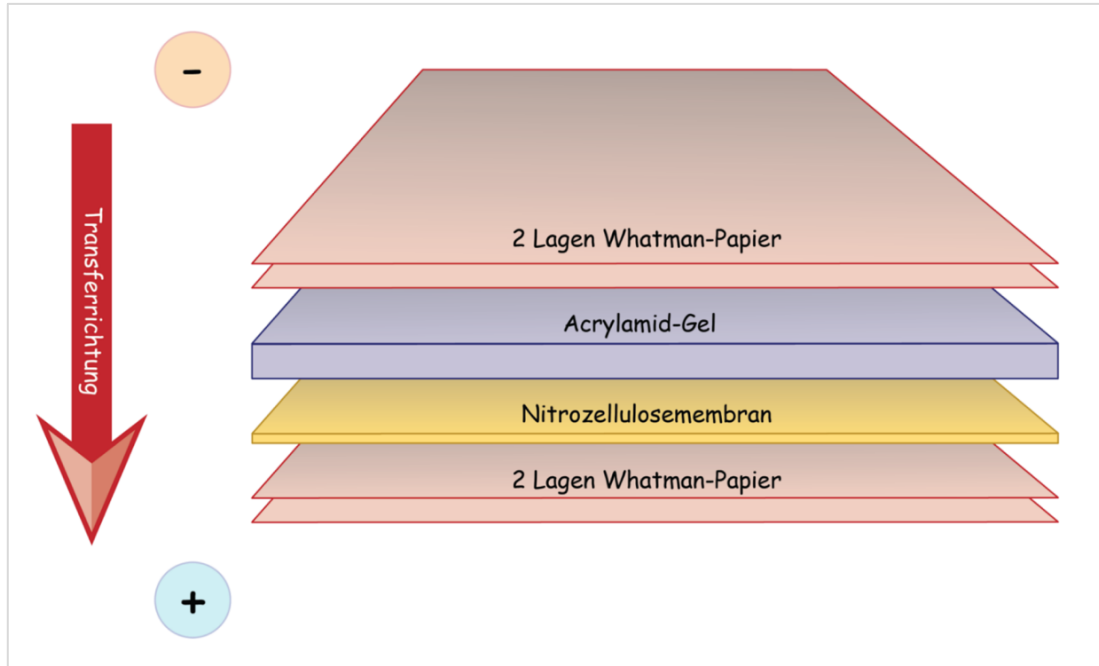


Abbildung 10: Aufbau des Semi-Dry-Blots.

Der Blottingvorgang erfolgte unter Verwendung eines Transferpuffers bei einer angelegten Spannung von 15 V und einer Stromstärke von 0,2–0,4 A über einen Zeitraum von 90 min.

Tabelle 5: Semi-Dry-Puffer

Semi-Dry-Puffer (1 x)
192 mM Glycin
25 mM Tris
20 % Methanol

### 2.6.5 Coomassie-Färbung

Zur Detektion der Proteinbanden im Polyacrylamidgel wurde nach einem Elektroblothing eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Damit konnte bereits eine erste Aussage zur Proteinquantifizierung getroffen werden. Die Polyacrylamidgele wurden dabei für ca. 10 min in der Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 6) und für weitere 15 min in einer Entfärbelösung geschwenkt und anschließend über Nacht mit Aqua dest. entfärbt. Am folgenden Tag wurden die Gele fotografiert.

**Tabelle 6: Coomassie-Blau und Entfärbelösung**

Coomassie-Blau (0,5 l)	Entfärbelösung
Serva-Blau G250 1,25 g	Essigsäure 10 %
Isopropanol 227 ml	Methanol 30 %
Aqua dest. 227 ml	Aqua dest. 60 %
Essigsäure 46 ml	

### 2.6.6 Immundetektion

#### *Prinzip der Immundetektion*

Bei der Immundetektion werden die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteinbanden mit einem antikörpergekoppelten Detektionsverfahren visualisiert. Dieses Verfahrens basiert auf dem Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip und besteht aus mehreren Schritten. Im ersten erkennen die antigenspezifischen Primärantikörper die durch die Semi-Dry-Methode transferierten Antigene auf der Nitrocellulosemembran und binden sich an Epitope auf dem Antigen. Im zweiten Schritt bindet ein Sekundärantikörper an die Fc-Region des primären Antikörpers. Bei diesem Sekundärantikörper handelt es sich um ein Antikörperkonjugat (Immunkonjugat) mit einem farbgebenden Reporterenzym, z. B. der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* [HRP]), über das die Detektion der Antigenbanden durch eine Lumineszenzreaktion (Schritt 3) erfolgt (siehe Abb. 11). Bei dieser Reaktion wandelt HRP die Substanz Luminol in deren oxidierte Form um, wobei die entstehende Chemilumineszenz durch spezielle Geräte detektiert werden kann. Im eingesetzten ECL-Gemisch ist Luminol in der Lösung I enthalten. Um diese Reaktion in Gang zu setzen, wird zusätzlich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltige Lösung II verwendet. Damit es nicht zu einer unspezifischen Bindung der Primärantikörper kommt, werden die entsprechenden Bindungsstellen durch eine Blockierlösung abgesättigt.

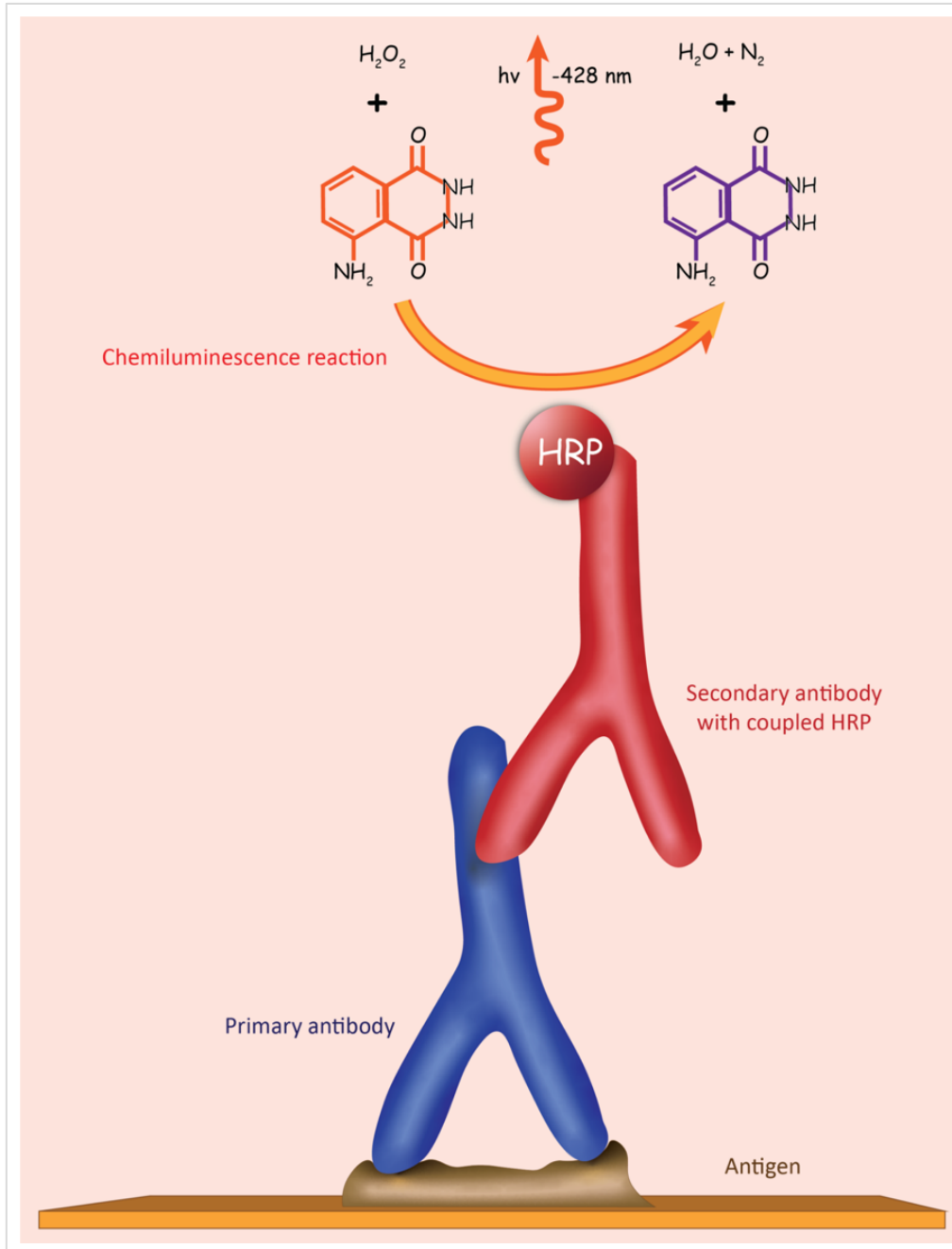


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Immundetektion.

### Protokoll

Nach dem erfolgten Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran zuerst 5 min mit *Tris-buffered-Saline*(TBS)-Tween gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur in TBS-Tween (siehe Tabelle 7) mit 5 % Magermilchpulver blockiert. Zur Detektion der Proteine auf der Membran wurde diese in einem entsprechend verdünnten Antikörper bei 4 °C

über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten ein Waschschrift (3 x für 10 min mit TBS-Tween) und die Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper (verdünnt in TBS-Tween mit 5 % Magermilchpulver) für 90 min. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift wurde die Detektion mit den ECL-Lösungen I und II des *Lumi Light Plus Western Blotting Kits* von Roche durchgeführt. Dabei werden die Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und lichtgeschützt auf die Membran aufgetragen. Die dabei auftretenden Lichtemissionen werden mit dem FluorChem-2-System (Alpha Innotech) fotografiert.

Um die gleichmäßige Beladung des Gels verifizieren zu können, wurde zusätzlich eine Ladekontrolle durchgeführt. Nur mit deren Hilfe kann sichergestellt werden, dass Änderungen in der Bandenintensität tatsächlich biologische Unterschiede zwischen den Proben zeigen. Dazu wurden die Arbeitsschritte der Immundetektion erneut mit einem zweiten Set von Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle für das Hinterpfotengewebe diente dabei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Für den *N. ischiadicus* wurde  $\beta$ -Aktin als Kontrolle eingesetzt. In mehreren Untersuchungen konnte diesbezüglich bereits gezeigt werden, dass  $\beta$ -Aktin im entzündeten Gewebe mitreagiert. Die verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 8 und 9 gelistet.

**Tabelle 7: TBS-Tween und Blockierlösung**

TBS-Tween	Blockierlösung
10 mM Tris	2,5 % BSA
150 mM NaCl	2,5 % Milchpulver
0,1 % Tween-20	in TBS-Tween gelöst

**Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper**

Antigen	Primärantikörper
$\beta$ -Aktin	Monoklonaler AK Maus Sigma #A5441 1:10 000 in 5 % BSA in TBS-Tween
Claudin-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #51-9000 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
Claudin-19	Monoklonaler AK Ziege v. Santa Cruz Biotechnology: sc-162689 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween
$\beta$ -Catenin	AK Kaninchen v. Abcam ab6302 1:40 000 in 5% BSA in TBS-Tween

Antigen	Primärantikörper
GAPDH	Monoklonaler AK Maus Millipore #MAB374 1:2000 in 5 % BSA in TBS-Tween

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper

Primärantikörper	Sekundärantikörper
β-Aktin	Anti-Kaninchen IgG GE Healthcare #NA9310 1:3000 in Blockierlösung
GAPDH	Anti-Maus IgG GE Healthcare #NA9310 1:3000 in Blockierlösung
Claudin-1	Anti-Kaninchen IgG Roche Lumi-Light WB Kit #2015218 1:1000 in Blockierlösung
Claudin-19	Anti-Ziege IgG-HRP sc-2020,LOT,JO711; Santa Cruz Biotechnology 1:1000 in Blockierlösung
β-Catenin	Anti-Kaninchen IgG HRP-linked AK Cell Signaling 7074S 1:30 000 in Blockierlösung

### 2.6.7 Densitometrie

Zur semiquantitativen Analyse der *Western Blots* wurde das Verfahren der Densitometrie verwendet. Bei diesem erfolgt die Bestimmung der optischen Dichte (*integrated density value* [IDV]) von Proteinbanden computergestützt. Für die densitometrische Auswertung der *Western Blots* wurde die Software *Alpha View* (Alpha Innotech) herangezogen. Die Berechnung des Intensitätsverhältnisses zwischen einer Bande des zu untersuchenden Proteins X und der dazugehörigen Ladungskontrolle erfolgte anhand der folgenden Formel:

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



## 2.7 EBA-Permeabilitätstest

*Evans Blue* bzw. Evansblau ist ein Farbstoff, der Albumin bindet. Die entsprechende Methode basiert darauf, dass das Perineurium unter physiologischen Bedingungen für Albumin undurchlässig ist, sodass durch evansblaugebundenes Albumin (EBA) außerhalb des Perineuriums verbleibt. Bei pathologischen Zuständen, die zu einer erhöhten Permeabilität des Perineuriums führen, verliert das Perineurium teilweise seine TJs und wird so für große Proteine wie Albumin durchlässig. Aufgrund dieser Eigenschaften dient der EBA-Permeabilitätstest als einfaches, reproduzierbares und genaues Instrument zur Beurteilung von Veränderungen der Permeabilität des Perineuriums. Eine erhöhte Permeabilität der Barriere wird als Permeation von EBA, die durch eine rote Färbung des Nervs angezeigt wird, in das Endoneurium definiert.

### *Protokoll*

Die Ischiasnerven von Kontrollratten und Ratten, denen FCA injiziert worden war, wurden nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h Stunden entnommen. Die Proben wurden *ex vivo* für die Dauer von 1 h in ein Bad mit 2 ml EBA (5 % Rinderalbumin, markiert mit 1 % Evansblau, alle Sigma Chemicals) getaucht. Zur Anfertigung der histologischen Präparate wurden die Proben mit 10 % Formaldehydlösung fixiert, um anschließend 10 µm breite Gefrierschnitte mit dem Kryostat (CM3050S, Leica) für die konfokale Laserscanmikroskopie anzufertigen. Als Kontrolle diente ein aus der unbehandelten Ratte entnommener *N. ischiadicus*. Eine erhöhte Permeabilität der Barriere wurde als Permeation von EBA (rote Färbung im Nerv) in das Endoneurium definiert.

## 2.8 Immunfluoreszenzfärbung

### 2.8.1 Aufbereitung der Proben

Die entnommenen *Nn. ischiadici* wurden unmittelbar nach der Präparation in eine Form mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound) überführt und in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Danach wurden 7 µm dicke Kryoquerschnitte der Nerven mit einem Kryostaten vom Typ CM3050S (Leica) bei -20 °C angefertigt, auf Objektträger (*Thermo Fisher Scientific*, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und in Objektträgerkästen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.8.2 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Das Grundprinzip der indirekten Immunfluoreszenz ähnelt dem des *Western Blots* und besteht aus zwei Arbeitsschritten (siehe Abb. 12). Im ersten Schritt erfolgt die Inkubation der angefertigten Schnitte mit dem Primärantikörper, der gegen das entsprechende Zielantigen des gesuchten Proteins gerichtet ist. In einem zweiten Arbeitsschritt werden durch den Einsatz eines mit Fluorochrom gekoppelten Detektionssekundärantikörpers, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, die im ersten Arbeitsschritt gebildeten Komplexe sichtbar. Mit dieser Methode kann die Lokalisation der vermuteten molekularen Prozesse erfolgen. Der Einsatz von zwei Antikörpern hat darüber hinaus den Vorteil, dass es dadurch zu einer wesentlichen Verstärkung der Fluoreszenz kommt und sich aus wenigen Grundelementen viele Kombinationen ergeben können.

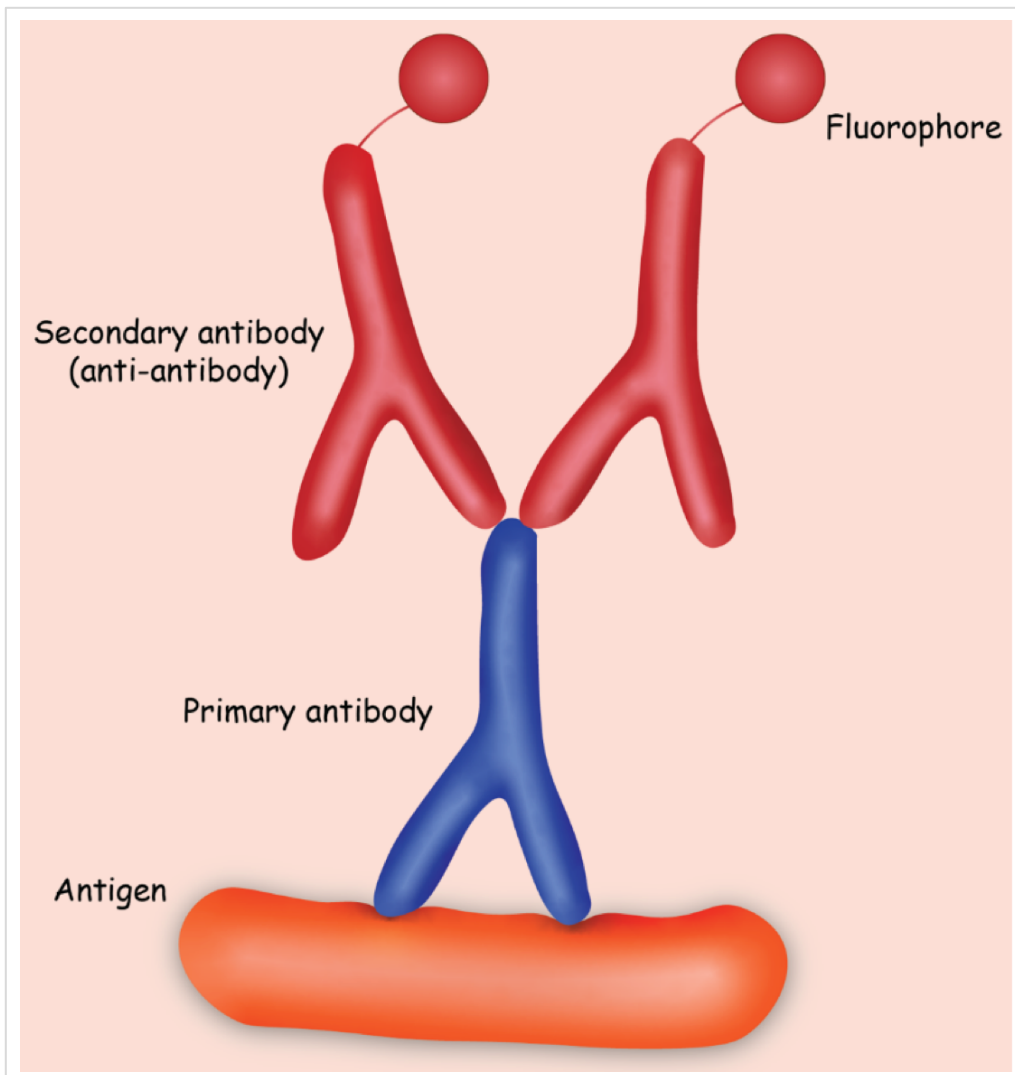


Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.

### 2.8.3 Protokoll der Claudin-1-Färbung

Die vorbereiteten Kryoschnitte wurden mit Aceton bei 4 °C für 10 min fixiert. Danach wurden die auf dem Objektträger befindlichen Kryoschnitte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) 10 min lang gewaschen und anschließend mit 1 % Triton X-100 für 2 h permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschvorgang über zweimal 10 min mit PBS wurde eine 60-minütige Blockade mit 10 % Eselserum in PBS durchgeführt. Danach wurde der erste spezifische Antikörper (Konzentration 1:100 in PBS) aufgetragen und im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden sie dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Primärantikörper (jeweils 1:600 in PBS) inkubiert.

Zur Darstellung von Claudin-1 wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, dessen Emissionen im grünen Farbspektrum liegen (siehe Tabelle 10). Zur DNA-Färbung wurden die Nervenquerschnitte für 10 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) behandelt. Nach viermaligem Waschen für 10 min in PBS wurden die Schnitte mit *Vecta Shield Mounting Medium* bedeckt und zusätzlich wurde ein Deckglas (A. Hartenstein) aufgebracht. Die Lagerung der fertigen Färbungen erfolgte unter Lichtausschluss in einer Präparatmappe bei 4 °C.

**Tabelle 10: Benutzte Antikörper für die Claudin-1-Färbung**

Antikörper	
Claudin-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #51-9000 1:100 in PBS
Antikörper	
Alexa-Fluor-488	Polyklonaler AK Esel Anti-Kaninchen Invitrogen #A-21206 1:600 in PBS

### 2.8.4 Fotodokumentation der immunhistochemischen Färbungen

Die gefärbten Schnittpräparate wurden mit dem Mikroskop *BX51* (Olympus) betrachtet. Mithilfe der Software *cellSens Dimension* (Olympus) wurden Bilddateien der Präparate erstellt und gespeichert. Um gleiche Rahmenbedingungen zu schaffen, wurde die Belichtungszeit bei allen Aufnahmen identisch gewählt.

## 2.9 Software

Tabelle 11: Software

Name der Software	Benutzung für die folgenden Arbeitsschritte	Firmenname
Magellan V5.01	BCA-Proteinassay	Tecan
Alpha View	Densitometrie	Alpha Innotech
cellSens Dimension	Immunfluoreszenzaufnahmen	Olympus
Sigma Plot 11.0	Grafik	Systat Software Inc.
Endnote X4.0.2	Literaturrecherche	Thomson Reuters
Microsoft Excel 2003	Statistik	Microsoft
Sigma Stat 3.5	Statistik	Systat Software Inc
Microsoft Word 2011	Textverarbeitung	Microsoft

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen der gewonnenen Daten und die Erstellung der Diagramme wurden mit den Programmen *SigmaPlot* (Version 14.01.142, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und *Microsoft Excel 2007* (Microsoft) durchgeführt. Die Versuchsauswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen *analysis of variance* (ANOVA). Die beiden durch die *Western-Blot*-Analysen erhaltenen densitometrischen Werte wurden auf die Werte der entsprechenden Ladekontrolle normiert. Für auftretende Abweichungen zwischen den Mittelwerten, wurden Post-hoc-Spannweitentests durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant definiert.

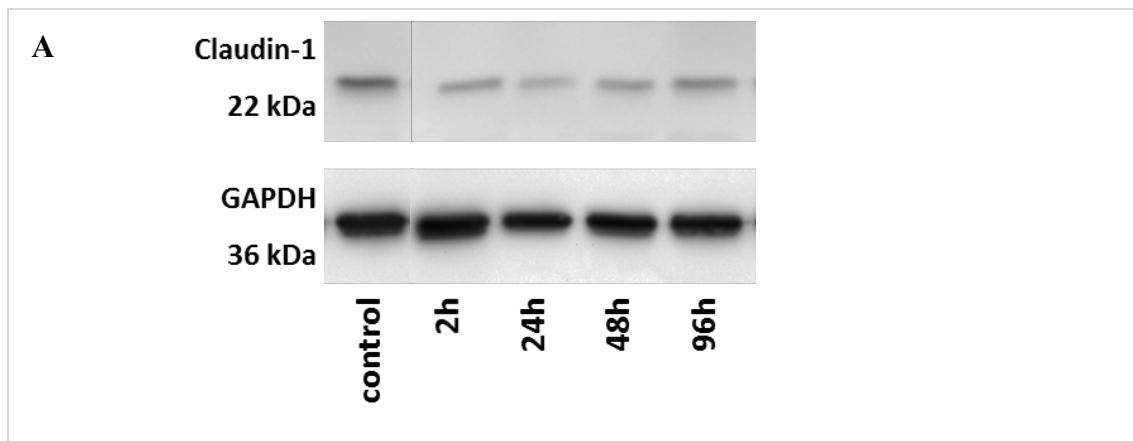
### 3 ERGEBNISSE

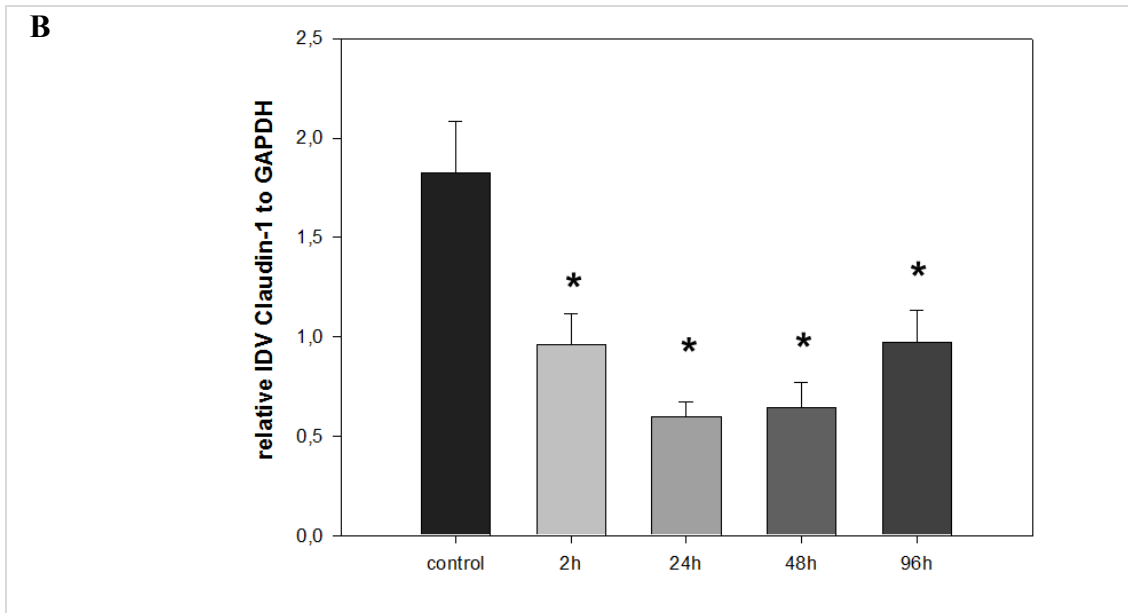
Bereits wenige Stunden nach der FCA-Injektion in die Hinterpfote konnten die typischen Zeichen einer Entzündung, wie Rötung, Schwellung und Überwärmung, deutlich registriert werden. Darüber hinaus entwickelten sich die Schmerzsymptomatik in der mit FCA behandelten Hinterpfote und eine damit verbundene Schonhaltung der Hinterpfote. Diese Entzündungsbildung war Voraussetzung für die Durchführung aller weiteren Versuche.

#### 3.1 Expression der TJ-Proteine (Claudin-1 und Claudin-19) am Ort der peripheren Entzündung nach FCA-Behandlung im Zeitverlauf

##### 3.1.1 Expression von Claudin-1 am Ort der peripheren Entzündung

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme von Claudin-1 nach der intraplantaren Injektion von FCA im Vergleich mit der Kontrollprobe (siehe Abbildung 13). Der maximale Effekt trat dabei 24 h bis 48 h nach der FCA-Injektion auf. Nach 96 h kam es wieder zu einem Anstieg von Claudin-1, wobei die Proteinexpression im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle weiterhin signifikant verringert war.

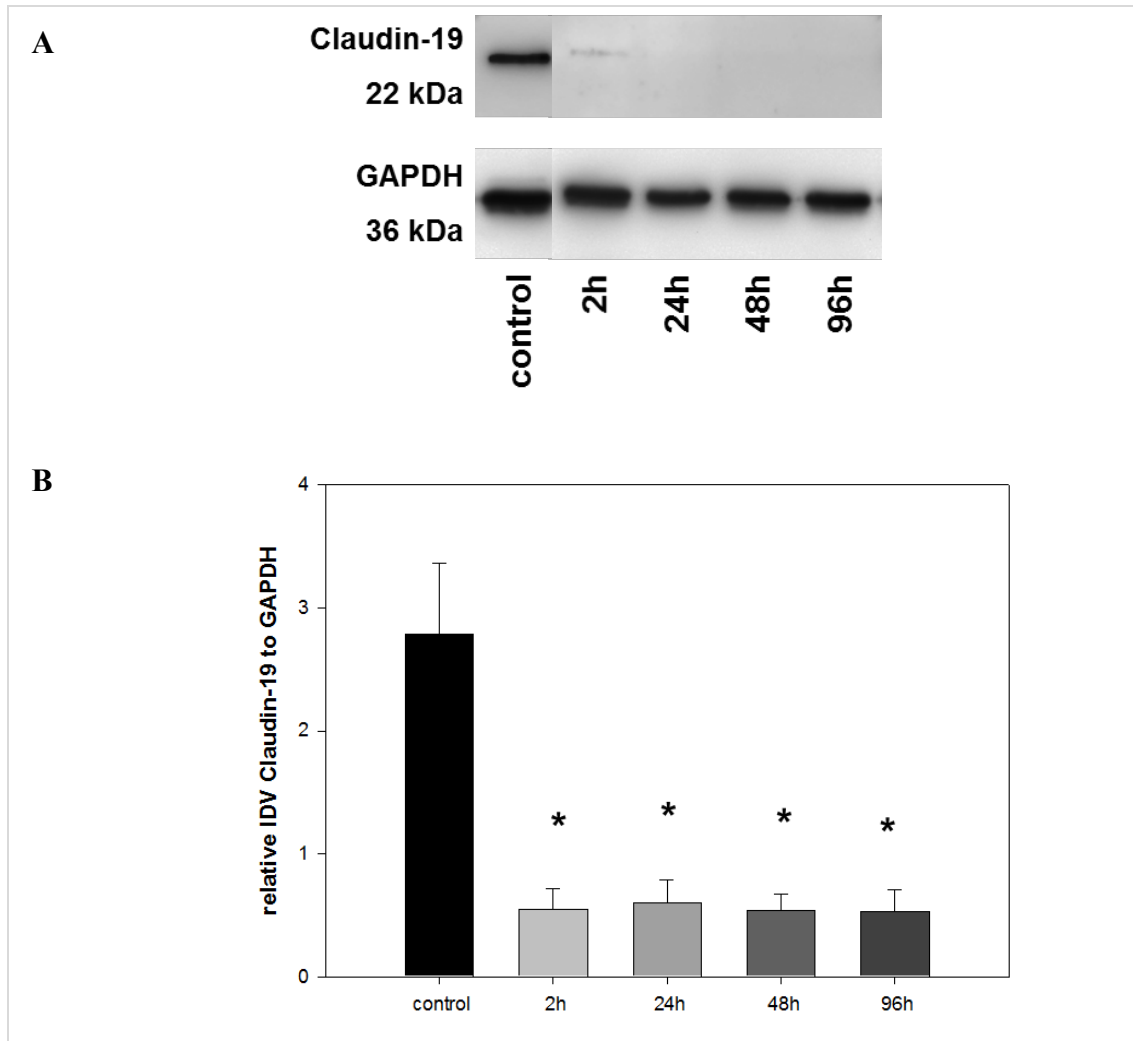




**Abbildung 13: Expression von Claudin-1 am Entzündungsort nach intraplantarer Injektion von FCA (A)** Darstellung des exemplarischen *Western Blots* zur Analyse von Claudin-1 im Zeitverlauf (2 h, 24 h, 48 h und 96 h) nach den intraplantaren FCA-Injektionen. **(B)** Densitometrische Analyse mehrerer Blots. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von Claudin-1, insbesondere 24 h bis 48 h nach der FCA-Injektion. GAPDH diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak, \* $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ).

### 3.1.2 Expression von Claudin-19 am Ort der peripheren Entzündung

Ebenso nahm Claudin-19 im entzündeten und mit FCA behandelten ipsilateralen Hinterpotengewebe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab (siehe Abbildung 14). Der Zeitpunkt des maximalen Effekts ließ sich dabei nicht eindeutig identifizieren. Die densitometrischen Analysen der Blots ergaben ähnliche Werte für die Zeitabstände 2h, 24h, 48h und 96h, wobei mit minimaler Differenz, nach 48h die geringsten Werte gemessen wurden. Für diesen Zeitraum ergab die Abnahme der Expressionsrate ungefähr 84%.



**Abbildung 14: Expression von Claudin-19 am Entzündungsort nach intraplantarer Injektion von FCA. (A) Western Blot zur Analyse von Claudin-19. (B) Densitometrische Analyse mehrerer Blots. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Claudin-19-Gehalts nach der Injektion von FCA im Zeitverlauf. GAPDH diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak, \* $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ).**

### 3.2 Expression der TJ-Proteine (Claudin-1 und Claudin-19) im Perineurium des *N. ischiadicus* nach FCA-Behandlung im Zeitverlauf

Im zweiten Arbeitsschritt sollte – ähnlich dem Vorgehen beim Pfortengewebe – die Veränderung der Expression von Claudin-1 und Claudin-19 nach der intraplantaren FCA-Injektion im ipsilateralen *N. ischiadicus* mittels *Western Blot* im Zeitverlauf untersucht werden. Entsprechend der vorherigen Arbeitshypothese wurde angenommen, dass die FCA-Injektion wie im Pfortengewebe zu einer Verminderung der Expression von Claudin-

1 und Claudin-19 im *N. ischiadicus* führt. Diese Arbeitshypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden.

### 3.2.1 Expression von Claudin-1 im Perineurium des *N. ischiadicus*

Nach der FCA-Injektion konnte keine Veränderung der Expression von Claudin-1 im Perineurium zwischen 2 und 96 h nach der FCA-Injektion festgestellt werden. *Western-Blot*-Analysen (siehe Abbildung 15) zum Konzentrationsverlauf nach der peripheren FCA-Injektion bestätigten diese Ergebnisse. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der FCA-Injektion) konnten signifikante Intensitätszunahmen der Banden von Claudin-1 im *N. ischiadicus* nachgewiesen werden.

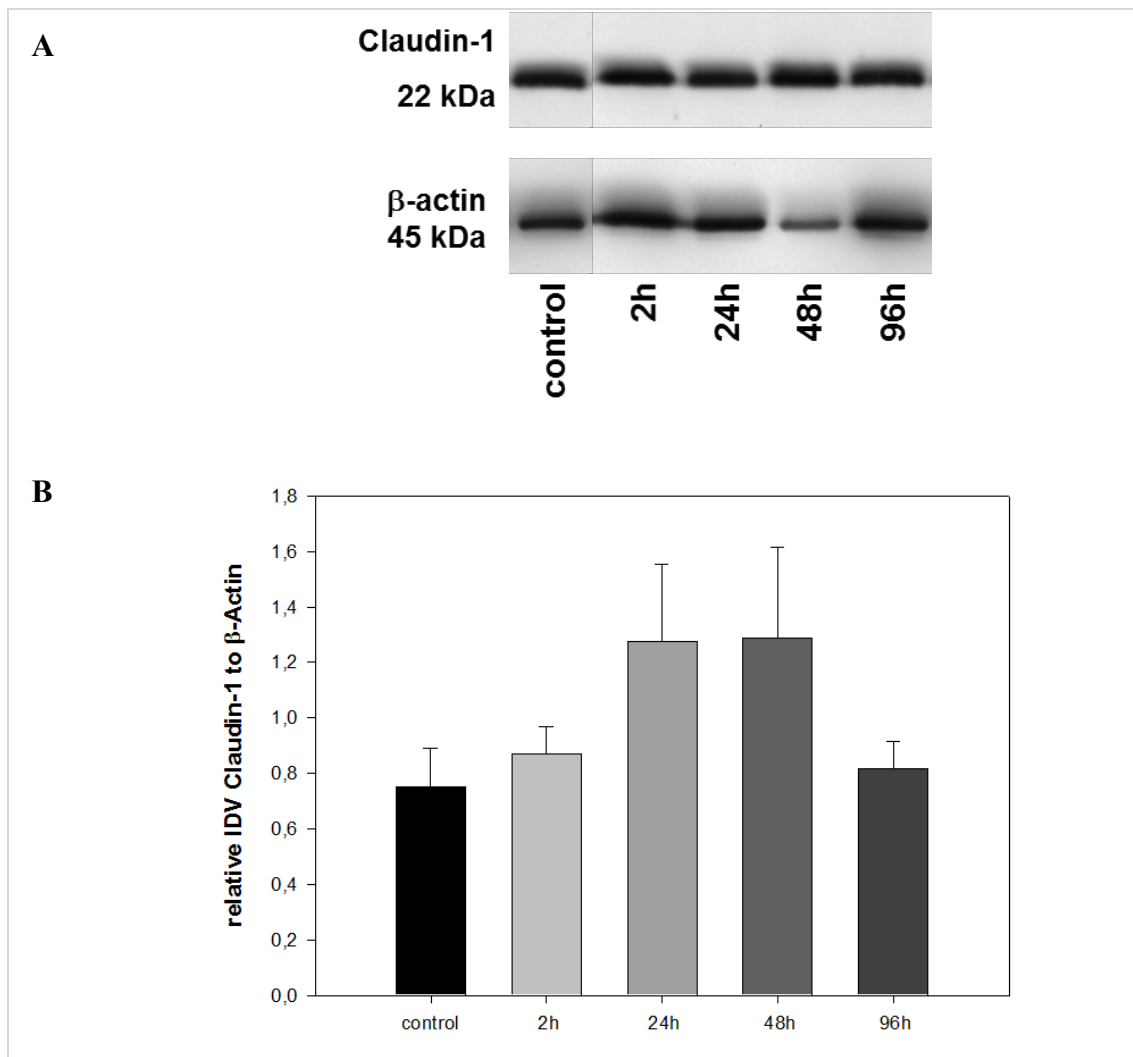


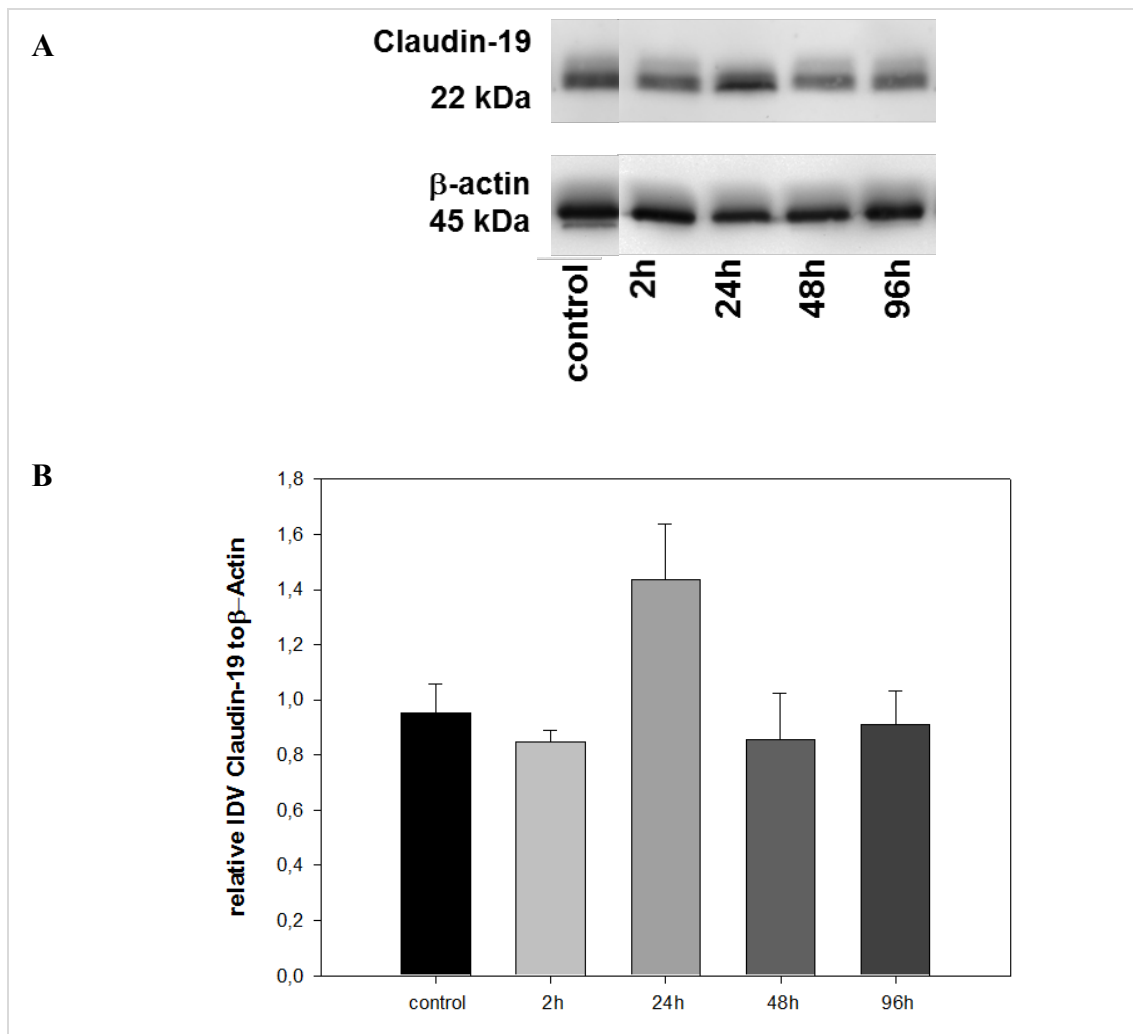
Abbildung 15: Expression von Claudin-1 im Perineurium des ipsilateralen und proximalen *N. ischiadicus*. (A) *Western Blot* zur Analyse von Claudin-1 nach der intraplantaren Injektion von FCA. Zu keinem



Untersuchungszeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der Injektion) ist eine Intensitätszunahme der Banden zu erkennen. **(B)** Die densitometrische Analyse der Proteinbanden zeigt über den Beobachtungszeitraum von 96 h keine signifikante Veränderung von Claudin-1.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak,  $p < 0,228$ ,  $n = 6$ ).

### 3.2.2 Expression von Claudin-19 im Perineurium des *N. ischiadicus*

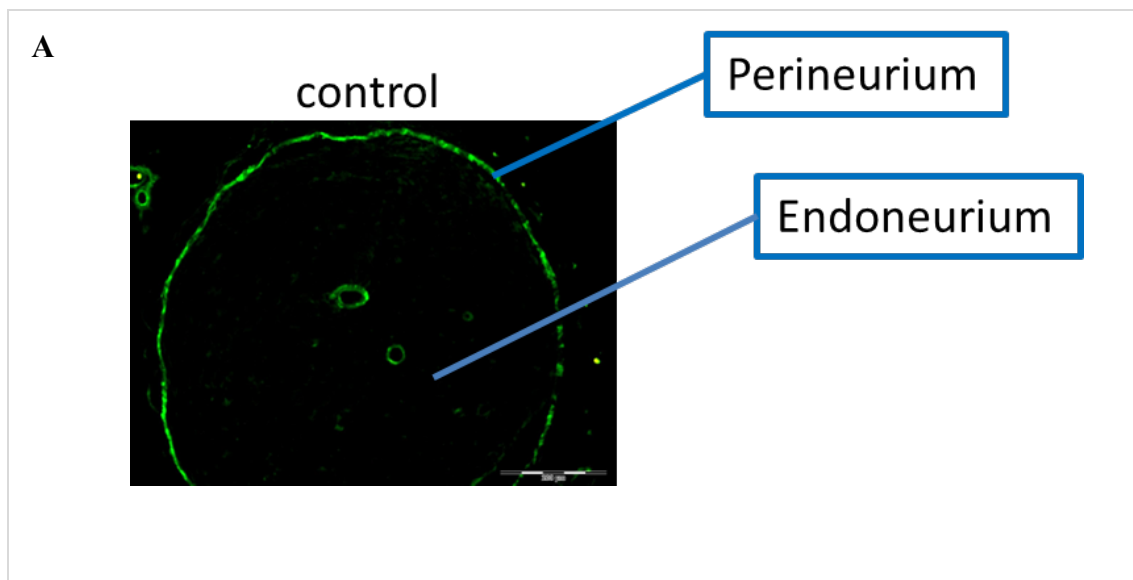
Nach der FCA-Injektion war ebenfalls zu keinem Untersuchungszeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Injektion) eine signifikante Veränderung des Claudin-19-Proteingehalts gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten (siehe Abbildung 16).

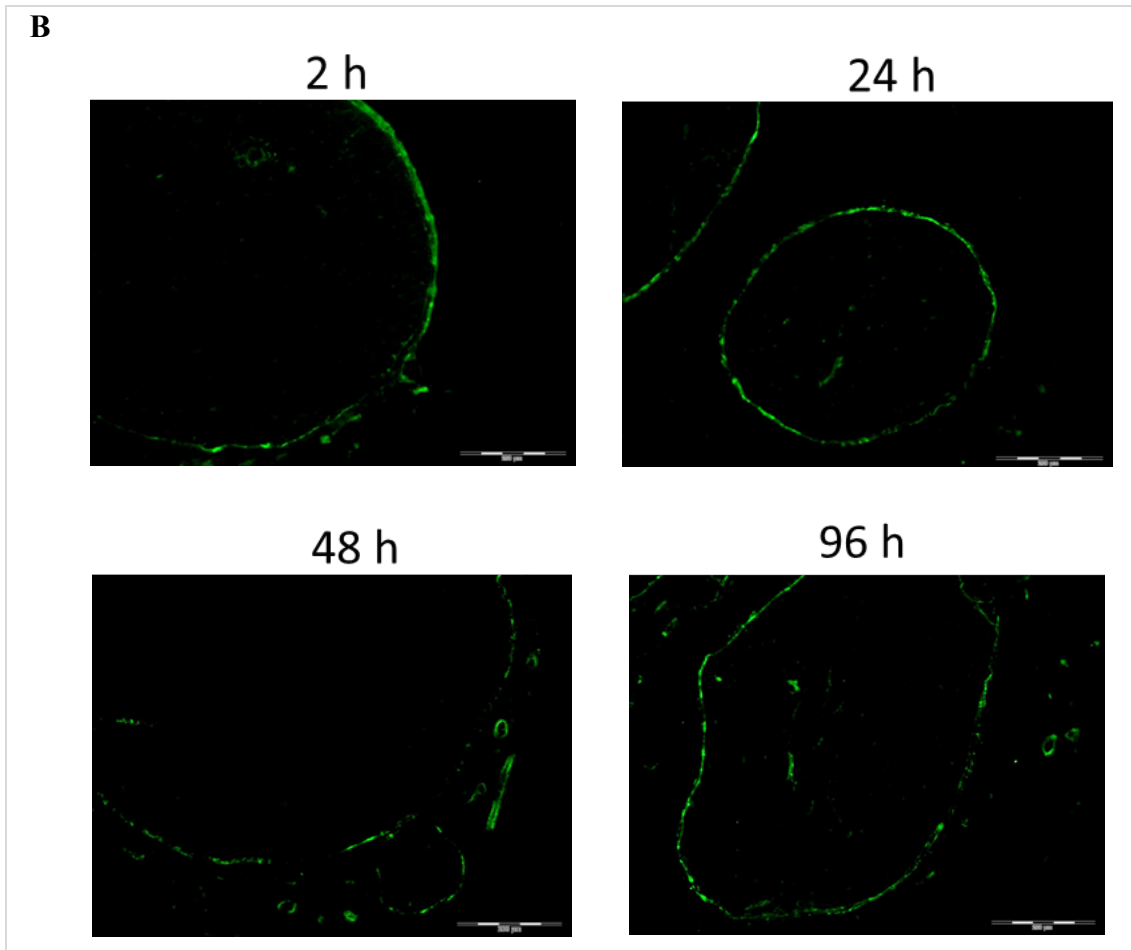


**Abbildung 16: Expression von Claudin-19 im Perineurium des ipsilateralen und proximalen *N. ischiadicus*.** **(A)** *Western Blot* zur Analyse von Claudin-19 nach der intraplantaren Injektion von FCA. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der Injektion) ist eine Intensitätszunahme der Banden zu erkennen. **(B)** Die densitometrische Analyse der Proteinbanden zeigt über den Beobachtungszeitraum von 96 h keine signifikante Veränderung von Claudin-19.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak,  $p < 0,30$ ,  $n = 6$ ).

### 3.3 Immunhistochemie für Claudin-1 beim *N. ischiadicus* im Zeitverlauf

Um die Auswirkungen einer intraplantaren FCA-Injektion auf die Claudin-1-Expression bezüglich seiner Lokalisation im *N. ischiadicus* zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den *Western Blots* immunhistochemische Untersuchungen in Form von Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. In Abbildung 17 ist die Claudin-1-Immunreaktivität (grün) unter Kontrollbedingungen (A) und 2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der Entzündungsinduktion durch eine intraplantare FCA-Injektion (B) dargestellt. Es war über den gesamten Zeitverlauf von 2 h bis 96 h und im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle kein Rückgang der Claudin-1-Immunfluoreszenz im Perineurium des ipsilateralen und proximalen *N. ischiadicus* nach der Entzündungsinduktion durch FCA zu beobachten. Diese Beobachtungen der Immunhistochemie korrelieren mit einem unveränderten Proteinspiegel von Claudin-1 im *Western Blot* und bestätigen zudem, dass lokale und periphere Entzündungen in der Hinterpfote keinen Einfluss auf die Expression von Claudin-1 im Perineurium haben.



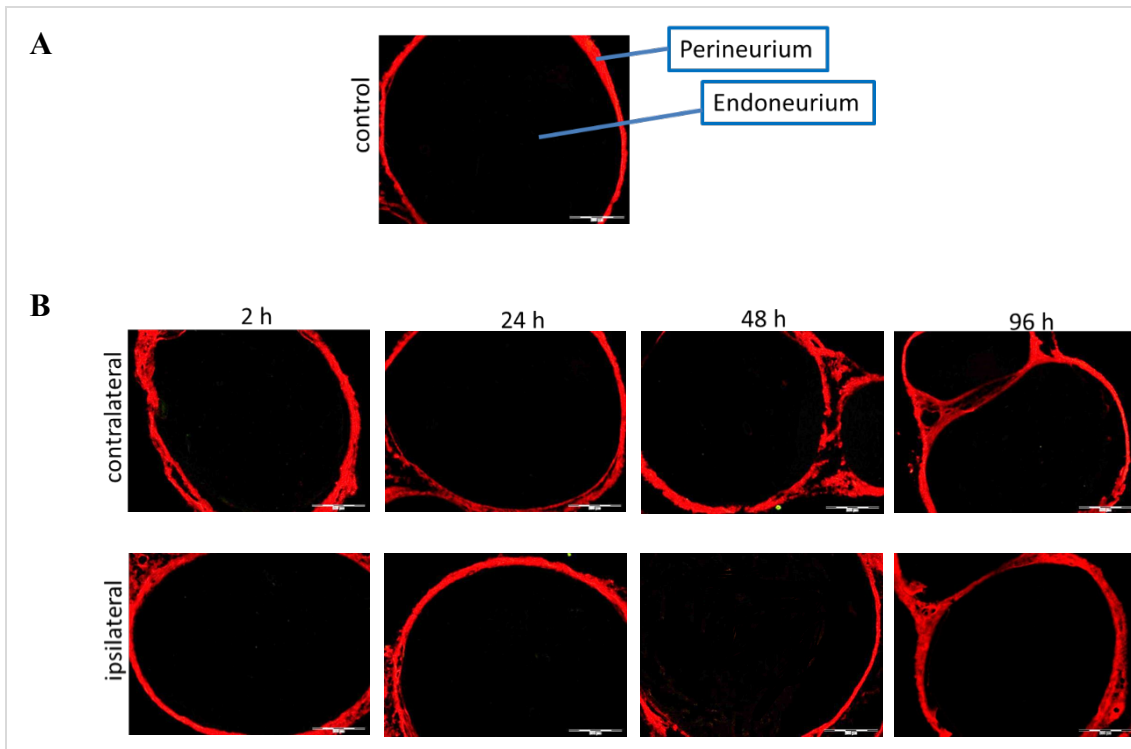


**Abbildung 17: Repräsentative Claudin-1-Immunfluoreszenzfärbungen des *N. ischiadicus* im Querschnitt, Messbalken = 200  $\mu\text{m}$ . Nervenquerschnitte. (A) Unbehandelter Nerv als Kontrolle. (B) Lokalisation von Claudin-1 (grün) zu den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der intraplantaren FCA-Injektion. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt ist eine Änderung der Immunreaktivität von Claudin-1 im Perineurium des ipsilateralen und proximalen *N. ischiadicus* nach der intraplantaren FCA-Injektion zu beobachten.**

### **3.4 Veränderung der Permeabilität des Perineuriums über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 h während der intraplantaren Entzündung**

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war eine Permeation von EBA innerhalb des Endoneuriums des *N. ischiadicus* bei Ratten mit einer Hinterpfotenentzündung zu beobachten. Weder im ipsilateralen noch im kontralateralen *N. ischiadicus* konnte eine erhöhte Permeabilität für EBA nachgewiesen werden, was durch Beschränkung der rot fluores-

zierenden Marker auf das Perineurium bewiesen wurde (siehe Abbildung 18). Somit bestand im gesamten untersuchten Zeitverlauf keine Schrankenstörung des Perineuriums für EBA.



**Abbildung 18: Evansblau-Albumin-Permeabilitätstest.** (A) Unbehandelter *N. ischiadicus*. (B) Zu keinem Untersuchungszeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h und 96 h) ist eine erhöhte Permeabilität des Perineuriums für EBA festzustellen – weder im ipsilateralen noch im kontralateralen *N. ischiadicus*.

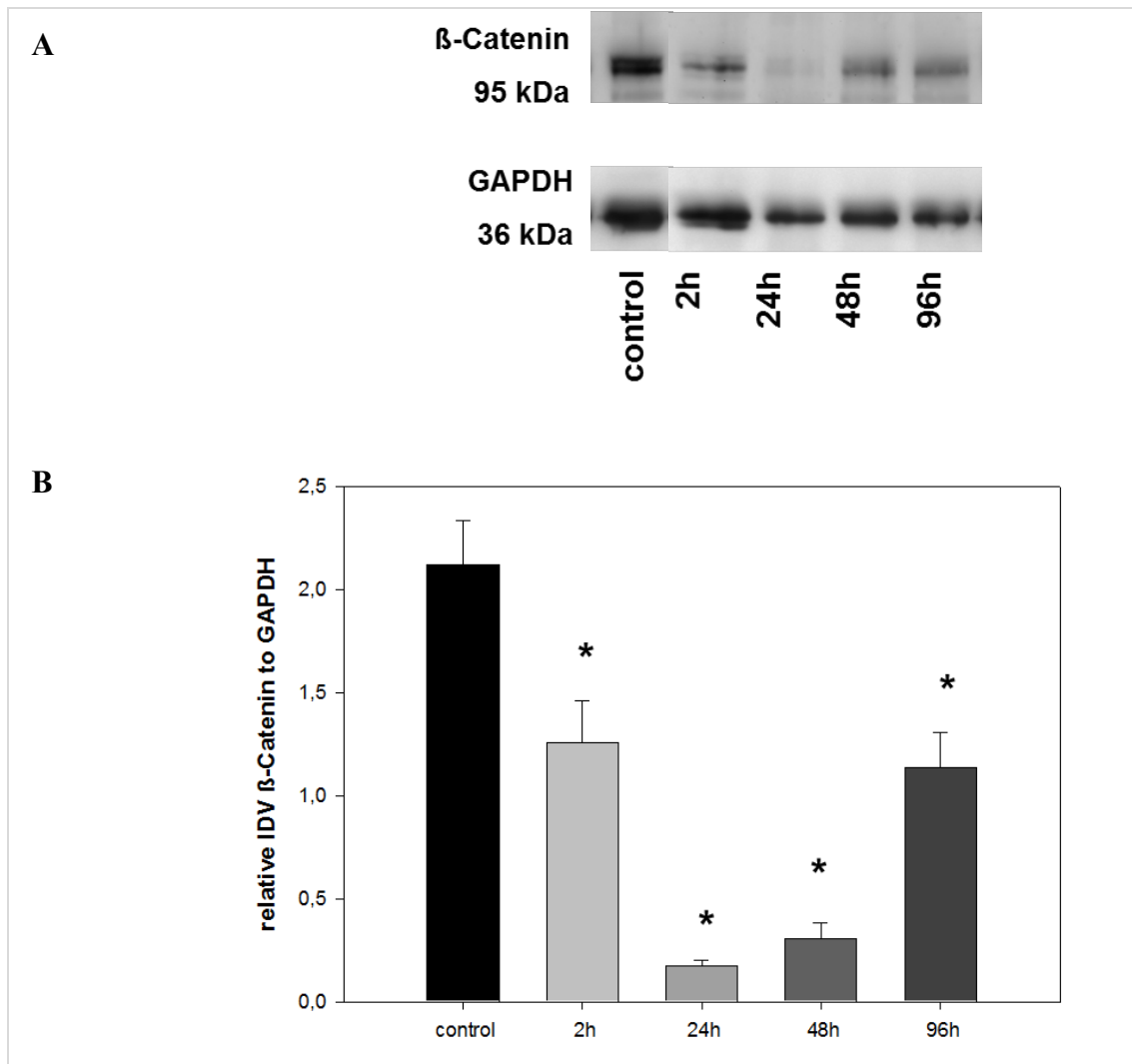
### 3.5 Einfluss der peripheren Entzündung auf die Expression des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte der Herunterregulierung des Claudin-1- und des Claudin-19-Proteingehalts im entzündeten Hinterpfotengewebe in einer Verbindung mit dem Co-Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges stehen, wurden im fünften Arbeitsschritt die *Western Blots* ebenfalls für  $\beta$ -Catenin durchgeführt.

Gemäß der Arbeitshypothese sollte der  $\beta$ -Catenin-Proteingehalt im entzündeten Pfotengewebe signifikant abnehmen und im *N. ischiadicus* unverändert bleiben. Diese Hypothese konnte bestätigt werden.

### 3.5.1 Zeitabhängige Herabregulation des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges im entzündeten Pfortengewebe nach der FCA-Behandlung

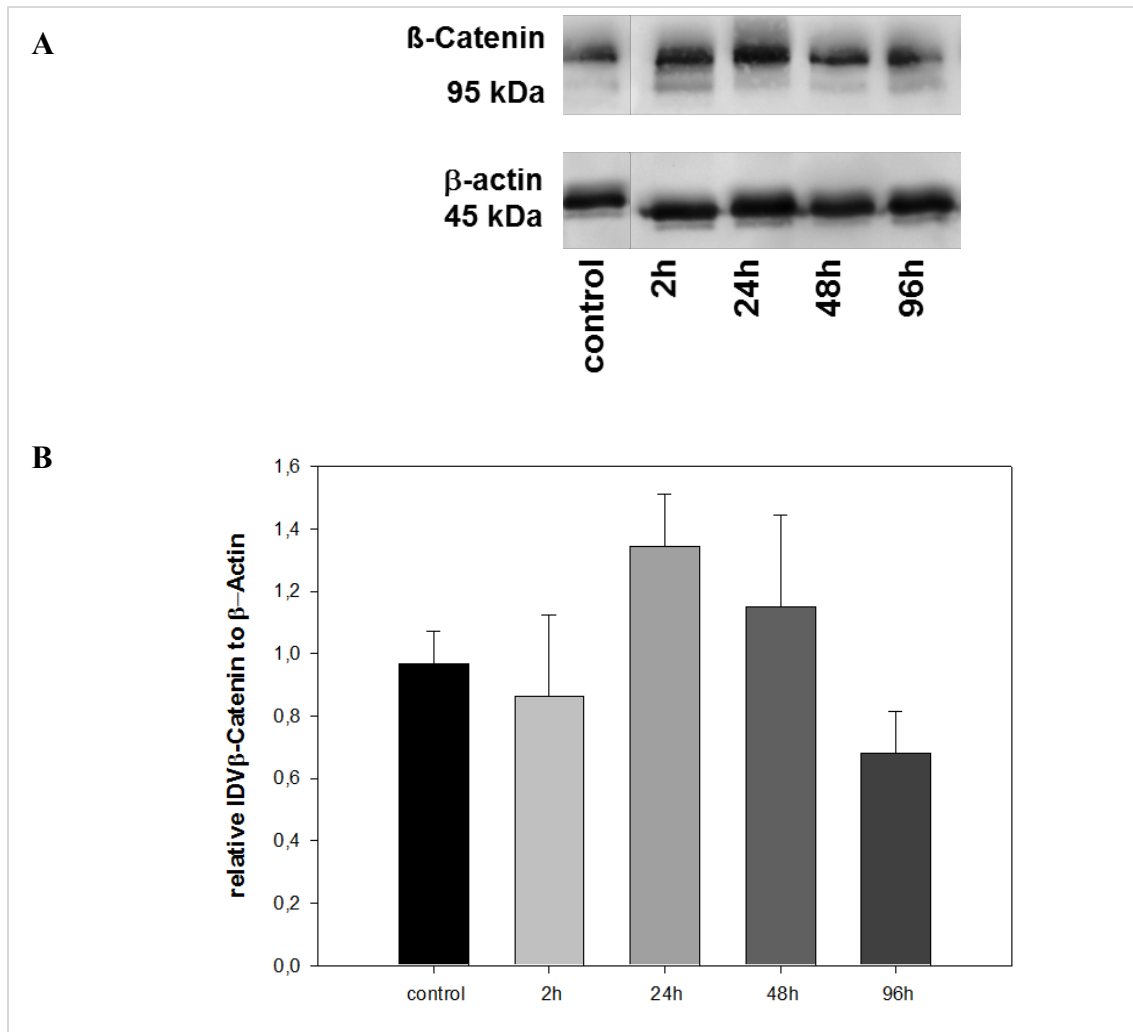
Abbildung 19 zeigt eine signifikante Abnahme des Gehalts von  $\beta$ -Catenin nach der intraplantaren FCA-Injektion. Der maximale Effekt war wie bei Claudin-1 nach 24 h zu beobachten; nach 96 h kam es zu einem erneuten Anstieg des  $\beta$ -Catenin-Proteingehalts, was sich mit den Daten für Claudin-1 vergleichen lässt.



**Abbildung 19: Intraplantare Injektion von FCA reduziert  $\beta$ -Catenin im entzündeten Gewebe.** (A) *Western Blot* zur Analyse des  $\beta$ -Catenin-Proteingehalts im Zeitverlauf nach der Injektion von FCA. (B) Densitometrische Analyse mehrerer Blots. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des  $\beta$ -Catenin-Gehalts nach der Injektion von FCA. GAPDH diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak, \* $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ).

### 3.5.2 Veränderung des Co-Transkriptionsfaktors $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges im Perineurium des *N. ischiadicus* im Zeitverlauf nach der FCA-Behandlung

Im Einklang mit den anderen Daten war im Nervengewebe zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Änderung des  $\beta$ -Catenin-Proteingehalts zu verzeichnen (siehe Abbildung 20).



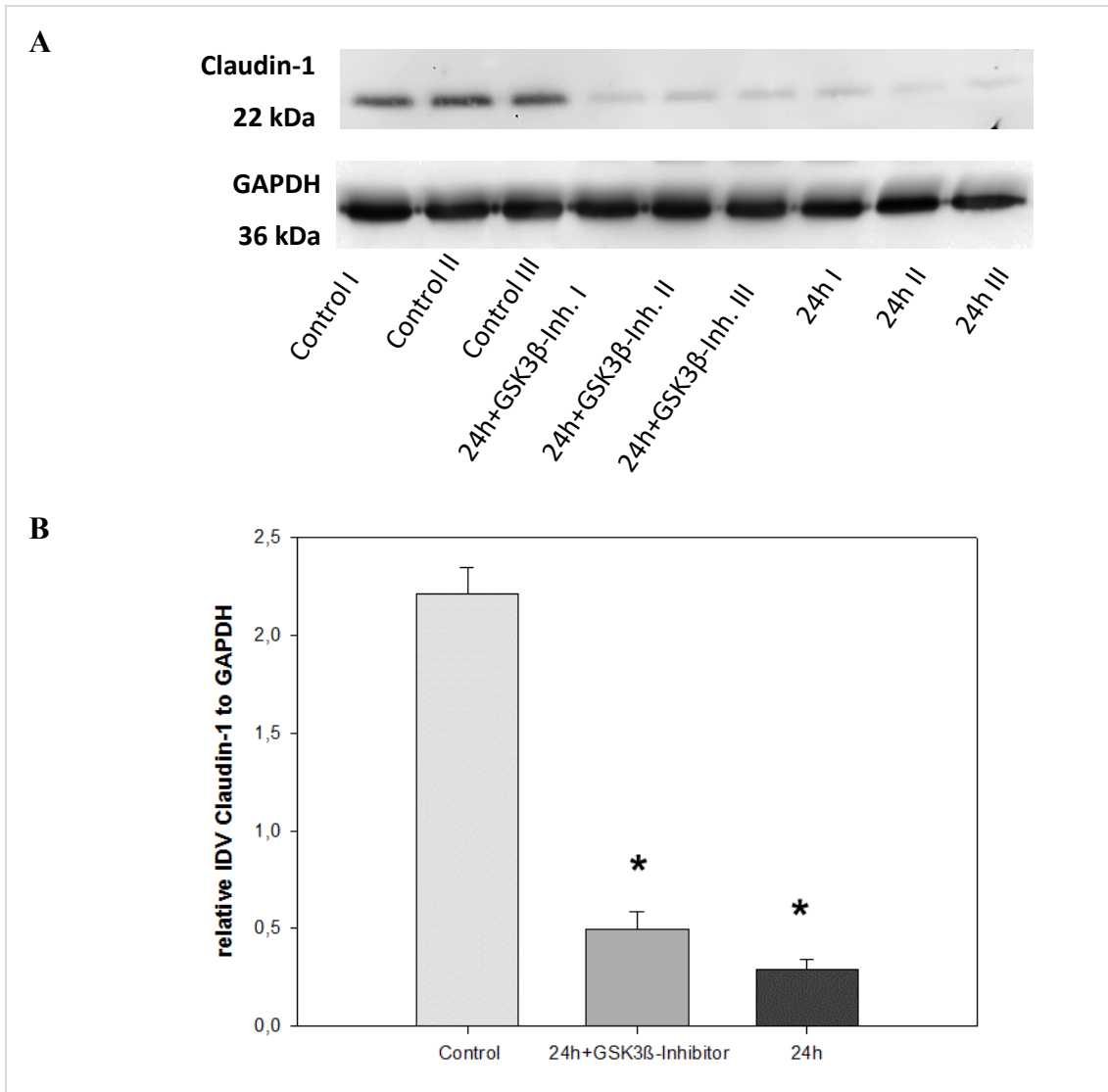
**Abbildung 20: Intraplantare Injektion von FCA führt zu keiner signifikanten Veränderung von  $\beta$ -Catenin im Perineurium des ipsilateralen und proximalen *N. ischiadicus*.** (A) *Western Blot* zur Analyse von  $\beta$ -Catenin nach der intraplantaren Injektion von FCA. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der Injektion) ist eine Intensitätszunahme der Banden zu erkennen. (B) Die densitometrische Analyse der Proteinbanden zeigt über den Beobachtungszeitraum von 96 h keine signifikante Veränderung von  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak,  $p < 0,366$ ,  $n = 6$ ).

### **3.6 Einsatz eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors**

Miwa konnte bereits mit seiner Studie aus dem Jahr 2001 Hinweise darauf liefern, dass das Claudin-1-Gen eines jener Gene ist, die durch  $\beta$ -Catenin im Rahmen des Wnt-Signalweges reguliert werden. Um die mögliche molekulare Verbindung zwischen GSK3 $\beta$  und Claudin-1 zu untersuchen und so die von uns aufgestellte Hypothese zu stützen, dass  $\beta$ -Catenin eine Rolle bei der Expression von Claudin-1 spielt, wurde ein GSK3 $\beta$ -Inhibitor eingesetzt. Dabei wurde angenommen, dass die intraperitoneale Verabreichung des GSK3 $\beta$ -Inhibitors über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg zu einer Reduzierung der Abnahme von Claudin-1 im entzündeten Hinterpfotengewebe führt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der FCA-Injektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt der maximale Effekt für die Abnahme von Claudin-1 und  $\beta$ -Catenin im entzündeten Hinterpfotengewebe beobachtet werden konnte.

#### **3.6.1 Zusammenhang zwischen der Claudin-1-Expression im Hinterpfotengewebe nach FCA-Injektion und der Injektion eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors**

Nach dem Einsatz des GSK3 $\beta$ -Inhibitors SB415286 (0,1–1 mg/kg Körpergewicht, Sigma Aldrich), der den Ratten 24 h nach der Vorbehandlung mit einer intraplantaren FCA-Injektion intraperitoneal verabreicht worden war, kam es nach weiteren 24 h zu einem signifikanten Wiederanstieg der Konzentration von Claudin-1 im Hinterpfotengewebe. Allerdings wurde die Ausgangskonzentration von Claudin-1 nicht wieder erreicht. Die Ergebnisse liefern jedoch dahingehend eine Bestätigung der Studie von Miwa, dass das Claudin-1-codierende Gen durch  $\beta$ -Catenin innerhalb des Wnt-Signalweges reguliert wird. Ohne die Verabreichung des GSK3 $\beta$ -Inhibitors wäre ein Wiederanstieg der Claudin-1-Konzentration nach FCA-Injektion erst wieder nach 96 h zu erwarten gewesen.



**Abbildung 21: GSK3 $\beta$ -Inhibitor (SB415286) reduziert die Abnahme des Claudin-1-Gehalts 24 h nach der intraplantaren Injektion von FCA in das ipsilaterale Hinterpfotengewebe. (A) *Western Blot* zur Analyse des Claudin-1-Gehalts 24 h nach der Injektion von FCA zusammen mit dem GSK3 $\beta$ -Inhibitor. Es ist eine deutliche Intensitätsveränderung der Banden zu erkennen. (B) Die densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab eine reduzierte Konzentrationsabnahme von Claudin-1 im Hinterpfotengewebe nach der erfolgten Behandlung mit dem GSK3 $\beta$ -Inhibitor. GAPDH diente als Ladekontrolle (ANOVA, Holm-Sidak, \* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).**



## 4 DISKUSSION

Die im Vorfeld der vorliegenden Untersuchungen getroffenen Annahmen zur Expression von Claudin-1 und Claudin-19 im Hinterpfotengewebe der Ratte nach intraplantarer Injektion von FCA konnten bestätigt werden. Sowohl die Expression von Claudin-1 als auch jene von Claudin-19 nahmen am Ort der Entzündung signifikant ab. Nach 96 h stiegen sie wieder an, ohne jedoch den Ausgangswert zu erreichen.

Die Vermutungen betreffend die Wirkung von FCA auf die Claudin-1- und Claudin-19-Expression im *N. ischiadicus* waren nicht spezifisch, jedoch wurde eine Veränderung der Expressionsrate erwartet. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden – es wurden keine signifikanten Konzentrationsänderungen der beiden Proteine gemessen. Auch die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten keinen Rückgang der Claudin-1-Expression im Perineurium von *N. ischiadicus*.

Mit der Konzentration des Barriereproteins  $\beta$ -Catenin verhielt es sich ähnlich wie mit der Konzentration von Claudin-1: Am Ort der Entzündung nahm diese innerhalb von 24 h stark ab und stieg nach 96 h wieder an, ohne jedoch den Ausgangswert zu erreichen. Proximal von der Verletzung war der Nerv jedoch nicht betroffen – sowohl hinsichtlich der Dichtigkeit der BNS als auch der Expression des  $\beta$ -Catenins. Der  $\beta$ -Catenin-Proteingehalt wies dort keine Änderung auf. Der Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges reguliert die Claudin-1-Expression demnach lediglich in der Hinterpfote.

Wie in Kapitel 1.1.6 erwähnt wurde, ist die Kinase GSK3 $\beta$  Bestandteil des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes. Ihre Hemmung durch Applikation eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors bewirkt, dass  $\beta$ -Catenin die Wnt-Zielgene aktiviert, zu denen auch Claudin-1 zählt. Das Ergebnis stimmt somit mit den Erwartungen überein, dass durch den Inhibitor die Konzentrationsabnahme von Claudin-1 gebremst wird und seine Expression wieder zunimmt. Allerdings scheint hier der Effekt von FCA im Vergleich größer zu sein, da die Anfangskonzentrationen vor Injektion von FCA auch mithilfe des GSK3 $\beta$ -Inhibitors nicht wieder erreicht wurden.

#### 4.1 Wirkung von FCA nach intraplantarer Injektion in den Ort der Entzündung

Claudin-1 gilt nachweislich als Hauptversiegelungskomponente im Perineurium (Hackel, Brack et al. 2012, Rittner, Amasheh et al. 2012, Zwanziger, Hackel et al. 2012, Sauer, Krug et al. 2014, Dabrowski, Staat et al. 2015) und wird nur in geringerem Maße in den endoneuralen Gefäßen gefunden (Pummi, Heape et al. 2004). Wie in Kapitel 1.2.2 erläutert, führen Entzündungszustände zu einer mangelhaften Funktion der perineuralen Barriere und/oder zu einer erhöhten Permeabilität der endoneuralen Kapillaren (De la Motte, Hall et al. 1975, Rechthand and Rapoport 1987, Bockman, Buchler et al. 1988, Powell and Myers 1989, Olsson 1990).

So werden neuroinflammatorische Erkrankungen wie das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und die chronisch entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ebenfalls durch eine TJP-Herunterregulierung und eine BNS-Leckage begleitet (Kanda 2013). Darüber hinaus zeigten frühere Studien, dass Claudin-1 bei Neuropathien wie Nervenquetschung, chronischer Konstriktionsverletzung (*chronic constriction injury* [CCI]) und partieller Ischiasnervenligatur eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Dichtigkeit des Perineuriums spielt und seine Verringerung zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BNS führt und letztendlich mit einem Barriereabbau einhergeht (Hirakawa, Okajima et al. 2003, Lim, Shi et al. 2014, Moreau, Mauborgne et al. 2016).

Es häufen sich Hinweise darauf, dass der Zusammenbruch der BNS eine zentrale pathophysiologische Rolle bei der diabetischen Neuropathie spielt, die als häufigste diabetische Komplikation angesehen wird und durch eine Schädigung der Nerven-Gliazellen, ihrer Axone und Endothelzellen gekennzeichnet ist (Richner, Ferreira et al. 2019). Diese Effekte der entzündlichen Prozesse auf die Barrierefunktion des Perineuriums können durch die extraneurale Anwendung von hyperosmolaren Lösungen im normalen Gewebe nachgeahmt werden. Antonijevic konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte Färbung des Endoneuriums nach einer intraplantaren Injektion von HRP und einer Vorbehandlung mit Mannitol oder hypertoner 20-prozentiger NaCl-Lösung im Vergleich mit einem ungefärbten Endoneurium nach einer alleinigen Injektion von HRP nachweisen.

In vorherigen von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Permeabilität des Perineuriums im Ischiasnerv für EBA (10 min und

60 min) nach der perineuralen Anwendung von 10-prozentiger NaCl-Lösung im Vergleich zur Kontrolle zunahm (Hackel, Brack et al. 2012).

Darüber hinaus ergab die genannte Studie, dass die periischiale Applikation (*perisciatic injection*) von hypertoner Kochsalzlösung zu einer Abnahme der Claudin-1-Proteinexpression in der Membranfraktion und zu einer Verminderung der Immunreaktivität von Claudin-1 im Perineurium des Ischiasnervs der Ratte führt (Hackel, Brack et al. 2012). *Western Blots* führten zu den gleichen Ergebnissen, sodass es auch dabei zu einer signifikanten Reduktion des Claudin-1-Proteingehalts in der Membranfraktion von Ischiasnerven nach einer periischialen Applikation von 10-prozentiger NaCl-Lösung kam.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verringerung der Claudin-1-Immunreaktivität im Perineurium nach einer durch FCA induzierten Entzündung stimmt mit früheren Beschreibungen überein, nach denen die Applikation von hypertoner Kochsalzlösung oder eine Nervenverletzung zu einer Abnahme der Claudin-1-Proteinexpression führt (Hackel, Brack et al. 2012, Reinhold, Schwabe et al. 2018). Auch darin zeigt sich die Bedeutung von Claudin-1 für die Barrierefunktion des Perineuriums.

Bezüglich der Änderung der Expression von Claudin-19 nach der intraplantaren Applikation von FCA konnte anhand von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Claudin-19 nicht nur – wie es bereits aus den anderen Studien bekannt ist – in der paranodalen Region der Schwann-Zellen, im Mesaxon (Alanne, Pummi et al. 2009), exprimiert wird, sondern auch im Perineurium des *N. ischiadicus*. Somit ist es als TJ-Protein ein Bestandteil der BNS (Sauer, Krug et al. 2014).

Außerdem ist bekannt, dass sich Claudin-19-haltige TJs auch auf die Nervenleitung auswirken können, wie die unten aufgeführten Ergebnisse von Claudin-19-Knockout-Mäusen aus der Studie von Miyamoto vermuten lassen (Miyamoto et al. 2005). Die in dieser Untersuchung erzeugten Claudin-19-KO-Mäuse waren vital und fruchtbar, wiesen aber ein motorisches Defizit auf, das einer peripheren Neuropathie ähnelte, und es fehlte die TJ-Bildung in den Schwann-Zellen mit daraus resultierendem Defekt der Schwann-Zellbarriere (Miyamoto et al. 2005).

In der Studie vom Miyamoto wurde der Frage nachgegangen, was die wirkliche physiologische Funktion von Claudin-19-basierten TJs in Schwann-Zellen ist. Basierend auf einem angesammelten Wissen über TJs in den Epithelien wäre es vernünftig zu spekulieren,

dass diese Verhaltensanomalien auf die Defekte in der elektrischen Versiegelung durch TJs in Schwann-Zellen zurückzuführen sind (Miyamoto et al. 2005). Kompaktes Myelin und die paranodalen Axo-Glia-Übergänge sind auch direkt an der elektrischen Versiegelung in Schwann-Zellen beteiligt. Tatsächlich begünstigten elektrophysiologische Analysen isolierter peripherer Nerven die Vorstellung, dass die Saltatorleitung myelinisierter Axone selbst bei *Cld19*<sup>-/-</sup>-Mäusen betroffen war. Diese Studie zeigte anhand der *Cld19*<sup>-/-</sup>-Mäuse, dass diese TJs für PNS-myelinisierte Axone funktionell unverzichtbar waren. Daher ist es verlockend, über die mögliche Existenz einer erblichen peripheren Neuropathie beim Menschen zu spekulieren, d. h. einer Charcot-Marie-Tooth(CMT)-Neuropathie, die durch Mutationen im Claudin-19-Gen verursacht wird (Bertorini, Narayanaswami et al. 2004).

Nach Nervenquetschung wird nicht nur die Claudin-1-Expression, sondern auch die Claudin-19-Expression reduziert (Wang, Miao et al. 2018), wodurch die BNB- und Myelinbarrierefunktion mit erhöhtem parazellulären Einstrom beeinträchtigt wird (Richner, Ferreira et al. 2019). Die peripheren Axone degenerieren, aber Schwann-Zellen dedifferenzieren, um so eine neue Leitschiene für Axone zu bilden. Die Proliferation, Migration und Remyelinisierung von Schwann-Zellen, wird hierbei durch die Freisetzung des neuronalen Leitproteins Netrin-1 und die Aktivierung der Unc5b-Signalkaskade induziert (Chen et al. 2021).

Die gleichzeitige Abnahme des Gehalts von Claudin-19 und Claudin-1 lieferte erste Hinweise darauf, dass auch dem Claudin-19 eine Funktion in der perineuralen Barriere zukommt. Dabei ist eindeutig, dass die Myelinbarriere betroffen ist, da Claudin-19, wie zuvor erwähnt wurde, das relevanteste Versiegelungsprotein in den Schwann-Zellen innerhalb der Myelinbarriere darstellt. Daher könnte eine genauere Untersuchung der Myelinbarriere neue Pathologien bei Entzündungen aufdecken.

Zusammenfassend zeigen diese Daten ein paralleles Auftreten von Entzündungszeichen, eine Abnahme des Gehalts von Claudin-1 und Claudin-19 sowie einen damit verbundenen Zusammenbruch der perineuralen Barriere. Wie die meisten bisherigen Untersuchungen zur BNS konzentrierte sich auch diese Studie primär auf die quantitativen Gesamtänderungen der Proteinexpression ohne eine Berücksichtigung der Kompartimentverteilung der TJPs.

Es gibt Hinweise darauf, dass es im Rahmen von inflammatorischen Prozessen zu einer Neuorganisation unterschiedlicher Claudine kommt, was zu Permeabilitätsänderungen führen kann (Yamazaki, Tokumasu et al. 2011, Capaldo, Farkas et al. 2014). So ist denkbar, dass bei entzündlichen Prozessen die BNS zu Beginn durch Neustrukturierungen von Claudinen permeabler wird. Nur durch quantitative Methoden zur Bestimmung von TJPs bei pathologischen Prozessen können keine hinreichenden Aussagen über die Funktionalität getroffen werden. Um die Relevanz solcher Beobachtungen abschätzen zu können, müssen deshalb die damit verbundenen strukturellen Änderungen und die genaue Lokalisierung entsprechender quantitativen Änderungen berücksichtigt werden. Bezüglich der Lokalisierung ist es möglich, dass Proteine temporär ins Zellinnere verlagert werden, ohne dass ein Abbau erfolgt und eine neuerliche Synthese notwendig wird.

#### **4.2 Zeitlicher Verlauf der Expression von Claudin-1 und Claudin-19 am Ort der Entzündung**

Der maximale Effekt der Abnahme des Claudin-1-Proteingehalts konnte 24 h nach der intraplantaren Injektion von FCA beobachtet werden. Diese Erkenntnisse decken sich mit vorherigen Untersuchungen von Antonijevic, die ebenfalls zeigen konnten, dass die peripheren und opioid-antinozizeptiven Wirkungen in frühen Stadien von Entzündungszuständen auftraten, in diesem Fall 12 h nach Inokulation mit FCA (Antonijevic et al. 1995). Dadurch wird die Annahme von Antonijevic gestützt, dass die Opiode ihre Wirkung an sensorischen Neuronen wegen des Zusammenbruchs der perineuralen Barriere entfalten können. Ebenso wäre dies auch ein Einwand gegen die von Hassan et al. aufgestellte Hypothese, dass die antinozizeptive Wirkung von Opioiden auf eine Zunahme der Anzahl bzw. eine Hochregulation von Rezeptoren zurückzuführen ist (Hassan, Ableitner et al. 1993, Schäfer, Bette et al. 1994). Die De-novo-Synthese von Opioidrezeptoren und der axonale Transport vom Perikaryon zur Peripherie dauern mehrere Tage und können daher keine plausible Erklärung für diese opioid-antinozizeptiven Effekte sein (Hassan, Ableitner et al. 1993).

Die Untersuchungen in dieser Studie zeigten, dass die Expression von Claudin-1 nach 96 h wieder zunahm, aber im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant niedriger blieb. Eine Wiederherstellung der perineuralen Barriere kann damit nicht eindeutig nach-

gewiesen werden. In den Untersuchungen von Antonijevic zeigte sich 96 h nach der subkutanen FCA-Injektion in zahlreichen Nervenästen eine intensive und homogene, endoneurale HRP-Färbung, was auf eine intakte perineurale Barriere hinweist (Antonijevic et al. 1995).

Für Claudin-19 konnte der Zeitpunkt des maximalen Effekts nicht eindeutig identifiziert werden. Bereits nach 2 h war eine signifikante Abnahme der Expression zu verzeichnen, die über die gesamte Untersuchungszeit von 96 h konstant auf einem niedrigen Niveau blieb. Im Hinblick auf Claudin-19 ist somit noch unklarer als für Claudin-1, zu welchem Zeitpunkt die perineurale Barriere in der Pfote wieder vollständig intakt war. Zur Klärung dieser Frage müssen für beide Proteine weitere Untersuchungen erfolgen.

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ging hervor, dass eine perineurale Applikation von 10-prozentiger NaCl-Lösung nach einer perineuralen Opioidgabe zu einer Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle unmittelbar nach der Injektion für mindestens 2 h führt. Die Ergebnisse der Studie von Hirakawa von 2003 zeigten, dass in einem Mausmodell des Ischiasnervs nach einer Quetschverletzung sowohl die Permeabilität des Ischiasnerv-Perineuriums als auch die Permeabilität der endoneuralen Gefäße zunehmen und erst nach sieben Tagen eine Normalisierung zu verzeichnen ist. Im gleichen Zeitraum nehmen die TJ-Proteine, wie Claudin-1, Claudin-5 und Occludin, ab. Die Claudin-1-Immunreaktivität tritt nach zwei Tagen erneut auf; ähnlich verhält es sich bei Occludin und Claudin-5 (Hirakawa, Okajima et al. 2003).

Auch in einem Rattenmodell konnte nach einer CCI (Ligation des Ischiasnervs, die neuropathische Schmerzen verursacht) bereits 6 h nach der Operation eine BNS-Leckage beobachtet werden (Moreau, Mauborgne et al. 2016).

### **4.3 Wirkung der FCA-induzierten und peripheren Entzündung in der Hinterpfote auf die Permeabilität der BHS**

Aus früheren Studien ist bekannt, dass sowohl Entzündungen als auch periphere Nervenverletzungen die Barriere an einem entfernten Ort stören und zu zentralen Manifestationen von Krankheiten beitragen können. So erhöhen die durch  $\lambda$ -Carrageenan (CIP) induzierten und peripheren lokalen Hinterpfotenentzündungen – vermutlich durch das Überströmen von *transforming growth factor* (TGF) in den systemischen Kreislauf – die Durchlässigkeit der BHS. Dies kann Veränderungen der TJ-Proteinexpression nach sich

ziehen, was eine Modifikation der Funktionsintegrität der BHS zur Folge hat (Ronaldson, DeMarco et al. 2009).

Beispielsweise zeigten Studien unter Verwendung eines Nagetiermodells, bei dem unter anderem  $\lambda$ -Carrageenan, Formalin oder FCA in die rechte Hinterpfote injiziert wurde und dadurch periphere Entzündungen ausgelöst wurden, eine Zunahme der  $^{14}\text{C}$ -Saccharose-Permeation durch die BHS (Huber, Witt et al. 2001, Huber, Hau et al. 2002, Campos, Ocheltree et al. 2008). Diese Veränderungen in der Durchlässigkeit verliefen parallel zu einer veränderten Expression der für die BHS charakteristischen TJ-Proteine einschließlich Occludin, Claudin-5 und ZO-1 (Huber, Witt et al. 2001, Huber, Hau et al. 2002, Campos, Ocheltree et al. 2008).

Die Untersuchungen von Huber zeigten, dass eine direkte intravenöse Applikation von  $\lambda$ -Carrageenan in den peripheren Kreislauf keine Wirkung auf die funktionelle und strukturelle Integrität der BHS hat. Ergebnisse einer ähnlichen Untersuchung von Brooks wiesen bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nach einer FCA-Injektion in die rechte plantare Hinterpfote ebenfalls auf eine signifikant erhöhte Saccharoseaufnahme im Gehirn mithilfe von Durchlässigkeitstests der BHS auf der Grundlage von In-situ-Perfusion von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose hin. Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass chronische entzündliche Schmerzen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führen (Brooks, Hawkins et al. 2005).

Dieselben systemischen Effekte waren auch, wie zuvor erwähnt wurde, nach einer peripheren Nervenverletzung zu beobachten. Bei einer Nervenverletzung werden Entzündungsreaktionen ausgelöst, die zum einen eine Schlüsselrolle bei der Modulation der lokalen BNS-Permeabilität spielen und sich zum anderen auf proximal gelegene Gewebe auswirken. Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Echeverry, innerhalb derer nachgewiesen wurde, dass eine periphere Nervenverletzung systemisch wirken kann, womit nicht nur physische Barrieren im peripheren Nervensystem beeinflusst werden können, sondern es auch zu Veränderungen von physischen Barrieren im zentralen Nervensystem kommen kann. So konnte bestätigt werden, dass eine partielle Ischiasnervligatur bei Ratten eine entfernte Leckage der Blut-Rückenmark-Schranke induziert, was sich möglicherweise auf das Auslösen von Entzündungsreaktionen im Rückenmark zurückführen lässt (Echeverry, Shi et al. 2011). Diese Befunde verbinden die pathologischen Veränderungen

der peripheren Nerven mit Veränderungen des gesamten Nervensystems, was die Komplexität der Auswirkungen peripherer Nervenverletzungen deutlich macht.

Die Studie aus der Arbeitsgruppe von Sauer lieferte den Nachweis, dass eine Neuropathie – hier CCI sowie SNI im Ischiasnerv – die Blut-Rückenmark-Schranke für kleine und größere Moleküle öffnet. Dies ist mit einer erhöhten Konzentration des Thrombocytin-Wachstumsfaktor-Rezeptors  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) und Pericyten verbunden. Gleichzeitig nimmt die Expression der TJPs Occludin, Claudin-1, Claudin-5, Claudin-19, Tricellin und ZO-1 ab (Sauer, Kirchner et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde abweichend von den genannten Studienergebnissen festgestellt, dass intraplantare FCA-Injektionen die Barriereintegrität zwar am Entzündungsort herabsetzen, jedoch nicht die perineurale Barriere des versorgenden (Ischias-) Nervs beeinträchtigen. Es liegen jedoch auch Studienergebnisse vor, welche die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern. So zeigten die Resultate der Untersuchung von Lu, dass mittels intraplantaren Capsaicins und  $\lambda$ -Carrageenan erzeugte lokale Entzündungen im Rattenmodell weder im Gehirn noch im Rückenmark die Aufnahme des Farbstoffs EBA beeinflussten (Lu, Gonzales et al. 2009).

Es gibt auch weitere Studien dieser Arbeitsgruppe, die ähnliche Ergebnisse bei Untersuchungen der Eigenschaften der Blut-Dorsal-Root-Ganglion(DRG)-Barriere im Spinalganglion nach CCI zeigten. Hierbei wurden die TJ-Proteine Claudin-1, -5, -12 und -19 untersucht. Dabei konnten keine veränderten Claudin-19-mRNA-Spiegel, Claudin-19-IR (immunoreactivity) sowie Claudin-1-mRNA und Claudin-1-IR (immunoreactivity) im proximal der Verletzung liegenden DRG nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das putative Epi-/Perineurium um Ratten-DRGs herum nicht durch CCI beeinflusst zu werden scheint (Lux, Hu et al. 2020). Diese Studie zeigte auch, dass eine kurzfristige traumatische Nervenverletzung die bereits hochpermeable Blut-DRG-Barriere für kleine und große Moleküle unverändert lässt. Demgegenüber belegten die Ergebnisse, dass Claudin-5, -12 und TJP1(-Ratten)-mRNA für den Zeitraum von einer Woche nach traumatischer Nervenverletzung herunterreguliert war. Untersuchungen zu den Regulationsmechanismen dieser TJ-Proteine im FCA-Modell könnten Gegenstand zukünftiger Studien sein.



#### 4.4 Möglicher Mechanismus der veränderten Expression bzw. Regulation der TJ-Proteine

Welcher Mechanismus der veränderten Expression bzw. Regulation der TJ-Proteine durch die Entzündung zugrunde liegt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass Wnt-Signale an der Regulation der Promotoraktivität von Claudin-1 beteiligt sind (Miwa, Furuse et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass GSK3 $\beta$  ein wichtiges regulatorisches Signalmolekül für die Bildung oder Störung der Barriere ist. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass eine Inhibierung von GSK3 $\beta$  durch *small interfering RNA* (siRNA) oder synthetische Inhibitoren zu einer Veränderung der Expression von Claudinen und der Barrierefunktion führen (Severson, Kwon et al. 2010, Zhang, Jouret et al. 2011, Ramirez, Fan et al. 2013). So löst etwa die Hemmung von GSK3 $\beta$  eine Herunterregulierung von Claudin-1 und eine defekte Barriere bei den Epithelzellen aus (Severson, Kwon et al. 2010).

Die Anwendung eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors führt zur Akkumulation von cytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin und einer anschließenden  $\beta$ -Catenin-Translokation in den Kern, in dem es als transkriptionaler Co-Faktor von Claudin-1 fungiert (Miwa, Furuse et al. 2001, Wang, Li et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob es nach dem Auslösen einer peripheren Entzündung zu einer Veränderung hinsichtlich des  $\beta$ -Catenins kommt. Nach den Ergebnissen war das  $\beta$ -Catenin nach der peripheren und intraplantaren FCA-Injektion über den Beobachtungszeitraum von 2–96 h am Entzündungsort verringert, aber nicht im Perineurium des *N. ischiadicus*. Diese Resultate entsprechen den für Claudin-1 und Claudin-19 gewonnenen Erkenntnissen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Einsatz eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors der Abnahme des Claudin-1-Proteingehalts am Ort der lokalen Entzündung (in der entzündeten Hinterpfote) entgegenwirkt und dessen Abnahme verlangsamt. Der Untersuchungszeitpunkt wurde auf 24 h nach der FCA-Injektion gelegt, da hier der maximale Effekt der Abnahme von Claudin-1 und  $\beta$ -Catenin beobachtet wurde. Es zeigte sich, dass der GSK3 $\beta$ -Inhibitor zu einer Reduzierung der Abnahme von Claudin-1 führt, wodurch die Rolle von  $\beta$ -Catenin bei der Claudin-1-Regulation im Perineurium bestätigt wird.

Somit ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg ein möglicher Mechanismus für die Veränderung der Expression bzw. Regulation der TJs der perineuralen Barriere im Rahmen einer peripheren Entzündung. Dieser Mechanismus sollte in weiteren Untersuchungen näher erforscht werden.

Versuche mit dem Claudin-1 Peptid mC1C2 führten in Zellkulturen unter anderem zur Umverteilung von Claudin-1 von der Zellmembran ins Zytosol und erhöhten die Permeation hydrophiler Substanzen (Staat 2015). Auch *in vivo* führte mC1C2 durch Claudin-1 Bindung über den Transkriptionsfaktor *cdx2* zur Verringerung der Claudin-1 Expression im Perineurium (Staat 2015).

Weitere Forschungen könnten untersuchen, ob diese Prozesse im Entzündungsstadium über *cdx2* vermittelt werden. Bei chronischen Verengungsverletzungen war die Hemmung der Wnt-Signalübertragung *in vivo* allerdings noch nicht erfolgreich (Moreau, Dieb et al. 2017), weshalb auch hier weitere Studien erforderlich sind, um die Relevanz dieses Signalweges bewerten zu können.

#### **4.5 Übersicht über weitere mögliche Mechanismen der Regulation der Claudin-1-Expression**

##### *Metalloproteinasen*

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Familie von zinkabhängigen extrazellulären Proteasen mit einer Vielzahl von biologischen Rollen bei der Zellmigration, der Angiogenese und der Matrixumgestaltung (Mott and Werb 2004). In peripheren Nerven initiieren sie frühe degenerative Ereignisse im Zusammenhang mit der Aktivierung der Schwann-Zellen, der Rekrutierung von Makrophagen und der Demyelinisierung, was an experimentell induzierter Neuropathie gezeigt werden konnte (Shubayev, Angert et al. 2006).

Es ist bekannt, dass Matrixmetalloproteinasen-9 in entzündetem Gewebe heraufreguliert wird und auch am Abbau von TJ-Proteinen beteiligt ist (McColl, Rothwell et al. 2008, Kubelka, Azeredo et al. 2010).

Nach Injektion von Kochsalzlösung wurde die Freisetzung von MMP-9 festgestellt. Die Interaktion Hämopexin-Domäne (MMP9-PEX) dieser Metallproteinase mit dem *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP-1), führte zu einer verstärkten Phospho-

rylierung der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK). Die dadurch induzierte Abnahme der Claudin-1 Expression bewirkte eine Öffnung der Barriere des Perineuriums. (Hackel, Brack et al. 2012)

Diese Effekte lassen sich mithilfe von *recombinant tissue-type plasminogen activator* (rtPA) nachahmen, indem rtPA das LRP-1 aktiviert. Die Öffnung der BNS lässt sich somit durch inaktive MMP-9-PEX- oder LRP-1-Agonisten, wie den inaktiven rekombinanten Gewebeplasminogen-Aktivator, erreichen. (Reinhold, Yang et al. 2019)

#### *micro RNA*

Bei microRNAs (miR) handelt es sich um kurze, nichtkodierende RNA-Sequenzen, die unter anderem in der Genexpression eine Rolle spielen. Mehrere miR wirken sich auf die Expression von Claudin-1 aus.

Studien konnten nachweisen, dass miR-183-5p und miR-183-3p als mögliche Vermittler zwischen rtPA und den Promotoren der Claudin-1-Transkription fungieren. So führte die perineurale Verabreichung von rtPA an peripheren Rattennerven zu einem signifikanten Anstieg von miR-183-5p. (Yang, Krug et al. 2016) Weitere Versuche an Ratten zeigten, dass die perineurale Injektion von miR-183-Mimetika zu einer Reduktion sowohl der Claudin-1-RNA als auch der Proteinexpression von Claudin-1 führte (Yang, Krug et al. 2016).

Versuche an männlichen Ratten ließen darauf schließen, dass rtPA die BNB möglicherweise über miR-155-5p vorübergehend öffnet (Reinhold, Yang et al. 2019).

## 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Entzündliche, traumatische und degenerative Erkrankungen des Nervensystems sind häufig mit einer Barriereöffnung der BNS verbunden. Daher ist das Verständnis der dabei ablaufenden Prozesse von großer Relevanz.

Die gewonnenen Erkenntnisse zu den Prozessen bei der Inflammation in den peripheren Nerven können darüber hinaus zum Verständnis der Pathogenese mehrerer neurologischer Erkrankungen beitragen, bei denen eine Herunterregulierung der TJP-Expression zu einem Barriereabbau sowie einer erhöhten Permeabilität der BNS führt.

Beispiele für demyelinisierende Erkrankungen, die das periphere Nervensystem betreffen, sind, wie bereits unter 4.1. erwähnt, das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP). Bei GBS handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die sich nach vorangegangener Infektion innerhalb von vier Wochen über eine schnell fortschreitende aufsteigende Lähmung mit oder ohne sensorische und autonome Dysfunktion manifestiert (Koike et al. 2021). Mit der Erkrankung assoziierte Erreger sind Epstein-Barr- und Influenza-Viren. Es wird angenommen, dass eine Infektion mit diesen Erregern zur Produktion von Autoantikörpern gegen Komponenten des peripheren Nervensystems, wie Ganglioside, führt und so neurodegenerative Prozesse eingeleitet werden (Koike et al. 2021). Im Tiermodell des GBS zeigte sich zudem eine ausgedehnte BNS-Leckage (Kanda, Yamawaki et al. 2003).

CIDP ähnelt in seiner Symptomatik und Pathogenese dem GBS, nimmt allerdings im Gegensatz dazu einen chronischen Verlauf (Markvardsen et al. 2019). Die genaue Ursache der Erkrankung konnte zwar noch nicht ermittelt werden, jedoch sprechen das Auftreten einer Entzündung peripherer Nerven und das Ansprechen der Symptome auf eine immunmodulatorische Therapie dafür, dass es sich, wie beim GBS, um eine Autoimmunerkrankung handelt (Markvardsen et al. 2019). Weitere Studien, die bestätigten, dass Autoantikörper an der Pathogenese von CIDP beteiligt sind, so z.B. gegen Neurofascin, was eine essenzielle Rolle bei der Weiterleitung des Aktionspotentials spielt, untermauern diese These (Gao et al. 2021). Die Produktion dieser Antikörper basiert auf der Dysfunktion der BNS, durch die Antigene des PNS freigesetzt werden (Gao et al. 2021).

Im Hinblick auf die Pathogenese von CIDP, ist die Untersuchung des Einflusses humoraler Immunreaktionen auf die Entstehung und Progression entzündlicher Neuropathien

ein wichtiger Faktor zur Aufklärung aller Prozesse, die Auswirkungen auf die Permeabilität der BNS haben (Gao et al. 2021).

Allgemein wird angenommen, dass dieselben Mechanismen, die zur Funktionsstörung der BHS führen, auch eine Funktionsstörung der BNS hervorrufen können (Gartzen et al. 2008).

Auch Nervenverletzungen können zu einem Zusammenbruch der BNS führen. Ein besseres Verständnis der Merkmale der BNS ist demnach von großer Bedeutung, um neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von defekten Barrieren bei neuropathischen Erkrankungen zu erschließen. Der pathologische Zusammenbruch der BNS kann ein Schlüsselereignis sein, das periphere Neuropathien induziert.

Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie dieser Barriereregulatoren könnte auch die Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungen anregen. Der Schwerpunkt liegt hierbei darauf, ein Versiegeln der Barriere zu Beginn des Krankheitsprozesses zu erleichtern und das Fortschreiten des Abbaus zu begrenzen. Außerdem könnten sich Arzneimittelverstärker und eine vorübergehende Überwindung der Barriere als wirksam bei der Behandlung von Schmerzen, Neoplasien oder degenerativen Störungen erweisen.

Zudem sind die genauen Kenntnisse dieser Mechanismen entscheidend für die Entwicklung und den Einsatz von Medikamenten, die, um ihren Wirkort zu erreichen, Hürden wie die BNS überwinden müssen. Optionen zu finden, um gezielt transiente Öffnungen dieser Barrieren zu bewirken, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Arzneimittel, die innerhalb dieser Modulationen ihre Anwendung finden, sind Analgetika, genetische Modulatoren oder Wachstumsfaktoren.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Studium menschlicher peripherer Nerven generell herausfordernd ist, da Proben nicht ohne Weiteres verfügbar sind. Tiermodelle stellen zwar gute Alternativen dar, jedoch muss bei ihrer Verwendung beachtet werden, dass u.a. die Expression der Claudin-Typen zwischen den Arten variiert und Schlussfolgerungen aus Tierstudien nicht unbedingt auf die menschliche Biologie und auf humane Krankheiten übertragbar sind.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In früheren Studien wurde gezeigt, dass durch eine mit FCA-induzierte Pfotenentzündung die Permeabilität für hydrophile Analgetika der kleinen Nerven am Entzündungsort zunimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Veränderungen von Barriereproteinen des Perineuriums und der Schwannschen Zellen und ihren Regulatoren nach intraplantarer Injektion von FCA lokal in die Hinterpfote und proximal am *N. ischiadicus* untersucht. Aus früheren Studien ist bekannt, dass vor allem Claudin-1 das Perineurium abdichtet. Daher konzentrierte sich die Arbeit auf Claudin-1 und einen möglichen Einfluss von Claudin-19 aus Schwannschen Zellen. Alle Untersuchungen erfolgten an Wistar-Ratten.

Zwei Stunden bis 96 Stunden nach der FCA-Injektion in die Hinterpfote waren die Expression sowie die Immunreaktivität von Claudin-1 und die Expression von Claudin-19 im ipsilateralen proximalen Ischiasnerv unverändert. Zudem wurde keine Penetration des Farbstoffes EBA in das Endoneurium und in den Ischiasnerv nach ex vivo Applikation nachgewiesen, was auf eine gute Abdichtung des Perineuriums hinweist. In der entzündeten Pfote selbst allerdings nahm die Expression von Claudin-1 und Claudin-19 ab. Parallel dazu kam es zu einer starken Abnahme des Co-Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin in der Pfote, aber nicht im Nerven.  $\beta$ -Catenin steuert die Expression von Claudin-1. Die Behandlung mit einem GSK3  $\beta$ -Inhibitor bremste die Herunterregulation von Claudin-1 24 Stunden nach der intraplantaren Injektion von FCA ins Hinterpfotengewebe und führte zu einem Wiederanstieg der Konzentration.

Daher kann abschließend festgehalten werden, dass eine periphere Entzündung zwar wie erwartet lokal die Barriere öffnet, es aber proximal nicht zu einer Barrierestörung kommt. Dies ist bei der Blut-Hirn-Schranke anders. Diese wird vermutlich über lösliche Faktoren bei Entzündung oder bei Nervenschäden, bei denen sich auch die Barriere im Spinalganglion verändert, durchlässiger.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Alanne, M. H., et al. (2009). "Tight junction proteins in human Schwann cell autotypic junctions." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **57**(6): 523-529.
- Alshbool, F. Z. and S. Mohan (2014). "Emerging multifunctional roles of Claudin tight junction proteins in bone." Endocrinology **155**(7): 2363-2376.
- Anderson, J. M. (2001). "Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport." Physiology **16**(3): 126-130.
- Angelow, S., et al. (2008). "Biology of claudins." American Journal of Physiology-Renal Physiology **295**(4): F867-F876.
- Antonijevic, I., et al. (1995). "Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation." Journal of Neuroscience **15**(1): 165-172.
- Bertorini, T., et al. (2004). "Charcot-Marie-Tooth disease (hereditary motor sensory neuropathies) and hereditary sensory and autonomic neuropathies." The neurologist **10**(6): 327-337.
- Bhat, A. A., et al. (2012). "Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells." PloS one **7**(6): e37174.
- Binari, L. A., et al. (2013). "Perineurial glia require Notch signaling during motor nerve development but not regeneration." Journal of Neuroscience **33**(10): 4241-4252.
- Bockman, D., et al. (1988). "Analysis of nerves in chronic pancreatitis." Gastroenterology **94**(6): 1459-1469.
- Brembeck, F. H., et al. (2006). "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin." Current opinion in genetics & development **16**(1): 51-59.
- Brooks, T. A., et al. (2005). "Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **289**(2): H738-H743.
- Bunge, M. B., et al. (1989). "Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker." Science **243**(4888): 229-231.
- Burkel, W. E. (1967). "The histological fine structure of perineurium." The Anatomical Record **158**(2): 177-189.
- Campos, C. R., et al. (2008). "Nociceptive inhibition prevents inflammatory pain induced changes in the blood-brain barrier." Brain research **1221**: 6-13.

Capaldo, C. T., et al. (2014). "Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins." Molecular biology of the cell **25**(18): 2710-2719.

Chen, J. T.-C., et al. (2021). "Netrin-1 as a Multitarget Barrier Stabilizer in the Peripheral Nerve after Injury". In: *International journal of molecular sciences* **22** (18). DOI: 10.3390/ijms221810090.

Colegio, O. R., et al. (2003). "Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture." American Journal of Physiology-Cell Physiology **284**(6): C1346-C1354.

Colegio, O. R., et al. (2002). "Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells." American Journal of Physiology-Cell Physiology **283**(1): C142-C147.

Creange, A., et al. (1998). "Cytokines and peripheral neuropathies." Revue Neurologique **154**(3): 208-216.

Dabrowski, S., et al. (2015). "Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell–cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals." Antioxidants & redox signaling **22**(1): 1-14.

De la Motte, D., et al. (1975). "A study of the perineurium in peripheral nerve pathology." Acta neuropathologica **33**(3): 257-270.

Dhawan, P., et al. (2005). "Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer." The Journal of clinical investigation **115**(7): 1765-1776.

Echeverry, S., et al. (2011). "Peripheral nerve injury alters blood–spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway." Journal of Neuroscience **31**(30): 10819-10828.

Etheridge, S. L., et al. (2004). "Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells." Stem cells **22**(5): 849-860.

Feldmeyer, L., et al. (2006). "Confirmation of the origin of NISCH syndrome." Human mutation **27**(5): 408-410.

Friedland, J., et al. (2002). "Differential regulation of MMP-1/9 and TIMP-1 secretion in human monocytic cells in response to Mycobacterium tuberculosis." Matrix biology **21**(1): 103-110.

Furuse, M., et al. (1998). "Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." The Journal of cell biology **141**(7): 1539-1550.



Furuse, M., et al. (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier a lesson from claudin-1-deficient mice." The Journal of cell biology **156**(6): 1099-1111.

Gamble, H. and R. A. Eames (1964). "An electron microscope study of the connective tissues of the human peripheral nerve." Journal of anatomy **98**(Pt 4): 655.

Gao et al. (2021). "Impact of Neurofascin on Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy." Frontiers in molecular neuroscience **14**: 779385

Gartzen, K.; Katsarava, Z.; Putzki, N. (2008).  
Beteiligung des peripheren Nervensystems bei Multipler Sklerose.  
In: Akt Neurol 35 (S 01). DOI: 10.1055/s-0028-1086831.

González-Mariscal, L., et al. (2010). Regulation of claudins by posttranslational modifications and cell-signaling cascades. Current Topics in Membranes, Elsevier. **65**: 113-150.

Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." Journal of Biological Chemistry **281**(32): 22429-22433.

Grant, G., et al. (2001). "Perineural antinociceptive effect of opioids in a rat model." Acta anaesthesiologica scandinavica **45**(7): 906-910.

Guenzel, D. (2017). Claudins and the modulation of tight junction permeability. ACTA PHYSIOLOGICA, WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.

Gumbiner, B. M. (1993). "Breaking through the tight junction barrier." The Journal of cell biology **123**(6 Pt 2): 1631-1633.

Günzel, D. and M. Fromm (2012). "Claudins and other tight junction proteins." Comprehensive Physiology **2**(3): 1819-1852.

Günzel, D. and A. S. Yu (2013). "Claudins and the modulation of tight junction permeability." Physiological reviews **93**(2): 525-569.

Guy, J. and N. A. Rao (1984). "Acute and chronic experimental optic neuritis: alteration in the blood-optic nerve barrier." Archives of Ophthalmology **102**(3): 450-454.

Hackel, D., et al. (2012). "Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control." Annals of the New York Academy of Sciences **1257**(1): 199-206.

Hackel, D., et al. (2012). "Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(29): E2018-E2027.

- Hadj-Rabia, S., et al. (2004). "Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease." Gastroenterology **127**(5): 1386-1390.
- Hassan, A., et al. (1993). "Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue." Neuroscience **55**(1): 185-195.
- Hirakawa, H., et al. (2003). "Loss and recovery of the blood–nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins." Experimental cell research **284**(2): 194-208.
- Hou, J., et al. (2008). "Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex." The Journal of clinical investigation **118**(2): 619-628.
- Huber, J., et al. (2001). "Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **280**(3): H1241-H1248.
- Huber, J. D., et al. (2002). "Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to  $\lambda$ -carrageenan-induced inflammatory pain." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **283**(4): H1531-H1537.
- Itoh, M., et al. (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**(6): 1351-1363.
- Kanda, T. (2013). "Biology of the blood–nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(2): 208-212.
- Kanda, T., et al. (2003). "Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood–nerve barrier model." Neurology **60**(2): 301-306.
- Katsuno, T., et al. (2008). "Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells." Molecular biology of the cell **19**(6): 2465-2475.
- Kikuchi, A. (2013). "Canonical Wnt signaling pathway and cellular responses." Clinical calcium **23**(6): 799-807.
- Koike, Haruki; Chiba, Atsuro; Katsuno, Masahisa (2021), "Emerging Infection, Vaccination, and Guillain-Barré Syndrome: A Review" Neurology and therapy **10**(2): 523–537.
- Konrad, M., et al. (2006). "Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement." The American Journal of Human Genetics **79**(5): 949-957.

Krause, G., et al. (2008). "Structure and function of claudins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1778**(3): 631-645.

Kristensson, K. and Y. Olsson (1971). "The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers." Acta neuropathologica **17**(2): 127-138.

Kristensson, K. and Y. Olsson (1976). "Osmotic opening of perineurial diffusion barrier in peripheral nerve." Neuropathology and applied neurobiology **2**(6): 479-488.

Kubelka, C. F., et al. (2010). "Metalloproteinases are produced during dengue fever and MMP9 is associated with severity." The Journal of infection **61**(6): 501-505.

Kucenas, S., et al. (2008). "CNS-derived glia ensheath peripheral nerves and mediate motor root development." Nature neuroscience **11**(2): 143-151.

Kucenas, S. (2015). "Perineurial glia". In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7** (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a020511.

Kwon, M. J. (2013). "Emerging roles of claudins in human cancer." International journal of molecular sciences **14**(9): 18148-18180.

Laksitorini, M. D., et al. (2019). "Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells." Scientific Reports **9**(1): 1-13.

Lee, N. P., et al. (2006). "Kidney claudin-19: Localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease." FEBS letters **580**(3): 923-931.

Lim, T. K., et al. (2014). "Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief." PAIN® **155**(5): 954-967.

Lu, P., et al. (2009). "CNS penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system." Life sciences **85**(11-12): 450-456.

Lux, T. J., et al. (2020). "Regional differences in tight junction protein expression in the Blood-DRG Barrier and Their Alterations after Nerve Traumatic Injury in Rats." International journal of molecular sciences **21**(1): 270.

Majno, G. and I. Joris (2004). Cells, tissues, and disease: principles of general pathology, Oxford University Press.

Markvardsen et al. (2019). "Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." Ugeskrift for læger **181**(30)

- McColl, B. W., et al. (2008). "Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice." Journal of Neuroscience **28**(38): 9451-9462.
- McMillin, M. A., et al. (2015). "TGF  $\beta$  1 exacerbates blood–brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5." Laboratory investigation **95**(8): 903-913.
- Medzhitov, R. (2010). "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." Cell **140**(6): 771-776.
- Menorca, R. M. G., et al. (2013). "Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery". In: *Hand clinics* 29 (3), S. 317–330. DOI: 10.1016/j.hcl.2013.04.002.
- Mikels, A. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." Oncogene **25**(57): 7461-7468.
- Mineta, K., et al. (2011). "Predicted expansion of the claudin multigene family." FEBS letters **585**(4): 606-612.
- Miwa, N., et al. (2001). "Involvement of claudin-1 in the  $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers." Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics **12**(11-12): 469-476.
- Miyamoto, K., et al. (2008). "Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma." Biomedical Research **29**(2): 71-76.
- Miyamoto, T., et al. (2005). "Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19–deficient mice." The Journal of cell biology **169**(3): 527-538.
- Mizisin, A. P. and A. Weerasuriya (2011). "Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult." Acta neuropathologica **121**(3): 291-312.
- Moreau, N., et al. (2017). "Hedgehog Pathway–Mediated Vascular Alterations Following Trigeminal Nerve Injury." Journal of dental research **96**(4): 450-457.
- Moreau, N., et al. (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**(4): 827-839.
- Moreau, N., et al. (2017). "Could an endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and Sonic Hedgehog pathways underlie the early disruption of the infraorbital blood–nerve barrier following chronic constriction injury?" Molecular pain **13**: 1744806917727625.

- Morin, P. J. (2005). "Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy." Cancer research **65**(21): 9603-9606.
- Morita, K., et al. (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(2): 511-516.
- Mott, J. D. and Z. Werb (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Current opinion in cell biology **16**(5): 558-564.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways." Science **303**(5663): 1483-1487.
- Neuhuber, W. (2016). "Anatomische Grundlagen". In: Grundkurs Mikrochirurgie: Springer, Berlin, Heidelberg, S. 31–38. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48037-3\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48037-3_4).
- Oldfors, A. (1981). "Permeability of the perineurium of small nerve fascicles: an ultrastructural study using ferritin in rats." Neuropathology and applied neurobiology **7**(3): 183-194.
- Oliva, C. A., et al. (2013). "Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies." Frontiers in cellular neuroscience **7**: 224.
- Olsson, Y. (1990). "Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions." Critical reviews in neurobiology **5**(3): 265-311.
- Peltonen, J., et al. (1990). "Type VI collagen. In situ hybridizations and immunohistochemistry reveal abundant mRNA and protein levels in human neurofibroma, schwannoma and normal peripheral nerve tissues." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **62**(4): 487-492.
- Peltonen, S., et al. (2013). "Barriers of the peripheral nerve." Tissue Barriers **1**(3): e24956.
- Pia-Oviedo, S. and C. Ortiz-Hidalgo (2008). "The normal and neoplastic perineurium." Adv. Anat. Pathol **15**: 147-164.
- Polakis, P. (2008). "Formation of the blood–brain barrier: Wnt signaling seals the deal." The Journal of cell biology **183**(3): 371-373.
- Poliak, S., et al. (2002). "Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells." The Journal of cell biology **159**(2): 361-372.
- Powell, H. C. and R. R. Myers (1989). The blood-nerve barrier and the pathologic significance of nerve edema. Implications of the blood-brain barrier and its manipulation, Springer: 199-222.

Pummi, K. P., et al. (2004). "Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **52**(8): 1037-1046.

Ramirez, S. H., et al. (2013). "Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5." PloS one **8**(2).

Rechthand, E. and S. I. Rapoport (1987). "Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier." Progress in neurobiology **28**(4): 303-343.

Reinhold, A. and H. Rittner (2017). "Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review." Pflügers Archiv-European Journal of Physiology **469**(1): 123-134.

Reinhold, A.-K., et al. (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**(6): 1160-1169.

Reinhold, A. K., et al. (2018). "Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy." Frontiers in neuroscience **12**: 936.

Richard, L., et al. (2012). "Endoneurial fibroblast-like cells." Journal of neuropathology and experimental neurology **71**(11): 938-947.

Richner, M., et al. (2019). "Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy." Frontiers in neuroscience: 1038.

Rittner, H. L., et al. (2012). "Modulation of tight junction proteins in the perineurium to facilitate peripheral opioid analgesia." Anesthesiology **116**(6): 1323-1334.

Roe, K. (2021). "An inflammation classification system using cytokine parameters". In: Scandinavian journal of immunology **93** (2), e12970. DOI: 10.1111/sji.12970

Ronaldson, P. T., et al. (2009). "Transforming growth factor- $\beta$  signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **29**(6): 1084-1098.

Sauer, R.-S., et al. (2014). "Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood–nerve–barrier permeability." Journal of Controlled Release **185**: 88-98.

Sauer, R. S., et al. (2017). "Blood–spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy." Annals of the New York Academy of Sciences **1405**(1): 71-88.

Schäfer, M. K.-H., et al. (1994). "Localization of  $\kappa$ -opioid receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat sensory ganglia and spinal cord." Neuroscience letters **167**(1-2): 137-140.

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (1992). "Structure, function, and regulation of cellular tight junctions." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology **262**(6): L647-L661.

Severson, E. A., et al. (2010). "Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression." Biochemical and biophysical research communications **397**(3): 592-597.

Shapiro, A. L., et al. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." Biochemical and biophysical research communications **28**(5): 815-820.

Sharma, R. and V. Chopra (1976). "Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*." Developmental biology **48**(2): 461-465.

Shubayev, V. I., et al. (2006). "TNF $\alpha$ -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve." Molecular and Cellular Neuroscience **31**(3): 407-415.

Simon, D. B., et al. (1999). "Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption." Science **285**(5424): 103-106.

Singh, A. B., et al. (2010). "Claudin family of proteins and cancer: an overview." Journal of oncology **2010**.

Staat, C. (2015). "Claudin-Peptide zur Modulation der tight junction-Dichtheit." Universitätsbibliothek der FU Berlin

Stein, C., et al. (1988). "Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds." Pharmacology Biochemistry and Behavior **31**(2): 445-451.

Sunderland, S. (1978). "Nerves and nerve injuries, Churchill Livingstone." Edinburgh London.

Suter, U. and S. S. Scherer (2003). "Disease mechanisms in inherited neuropathies." Nature reviews neuroscience **4**(9): 714-726.

Tokumasu, R., et al. (2016). "Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(28): E4061-E4068.

Tran, K. A., et al. (2016). "Endothelial  $\beta$ -catenin signaling is required for maintaining adult blood–brain barrier integrity and central nervous system homeostasis." Circulation **133**(2): 177-186.

Tsukita, S. and M. Furuse (1999). "Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?" Trends in cell biology **9**(7): 268-273.

Tsukita, S., et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." Nature reviews Molecular cell biology **2**(4): 285-293.

Turksen, K. and T.-C. Troy (2004). "Barriers built on claudins." Journal of cell science **117**(12): 2435-2447.

Valkenburg, K. C., et al. (2011). "Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in normal and cancer stem cells." Cancers **3**(2): 2050-2079.

Wang, W., et al. (2016). "GSK-3 $\beta$  inhibitor TWS119 attenuates rtPA-induced hemorrhagic transformation and activates the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway after acute ischemic stroke in rats." Molecular neurobiology **53**(10): 7028-7036.

Wang, X., et al. (2018). "Peripheral nerve injury induces dynamic changes of tight junction components." Frontiers in Physiology: 1519.

Wilcox, E. R., et al. (2001). "Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29." Cell **104**(1): 165-172.

Yamazaki, Y., et al. (2011). "Role of claudin species–specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens." Molecular biology of the cell **22**(9): 1495-1504.

Yang, S., et al. (2016). "Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier." Biomaterials **82**: 20-33.

Yosef, N. and E. E. Ubogu (2013). "An immortalized human blood-nerve barrier endothelial cell line for in vitro permeability studies." Cellular and molecular neurobiology **33**(2): 175-186.

Zhang, L., et al. (2011). "AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) inhibition induce Ca<sup>2+</sup>-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane." Journal of Biological Chemistry **286**(19): 16879-16890.

Zhou, B., et al. (2015). "Claudin 1 in breast cancer: new insights." Journal of clinical medicine **4**(12): 1960-1976.

Zwanziger, D., et al. (2012). "A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia." Molecular pharmaceuticals **9**(6): 1785-1794.





## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Die Abbildungen 2–12 und 22–24 wurden von mir persönlich mithilfe von *Adobe Illustrator* erstellt.

Abbildung 1: Humaner N. tibialis, HE-Färbung. Drei anatomische Kompartimente: Epineurium, Perineurium und Endoneurium. ....	4
Abbildung 2: Die makro- und mikroskopische Grundstruktur eines peripheren Nervs. ....	5
Abbildung 3: Aufbau der TJs. ....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Claudin-Struktur. ....	11
Abbildung 5: Mögliche Interaktionsformen zwischen Claudinen. ....	12
Abbildung 6: Wnt-Signalweg. ....	17
Abbildung 7: Schematische Übersicht über die Versuche. ....	23
Abbildung 8: Schema des <i>Western Blots</i> . ....	25
Abbildung 9: Prinzip des BCA-Assays. ....	27
Abbildung 10: Aufbau des Semi-Dry-Blots. ....	31
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Immundetektion. ....	33
Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. ....	37
Abbildung 13: Relative Dichte von Claudin-1 am Entzündungsort nach intraplantarer Injektion von FCA. ....	41
Abbildung 14: Relative Dichte von Claudin-19 am Entzündungsort nach intraplantarer Injektion von FCA. ....	42
Abbildung 15: Relative Dichte von Claudin-1 im Perineurium des ipsilateralen und proximalen <i>N. ischiadicus</i> nach intraplantarer Injektion von FCA. ....	43
Abbildung 16: Relative Dichte Claudin-19 im Perineurium des ipsilateralen und proximalen <i>N. ischiadicus</i> . ....	44
Abbildung 17: Repräsentative Claudin-1-Immunfluoreszenzfärbungen des <i>N. ischiadicus</i> im Querschnitt, Messbalken = 200 $\mu\text{m}$ . Nervenquerschnitte. ....	46
Abbildung 18: Evansblau-Albumin-Permeabilitätstest. ....	47
Abbildung 19: Intraplantare Injektion von FCA reduziert $\beta$ -Catenin im entzündeten Gewebe. ....	48
Abbildung 20: Intraplantare Injektion von FCA führt zu keiner signifikanten Veränderung von $\beta$ -Catenin im Perineurium des ipsilateralen und proximalen <i>N. ischiadicus</i> . ....	49

Abbildung 21: GSK3 $\beta$ -Inhibitor (SB415286) reduziert die Abnahme des Claudin-1-Gehalts 24 h nach der intraplantaren Injektion von FCA in das ipsilaterale Hinterpfotengewebe. .... 51

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Verwendete Geräte.....	22
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien.....	22
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Elektrophoresegels.....	29
Tabelle 4:	Elektrophoresepuffer und Ladepuffer.....	30
Tabelle 5:	Semi-Dry-Puffer .....	31
Tabelle 6:	Coomassie-Blau und Entfärbelösung.....	32
Tabelle 7:	TBS-Tween und Blockierlösung.....	34
Tabelle 8:	Verwendete Primärantikörper.....	34
Tabelle 9:	Verwendete Sekundärantikörper.....	35
Tabelle 10:	Benutzte Antikörper für die Claudin-1-Färbung.....	38
Tabelle 11:	Software .....	39

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM15 .....	Metalloproteinase-15
AJ.....	adherens junction
ANOVA.....	analysis of variance (Varianzanalyse)
APC .....	adenomatous polyposis coli
APS.....	Ammoniumperoxodisulfat
BCA .....	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BHS .....	Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier)
BMEC.....	brain microvascular endothelial cell
BNS .....	Blut-Nerven-Schranke (blood nerve barrier)
BSA .....	bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
C1C2.....	Claudin-1-Peptidomimetikum
CCI.....	chronic constriction injury (chronische Verengungsverletzung)
cdx2 .....	caudal homeobox proteins
CIDP .....	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CIP .....	$\lambda$ -Carrageenan
CK-1 .....	casein kinase 1
CPE.....	clostridium perfringens enterotoxin
CTNNB1.....	Catenin Beta 1
DAMGO .....	(D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol)-Enkephalin
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA.....	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRG.....	dorsal root ganglion (Hinterwurzelganglion)
Dvl .....	Dishelved
EAE .....	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBA .....	evansblaugebundenes Albumin
ECL .....	extracellular loop (extrazelluläre Schleife)
EDTA.....	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ERK .....	extracellular-signal regulated kinase
FCA .....	Freund's Complete Adjuvant
FHHNC.....	familial primary hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
Fzd .....	Frizzled Rezeptor

GAPDH .....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBS .....	Guillain-Barré-Syndrom
GSK-3 .....	Glycogensynthasekinase 3
HE-Färbung .....	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hMSC.....	humane mesenchymale Stammzellen
HRP .....	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IDV .....	integrated density value (optische Dichte)
IL .....	Interleukin
INT-1 .....	Proto-Onkogen der Maus
IR .....	immunoreactivity
JAM .....	junctional adhesion molecule (Verbindungsadhäsionsmolekül)
LDL .....	low density lipoprotein
LPS .....	Lipopolysaccharid
LRP.....	low density lipoprotein receptor-related protein
MAGUK.....	membran-assoziierte Guanylatkinase
MARVEL .....	MAL [myelin and lymphocyte] and related proteins for vesicle
MF .....	myelinisierte Nervenfasern
miR .....	microRNAs
MMP.....	Matrix-Metalloproteinase
mRNA.....	Messenger-RNA
NISCH .....	neonatales Ichthyose-Sklerosierendes-Cholangitis-Syndrom
PBS .....	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR.....	polychain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF- $\beta$ .....	Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor $\beta$
PDZ.....	postsynaptic density 95/disc large/zona occludens-1
PEX.....	hemopexin
PNS.....	peripheres Nervensystem
PTT .....	Pfotendruckschwellentest
RNA.....	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rtPA.....	recombinant tissue-type plasminogen activator (rekombinanter Tissue-Plasminogen-Aktivator)
SDS.....	Sodium-Dodecyl-Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE .....	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA.....	small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)

TAMP .....	TJ-assoziiertes Marvel-Protein
TBS .....	tris buffered saline
TCF .....	T-Zellfaktor
Tcf4.....	Transkriptionsfaktor-4 bindende Elemente
TEMED .....	Tetramethylethylendiamin
TGF.....	transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TJ .....	tight junction
TJP .....	tight junction protein
TM .....	Transmembran
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TRIS.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWS119.....	4,6-disubstituiertes Pyrrolopyrimidin
UMF.....	nichtmyelinisierte Nervenfasern
5'UTR .....	5' untranslatierter Bereich
VEGF.....	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
Wnt .....	wingless and Int-1
ZNS.....	zentrales Nervensystem
ZO.....	Zonula-occludens-Protein

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Dieser Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter Frau Professor Heike Rittner sowie meiner Betreuerin Frau Dr. Solange Sauer. Vielen Dank für die nachhaltige Unterstützung und die vielen Anregungen. Ein herzlicher Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe *Molekulare Schmerzforschung*.

Nicht zuletzt danke ich besonders meiner Familie.



