

**Signaltransduktionsweg nach rtPA-Behandlung im
peripheren Nerven zur Barrierenöffnung für hydrophile
Analgetika in der Regionalanästhesie**

**Signaling pathway of rtPA for drug delivery of hydrophilic
analgesics to the peripheral nerve for nociception-specific
regional analgesia**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse 2014.
(Neurowissenschaften)

Vorgelegt von

Johanna Friederike Heitmann

aus

Würzburg

Würzburg, 2019

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r:

1. Betreuer:

2. Betreuer:

3. Betreuer:

(4. Betreuer:)

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1. Schmerz	1
1.2. Schmerzphysiologie	1
1.3. Postoperative Schmerzen und therapeutische Ansatzpunkte	1
1.4. Periphere Nervenblockade	3
1.5. Wirkungsweise von Lokalanästhetika und Opioiden	4
1.6. Anatomie der Blut-Nerven-Barriere	5
1.7. Transepithelialer Stoffaustausch	7
1.8. Tight Junction-Proteine im Perineurium	8
1.9. Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch rtPA	9
1.10. Stimulierung des LRP-1-Rezeptors	11
1.11. Intrazelluläre Signalwege	13
1.12. Vorversuche	14
1.13. Arbeitshypothesen	16
2. Material und Methoden	20
2.1. Materialien	20
2.1.1. Versuchstiere.....	20
2.1.2. Antikörper und Primer	20
2.1.3. Inhibitoren und Enzyme.....	21
2.1.4. Geräte.....	21
2.1.5. Hilfsmittel	22
2.2. Behandlung der Ratten	23
2.3. Western Blot	23
2.3.1. Nervenhomogenisierung und Separation der Membran- und Zytosolfractionen	24
2.3.2. Proteinbestimmung mittels BCA Assay	25
2.3.3. SDS-Gelelektrophorese	26
2.3.4. Proteintransfer auf die Membran.....	29
2.3.5. Coomassie-Färbung.....	30
2.3.6. Immundetektion	31
2.3.7. Densitometrie	32
2.4. RT-qPCR	32
2.4.1. RNA Isolierung für die PCR.....	34
2.4.2. cDNA.....	35
2.4.3. PCR.....	35

2.4.4. Auswertung der RT-qPCR.....	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Veränderung der Proteine nach rtPA Injektion in der frühen Phase	37
3.2. Veränderung der Proteine nach rtPA Injektion in der späten Phase	39
3.3. Veränderung von Erk nach Interaktionen mit Schlüsselpunkten des Signalweges	40
4. Diskussion	43
4.1. Allgemeines	43
4.2. Methodik.....	43
4.2.1. Messung der Proteine im Perineurium.....	43
4.2.2. Referenzproteine und Referenzgene	44
4.2.3. Vorteile und Limitationen der RT-qPCR.....	45
4.2.4. Alternative Methoden zur Detektion von Proteinen.....	49
4.3. Interaktion von rtPA mit dem LRP-1-Rezeptor und Beeinflussung der Erk- Phosphorylierung.....	50
4.4. Claudin-1 nach rtPA Applikation	51
4.5. Verschluss der Blut-Nerven-Barriere.....	57
4.6. Toxizität und Nebenwirkungen von rtPA.....	58
4.7. Alternative Therapieoptionen zur Verbesserung der perioperativen Analgesie ...	60
4.8. Ausblick und klinische Einordnung	61
5. Zusammenfassung.....	64
6. Summary.....	65
7. Quellen	66
8. Anhang.....	72
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	72
8.2. Abbildungsverzeichnis	73
8.3. Tabellenverzeichnis	74
8.4. Reagenzien.....	75
9. Eidesstattliche Erklärung.....	77
10. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11. Veröffentlichungen	80
12. Danksagung.....	81

1. Einführung

1.1. Schmerz

Schmerz ist definiert als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ (*International Association for the Study of Pain (IASP)*).

Schmerz im Allgemeinen entsteht durch die Aktivierung von Nozizeptoren, Verletzung von peripheren Nerven oder durch Schäden am zentralen Nervensystem [1, 2]. Die physiologische Funktion des akuten Schmerzes besteht darin, auf Organschädigungen oder Organdysfunktionen hinzuweisen. Im Gegensatz dazu erfüllt der chronische Schmerz keine physiologische Funktion. Chronische Schmerzen können zu Inaktivität, Anhedonie und Depressionen führen [1].

1.2. Schmerzphysiologie

Grundsätzlich werden drei Formen von peripheren afferenten Nervenfasern unterschieden: erstens die schnell leitenden, dick myelinisierten A β -, zweitens die mittel schnell leitenden, mittel dick myelinisierten A δ - und drittens die langsam leitenden, unmyelinisierten C-Nervenfasern. Postoperativer Schmerz entsteht in erster Linie infolge der mechanischen Reizung von A δ - und C-Nervenfasern. Die A δ -Fasern vermitteln den schnellen, scharfen Schmerz, die C-Fasern den langsamen, dumpfen Schmerz [3]. Beide Nervenfasern können nicht nur durch mechanische Irritation, sondern auch durch andere Substanzen wie z.B. Aminosäuren (z.B. Glutamat), Neuropeptide (z.B. Substanz P), Prostaglandine oder Capsaicin erregt werden.

1.3. Postoperative Schmerzen und therapeutische Ansatzpunkte

Nach Operationen werden durch das Operationstrauma Nozizeptoren erregt, welche dazu führen, dass Patienten an Schmerzen leiden. Insbesondere erhöhte Laktat- und erniedrigte pH-Werte in Haut und Muskeln tragen zur postoperativen

Schmerzentstehung bei [3]. Diese Schmerzen beeinträchtigen nicht nur das Wohlbefinden der Patienten, sondern führen durch Stimulierung des Sympathikus auch zu Tachykardie, Tachypnoe und erhöhtem Blutdruck. Zudem ist auch die postoperative Rehabilitation erschwert [4], was zu verlängerten Krankenhausaufenthalten und höheren Kosten für das Gesundheitssystem führt [5].

Es existieren verschiedene Methoden postoperative Schmerzen zu verhindern und zu behandeln. Präemptive d.h. bereits prä- und intraoperativ applizierte Analgetika reduzieren beispielsweise den postoperativen Analgetikaverbrauch, führen zu günstigeren postoperativen Schmerzscores und verlängern die Zeit bis zum ersten Abrufen einer Schmerzmedikation [6]. Jedoch zeigten die Studien auch zweideutige Ergebnisse: durch die systemische Applikation von Opioiden oder NMDA-Antagonisten konnte kein postoperativer Vorteil in der Schmerztherapie gezeigt werden.

Als erfolgreich sind in diesem Zusammenhang eher die regionalanästhetischen Verfahren anzusehen [7]. Die Regionalanästhesien haben einer alleinigen Allgemeinanästhesie erstens postoperativ niedrigere Schmerzscores und zweitens eine geringere Rate an anästhesieassoziierten Nebenwirkungen und Komplikationen wie Übelkeit, Erbrechen, Atemdepression, Myokardinfarkte, Pneumonien und Darmatonien voraus. Durch die Kombination mehrerer therapeutischer Verfahren wird der gesamte intra- und postoperative Opioidverbrauch weiter gesenkt [3, 4]. Zu den Regionalanästhesien zählen Spinal-, Epidural- und Plexusanästhesien wie auch die Blockade einzelner Nerven [4]. Lokalanästhetika wie auch Opioide kommen im Rahmen dieser Methoden zur postoperativen Schmerzkontrolle zum Einsatz. Kombinierte Verfahren sind z.B. die simultane Anlage einer Spinal- und einer Epiduralanästhesie mit Verwendung von Lokalanästhetika wie z.B. Bupivacain und Opioiden. Dadurch werden die Vorteile beider Verfahren genutzt. In der Spinalanästhesie profitiert man von einem schnellen Wirkungseintritt und einer motorischen Blockade und durch die Epiduralanästhesie kann man eine gute postoperative Schmerzeinstellung gewährleisten. Trotz dieser etablierten Verfahren leiden jedoch weiterhin viele Patienten an postoperativen Schmerzen [3], weshalb die aktuellen Therapien verbessert werden sollten.

1.4. Periphere Nervenblockade

Regionalanästhesien nutzen die analgetische Wirkung der peripheren Nervenblockade. Die perineurale Injektion von Lokalanästhetika verhindert im Rahmen der peripheren Nervenblockaden vorübergehend die Fortleitung von Aktionspotentialen [4]. Es existieren verschiedene Formen und Applikationstechniken: so können Spinalnervenzwurzeln am Rückenmark, Nervenplexus der Extremitäten oder auch nur einzelne periphere Nerven blockiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen kurzwirksamen einmaligen Bolusinjektionen und kathetergestützten Verfahren, die eine anhaltende Analgesie bis hin zu mehreren Tagen gewährleisten können. Die zu blockierenden Nerven werden mittels Nervenstimulatoren oder Ultraschall aufgesucht [8]. Im Rahmen der regionalanästhesiologischen Verfahren kommen vor allem langwirksame Lokalanästhetika wie beispielsweise Bupivacain oder Ropivacain zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die spannungsabhängige Natriumkanäle blockieren und so die Weiterleitung von Aktionspotentialen am peripheren Nerven hemmen. Insbesondere Bupivacain ist ein lipophiles Molekül, welches somit gut in das fettreiche, myelinisierte Nervengewebe penetrieren kann [4]. Die Lokalanästhetika blockieren die Nervenfasern allerdings nicht selektiv. Dies bedeutet, dass sowohl sensorische, nozizeptive, wie auch vegetative und motorische Nervenfasern gehemmt werden. Dies bedingt, dass beispielsweise bei rückenmarksnahen Anästhesien Sympathikolysen mit erheblichen kardiovaskulären Nebenwirkungen, eine Hemmung des Atemzentrums [9] oder Harnverhalt bzw. Inkontinenz auftreten können [10]. Problematisch ist ferner die ungewollte zusätzliche Blockade motorischer Fasern, welche die postoperative Rehabilitation erschwert und zu einer erhöhten Sturzgefahr führt [11-13]. Durch genaue Berechnung der zu applizierenden Dosis kann versucht werden nur die sensorischen und nicht die motorischen Fasern zu blockieren, da dünnere, weniger myelinisierte A δ - und C-Nervenfasern bereits bei geringeren Konzentrationen gehemmt werden als die dicker myelinisierten motorischen Fasern. Diese Methode ist allerdings sehr unzuverlässig, da eine zu hohe Dosis zu einer Blockade der motorischen Funktion und eine zu geringe Dosis zu keiner ausreichenden Analgesie führt. Zudem wird eine direkte, von der Bindung an den Natrium-Kanal unabhängige, Neurotoxizität von z.B. Bupivacain diskutiert [14-16].

Neben diesen unselektiven Inhibitoren peripherer Nerven existieren verschiedene Stoffe wie beispielsweise Opioide oder $\text{Na}_v1.7$ -Kanalblocker, die selektiv auf schmerzleitende Nervenfasern wirken. Der hydrophile Charakter dieser Opioide oder des ProToxin-II verhindert allerdings, dass die Substanzen die lipophile Blut-Nerven-Schranke überqueren können. Die perineurale Applikation beider Substanzen führt daher zu keiner vermehrten Analgesie, sodass diese Substanzen in der Infiltrationsanästhesie nicht verwendet werden können. Andere Lokalanästhetika wie z.B. das QX-314, ein Derivat des Lidocains, können in Tierversuchen durch Poren des Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1)-Kanals zu den Nerven vordringen. Dabei wird die Pore durch Co-Applikation von Capsaicin geöffnet und so eine Analgesie ohne Störung der motorischen Funktion ermöglicht [17]. Jedoch erregt Capsaicin den TRPV1-Rezeptor in sensorischen Nervenfasern und führt zu brennenden Schmerzen [18]. Ebenfalls führte die Kombinationsbehandlung von Capsaicin und QX-314 zu einer verzögerten mechanischen Hypersensitivität und Neurotoxizität und ist damit für den klinischen Alltag nicht geeignet [19].

1.5. Wirkungsweise von Lokalanästhetika und Opioiden

Lokalanästhetika wie auch Opioide entfalten ihre analgetische Wirkung durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren des peripheren und/oder des zentralen Nervensystems: Lokalanästhetika wie beispielsweise Bupivacain binden an spannungsabhängige Natriumkanäle, welche eine bedeutende Rolle in der Initiation und Fortleitung von Aktionspotentialen in Neuronen und anderen Zellen spielen. Physiologischerweise führt die Depolarisation einer Zellmembran zur Aktivierung von Natriumkanälen und dem Einstrom von Natrium ins Zellinnere. So entsteht ein Aktionspotential und der Reiz, beispielsweise Schmerzen, wird fortgeleitet. Diese spannungsabhängigen Natrium-Kanäle sind große Proteinkomplexe, die aus einer größeren α -Untereinheit und einer kleineren β -Untereinheit bestehen [20]. In der α -Untereinheit befindet sich die Pore, durch welche die Ionen in die Zelle durchtreten. Die β -Untereinheit vermittelt die spannungsabhängige Öffnung des Kanals. Hinsichtlich der spannungsabhängigen Natriumkanäle existieren neun verschiedene Isoformen der α - und 3 Isoformen der β -Untereinheiten. Die verschiedenen Isoformen werden in unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen exprimiert; so ist der $\text{Na}_v1.2$ Kanal in

unmyelinisierten Axonen nachweisbar, wogegen $\text{Na}_v1.8$ - und $\text{Na}_v1.9$ -Kanäle vor allem in sensorischen Nervenzellen der Spinalganglien vorkommen. $\text{Na}_v1.4$ - und $\text{Na}_v1.5$ -Kanäle sind in den Muskelzellen für die Initiierung der Kontraktion verantwortlich. Der wichtigste Kanal des peripheren Nervensystems (PNS) ist der $\text{Na}_v1.7$ -Kanal [21]. $\text{Na}_v1.7$ -Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Erregung sensorischer Neuronen. Loss-of-Function-Mutationen des codierenden Gens des $\text{Na}_v1.7$ -Kanals führen zu einer Reduktion des Schmerzempfindens. Dagegen führen Gain-of-Function-Mutationen zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit. Ein selektiver Inhibitor dieses Kanals, das ProToxin-II, induziert die Blockade des Aktionspotentials des Nervens und verhindert so die Signalweiterleitung [22]. Die Natrium-Kanäle können durch Lokalanästhetika wie beispielsweise Bupivacain an der Öffnung und damit der Fortleitung des Aktionspotentials gehindert werden.

Opioide sind eine heterogene Stoffgruppe, die ihre analgetische Wirkung durch Bindung an die sogenannten Opioidrezeptoren (μ -, κ -, δ -Subtypen) entfalten. Opioidrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembran-Domänen. Sie sind hauptsächlich an den präsynaptischen Endigungen der Nervenfasern lokalisiert. Ihre Aktivierung verhindert durch die Hyperpolarisation der Zelle eine Ausschüttung von Neurotransmittern und blockiert so die Erregungsförderung [23]. Insbesondere der μ -Rezeptor ist ein zentraler Ansatzpunkt in der Schmerztherapie: dieser Rezeptor ist sowohl im Gehirn, an den Spinal- und den peripheren Nerven zu finden und zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Morphin aus [24].

1.6. Anatomie der Blut-Nerven-Barriere

Epithelien und Endothelien werden durch eine Lage von Zellen gebildet, die Körperhöhlen und Oberflächen der Organsysteme auskleiden. Ihre Hauptrolle ist es, als physikalische und chemische Barriere die Körperfunktionen aufrecht zu erhalten. Die Haut dient beispielsweise als Schutz zur Umgebung, Darmepithelien zur Resorption, Sekretion und Schutz vor Toxinen und die Blut-Nerven-Barriere trägt zur Regulation der Homöostase, Ernährung und Schutz der Nervenfasern bei. Die Blut-Nerven-Barriere gehört zu den dichtesten Schranken des Körpers und dient der Regulation des Umgebungsmilieus der Nerven [25]. Sie wird aus dem Perineurium und den endoneuralen Blutgefäßen gebildet.

Periphere Nerven bestehen aus Bündeln von einer bis zehn myelinisierten oder unmyelinisierten Nervenfasern, die von Hüllstrukturen umgeben sind. Die äußerste Hüllstruktur ist das Epineurium, ein aus Kollagenfasern, elastischen Netzen, Fettzellen und Blutgefäßen bestehendes Bindegewebe. Es dient der Einbettung des Nerven in die Umgebung, zur Ernährung und dem mechanischen Schutz. Unter dem Epineurium liegt das Perineurium. Es besteht aus epithelartigen Perineuralzellen, die in konzentrischen Lagen angeordnet sind. Das Perineurium kann in die äußere Pars fibrosa und die innere Pars epitheloidea aufgeteilt werden. Die Pars fibrosa hat vor allem mechanische Funktion während die innere Pars epitheloidea die eigentliche Blut-Nerven-Barriere bildet. Die Epithelzellen der Pars epitheloidea sind durch Tight Junctions, Adhärenskontakte und Desmosomen untereinander verbunden (vgl. Abbildung 1) [26]. Palladino et al. konnten in einer Transkriptomanalyse 22 verschiedene Tight Junction-Proteine, 45 Adhärens-Proteine und 52 Junctions- oder Adaptor Proteine in der Blut-Nerven-Barriere nachweisen [27]. Es finden sich dort vor allem Claudin-1, Claudin-3, ZO-1 und Occludin [28]. Die einzelnen Zellschichten sind beidseits von Basallaminae bedeckt, deren negative Ladung als molekulares Sieb positiv geladene Moleküle an der Diffusion hindert [29]. Dieser Aufbau bildet um den Nerven eine wirksame und schützende Barriere gegenüber hydrophilen Substanzen. Studien konnten zeigen, dass Tracermoleküle wie beispielsweise Meerrettich-Peroxidase im humanen Gewebe nicht aus den endoneuralen Blutgefäßen, jedoch aus den epineuralen Blutgefäßen austreten können. Das Tracermolekül diffundiert frei durch das Epineurium, kann allerdings das Perineurium nicht durchdringen [30].

Innerhalb des Perineuriums sind die Nervenfasern in lockeres Bindegewebe eingebettet, das Endoneurium. Darin werden die peripheren Nerven von Myelinscheiden umhüllt, die von Schwannzellen gebildet werden. Die Myelinisierung dient einerseits dem Schutz des Nerven, andererseits als Isolation um die Leitungsgeschwindigkeit zu erhöhen. Die Schwannzellen wickeln sich um das Axon des Nerven und bilden so mehrere Lagen einer kompakten, membranösen Struktur. Daneben existieren allerdings auch nicht kompakte Bereiche, wie die paranodalen Regionen, Schmidt-Lantermann-Inzisuren oder das Mesaxon, an denen sich ebenfalls wie an den Perineuralzellen Tight Junction-Proteine wie beispielsweise Claudin-1 finden (vgl. Abbildung 1) [31].

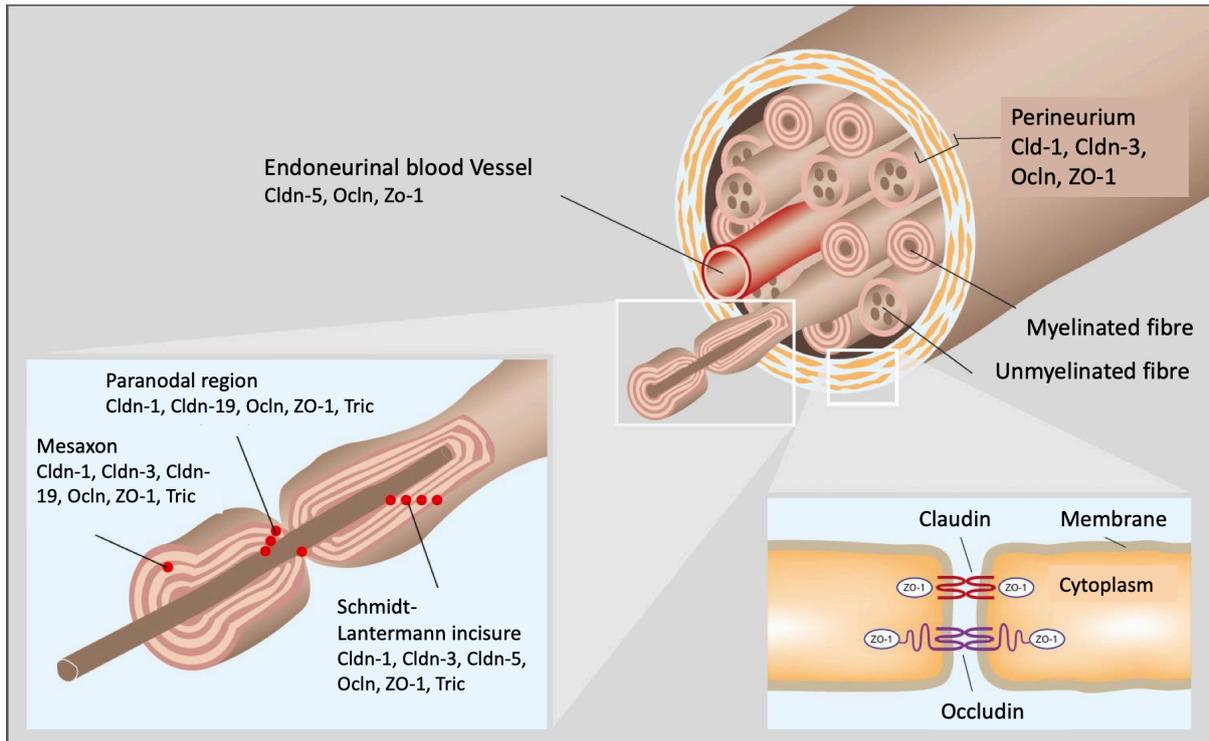


Abb. 1. Anatomie der Blut-Nerven Schranke

Die Blut-Nervenschranke besteht aus dem Perineurium und den endoneuralen Gefäßen. Das Mesaxon, Schmidt-Lantermann Inzisionen und die perinodale Region bilden die Myelinscheide. Schematische Darstellung der Hauptkomponenten und Tight Junction-Proteine. Die roten Punkte markieren Tight Junction-Proteine [32]. Abbildung modifiziert mit Erlaubnis der Autorin und verwendet mit Erlaubnis von Springer.

1.7. Transepithelialer Stoffaustausch

Die Passage von Stoffen über Epithelien und Endothelien kann entweder transzellulär oder parazellulär erfolgen (vgl. Abbildung 2). Aufgrund der Lipophilie der Zellmembranen können lipophile Stoffe ungehindert entlang eines Konzentrationsgefälles über die Barriere diffundieren, wogegen hydrophile Stoffe wie Aminosäuren, Proteine und Ionen zurückgehalten werden. Diese können aktiv mittels membranständiger Pumpen und Kanäle transportiert werden [33].

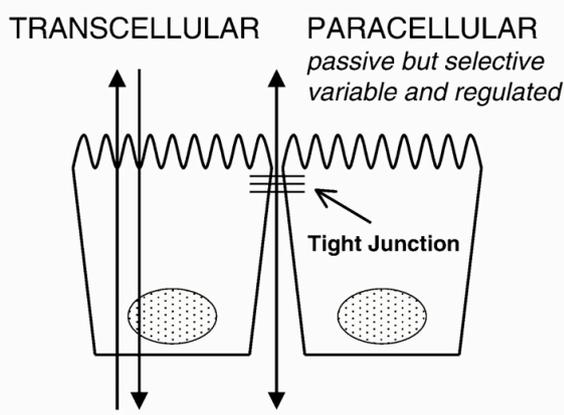


Abb. 2. Transepithelialer Stoffaustausch

Der transzelluläre Transportweg ist aktiv und passiv, in Abhängigkeit von der Aktivität und der Expression von Pumpen, Kanälen und Transportern. Der parazelluläre Transport ist ausschließlich passiv und wird durch Konzentrationsgradienten verursacht. Diese werden durch aktive transzelluläre Transportmechanismen aufrecht erhalten, Die hauptsächliche Einschränkung des parazellulären Transports erfolgt durch die Tight Junction-Proteine [34]. Eine Abbildungs-genehmigung ist gemäß der American Physiological Society nicht erforderlich.

Der parazelluläre Transport wird durch Tight Junction-Proteine reguliert. Diese formen durch die gegenseitige Interaktion ein die Zellen umspannendes Netzwerk. Dadurch werden die einzelnen Kompartimente wie durch einen Zaun voneinander getrennt. Dies verhindert, dass sich membranständige Proteine unkontrolliert zwischen apikaler und basaler Zellmembran bewegen können. Die Tight Junction-Proteine gewährleisten, dass die apikale und die basale Zellmembran unterschiedliche Proteinzusammensetzungen aufweisen und so eine Zellpolarität aufgebaut werden kann [25]. Diese Zellpolarität ist wichtig für die Zelldifferenzierung, Zellmigration und den gerichteten Transport von Molekülen über die Plasmamembran [35]. Die Tight Junction-Proteine tragen nicht nur zur Polarität der Zellen bei sondern zeigen ferner eine Ladungs- und Größenselektivität, wodurch sie den Durchtritt von Wasser, gelösten Stoffen und Immunzellen regulieren [34].

1.8. Tight Junction-Proteine im Perineurium

Im Perineurium peripherer Nerven liegen vor allem Claudin-1, -3, und-19 sowie ZO-1 und Tricellulin als Tight Junction-Proteine vor [28, 36, 37]. Claudine sind integrale Membranproteine, die in Tight Junctions von Epithelien und Endothelien vorkommen. Claudine wurden erstmals 1998 von Shoichiro Tsukita identifiziert. Der Begriff Claudine wird vom lateinischen *claudere* (schließen) abgeleitet. Momentan sind 27 Proteine bekannt, die der Familie der Claudine zugeordnet werden [38]. Studien, die die Über- oder Unterexpression von Claudinen untersuchten, zeigen die wichtige Rolle der Claudine in der Bildung von Barrieren [39, 40]. Claudine tragen allerdings nicht nur zum Verschluss, sondern auch zur Öffnung von Barrieren bei und nehmen so eine zentrale Rolle in der Steuerung der Permeabilität von Epithelien und Endothelien ein. Die variable Permeabilität von Barrieren wird durch die unterschiedliche Expression und Kombination der Claudin-Untergruppen bestimmt.

Die Regulation der Expression und Kombination von Claudinen beruht auf verschiedenen Mechanismen: So können deren Expression und Einbau in die Zellmembran durch externe Stimuli über Signalkaskaden auf translationaler Ebene, durch Endozytose, Phosphorylierung oder Palmitoylierung reguliert werden. Eine Phosphorylierung der Claudine durch intrazelluläre Kinasen führt über einen vermehrten oder verminderten Einbau in Tight Junctions zur Modulation der

Permeabilität der Barriere der Zellmembranen [41, 42]. Externe Stimuli stellen beispielsweise Proteine wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) oder Interleukine dar. Diese steigern oder inhibieren über intrazelluläre Signalkaskaden die Expression von Claudinen. So führt z.B. Interleukin-6 in Mausmodellen über den Janus-Kinase-Signalweg zu einer vermehrten Expression von Claudin-2 [43]. In dieser Doktorarbeit wird besonders der MAPK-Signalweg von Interesse sein; hierbei kann eine Aktivierung des Signalweges sowohl zu einer Hoch- wie auch einer Herabregulation der Claudine führen [44-46].

Voruntersuchungen zeigten, dass eine Aktivierung des Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1) Rezeptors durch hypertone Kochsalzlösung über eine Phosphorylierung von Erk (Extrazellular Regulated Kinase) zu einer Herabregulation von Claudin-1 in Tight Junctions des Perineuriums des Nervus ischiadicus von Wistar Ratten führt [47].

1.9. Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch rtPA

Hypertone Kochsalzlösung ist jedoch kein geeigneter Wirkstoffvermittler, da die Injektion äußerst schmerzhaft ist [48]. Dieses akute Schmerzerlebnis kann einerseits durch das veränderte perineurale Milieu [49] verursacht sein, andererseits vermuten Alessandri-Haber et al. einen Zusammenhang mit dem TRPV4-Rezeptor und der intrazellulären Src Tyrosin-Kinase [50].

Im klinischen Alltag und in Studien wurde allerdings beobachtet, dass nach systemischer Applikation von Rekombinatem Tissue Plasminogen Aktivator (rtPA), beispielsweise im Rahmen der Therapie eines Schlaganfalls, vermehrt Hirnödeme auftreten [51, 52]. Dies wird durch eine „Öffnung“ der Blut-Hirn-Schranke erklärt. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Perfusion von Rattenhirnen mit rtPA und anschließender intravenöser Infusion eines Farbstoffes (Evans Blue) dieser vermehrt ins Gewebe austrat. Bei Evans Blue handelt es sich um einen an Albumin gebundenen Farbstoff, der normalerweise die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann (vgl. Abbildung 3) [53].



Abb. 3: Schrankenstörung durch rtPA

Nach Perfusion von Rattenhirnen mit rtPA und anschließender intravenöser Infusion von Evans Blue, tritt dieses vermehrt aus [53]. Verwendet mit Erlaubnis von Mary Ann Liebert Inc.

Yepes et. al konnten in Rattenmodellen zeigen, dass diese Öffnung nicht durch die katalytische Aktivität von rtPA zu erklären ist. Dabei wurde rtPA-Ser⁴⁸¹Ala, eine rtPA Variante ohne katalytische Aktivität, injiziert. Eine einzelne Dosis dieser katalytisch inaktiven rtPA-Variante erhöhte die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [54]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Tissue Plasminogen Aktivator (tPA) bzw. rtPA eine Signalkaskade auslöst, die zum Zusammenbruch der Schranke führt. Eine Theorie ist, dass diese Signalkaskade durch ein Zusammenspiel von rtPA und der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) mit dem LRP-1-Rezeptor ausgelöst wird [55]. In Rattenmodellen konnte gezeigt werden, dass tPA die Aktivität der MMP-9 in ischämischen Hirnarealen über die Interaktion mit dem LRP-1-Rezeptor steigert [56]. Die Aktivitätssteigerung von MMP-9 führt dazu, dass Tight Junction-Proteine vermehrt degradiert werden und die Blut-Hirn-Schranke geöffnet wird [57]. Yepes et al. zeigten allerdings ebenfalls, dass rtPA auch in MMP-9 Knock-Out-Mäusen zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führen kann und die Blockierung des LRP-1-Rezeptors diese Öffnung verhindert. So ist davon auszugehen, dass rtPA über den LRP-1-Rezeptor, nicht jedoch über MMP-9, zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt. [54]

tPA ist ein 70 kDa großes Protein, welches hauptsächlich von Endothelzellen synthetisiert wird und aus 5 Domänen aufgebaut ist: einer finger-, einer epidermal growth factor-, zwei kringle- und einer proteolytischen Domäne [58]. Die proteolytische Domäne spaltet Plasminogen zu Plasmin und ist essentiell für die Hämostase. Die Hämostase ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, der übermäßige Thrombusbildung oder Blutungen verhindert. Durch die Aktivierung von Plasmin kann dieses Fibrin spalten und Thromben auflösen (vgl. Abbildung 4). Plasmin wird durch α 2-Antiplasmin und tPA von Plasminogen Aktivatoren Inhibitoren (PAI) inaktiviert.

In der Schlaganfalltherapie wird rekombinantes tPA zur Lyse der unphysiologischerweise gebildeten Thromben verwendet. Das rekombinante tPA wird durch genetische Verfahren hergestellt. Durch Mutationen von DNA-Sequenzen des

nativem tPAs wird eine längere Halbwertszeit, eine erhöhte Fibrinspezifität und eine Resistenz gegenüber PAIs im Vergleich zu tPA erreicht [58].

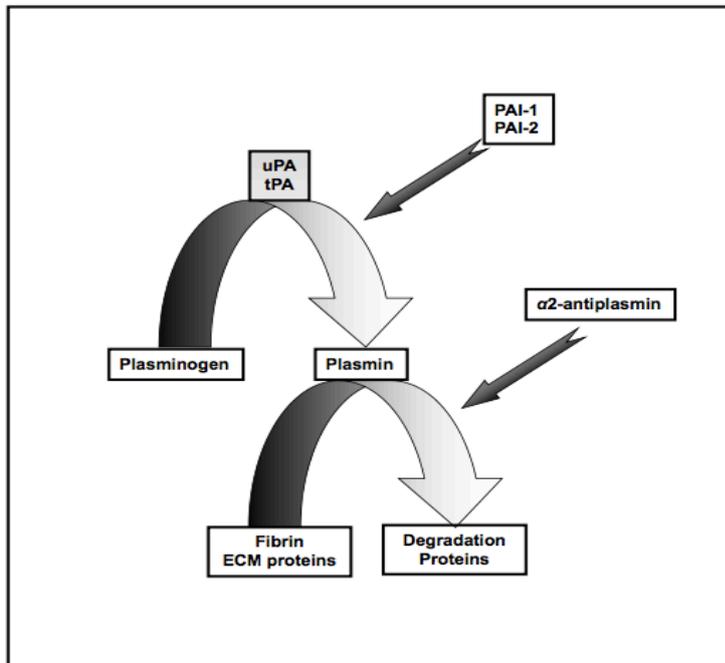


Abb. 4: Plasmin Aktivierung und Degradierung

Die Plasminogen Aktivatoren uPA und tPA katalysieren die proteolytische Umwandlung von Plasminogen in die aktive Protease Plasmin, welche Fibrin und andere extrazelluläre Matrixproteine (ECM) spaltet. Die Aktivität von uPA und tPA kann von den Plasminogen Aktivatoren Inhibitoren (PAI) und die Aktivität von Plasmin durch α 2-Antiplasmin inhibiert werden [59]. Verwendet mit Erlaubnis von Bentham Science Publishers.

1.10. Stimulierung des LRP-1-Rezeptors

Der Low density lipoprotein-receptor related Protein-1-Rezeptor (LRP-1-Rezeptor) wurde erstmals 1988 von Herz et al. beschrieben [60]. Er gehört zur Familie der Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren, zu der mehr als 11 verschiedene Zellmembranrezeptoren zählen. Diese Rezeptoren finden sich unter anderem im zentralen und peripheren Nervensystem und den darin enthaltenen Endothelzellen [61]. Sie sind beispielsweise an der Endozytose extrazellulärer Liganden, der Nervenregeneration, dem Vitamin- und Lipidmetabolismus und der Signaltransduktion beteiligt [56, 62].

LRP-1 ist mit 600 kDa ein großes Protein mit einem kleinen 85 kDa schweren C-terminalen β -Fragment, welches aus einer kurzen extrazellulären, einer membranständigen, einer intrazellulären Domäne und einer 515 kDa schweren

extrazellulären n-terminalen α -Kette besteht, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die lange extrazelluläre Kette enthält vier Bindestellen für die über 40 verschiedenen Liganden des LRP-1-Rezeptors. Zu diesen Liganden gehören unter anderem tPA, Proteinase-Inhibitoren und Receptor-Associated Protein (RAP) [63]. RAP fungiert dabei als Antagonist, der die Bindung von anderen Liganden an den Bindestellen der extrazellulären Kette nicht-kompetitiv blockiert [64, 65].

Eine Aktivierung des LRP-1-Rezeptors durch extrazelluläre Liganden führt durch eine Interaktion der intrazellulären Domäne mit zytoplasmatischen Adaptor- und Gerüstproteinen zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege [66]. So bewirkt eine Bindung von rtPA an den LRP-1-Rezeptor in Fibroblasten der Rattenniere (NRK-49F Zellen) am β -Fragment eine Phosphorylierung von Tyrosin. Diese Tyrosinaktivierung führt zu einer Mek1 Phosphorylierung und zu einem Anstieg von phosphoryliertem Erk-1/2, einem nachgeschalteten Molekül des Mitogen-activated Protein (MAP)-Kinase Signalweges. Die Phosphorylierung von Erk-1/2 führt zu einer Aktivierung des Moleküls und zu einer vermehrten Expression der MMP-9. Applikation von RAP oder PD98059 verhindert die Aktivierung von Erk-1/2 und die Expression der MMP-9 [67]. PD98059 ist ein selektiver Inhibitor des MAP-Kinase Signalweges. In MDCK-Zellen konnte nach Inhibition des MAP-Kinase Signalweges durch PD98059 ein vermehrter Einbau von Claudin-1, ZO-1 und Occludin in die Zellmembran nachgewiesen werden [68]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine Aktivierung dieses Signalweges zu einer Verminderung der Tight Junction-Proteine führt. Dies konnte in einer anderen Studie bewiesen werden. Dort führt rtPA über eine Erk-1/2-Aktivierung durch Verringerung des Tight Junction-Proteins Occludin zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke [69].

In PC12 und N2a Zelllinien (welche als Modelle für Nervenzellen dienen) wird LRP-1 durch aktives oder inaktives rtPA stimuliert und interagiert anschließend mit dem N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und Tyrosin Rezeptor Kinase- (TrK) Rezeptor. Der NMDA-Rezeptor ist ein Ionenkanal, der durch Bindung von extrazellulären Liganden aktiviert wird. Der TrK-Rezeptor wird vor allem durch Neurotropine aktiviert und dient im Nervensystem unter anderen der Differenzierung, dem Überleben und der Funktion der Neuronen. Dieser Komplex aus LRP-1, NMDA und TrK-Rezeptoren führt zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch Phosphorylierung von Erk-1/2 [70]. Diese Signalkaskade konnte beispielsweise durch RAP geblockt werden (vgl. Abbildung 5).

Co-receptors in LRP1 Signaling

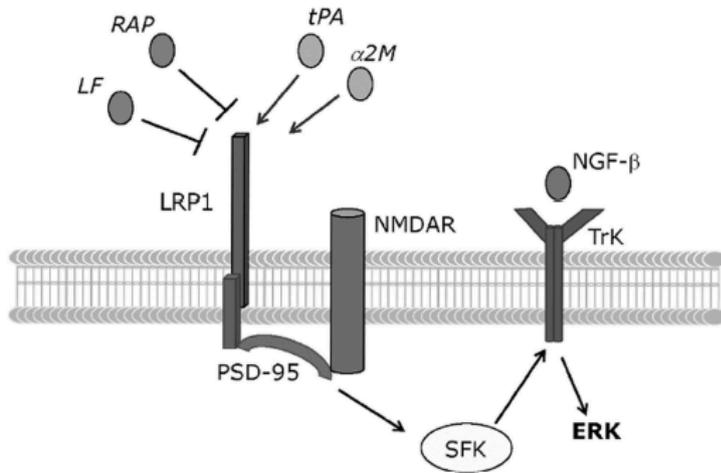


Abb. 5: Co-Rezeptoren des LRP-1-Rezeptors

Das Modell zeigt die Interaktion der LRP-1, NMDA und TrK Rezeptoren und die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade nach Bindung der LRP-1 Liganden [70]. Eine Abbildungsgenehmigung ist laut American Society for Biochemistry and Molecular Biology nicht erforderlich.

1.11. Intrazelluläre Signalwege

Auch die Untersuchungen weiterer Studien lassen den Schluss zu, dass extrazelluläres rtPA über den LRP-1-Rezeptor den MAP-Kinase Signalweg stimuliert. Der MAP-Kinase Signalweg beschreibt die kettenartige Interaktion von im Zytoplasma der Zelle lokalisierten Kinasen, die ein Signal von zellmembranständigen Rezeptoren an den Zellkern vermitteln. Zu diesen Kinasen, die auf diese Weise unter anderem die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung sowie den Zellzyklus steuern, gehört beispielsweise Erk [71]. Die vorgeschalteten Kinasen phosphorylieren die nachfolgenden und aktivieren diese dadurch. Das Signal wird so nicht nur verstärkt, sondern lässt Raum für Regulationsmechanismen und Interaktionen mit anderen Signalwegen. Anschließend wird über Transkriptionsfaktoren die Transkription bestimmter Proteine reguliert. Ist der Signalweg gestört, können entzündliche, degenerative oder maligne Erkrankungen entstehen.

Ein möglicher Transkriptionsfaktor, der das Signal von rtPA über LRP-1 und phosphoryliertem (aktivierten) Erk vermittelt, könnte Snail sein. Snail ist ein Zink-Finger Protein, welches unter anderem zur Herabregulation der Tight Junction-Proteine E-Cadherin [72] und Claudin-1 führt [73]. Snail ist dabei ein Repressor, der an die spezifischen E-Boxes der Promotoren bindet und so die Transkription verhindert. In z.B. Trophoblasten wird die Transkription von E-Cadherin durch Snail2 über die Aktivierung von Erk inhibiert [74].

Der MAP-Kinase Signalweg interagiert über Erk ebenfalls mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg. Dabei führt Erk über eine Phosphorylierung der GSK-3 (Glykogen Synthase Kinase-3) zu einer Akkumulation von β -Catenin [75]. Diese Akkumulation von β -Catenin wiederum führt zu einer vermehrten Expression des Caudal Homeobox Proteins Cdx2 [68, 76]. Cdx2 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem in entarteten Colonzellen zu einer Hochregulation von Claudin-1 und -2 führen kann [77, 78]. Dieser Effekt wird durch β -Catenin verstärkt.

1.12. Vorversuche

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass hypertone Kochsalzlösung über die MMP-9 durch Interaktion mit dem LRP-1-Rezeptor zu einer Phosphorylierung von Erk-1/2 und einem verminderten Gehalt von Claudin-1 in der Zellmembran führt. Hierbei wurde hypertone Kochsalzlösung an den peripheren Nerven appliziert und die Proteine mittels Western Blot untersucht. Ebenfalls zeigte sich Applikation von hypertoner Kochsalzlösung und DAMGO [(D-Ala²,N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol)-Enkephalin], einem synthetischen Opioid mit μ -Rezeptorspezifität, eine signifikante Erhöhung der Schmerzschwelle in dem Pfotendruckschwellentest (PTT). Der Pfotendruckschwellentest beschreibt ein Testverfahren, das 1957 von Randall und Selitto zur Messung der Schmerzschwelle bei Nagetieren entwickelt wurde [79]. Das Prinzip beruht darauf, dass mechanischer Druck auf die Hinterpfote oder seltener den Schwanz von Ratten ausgeübt wird und gemessen wird bei welcher Druckbelastung in Gramm das Tier seine Hinterpfote bzw. den Schwanz entzieht. Im Vergleich zu den Normwerten kann so nach Applikation von Substanzen wie beispielsweise Analgetika objektiviert werden, in wie weit die applizierte Substanz die Schmerzschwelle beeinflusst. Gesteigerte Druckwerte implizieren ein vermindertes Schmerzempfinden des untersuchten Versuchstiers.

Es wird angenommen, dass die Applikation von hypertoner Kochsalzlösung über die Aktivierung des LRP-1-Rezeptors und der darauffolgenden Phosphorylierung von Erk den Claudin-1 Gehalt in der Zellmembran des Perineuriums vermindert. Dies bewirkt, dass die Barrierefunktion der Blut-Nerven-Schranke durchlässig für z.B. Opiode wird und eine periphere Analgesie ohne motorische Funktionseinschränkungen induziert

werden kann [47]. Hypertone Kochsalzlösung ist allerdings für den klinischen Alltag ungeeignet, da die Injektion äußerst schmerzhaft ist.

Basierend auf der Erkenntnis, dass rtPA LRP-1 aktiviert, wurden weitere Versuche mit rtPA anstatt hypertoner Kochsalzlösung durchgeführt. Wistar Ratten wurde perineural am Nervus ischiadicus rtPA in verschiedenen Konzentrationen (10, 50 und 100 μg) injiziert. Eine Stunde später wurde an selber Lokalisation DAMGO injiziert und der Pfotendruckschwellentest durchgeführt [37].

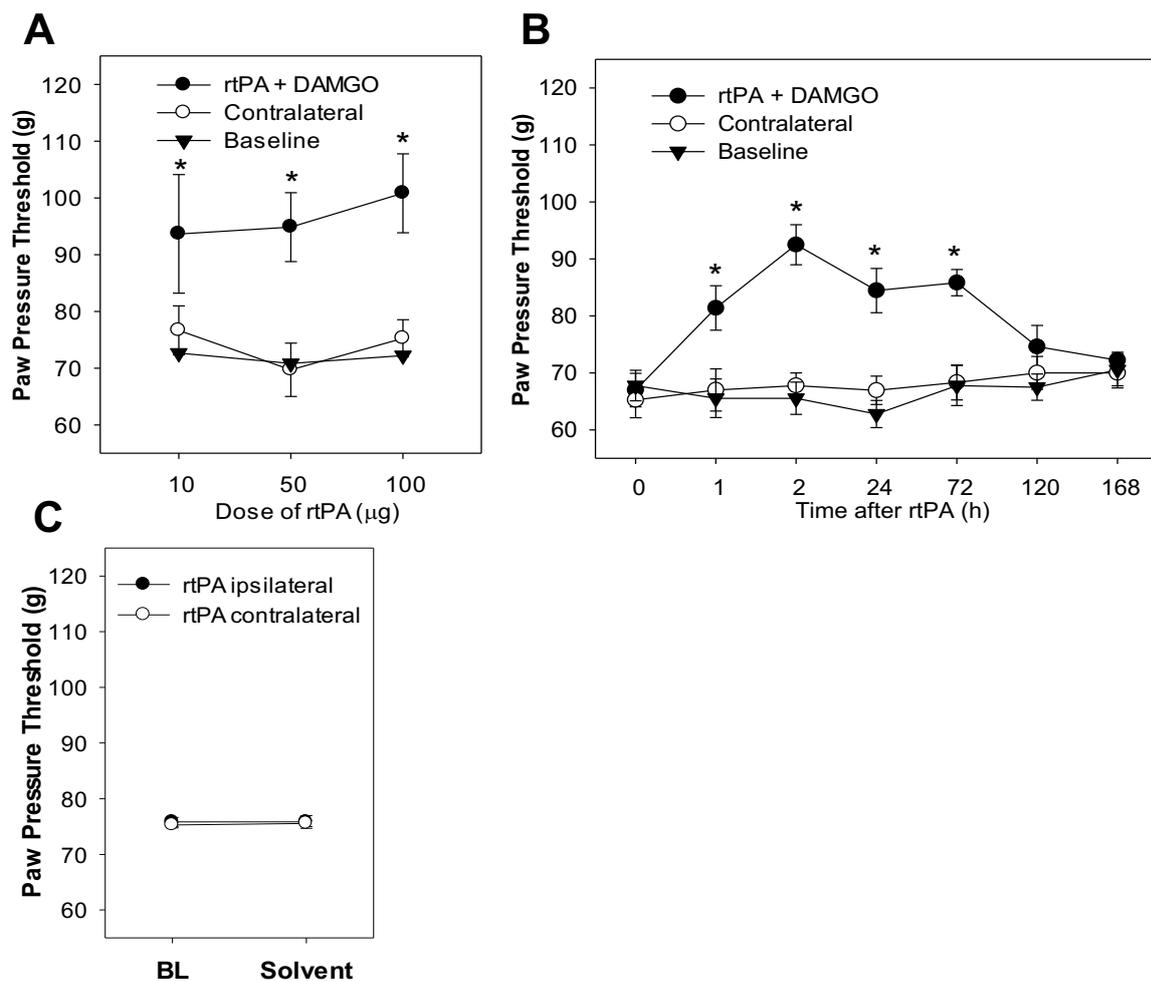


Abb. 6: RtPA öffnet funktionell die Blut-Nerven-Schranke

(A) Wistar Ratten wurden unterschiedliche Konzentrationen von rtPA (10, 50 und 100 μg) und 1 h später DAMGO perineural am Nervus ischiadicus injiziert. Der PTT wurde vor und 10 min nach der Injektion durchgeführt. (* $p < 0.05$ vs. Basalwert (BL), Two-Way ANOVA, $n = 6$).

(B) Wistar Ratten wurde perineural 10 μg rtPA injiziert gefolgt von einer zweiten Injektion mit DAMGO (30 mg, 1 bis 168 h später) (* $p < 0.05$ vs. Basalwert, Two-Way RM-ANOVA, $n = 6$).

(C) Wistar Ratten wurde rtPA und nach 2 h ein Lösemittel perineural injiziert [80].

Eine Abbildungsgenehmigung ist als Co-Autor nicht erforderlich.

Es zeigte sich eine erhöhte Schmerzschwelle nach perineuraler Injektion von rtPA und DAMGO aber nicht nach alleiniger Injektion von rtPA. (vgl. Abbildung 6 C). Es muss davon ausgegangen werden, dass rtPA ein möglicher Mediator der opioidvermittelten

Analgesie am peripheren Nerven ist. Die hierdurch induzierte analgetische Wirkung erreichte ihr Maximum 2 h nach Injektion und hatte sich nach 120 h wieder normalisiert (vgl. Abbildung 6 B). Der analgetische Effekt konnte bereits nach Injektion von 10 μg rtPA beobachtet werden; die Dosissteigerung auf 100 μg zeigte keine signifikante Erhöhung der Schmerzschwelle (Daten nicht gezeigt). Um die Öffnung der perineuralen Barriere zu visualisieren, wurden immunhistochemische Färbungen peripherer Nerven angefertigt. Ein Claudin-1-Antikörper wurde mit einem grünen Farbstoff gekoppelt, sodass Claudin-1 grün fluoreszierte. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine Verringerung von Claudin-1 im Perineurium und eine erhöhte Zellmembranpermeabilität 2 h nach Injektion von rtPA (vgl. Abbildung 7).

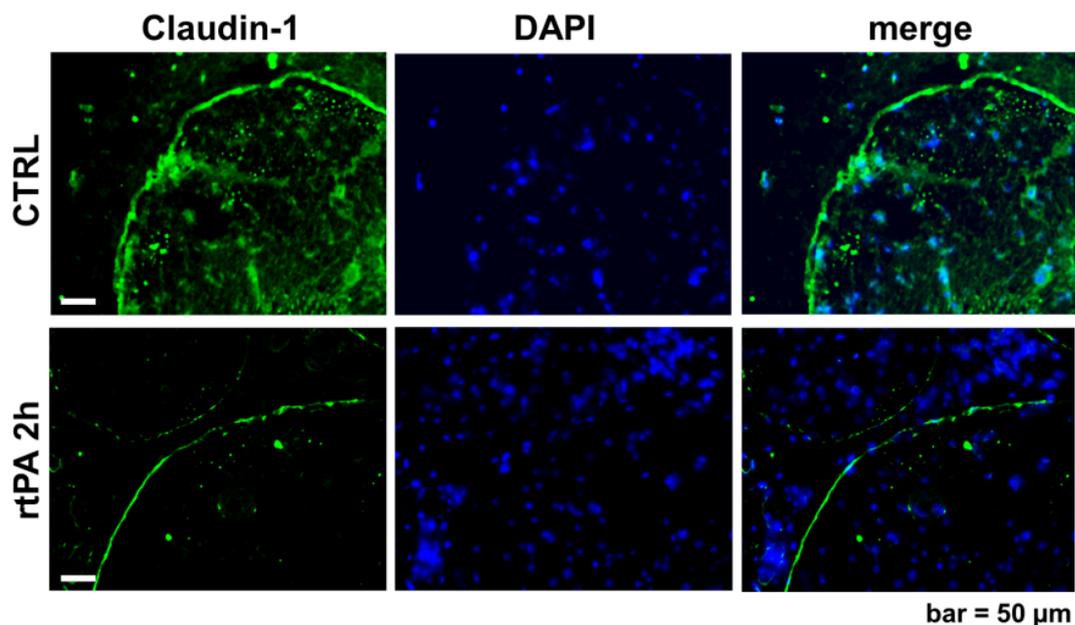


Abb. 7: RtPA reduziert Claudin-1 in der Zellmembran

Immunreaktivität von Claudin-1 [rabbit Claudin-1 Primärantikörper und goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 Sekundärantikörper (von Life Technologies), grün] und Färbung der Zellkerne (DAPI, blau) des Perineuriums unter Kontrollbedingungen und 2 h nach der perineuralen Injektion von 10 μg rtPA. Man sieht eine Verminderung von Claudin-1 im Perineurium und eine erhöhte Permeabilität [80]. Eine Abbildungsgenehmigung ist als Co-Autor nicht erforderlich.

1.13. Arbeitshypothesen

Trotz herausragender Fortschritte in der Schmerztherapie sind regional- und allgemeinanästhesiologische Verfahren nach wie vor mit einem beträchtlichen Spektrum an unerwünschten Wirkungen und Komplikationen verbunden. Die fehlende Selektivität von Lokalanästhetika auf sensorische Nervenfasern bedingt deren kardiovaskuläres Risikoprofil sowie die ungewollte passagere Lähmung motorischer

Nerven. Bislang existieren keine in vivo wirksamen Medikamente, die selektiv und ausschließlich die Schmerzrezeptoren blockieren. Es sind zwar selektiv wirksame Substanzen bekannt, doch gelangen diese bislang nicht über die Blut-Nerven-Schranke. Diese Arbeit untersucht und beschreibt Grundlagen für die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Öffnung der perineuralen Barriere für die oben beschriebenen selektiv wirksamen Analgetika. RtPA gilt als möglicher Wirkstoffvermittler der opioidvermittelten Analgesie am peripheren Nerven, sodass die molekularen Mechanismen nach Applikation von rtPA von besonderem Interesse sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, aufbauend auf den Vorversuchen von Dr. Judith Bosten und Dr. Alexander Boecker, die intrazellulären Mechanismen nach Applikation von rtPA an peripheren Nerven zu untersuchen. Annahme ist, dass rtPA in einer frühen Phase ca. 2 h nach Applikation über eine Bindung an den LRP-1-Rezeptor zu einer vermehrten Phosphorylierung von Erk und somit über eine Repression der Transkription durch Snail zu einer verminderten Claudin-1 Expression führt (vgl. Abbildung 8). GSK-3 vermittelt die Ubiquitinierung und damit den Abbau von β -Catenin.

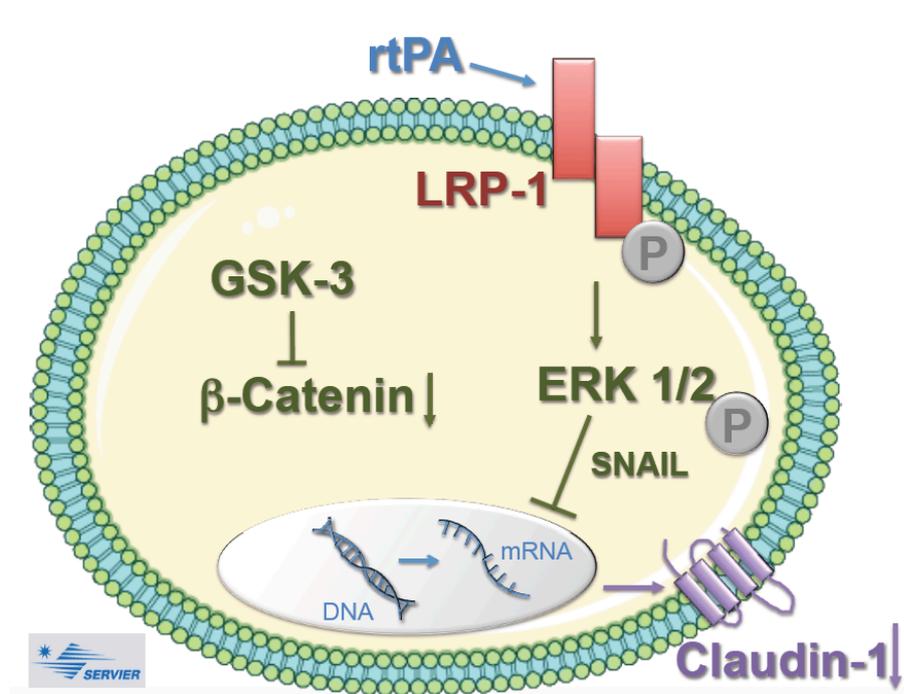


Abb. 8: Signalweg in der frühen Phase

Hypothetischer Signalweg nach Bindung von rtPA an den LRP-1-Rezeptor, frühe Phase. Erstellt mit Hilfe von smart Servier medical art.

Im Gegenzug wird in einer zweiten, späteren Phase ca. 24 h nach Applikation von rtPA über die Interaktion von Erk mit GSK-3 und der darauffolgenden Akkumulation von β -Catenin und Cdx2 die Expression von Claudin-1 wieder hochreguliert (vgl. Abbildung 9).

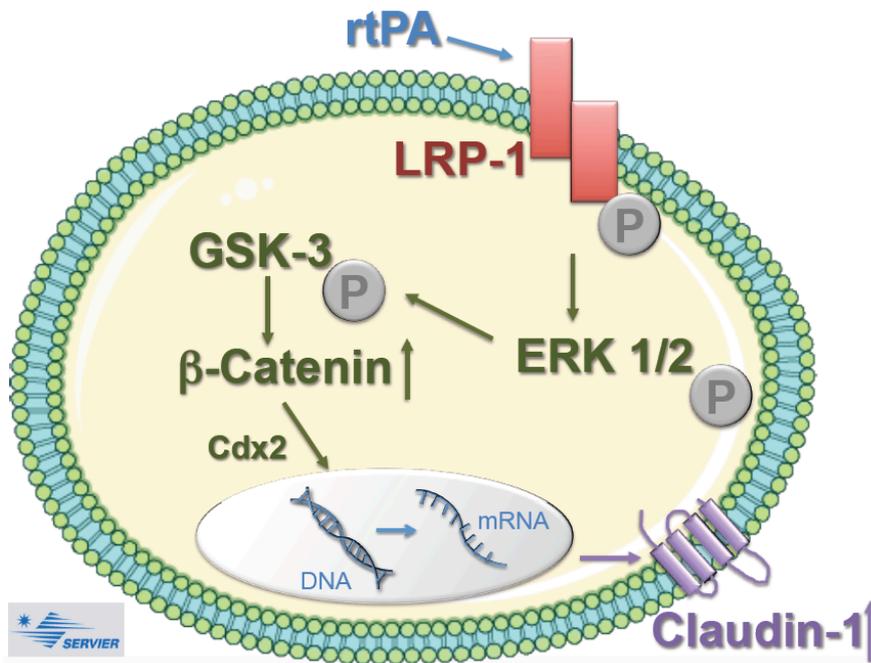


Abb. 9: Signalweg in der späten Phase

Hypothetischer Signalweg nach Bindung von rtPA an den LRP-1-Rezeptor, späte Phase.
Erstellt mit Hilfe von smart Servier medical art.

Durch die Herabregulation von Claudin-1 in der frühen Phase wird die Blut-Nerven Barriere geöffnet und hydrophile Stoffe, wie beispielsweise Opiate, können an den Nerven dringen. In einer späten Phase wird die Barrierefunktion wiederhergestellt und der Nerv ist wieder vor externen Stoffen geschützt.

Um die Abfolge des Signalweges genauer zu untersuchen, werden bestimmte Schlüsselpunkte des Signalweges inhibiert bzw. moduliert (vgl. Abbildung 10). Dabei wird RAP, ein nicht-kompetitiver Antagonist des LRP-1-Rezeptors, vor rtPA appliziert um zu untersuchen, ob durch die Inhibition des Rezeptors die nachgeschaltete Signalkaskade nicht ausgelöst wird. So kann bestätigt werden, ob die Phosphorylierung von Erk und die Herabregulation von Claudin-1 durch rtPA abhängig von der Aktivierung des LRP-1-Rezeptors sind. Um zu verifizieren, dass die Phosphorylierung von Erk für die Herabregulation von Claudin-1 nötig ist, wird PD98059, ein Inhibitor der Erk-Phosphorylierung, mit rtPA gemeinsam appliziert.

Auch wird untersucht, ob die perineurale Applikation von rtPAi die gleiche Signalkaskade wie rtPA auslösen kann. RtPAi ist katalytisch inaktives rtPA mit jedoch den gleichen Bindungsstellen und sollte somit auch an den LRP-1-Rezeptor binden können. Dadurch wird untersucht, ob die katalytische Aktivität von rtPA zur Stimulierung des LRP-1-Rezeptors notwendig ist oder ob das nebenwirkungsärmere rtPAi eine Alternative darstellen kann.

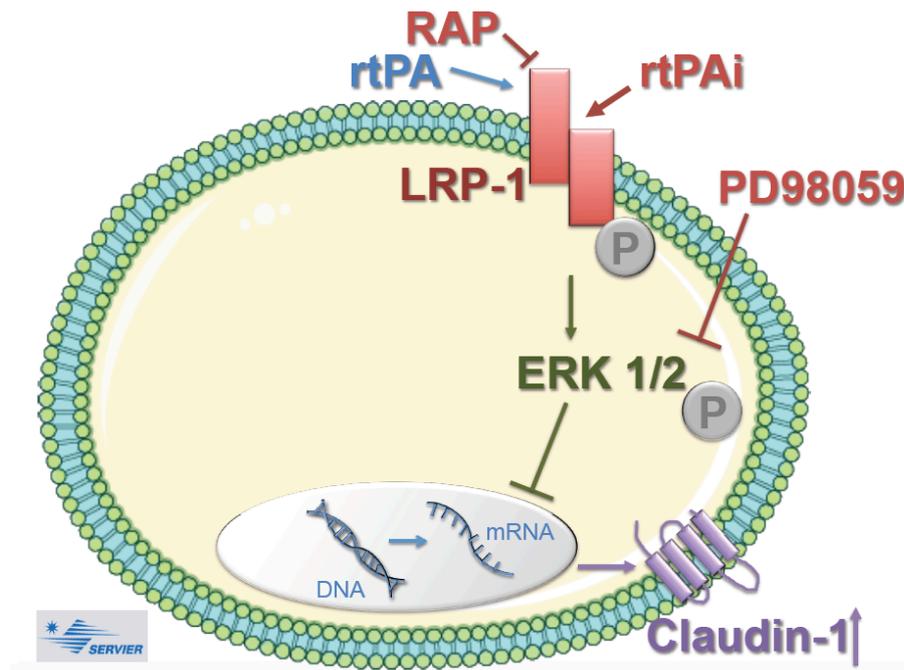


Abb. 10: Interaktion mit dem Signalweg

Blockierung durch RAP, Inhibition von Erk durch PD98059 und Aktivierung durch rtPAi des Signalweges.

Erstellt mit Hilfe von smart Servier medical art.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Versuchstiere

Sämtliche dieser Doktorarbeit zugrundeliegenden Tierversuche wurden von der Regierung Unterfranken nach §8 Abs. 1 TierSchG genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2531.01-3/13). Die Behandlung der Tiere, die Nervenentnahme sowie die Verhaltenstests wurden von Dr. Judith Bosten und Shaobing Yang durchgeführt. Männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 170 und 220 g dienten als Versuchstiere. Die Haltung der Ratten erfolgte in einem 12-h-Tag-12-h-Nacht-Rhythmus bei Raumtemperaturen von 20 - 25°C im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Zinklesweg 10 in 97090 Würzburg. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter. Sie stammten von Janvier S.A.S., 4105-Le Genest-St-Isle, Frankreich. Die perineurale Injektion der Medikamente erfolgte unter kurzer Isofluran-Narkose.

2.1.2. Antikörper und Primer

Primärantikörper		
Antikörper und Primer	Hersteller:	Verdünnung
β-Aktin-HRP anti-Maus Antikörper	Sigma #A5441	1:10.000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) anti-Kaninchen Antikörper	Cell Signaling #9101	1:400
P44/42 MAPK (Erk1/2) anti-Kaninchen Antikörper	Cell Signaling #9102	1:1.000
Claudin-1 anti-Kaninchen Antikörper	Invitrogen #51-9000	1:1.000
β-Catenin anti-Kaninchen Antikörper	abcam ab6302	1:4.000
Phospho-GSK-3α/β (Ser21/9) anti-Kaninchen Antikörper	Cell Signaling #9331	1:1.000
GSK-3β (27C10) anti-Kaninchen Antikörper	Cell Signaling #9315	1:1.000
Cdx2 (H-43) anti-Kaninchen Antikörper	Santa Cruz Biotech sc-134468#	1:100
SLUG (H-140) anti-Kaninchen Antikörper	Santa Cruz Biotech sc-15391	1:100

Tabelle 1: Antikörper und Primer

Die Primärantikörper wurden in 5% Magermilch in TBS-TWEEN verdünnt.

Sekundärantikörper:

- Anti-Kaninchen IgG HRP-linked Antikörper von Cell Signaling #7074S; Verdünnung 1:3.000 in 2,5% Blockierlösung mit 2,5% BSA in TBS-T

Primer:

- Claudin-1 Primer von MWG Eurofins, Ebersberg, Germany
- 18s-rRNA Primer von MWG Eurofins, Ebersberg, Germany

2.1.3. Inhibitoren und Enzyme

Inhibitoren und Enzyme		
Bezeichnung:	Hersteller:	Katalognummer
rtPA	Abcam	Ab62763
inactive rtPA (rtPAi)	Molecular innovations	HTPA-ALA
RAP receptor associated protein	Fitzgerald	30R-AR008
PD 98059 (pErk Inhibitor)	Cellsignaling	#9900
Complete ultra Tablets mini	Roche	05892970001

Tabelle 2: Inhibitoren und Enzyme

2.1.4. Geräte

Geräte I	
Bezeichnung:	Hersteller:
7300 Real Time PCR System	AppliedBiochem
Accu-jet pro Pipettierhelfer	Brand
Blotkammer Fast Blot B44	Biometra
Chemilumineszenzdetektor FluorChem FC2	Alpha Innotech
Dri Block DB2A	Techne
Folienschweißgerät Vacupak plus	Krupps
Heracell 150i Inkubator	Thermo Scientific
Microcentrifuge MC6400	Biospec
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise	Tecan

Tabelle 3: Geräte I

Geräte II	
Bezeichnung:	Hersteller:
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Gelkammer	BioRad
NanoDrop 2000 spectrophotometer	peqlab
Nervenstimulator Stimuplex HNS12	B. Braun Whatman peqlab
Power Supply Peq Power E300	Sony
Printer UP-D897	Marienfeld
Taumler	Applied Biosystems
Thermal cycler 2720	Quiagen
Tissuelyser 85220	Bachmann
Ultrazentrifuge Avanti J-30I	Eppendorf
Varipette 4720	Labinco
Vortexer L46	Eppendorf
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge 5418R	

Tabelle 4: Geräte II

2.1.5. Hilfsmittel

Die Hilfsmittel für die Gele sind von BioRad:

- Casting stand
- Casting frame
- Keile zum Aufbrechen der Gele („Gel releaser“)

Weitere Hilfsmittel:

- Stainless stealbeads (Stahlkugel) von Quiagen #69989; 200 Stück
- Mikrowellplatten mit 96 Wells von Thermo scientific
- Schere
- Stoppuhr
- Lineal
- Blotting-Papier (550g/m², #GB40 von Hartenstein)
- Blottingmembran (Whatman Protran BA83 von GE Healthcare: 0,2µm-Nitrocellulose-Membran #NC02 von Hartenstein)
- Kunststoffschalen
- Plastikfolie zum Einschweißen (Roth #H508.1)

2.2. Behandlung der Ratten

Die Wistar Ratten wurden mittels Isofluran in eine Kurznarkose versetzt und die Nn. ischiadici unter Zuhilfenahme eines Nervenstimulators (Stimuplex HNS12; B. Braun) ähnlich wie bei Patienten aufgesucht. Von der Dorsalseite des Beines und distal des Os ischii aus wurde eine 22 G-Nadel durch die Haut und die oberflächlichen Faszien eingestochen. Zur Nervenlokalisation wurden wiederholt über einen an die Nadel angeschlossenen Nervenstimulator elektrische Impulse mit einer Stärke von 0,4 mA appliziert. Eine impulssynchrone Plantarflexion der Rattenpfote signalisierte die Nähe der Nadel zum Zielnerven. Durch Reduzierung der Impulsstärke auf 0,2 mA wurde zur Feinjustierung der Nadelposition der Punkt bestimmt, an dem der größte Bewegungsaus Schlag zu verzeichnen war. An dieser Stelle wurde dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechend rtPA, rtPAi, PD 98059 und/oder RAP injiziert. Das gesamte Injektionsvolumen betrug dabei stets 300 µl. Im Falle der zweizeitigen Injektion von DAMO wurde das Injektionsvolumen auf 150 µl reduziert um wieder ein Gesamtvolumen von 300 µl zu erreichen. Nach Verstreichen der festgelegten Zeitpunkte wurden die Ratten gemäß dem Tierschutzprotokoll in tiefer Isoflurannarkose durch intrakardiale Injektion von 300 µl T61 (Embutramid, Mebezonium und Tetracain) getötet. Anschließend wurden die Nn. ischiadici entnommen und bei -80°C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Aufbereitung eingefroren. Jedes Reaktionsgefäß wurde mit jeweils zwei Nerven bestückt.

2.3. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, die 1979 im Labor von Robert Nowinski im Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle von W. Neal Burnette entwickelt wurde und dazu verwendet wird, Proteine in verschiedenen Geweben oder Flüssigkeiten nachzuweisen. Das Funktionsprinzip beruht auf unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten verschiedener Proteine in der Gelelektrophorese. Die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten hängen von Größe, Ladung und weiteren proteinspezifischen Eigenschaften ab. Durch Verwendung einer Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird durch das SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass diese nur ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt

werden können (vgl. Abschnitt 2.3.3) [81]. Die aufgetrennten Proteine werden in einem zweiten Schritt auf eine Membran transferiert und durch Bindung von Antikörpern visuell dargestellt. Dabei bindet der Primärantikörper das nachzuweisende Protein und ein weiterer Sekundärantikörper diesen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist enzymgekoppelt und kann in einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Folglich können erstens spezifische Proteine visualisiert und zweitens Proteinmengen semiquantitativ im Verhältnis zueinander betrachtet werden.

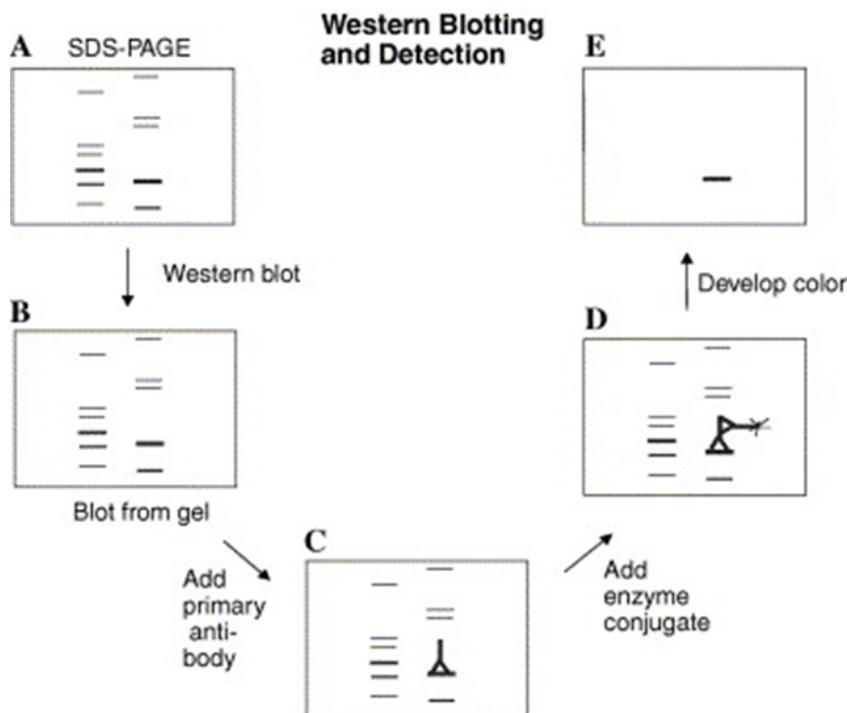


Abb. 11. Western Blot

Schematische Darstellung eines Western Blots. (A) Ungefärbtes SDS-PAGE Gel vor dem Western Blot. Die gezeigten Banden sind hypothetisch. (B) Die Membran nach dem Transfer der Banden aus dem Gel. (C) Der Primärantikörper bindet an das spezifische Protein. (D) Ein Sekundärantikörper, der an ein Enzym konjugiert ist, bindet den Primärantikörper. (E) Fluoreszenzentwicklung der spezifischen Bande [82]. Verwendet mit Erlaubnis von Elsevier.

2.3.1. Nervenhomogenisierung und Separation der Membran- und Zytosolfractionen

In das zwei Nerven fassende Reaktionsgefäße wurden pro behandelten Nerv 250µl eiskalter EP-Puffer sowie ein Proteaseinhibitor (Complete) hinzugefügt und die eingefrorenen Proben auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden nach Beigabe einer Stahlkugel der Firma Quiagen für 3 min im Quiagen Tissuelyser bei einer Frequenz von 30/s lysiert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren der Proben bei 4°C in der Zentrifuge 5418R für 10 min bei 4500 x g. Der Überstand wurde in neue, sterile Reaktionsgefäße überführt. Der Rückstand mitsamt der Stahlkugel wurde verworfen.

Der gewonnene Überstand wurde anschließend 30 min in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 40.000 x g zentrifugiert. Es erfolgte das erneute Abpipettieren und Überführen des Überstands in ein steriles Reaktionsgefäß. Der Bodensatz wurde mit 50 µl RIPA (vgl. Tabelle 6) mit dem Proteaseinhibitor Complete resuspendiert und auf Eis gestellt.

Die Gefäße mit dem Überstand enthielten den Zytosolanteil des aufbereiteten Nervens und die Gefäße mit dem Bodensatz (Sediment) die Membranbestandteile. Die Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben wurde bestimmt und die Proben anschließend bei -20°C bis zur Verwendung für den Western Blot eingefroren.

EP-Puffer	
Chemikalie	Konzentration
NaCl	120 mM
HEPES pH 7,6	25 mM
EDTA	2 mM
NaF	25 mM
Triton X	1 %

RIPA-Puffer	
Chemikalie	Konzentration
HEPES pH 7,6	25 mM
EDTA	2 mM
NaF	25 mM
SDS	1 %

Tabelle 5 und 6: EP- und RIPA-Puffer

2.3.2. Proteinbestimmung mittels BCA Assay

Der Bicinchoninic Acid (BCA) Assay wurde 1985 das erste Mal von Smith et al. beschrieben. Ein Assay (deutsch: Test, Probe) ist ein in der Labormedizin verwendetes Testverfahren zum Nachweis bestimmter Substanzen. Der BCA Assay beruht auf der Reaktion von Cu^{2+} zu Cu^+ unter alkalischen Bedingungen. Dieses einfach positive Cu-Ion reagiert mit BCA zu einem violetten Komplex dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt.

Da die Menge des produzierten Cu^+ von der Ausgangskonzentration an Proteinen in der Probe und der Inkubationszeit abhängt, kann die Proteinkonzentration der Probe photometrisch im Vergleich zu Gemischen mit bekannter Proteinkonzentration, einer sogenannten Standardreihe, bestimmt werden [83, 84].

Ziel dieser Proteinquantifizierung ist es, in der Gelelektrophorese gleiche Mengen an Proteinen je Probe aufzutragen. Damit kann eine Aussage über die quantitativen Proteinmengen der einzelnen Proben im Vergleich zueinander getroffen werden.

Protokoll:

Eine Standardreihe wurde aus dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach folgendem Schema angefertigt.

	Volumen RIPA (μl)	Volumen BCA (μl)	BSA-Konzentration ($\mu\text{l/ml}$)
A	125	375 der Stammlösung	1500
B	325	325 der Stammlösung	1000
C	175	175 aus A	750
D	325	325 aus B	500
E	325	325 aus D	250
F	325	325 aus E	125
G	400	100 aus F	25
H	400	0	0=BLANK

Tab. 7: Pipettierschema der Standardreihe

Jeweils 10 μl der Zytosol- und Sediment-Proben wurden mit 90 μl RIPA ohne Complete 1:10 verdünnt. Ein „Working Reagent“ wird aus Reagenz A und Reagenz B aus dem Pierce BCA Protein Assay Kit im Verhältnis 50:1 hergestellt. Jeweils 25 μl der Standardreihe oder der Probe wurden in ein Loch einer Loch-Platte gefüllt. Pro Probe wurden jeweils drei Löcher befüllt; in jedes Loch erfolgte ferner die Zugabe von 200 μl der Reagenz A:B-Mischung. Die Lochplatte wurde 30 min im Inkubator gewärmt und anschließend die Proteinkonzentration bei 562 nm unter Zuhilfenahme des Programm Magellan bestimmt. Mit Hilfe der Standardlösung von bovinem Serumalbumin (BSA) wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Lysate im Photometer ermittelt wurde.

2.3.3. SDS-Gelelektrophorese

In der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine gemäß ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld aufgetrennt. SDS stellt ein anionisches Tensid dar, das an Proteine bindet und deren Eigenladung überdeckt. Ein Gramm Protein bindet hierbei ca. 1.4 Gramm SDS. In der Folge weisen alle Proteine eine negative Ladung auf, was zu einer gegenseitigen Abstoßung der Proteine führt. Zusätzlich werden die Proben unter Zugabe von β -Mercaptoethanol auf 95°C erhitzt, wodurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen werden. Diese beiden Prozesse führen dazu, dass die Proteine gemäß

ihrer Molekülmasse in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können und lineare Banden bilden können. Dazu werden gleiche Proteinkonzentrationen in die Taschen des Gels aufgetragen und eine elektrische Spannung zwischen 50 V und 150 V angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern nun in Richtung Anode zuerst durch ein Sammelgel in dem die Proteine konzentriert werden und anschließend durch ein Trenngel. Das Trenngel wirkt wie ein Sieb, in dem die kleinen Proteine schneller durch die Maschen wandern können als die Großen, sodass die Proteine mit kleiner Molekularmasse weiter durch das Gel wandern als die mit größerer Molekülmasse. Anhand eines mit aufgetragenen Größenmarkers kann an der Höhe der Banden die Größe der Proteine abgeschätzt werden.

3 M Tris pH 8,8	
Chemikalie	Menge für 1 L
Tris	363,42 g
H ₂ O	auf 700 ml auffüllen
HCl 25 %	pH einstellen auf 8,8
H ₂ O	auf 1 L auffüllen

0,5 M Tris pH 6,8	
Chemikalie	Menge für 1 L
Tris	60,57 g
H ₂ O	auf 700 ml auffüllen
HCl 25 %	pH einstellen auf 6,8
H ₂ O	auf 1 L auffüllen

Tab. 8 und 9: Zusammensetzung von 3 und 0,5 M Tris

10 % APS	
Chemikalie	Menge für 50 ml
APS	5 g
H ₂ O	Auf 50 ml auffüllen

20 % SDS	
Chemikalie	Menge für 50 ml
SDS	10 g
H ₂ O	Auf 50 ml auffüllen

Tab. 10 und 11: Zusammensetzung 10 % APS und 20 % SDS

Protokoll:

Sammel- und Trenngel wurden entsprechend den Angaben in Tabellen 12-15 mit Hilfe der Reagenzien aus Tabelle 8 und 9 selbst hergestellt. Die Formen für die Gele waren von BioRad und bestanden aus einem Casting stand in den die Casting frames mit Glasplatten eingesetzt wurden. Zuerst wurde das Trenn- und anschließend das Sammelgel in die Hohlräume zwischen den Glasplatten gegossen. Eingesetzte 10-zackige Kämmen bildeten die Hohlräume für die Geltaschen. Nach dem Trocknen wurden die Gele in eine mit SDS-Laufpuffer (Tabelle 12) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt.

Die Proben wurden aufgetaut und gemäß eines Pipettierschemas, das anhand der BCA-Proteinkonzentrationsmessung erstellt wurde, mit vier μl Laemmli und RIPA-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Geltaschen so befüllt, dass jede Tasche mit 25 μg Protein in einem Gesamtvolumen von 20 μl beladen wurde. Die Proben wurden anschließend fünf min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Es erfolgte das Befüllen der Geltaschen mit 20 μl Probe oder vier μl Proteinmarker V. Um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren wurde zunächst eine Spannung von 50 V für 30 min angelegt; anschließend liefen die Proteine für eine Stunde bei 150 V durch das Trenngel.

Acrylamid-Trenngel 10 %	
Chemikalie	Menge für 1-2 Gele
H ₂ O	4 ml
3 M Tris	2,5 ml
SDS 20 %	100 μl
Acrylamid	3,33 ml
APS	100 μl
TEMED	6 μl

Acrylamid-Trenngel 12 %	
Chemikalie	Menge für 1-2 Gele
H ₂ O	3,35 ml
3 M Tris	2,5 ml
SDS 20 %	100 μl
Acrylamid	4 ml
APS	100 μl
TEMED	6 μl

Tabellen 12 und 13: Zusammensetzung der Acrylamid-Trenngele mit 10 und 12 % Acrylamid

Acrylamid-Sammelgel	
Chemikalie	Menge für 1-2 Gele
H ₂ O	2,85 ml
0,5 M Tris	1,25 ml
SDS 20 %	50 μl
Acrylamid	850 μl
APS	50 μl
TEMED	5 μl

5 x Laemmli	
Chemikalie	Menge für 50 ml
Tris	25 ml
SDS 2 %	1 g
Glycerol	5 ml
β -Mercaptoethanol	0,5 ml
EGTA	0,038 g
PMSF	0,087 g
Bromphenolblau	0,1 g

Tabellen 14 und 15: Zusammensetzung des Acrylamid-Sammelgels und von Lämmli

SDS-Laufpuffer, 10 x	
Chemikalie	Menge für 2 L
Tris	60,4 g
Glycin	376 g
SDS 1 %	20 g
H ₂ O	auf 2 L auffüllen

SDS-Laufpuffer, 1 x	
Chemikalie	Menge für 2 L
SDS-Laufpuffer 10 x	200 ml
H ₂ O	auf 2 L auffüllen

Tab. 16 und 17: Zusammensetzung der SDS-Laufpuffer

2.3.4. Proteintransfer auf die Membran

Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Blottingapparatur nach dem Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auch hierbei wurde eine elektrische Spannung angelegt, sodass die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel auf die Membran wanderten.

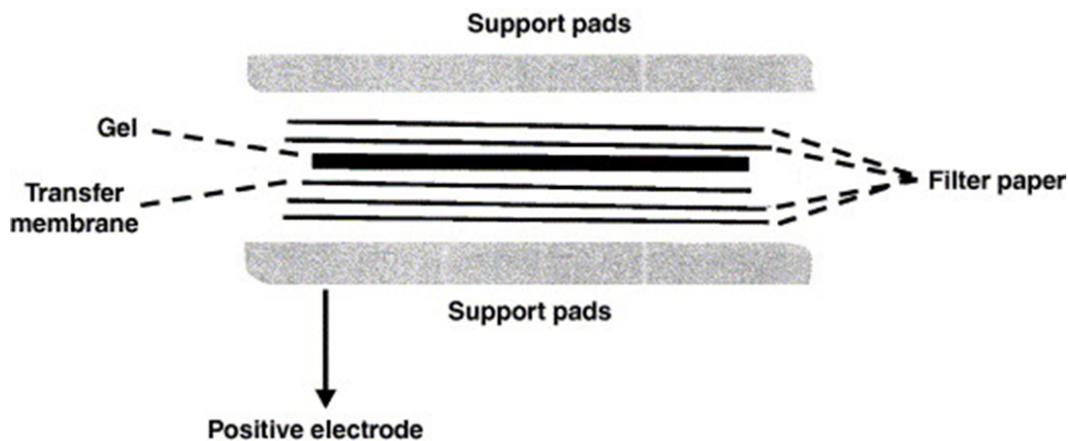


Abb. 12. Aufbau des Blots

Die Transfermembran und das Gel werden zwischen Filterpapieren und der Blottingapparatur eingeklemmt. Dabei liegt die Membran unter dem Gel in Richtung Anode [82]. Verwendet mit Erlaubnis von Elsevier.

Für den Proteintransfer wurden Gel und Nitrozellulosemembran in einem Transferpuffer (vgl. Tabelle 18) getränkt und wie ein Sandwich zwischen Filterpapieren und der Blottingapparatur eingeklemmt. Anschließend wurde eine Spannung von 15 V für 90 min angelegt. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls erfolgte die Entnahme der Membranen und Gele, welche daraufhin für die Immunodetektion beziehungsweise Coomassiefärbung vorbereitet wurden.

Semi-Dry Transferpuffer	
Chemikalie	Menge für 2 L
Tris	6,06 g
Glycin	28,82 g
Methanol	400 ml
H ₂ O	auf 2 L auffüllen

Tab. 18: Zusammensetzung des Semi-Dry Transferpuffers

TBS 0,05 % Tween (TBS-T) 10 x	
Chemikalie	Menge für 4 L
Tris	48,45 g
NaCl	350,64 g
H ₂ O	auf 3 L auffüllen
HCl	pH einstellen auf 7,6
H ₂ O	auf 4 L auffüllen
Tween 20	20 ml in 250 ml Puffer lösen

TBS-T 1 x	
Chemikalie	Menge für 2 L
TBS-T 10 x	200 ml
H ₂ O	auf 2 L auffüllen

Tab. 19 und 20: Zusammensetzung von TBS-T Waschlösung

2.3.5. Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung können Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt diese unspezifisch. Die Coomassie-Färbung erlaubt eine erste Aussage über den Erfolg der Gelelektrophorese und den Proteingehalt der Proben. Im Rahmen unserer Versuchsreihen wurden die Polyacrylamid-Gele zunächst für 10 min in die Coomassie-Lösung (vgl. Tabelle 21) gegeben und anschließend für 20 min mit einer Entfärberlösung (vgl. Tabelle 22) behandelt. Die Gele wurden über Nacht in Aqua gelagert und am nächsten Tag in einem Imager fotografiert.

Coomassie (0,5 L)	
Chemikalie	Menge
Serva-Blau G 250	1,25 g
Isopropanol	227 ml
H ₂ O Essigsäure	227 ml
	46 ml

Entfärber Lösung	
Chemikalie	Konzentration
Essigsäure	10 %
Methanol	30 %
H ₂ O	60 %

Tab. 21 und 22: Zusammensetzung von Coomassie- und Entfärber Lösung

2.3.6. Immundetektion

Die vorangegangenen Arbeitsschritte beschreiben wie die Proteine durch den Blot auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden. Das angewandte Verfahren der Immundetektion ermöglicht das Sichtbarmachen der Proteine mithilfe spezifischer Antikörper. Die auf der Membran verbliebenen Bindungsstellen für Proteine werden mit Hilfe einer proteinhaltigen Blockierlösung blockiert, somit wird gewährleistet, dass die Antikörper nicht unspezifisch an der Membran binden [85]. Nachdem die Membran mit dem Primärantikörper beschichtet ist, spült man die nicht gebundenen Antikörper von der Membran ab und inkubiert die Membran mit dem Sekundärantikörper. Dieser bindet den Fc-Teil der Antigen-Antikörper-Komplexe. Der Sekundärantikörper ist an Horseradish Peroxidase (HRP) gebunden, einem Enzym, das den Chemilumineszenz-Farbstoff Luminol oxidiert und so sichtbar macht. Die Intensität dieser Fluoreszenz kann mithilfe des Imagers quantifiziert werden, sodass Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Proben gemessen werden können.

Protokoll:

Die der Blottingapparatur entnommenen Membranen wurden für eine Stunde mit der Blockierlösung (vgl. Tabelle 23) beschichtet und anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper wurden dabei gemäß den Angaben unter Punkt 2.1.3. mit 5% Magermilch in TBS-T verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T (vgl. Tabelle 20) gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:3000 in TBS-T 2,5 % Magermilch mit 2,5 % BSA (vgl. Tabelle 24) verdünnt und die Membran für eine Stunde damit inkubiert. Abschließend erneutes Waschen der Membran drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T.

TBS-T mit 5 % Magermilch (Blockierlösung)	
Chemikalie	Menge für 200 ml
TBS-T	200 ml
Magermilch	10 g

2,5 % Blockierlösung mit 2,5 % BSA	
Chemikalie	Menge für 30 ml
Blockierlösung	15 ml
BSA	0,75 g
TBS-T 1 x	auf 30 ml auffüllen

Tab. 23 und 24: Zusammensetzung von Blockier Lösung und Blockier Lösung mit 2,5 % BSA

Im nächsten Schritt wurden die verbesserten (engl.: enhanced) Chemilumineszenz (ECL) Lösungen I und II im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und die Membranen damit benetzt. Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper oxidierten das in den Lösungen enthaltene Luminol. Dadurch leuchteten die mit Antikörper beschichteten Proteinbanden auf der Membran und konnten mithilfe des Programms FluorChem 2 System des Herstellers Alpha Innotech fotografiert werden. Das Signal war umso stärker, desto mehr Antigene auf der Membran vorhanden waren und von Antikörpern gebunden wurden.

Damit semiquantitative Vergleiche des Konzentrationsverlaufs der Proteine nach Behandlung gezogen werden konnten, war es notwendig die Veränderung von Proteinen zu messen, die ausreichend in den Proben enthalten waren und deren Konzentration durch die Behandlung nicht beeinflusst wurde. Diese Proteine werden auch Housekeeping Proteine genannt. In unseren Versuchsreihen diente das Protein β -Aktin als Ladekontrolle. Daher wurden die Membranen nach der Detektion der gesuchten Proteine nochmals mit einem β -Aktin Antikörper inkubiert, der direkt mit HRP gekoppelt ist, und auch dessen Lumineszenz im Imager quantifiziert.

2.3.7. Densitometrie

Die Densitometrie dient der semiquantitativen Analyse der Western Blots. Der Imager misst mit einer Kamera die Farbdichte (Integrated Density Value, IDV) der aufleuchtenden Banden, die mit der Proteinkonzentration in der Probe korreliert. Die IDVs der einzelnen Proteine wurden mit den entsprechenden IDVs der phosphorylierten Form des jeweiligen Proteins bzw. der Ladekontrolle zu den untersuchten Zeitpunkten ins Verhältnis gesetzt.

2.4. RT-qPCR

Die quantitative Reverse Transcriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) beschreibt eine Vervielfältigungsmethode für RNA, die Veränderungen in der Expression bestimmter Proteine quantifizieren kann. Für das Untersuchungsverfahren muss die mRNA des zu untersuchenden Proteins in einem ersten Schritt durch reverse Transkription in complementary DNA (cDNA) transkribiert werden um in einem zweiten Schritt mittels eines PCR-Verfahrens vervielfältigt werden zu können. Dabei

wurde im Rahmen unserer Versuchsreihe die cDNA in einem Thermocycler zuerst auf 95°C erhitzt, sodass diese denaturierte. In der Folge lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen, sodass sich die Primer im zweiten Arbeitsschritt, dem sogenannten Primer-Annealing, besser an die DNA anlagern konnten. Dafür wurde eine Temperatur von 57°C benötigt, da die Primer bei dieser Temperatur optimal an ihre spezifischen Nukleotide binden können. In der folgenden Elongationsphase verlängerte die DNA-Polymerase den Einzelstrang korrespondierend zu den Basen des Führungsstranges.

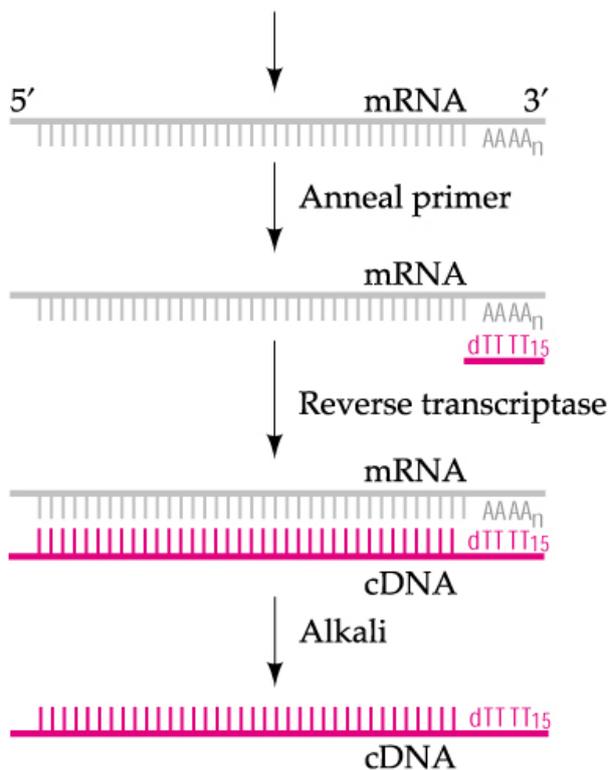


Abb. 13: Methode zu Herstellung von cDNA

Das Enzym Reverse Transkriptase transkribiert einen zur mRNA komplementären DNA-Strang [86]. Verwendet mit Erlaubnis von Oxford University Press.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green lagert sich in die neu gebildeten DNA-Doppelstränge ein und ermöglicht so die Quantifizierung des Proteins, da die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte ist. Um Messfehler durch Variationen in der Ausgangsmenge der mRNA des zu untersuchenden Proteins zu verhindern ist es sinnvoll diese Zielprotein mit einer endogenen Kontrolle (Referenzgen) zu korrelieren [87]. Dieses Referenzen sollte erstens ubiquitär und zweitens in einer konstanten Konzentration in dem verwendeten Gewebe vorkommen. In unseren Versuchen wurde 18S rRNA (18 Svedberg ribosomal RNA) als Referenzgen verwendet.

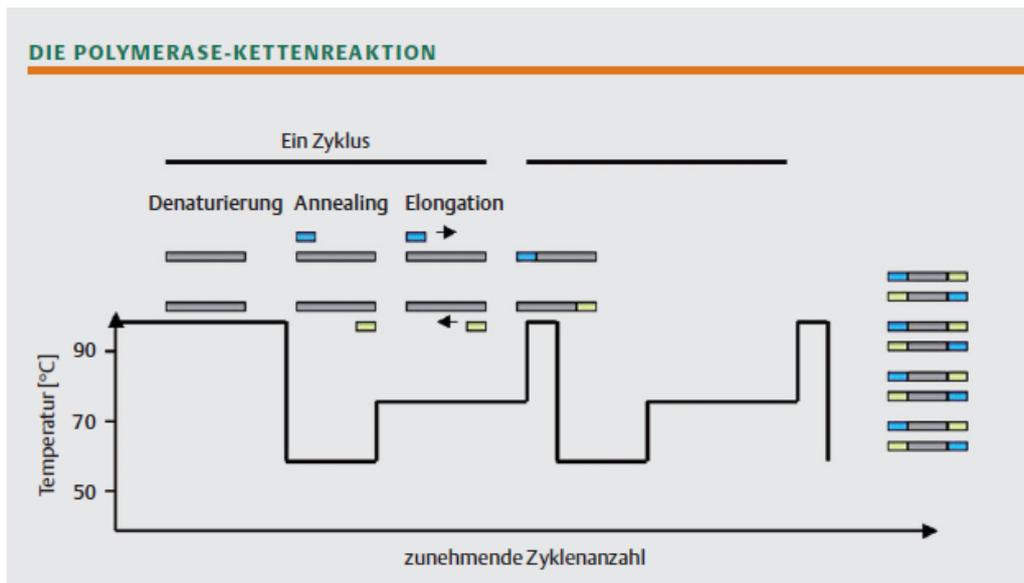


Abb. 14. Typisches Temperaturprofil einer PCR-Reaktion

Drei Schritte: Denaturierung, Annealing, Elongation. Die Primer sind blau bzw. gelb dargestellt. Nach 30 bis 40 Zyklen sind viele tausende Kopien entstanden [87]. Verwendet mit Erlaubnis von John Wiley and Sons.

2.4.1. RNA Isolierung für die PCR

Alle benutzten Werkzeuge und Arbeitsflächen wurden vor Beginn und während der gesamten Bearbeitung mit RNase Zap gereinigt um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Dies galt auch für die Herstellung der cDNA und der PCR.

Die behandelten Nerven wurden auf Eis gelegt und 1 ml Trizol und eine Stahlkugel Quiagen hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Lyse der Gewebeproben im Quiagen Tissuelyser für vier min bei einer Frequenz von 20/s. Nachdem die Proben sechs min auf Eis ruhten wurden diese nach Zugabe von 200 µl Chloroform (100 %) für 15 Sekunden durchmischt. Anschließend folgte eine erneute fünfminütige Ruhephase auf Eis und die folgende Zentrifugation der Proben für 15 min bei 4°C in der Biofuge Fresco bei 13.000 min⁻¹ (= 16.060 x g). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues, steriles, mit 500 µl Isopropanol (100%) gefülltes Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt. Nach anschließendem Durchmischen wurden die Proben über Nacht bei -20°C eingefroren, sodass die RNA ausfallen konnte. Die Proben wurden am nächsten Tag auf Eis aufgetaut und bei 4°C in der Biofuge Fresco für zehn min bei 12.000 min⁻¹ (=13.684 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml Ethanol (75%) zugegeben und die Probe anschließend erneut resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation der Probe bei 4°C in der Biofuge Fresco (5 min, 7.500 min⁻¹ (= 5.345 x g) und Abgießen des Überstandes wurde der Bodensatz bei 37°C im Thermomixer Compact der Firma

Eppendorf für ca. zehn min getrocknet und danach mit 45 µl RNA storage solution resuspendiert. Die Lösung wurde erneut für zehn min bei 57°C im Thermomixer compact bei 1400 min⁻¹ geschüttelt. Mithilfe des Spectrophotometers wurde die RNA-Konzentration in den Proben bestimmt. Für den kurzfristigen Gebrauch wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Für die längerfristige Konservierung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.4.2. cDNA

Die cDNA wurde mithilfe des cDNA Synthese High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems hergestellt. Zuerst erfolgte die Herstellung des Mastermixes (MM). Dieser bestand aus 2 µl 10x RT Puffer, 0,8 µl 25x dNTP mix (100mM), 2 µl RT Random Primer, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl multiscribe Reverse transcriptase. Insgesamt ergab dies pro Probe 6,8 µl MM. Im nächsten Schritt wurden jeweils 6,8 µl MM, 1 µg der RNA-Probe und je nach Konzentration der Probe nukleasefreies Wasser in ein steriles Reagenzgefäß pipettiert, sodass das Gesamtvolumen in jedem Gefäß hiernach 20 µl betrug. Zudem wurde eine Lösung ohne die RNA-Probe und eine Lösung ohne reverse Transkriptase als Kontaminationskontrollen erstellt. Nachdem die Proben gevortext und in der Mikrozentrifuge zentrifugiert wurden, startete die reverse Transkription in dem Thermal Cycler. Die hergestellte cDNA wurde entweder sofort weiter mittels PCR amplifiziert oder sofort zur späteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.4.3. PCR

Die cDNA Proben wurden um den Faktor 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die Mastermixe wurden vorbereitet und in die Löcher der Well-Platte gefüllt. Dabei enthielt jedes Loch 12,5 µl SYBR Green Mix, jeweils 1,75 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers sowie 4 µl nukleasefreies Wasser. Als Primer wurden Claudin-1 als zu untersuchendes Protein und 18S rRNA als Referenzgen benutzt.

In einer 96 Well-Platte wurden jeweils sechs Löcher mit 5 µl cDNA derselben Probe befüllt. Dazu wurden dreimal 20 µl MM von Claudin-1 bzw. 18S rRNA mit Hilfe der Varipette pipettiert, sodass jedes Proben-MM-Gemisch dreifach vorhanden war. Die Platte wurde in der Zentrifuge 5415C kurz zentrifugiert und in die Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System eingesetzt. Hiernach wurde die Annealingtemperatur bei 57°C eingestellt und die PCR gestartet.

2.4.4. Auswertung der RT-qPCR

Die Proben wurden mittels des Verfahren der relativen Quantifizierung analysiert. Dabei wurde die cDNA-Menge der verschiedenen untersuchten Zeitpunkte mit der cDNA-Ausgangsmenge zum Zeitpunkt Null verglichen.

Als Ausgangswert für die Berechnungen diente der CT-Wert (Cycle Threshold). Dies ist der Punkt der Standardkurve, an dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser Wert ist umso kleiner desto mehr cDNA in den Proben zum Beginn der PCR vorliegt. Dies ist darin begründet, dass mehr Kopien in den Polymerisierungszyklen hergestellt werden können und somit früher Fluoreszenzsignale entstehen. Die CT-Werte von Ziel- und Referenzgen werden voneinander subtrahiert um eine annähernd gleiche Effizienz der PCR zu belegen.

$$\Delta Ct = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}}$$

Anschließend wurden die unterschiedlichen ΔCt -Werte der verschiedenen Zeitpunkte voneinander abgezogen.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ treated} - \Delta CT \text{ untreated}$$

Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln wurde dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt [88]. Dies erlaubt es einen Wert zu ermitteln, der beschreibt wie sich die Ausgangsmenge an cDNA in der behandelten und in der unbehandelten Gruppe verhält.

3. Ergebnisse

In den Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die perineurale Injektion von rtPA zu einer Abnahme von Claudin-1 in der Zellmembran des Perineuriums und damit zu einer Öffnung der perineuralen Barriere führt. Die Erkenntnisse beruhen auf den Ergebnissen von Verhaltenstests und Immunfluoreszenzfärbungen. In den Verhaltenstest zeigten die Tiere nach perineuraler Injektion von rtPA und DAMGO eine signifikant erhöhte Schmerzschwelle im Pfortendrucktest, welche nach alleiniger rtPA-Injektion nicht beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 6). Da DAMGO physiologischerweise die perineurale Barriere nicht übertreten kann, ist anzunehmen, dass dieser Effekt durch rtPA vermittelt wird. Diese Wirkung wird vermutlich durch Interaktion mit dem LRP-1-Rezeptor und den darauffolgenden intrazellulären Signalwegen verursacht. Um diesen Zusammenhang zu belegen wurden in dieser Arbeit Phosphorylierungen der Proteine Erk und GSK-3, der Gehalt von Snail, β -Catenin und Cdx2, sowie die Expression von Claudin-1 nach Applikation von rtPA, rtPAi und den Inhibitoren des Signalweges RAP und PD 98059 gemessen.

3.1. Veränderung der Proteine nach rtPA Injektion in der frühen Phase

Der oben genannten Arbeitshypothese folgend wird durch Aktivierung des LRP-1-Rezeptors durch rtPA in der frühen Phase eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen. Vermutet wird, dass durch die Aktivierung des LRP-1-Rezeptors Erk phosphoryliert wird, welches wiederum über eine Interaktion mit Snail die Claudin-1 Transkription inhibiert. Daher wurden in dieser Arbeit nach perineuraler Injektion von rtPA erstens der Gehalt von Erk und phosphoryliertem Erk (pErk) im Zytoplasma bestimmt und zweitens die beiden Proteinkonzentrationen zueinander in Relation gesetzt. Beobachtet wurde der Gehalt vor sowie 1, 2, 8, 24, 48, 72 und 120 h nach der perineuralen Applikation von rtPA. Dabei zeigte sich verglichen mit dem Ausgangswert nach 1 und 2 h eine signifikant verstärkte Phosphorylierung von Erk im Verhältnis zu Erk (vgl. Abbildung 15 A). Bereits nach 8 h war der pErk/Erk Quotient wieder abgefallen und stieg im Verlauf nicht mehr signifikant an.

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten konnte in Trophoblasten erstens eine verstärkte Snail Expression nach Erk Phosphorylierung sowie zweitens eine Herabregulation von Tight Junction-Proteinen durch Snail nachgewiesen werden [74]. Snail fungiert dabei als Repressor, der die Transkription von beispielsweise Claudin-1 verhindert [73]. In dieser Arbeit wurde daher der Gehalt von Snail vor, 8 und 24 h nach rtPA Applikation untersucht. Allerdings konnte das Protein im Perineurium im Gegensatz zum Leberkontrollgewebe nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und scheint daher in der Signalkaskade im Perineurium keine Rolle zu spielen.

Snail scheint also nicht der Vermittler zwischen pErk und der Claudin-1 Transkription zu sein. Die Ergebnisse der Verhaltenstests sowie der immunhistochemischen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die perineurale Barriere nach rtPA Injektion durch einen verminderten Claudin-1 Gehalt in der Zellmembran geöffnet wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Claudin-1 Gehalt mittels Western Blot untersucht. In der Membranfraktion der aufbereiteten Nerven wurde die Veränderung von Claudin-1 nach Applikation von rtPA bestimmt. 24 h nach Applikation von rtPA zeigte sich ein signifikanter Abfall des Claudin-1 Gehalts im Vergleich zum unbehandelten Nerven. Dieser Abfall war bereits nach 48 h wieder auf den Ausgangswert angestiegen (vgl. Abbildung 15 B). Um zu zeigen, dass dieser Abfall mit einer verminderten Expression von Claudin-1 im Zellkern zusammenhängt, wurde die Claudin-1 mRNA mittels PCR quantifiziert. Dabei wurde der Gehalt der Claudin-1 mRNA vor rtPA Applikation und 2, 8, 72 und 120 h nach Applikation von rtPA gemessen. Die Expression sank 2 und 8 h nach Applikation von rtPA im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ab (vgl. Abbildung 15 C). Die Expression stieg nach 72 und 120 h wieder nahezu auf den Ausgangswert an.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass in der frühen Phase bis 24 h nach Applikation von rtPA eine Öffnung der perineuralen Barriere durch einen verminderten Gehalt an Claudin-1 vermittelt wird. Der verminderte Gehalt an Claudin-1 scheint durch die Phosphorylierung von Erk verursacht zu werden. Um diesen Zusammenhang weiter zu überprüfen wurden Untersuchungen mit PD98095, einem Inhibitor der Erk Phosphorylierung, durchgeführt (vgl. Abschnitte 3.3.).

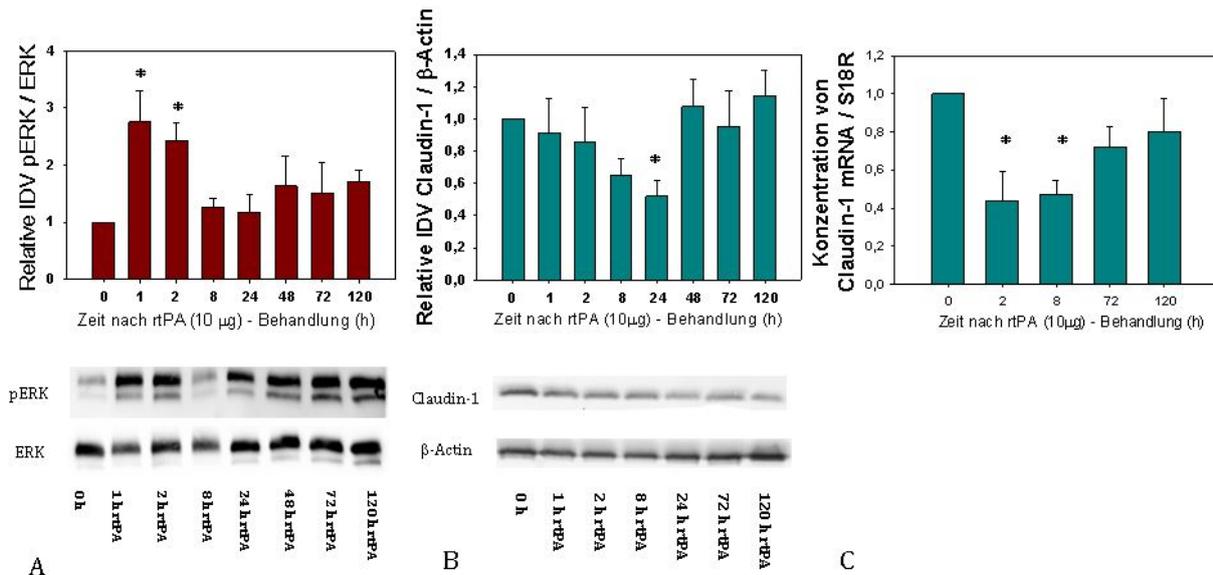


Abb. 15: rtPA führt zu einer vermehrten Phosphorylierung von Erk und einer Reduktion von Claudin-1

(A) Erk und phosphoryliertes Erk (pErk) wurden nach Injektion von rtPA zu verschiedenen Zeitpunkten in der Zytosolfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und quantifiziert (* $p=0,002$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

(B) Der Claudin-1 Gehalt nach Injektion von rtPA zu verschiedenen Zeitpunkten in der Membranfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten wurde mittels Western Blot analysiert. Der Gehalt wurde im Verhältnis zu β -Aktin (relative integrated density, IDV) quantifiziert (* $p=0,001$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

(C) Die Claudin-1 mRNA Expression im N. ischiadicus von Wistar Ratten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach perineuraler Injektion von rtPA im Verhältnis zu 18S rRNA analysiert (* $p = 0,013$ vs. rtPA 0 h, ONE WAY ANOVA, $n=6$).

3.2. Veränderung der Proteine nach rtPA Injektion in der späten Phase

Laut der Arbeitshypothese wird ca. 24 h nach Applikation von rtPA durch eine Phosphorylierung von GSK und die darauffolgende Zunahme der β -Catenin Konzentration im Zytoplasma die Barriere wiederhergestellt. Gemäß der Hypothese phosphoryliert das aktivierte Erk GSK. Infolge dieser Phosphorylierung wird β -Catenin nicht ubiquitiniert und nicht abgebaut, sodass es im Zytoplasma akkumuliert. β -Catenin fungiert dann als Mediator der Cdx2 vermittelten Claudin-1 Expression im Zellkern.

Um diesen Signalweg zu verifizieren wurden die Konzentrationen von GSK und phosphoryliertem GSK (pGSK) vor der Applikation von rtPA und zu den Zeitpunkten 8, 24, 48 und 72 h bestimmt. Es konnte jedoch keine signifikante Zunahme von pGSK im Verhältnis zu GSK zu den untersuchten Zeitpunkten festgestellt werden (vgl. 16 A). Daher scheint GSK nicht an der Signalweiterleitung beteiligt zu sein.

Dennoch wurde der Gehalt von β -Catenin in der Zytosolfraktion des Perineuriums zu späteren Zeitpunkten (72 und 120 h) mittels Western Blot bestimmt und mit dem

Ausgangswert vor der Applikation von rtPA verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des β -Catenin Gehalts im Verhältnis zu β -Aktin zu den untersuchten Zeitpunkten verglichen mit dem Ausgangswert vor rtPA Applikation (vgl. Abbildung 16 B).

Vermutet wird, dass β -Catenin eine Zunahme des Cdx2- Gehalts im Zytoplasma bewirkt und Cdx2 als Promotor zur Steigerung der Claudin-1 Expression fungiert. Daher wurde Cdx2 vor Applikation von rtPA und 120 h nach Applikation bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Gehalts von Cdx2 im Verhältnis zu β -Aktin im Vergleich zum Ausgangswert (vgl. Abbildung 16 C).

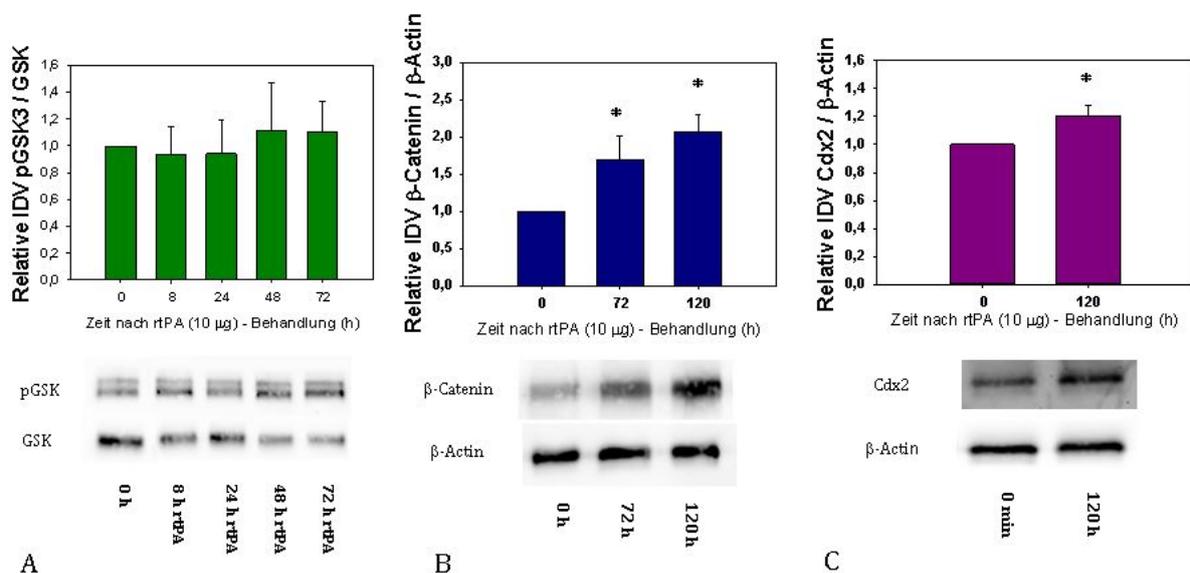


Abb. 16: rtPA führt nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung von GSK, aber zu einem späten Anstieg von β -Catenin und Cdx2

(A) GSK und phosphoryliertes GSK (pGSK) wurden nach Injektion von rtPA zu verschiedenen Zeitpunkten in der Zytosolfraction des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und quantifiziert ($p > 0.05$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

(B) β -Catenin wurde vor, 72 und 120 h nach Injektion von rtPA in der Zytosolfraction des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und im Verhältnis zu β -Aktin quantifiziert (* $p=0,001$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

(C) Cdx2 vor und 120 h nach Injektion von rtPA im Zytosol des N. Ischiadicus von Wistar Ratten wurde mittels Western Blot analysiert und im Verhältnis zu β -Aktin quantifiziert (* $p=0,01$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

3.3. Veränderung von Erk nach Interaktionen mit Schlüsselpunkten des Signalweges

Durch Interaktionen mit Schlüsselpunkten des Signalweges kann überprüft werden, ob diese tatsächlich eine Rolle in der Signalkaskade nach rtPA Applikation spielen. So wird in einem ersten Schritt untersucht, ob eine Blockade des LRP-1-Rezeptors die rtPA

vermittelte Erk-Phosphorylierung verhindern kann. In einem zweiten Schritt wird überprüft ob die katalytische Funktion von rtPA nötig ist um den LRP-1-Rezeptor zu aktivieren. Zuletzt wird durch Applikation eines Inhibitors der Erk-Phosphorylierung untersucht, ob die Herabregulation von Claudin-1 mit der vermehrten Erk-Phosphorylierung zusammenhängt.

Receptor-associated Protein (RAP) ist ein Antagonist des LRP-1-Rezeptors, der dessen Aktivierung verhindert. Er wurde dazu benutzt, den Zusammenhang der Erk-Phosphorylierung mit der Aktivierung des LRP-1-Rezeptors durch rtPA zu zeigen. Dafür wurde zuerst RAP und anschließend rtPA perineural injiziert. Es wurde der pErk/Erk-Quotient vor Applikation und jeweils 2 und 8 h nach RAP und rtPA sowie rtPA ohne RAP bestimmt. Dabei stieg die Phosphorylierung von Erk 2 h nach rtPA im Vergleich zum Ausgangswert signifikant an, blieb jedoch bei vorhergehender RAP -Applikation nach 2 sowie 8 h konstant auf dem Niveau des Ausgangswertes (vgl. Abbildung 17 B). 8 h nach alleiniger rtPA Applikation zeigte sich ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Phosphorylierung.

RtPAi ist katalytisch inaktives rtPA, welches jedoch die gleiche Bindungsstelle für den LRP-1-Rezeptor wie rtPA aufweist. Es wurde untersucht, ob die Effekte von rtPA auf die Erk-Phosphorylierung abhängig von der katalytischen Funktion sind oder nur durch die Bindung an den LRP-1-Rezeptor vermittelt werden. RtPAi wurde analog zu rtPA perineural injiziert und die Erk-Phosphorylierung im Verhältnis zu Erk bestimmt. Dabei wurden die Zeitpunkte vor Applikation und 2 h nach Applikation von rtPAi berücksichtigt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des pErk/Erk-Quotienten 2 h nach rtPAi Applikation im Vergleich zum Ausgangswert (vgl. Abbildung 17 A). Dies bedeutet, dass auch katalytisch inaktives rtPA in der Lage ist den LRP-1-Rezeptor zu stimulieren und zu einer Phosphorylierung von Erk zu führen.

Um die Funktionalität des Inhibitors der Erk Phosphorylierung, PD98059, nachzuweisen, wurde zunächst der Inhibitor perineural und anschließend rtPA injiziert. Da der Anstieg des pErk/Erk-Quotienten im Zeitstrahl nach 2 h am deutlichsten war (siehe Punkt 3.1.1.), wurde dieser Zeitpunkt untersucht. Es wurden PD98059 und rtPA sowie rtPA alleine perineural am N. ischiadicus injiziert.

Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des pErk/Erk-Quotienten nach rtPA Applikation verglichen mit dem Ausgangswert. Es wurde allerdings keine vermehrte Phosphorylierung von Erk nach vorhergehender Applikation des Inhibitors beobachtet (vgl. Abbildung 17 C). Ob durch die simultane Applikation von rtPA und PD98059 eine Herabregulation des Gehalts von Claudin-1 in der Membranfraktion zu verhindern ist, wurde im Anschluss durch Mitglieder der Arbeitsgruppe untersucht (siehe Abschnitt 4.3).

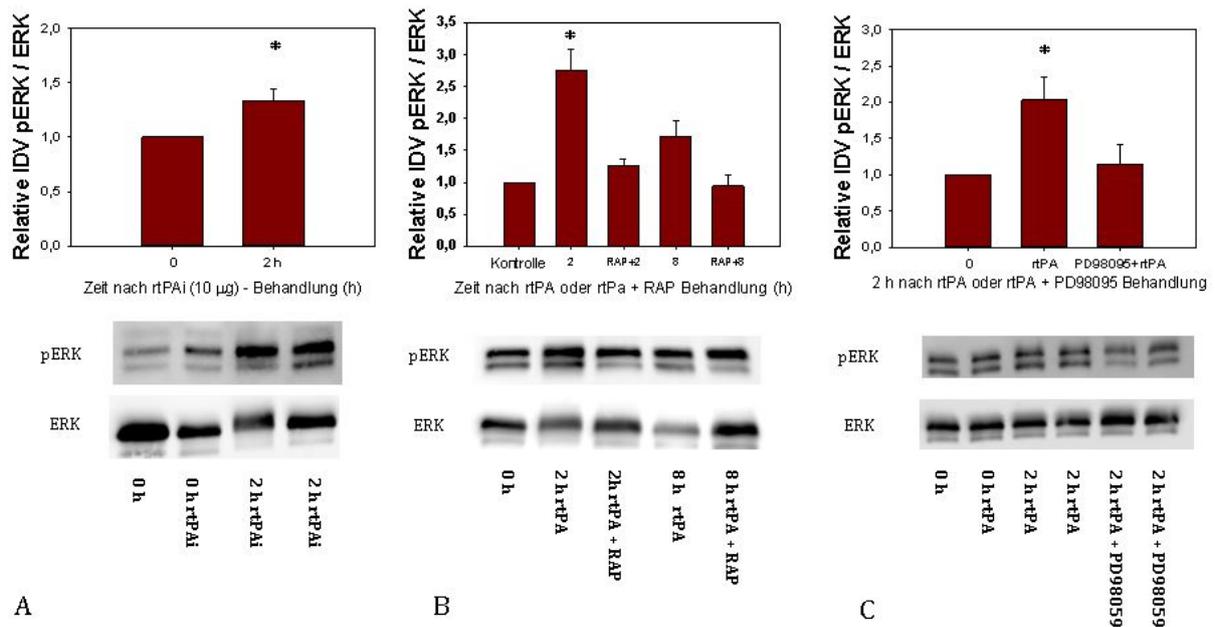


Abb. 17: Veränderung von Erk nach Interaktion mit dem Signalweg

(A) Erk und phosphoryliertes Erk (pErk) wurden vor und 2h nach Injektion von rtPAi in der Zytosolfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und quantifiziert (* $p=0,029$, ONE WAY ANOVA, $n=4$)

(B) Erk und phosphoryliertes Erk (pErk) wurden vor sowie 2 und 8 h nach Injektion von rtPA sowie rtPA und RAP in der Zytosolfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und quantifiziert (* $p<0,001$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

(C) Erk und phosphoryliertes Erk (pErk) wurden vor sowie 2 h nach Injektion von rtPA sowie rtPA und PD98059 in der Zytosolfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten mittels Western Blot analysiert und quantifiziert (* $p=0,006$, ONE WAY ANOVA, $n=8$).

4. Diskussion

4.1. Allgemeines

Diese Arbeit untersucht und beschreibt Grundlagen für die Entwicklung selektiv wirksamer Co-Analgetika. In den Versuchen dieser Arbeit konnte nach perineuraler Injektion von rtPA eine vermehrte Erk-Phosphorylierung im Zytosol und ein verminderter Claudin-1-Gehalt in der Zellmembran nachgewiesen werden. Die Claudin-1-Transkription zeigte sich ebenfalls, unabhängig von dem Transkriptionsfaktor Snail signifikant reduziert. Hier könnten miR-183-5p oder miR-183-3 β mögliche andere Vermittler darstellen. In der späteren Phase nach rtPA-Injektion kam es zu einer β -Catenin-Akkumulation im Zytoplasma; die Phosphorylierung von GSK scheint dabei keine Rolle zu spielen. Der folgende Anstieg von Cdx2 sowie des Claudin-1-Gehalts in der Zellmembran führte zur Wiederherstellung der Integrität der Blut-Nerven-Barriere. Eine Blockade des LRP-1-Rezeptors durch RAP konnte die oben beschriebene rtPA-vermittelte Signalkaskade verhindern. Konsekutiv scheint LRP-1 verantwortlich für die Signalweiterleitung von rtPA zu sein. RtPAi löste ähnliche Effekte wie rtPA aus. Dies lässt den Schluss zu, dass die katalytische Funktion von rtPA nicht zur Aktivierung des LRP-1-Rezeptors benötigt wird.

4.2. Methodik

Die beiden zentralen Methoden dieser Arbeit stellen Western Blot- und PCR-Untersuchungen an Zytosol- und Membranproben von *N. ischiadici* von Wistar Ratten dar. Mittels Aufarbeitung der Nerven wurden Zytosol- und Membranbestandteile (Sediment) des Perineuriums voneinander getrennt, siehe Kapitel 2.3.1. Die intrazelluläre Signalkaskade wurde im Zytosol und die Zellmembranproteine im Sediment untersucht.

4.2.1. Messung der Proteine im Perineurium

Opioid-Rezeptoren sind in unmyelinisierten C- oder A δ -Fasern zu finden, können allerdings nicht in Schwannzellen oder Endothelzellen nachgewiesen werden [89]. Daher müssen Opioide zu den Nervenfasern vordringen, um eine Analgesie zu erwirken.

Die Zielstruktur von rtPA wird daher auf den Barriere-bildenden Perineuralzellen vermutet. In unserem Versuchsaufbau wurden die Nervenfasern allerdings nicht von dem umgebenden Perineurium getrennt, sodass unsere Ergebnisse auch Signalwege in den Nerven beschreiben könnten. In Voruntersuchungen zeigte A. Boecker auf, dass Erk zwar in beiden Kompartimenten nachweisbar ist, jedoch eine Erk-Phosphorylierung nur im Perineurium und nicht im Nerven selbst stattfindet. Dazu wurde 30 min nach der perineuralen Injektion von NaCl (10 %), welches ebenfalls eine LRP-1-Rezeptor vermittelte Erk-Phosphorylierung auslöst, mikrochirurgisch die Nervenscheide vom Nerv getrennt. Die beiden Gewebe wurden separat untersucht und es zeigte sich im Western Blot nur im Perineurium, nicht jedoch im Nerven selbst, eine vermehrte Erk-Phosphorylierung [90]. Daher ist zu vermuten, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Veränderung der Proteine im Perineurium rückschließen lassen.

4.2.2. Referenzproteine und Referenzgene

Die zu analysierenden Proteine wurden in dieser Arbeit mittels Western Blot-Untersuchungen semiquantitativ bestimmt. Eine absolute Messung des Proteingehaltes ist mit dieser Methode nicht möglich. Im Rahmen von Western Blot-Untersuchungen werden Signalintensitäten gemessen, die die Menge der an das Zielprotein gebundenen Antikörper widerspiegeln. Eine quantitative Analyse ist durch den Vergleich der verschiedenen Intensitäten möglich. In dieser Arbeit wurden unter anderem die Intensitäten von phosphorylierten mit den jeweiligen nicht-phosphorylierten Proteinen verglichen. Dadurch konnten Aussagen getroffen werden, ob eine Phosphorylierung des Zielproteins stattgefunden hat. Ferner wurden die Proteingehalte mit einem so genannten Referenzprotein, welches in einigen Publikationen auch als Housekeeping Protein bezeichnet wird, verglichen. Das Referenzprotein sollte im Idealfall in dem zu untersuchenden Zelltyp immer in der gleichen Konzentration vorhanden sein und nicht von äußeren Stimuli beeinflusst werden. Bei PCR-Untersuchungen werden Referenzgene zum Vergleich herangezogen. In dieser Doktorarbeit wurde für die Western Blot-Untersuchungen β -Aktin als Referenzprotein verwendet. Dieses Protein kommt nahezu ubiquitär in allen Zellen vor, ist essentiell für die Struktur des Zytoskeletts der Zellen und spielt beispielsweise eine Rolle im Wachstum von Nervenzellen [91]. Kang et. al konnten mittels RT-qPCR in Mausmodellen nach Simulation eines zerebralen Insultes zeigen, dass der β -Aktin Gehalt der untersuchten N2a-Zellen stabil blieb und somit als Referenzgen genutzt werden kann [92]. Andere

Studien zeigen jedoch, dass das Expressionslevel von β -Aktin durch äußere Stimuli wie Hormone, Viren oder Hyperglykämie verändert werden kann [93-95]. Vor diesem Hintergrund ist β -Aktin als Referenzprotein nicht gänzlich unumstritten und Gegenstand aktueller Diskussionen und Forschung [96, 97]. Liu et al. diskutieren ob nicht beispielsweise β -Tubulin eine bessere Alternative als Referenzprotein in Spinalnervenzellen darstellen könnte, da in deren Untersuchungen der β -Aktin-Gehalt im Western Blot sieben Tage nach Verletzung von Spinalnerven signifikant anstieg [98]. In unserem Versuchsaufbau jedoch zeigte sich keine signifikante Veränderung des β -Aktin-Gehaltes bis 120 h nach rtPA-Applikation (Daten nicht gezeigt), sodass wir bei der Verwendung von β -Aktin keine Fehlerquelle vermuten.

Alternative Methoden zur Bestimmung des Proteingehaltes von Western Blots sind neben dem Vergleich mit Referenzproteinen beispielsweise die Färbung der Gele mit Coomassie oder der Membranen mit Ponceau [99]. Diese können zwar die Qualität der Elektrophorese oder des Proteintransfers auf die Membran widerspiegeln, erlauben jedoch keine Quantifizierung des Proteingehaltes. Daher kann mit diesen Methoden nur eine qualitative aber keine quantitative Aussage zum Proteingehalt getroffen werden. In dieser Doktorarbeit wurden die Gele mittels Coomassie-Färbung gefärbt, um den grundsätzlichen Erfolg der Gelelektrophorese darzustellen.

4.2.3. Vorteile und Limitationen der RT-qPCR

Die mittels Western Blot gezeigte Verminderung von Claudin-1 in der Zellmembran kann durch unterschiedlichste intrazelluläre Prozesse wie z.B. eine herabgesetzte Transkription bedingt sein, s. Kapitel 4.4. Die durchgeführten PCR-Untersuchungen dienten der Verifizierung der postulierten herabgesetzten Claudin-1-Transkription.

Die PCR ist eine äußerst sensitive Technik, die auch geringe RNA-Mengen nachweisen kann. Die quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) erlaubt Aussagen zur Menge des RNA-Gehaltes einer Probe. Dabei wird nach reverser Transkription der RNA in DNA die DNA amplifiziert um auch geringe Mengen detektieren zu können. Die Zahl der DNA-Amplifikate wird anschließend in jedem Zyklus (Echtzeit) bestimmt [100]. Die Zahl der Amplifikate wird jeweils in der exponentiellen Phase der PCR gemessen, in der die Anzahl direkt proportional zur Ausgangsmenge der RNA-Zielfrequenz ist.

Diese Quantifizierung des RNA-Gehaltes bzw. der entsprechenden DNA-Amplifikate einer Probe wird mittels fluoreszierender Farbstoffe durchgeführt und weist eine hohe Sensitivität auf. Dies geschieht jedoch zu Lasten der Spezifität [101]. Der geringen

Spezifität liegt zugrunde, dass nicht nur die Zielfrequenz, sondern auch weitere in der Probe enthaltene Frequenzen vervielfältigt werden [102]. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet unspezifisch an entstandene DNA-Doppelstränge. Daher ist es wichtig spezifische Primer zu verwenden, die nur an die jeweilige Zielfrequenz binden und diese vervielfältigen. Dadurch wird gewährleistet, dass nur zu dieser Zielfrequenz komplementäre DNA-Doppelstränge entstehen, welche dann fluoreszenzoptisch gemessen werden. Dabei sollte man bei der Auswahl des Primers auf folgende Dinge achten: erstens ist eine Primerlänge zwischen 18 – 24 Basenpaaren ideal. Sie ist kurz genug um an die Zielfrequenz zu binden und dabei lang genug um eine spezifische Bindung an die Zielfrequenz zu gewährleisten. Zweitens sollte die Schmelztemperatur auf den GC-Anteil (Anteil der Basen Guanin und Cytosin) angepasst sein. Ein höherer Anteil von GC-Bindungen stabilisiert die DNA-Doppelhelix und es wird daher eine höhere Schmelztemperatur benötigt um die DNA-Doppelhelix zu spalten. Ein GC-Anteil von 40 - 60 % und eine Schmelztemperatur von 52 - 58 °C sind für eine effiziente PCR ideal. Ist die Temperatur zu gering kann dies zu unspezifischen Bindungen führen, ist die Temperatur zu hoch binden zu wenige Primer an die Zielfrequenzen. Drittens ist der Aufbau des 3'- und 5'- Endes des Primers wichtig. Das 3'- Ende sollte eine weniger feste Bindung an die Zielfrequenz als das 5'- Ende aufweisen. Daher sollte das 5'- Ende z.B. aus den Basen Guanin und Cytosin aufgebaut sein, um die Bindung an die Zielfrequenz zu erhöhen; dies bezeichnet man auch als GC-Klammer. Viertens sollten innerhalb des Primers Wiederholungen einer Base oder mehrerer Basenpaare hintereinander vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen kommen kann. Ebenso sollten Palindrome vermieden werden um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen wie DNA-Haarschleifen zu verhindern [103]. Eine Schmelzkurvenanalyse nach abgelaufener PCR kann bestätigen, dass das Fluoreszenzsignal nur von den Zielfrequenzen herrührt, und somit ein fälschlicherweise zu hoch gemessenes Signal ausschließen. Während einer Schmelzkurvenanalyse werden die DNA-Doppelstränge langsam kontinuierlich bis 95°C erhitzt. Dadurch denaturieren die DNA-Doppelstränge bei einer fragmentspezifischen Schmelztemperatur zu Einzelsträngen, SYBR Green wird freigesetzt und das Fluoreszenzsignal verändert sich [104]. Anschließend wird die Temperatur (x-Achse) gegen das Fluoreszenzsignal (y-Achse) aufgetragen und eine Schmelzkurve erstellt. Die Peaks dieser Kurven sind spezifisch für ein jeweiliges PCR-Produkt. Dadurch zeigt sich, ob ausschließlich die Zielfrequenz oder verschiedene DNA-Doppelstränge mittels Fluoreszenz detektiert wurden.

Einen weiteren zentralen Nachteil des PCR-Verfahrens stellt der Umstand dar, dass Untersuchungsergebnisse sehr leicht durch Kontaminationen verfälscht werden können. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden während der Durchführung der Experimente auf Sauberkeit der verwendeten Materialien und der Arbeitsplätze geachtet. Ferner wurde bei jeder Messreihe jeweils eine Lösung ohne RNA-Probe als Kontrollreagenz mit untersucht. Zeigte diese in der Vervielfältigung kein Signal, konnte davon ausgegangen werden, dass die Probe nicht verunreinigt wurde. Zeigten sich Hinweise auf eine Verunreinigung wurde der gesamte Versuchslauf verworfen.

Nach der Aufarbeitung wurden für diese Arbeit die RNA-Konzentration und Reinheit der Proben im NanoDrop®-Spectrophotometer bestimmt um große Schwankungen des RNA-Gehaltes zwischen den Proben auszuschließen. Dabei wurde die A260/280 Ratio bestimmt, wobei die Absorption des Lichtes bei 260 nm und 280 nm verglichen wurde. Nukleinsäuren absorbieren dabei vor allem Licht im Bereich von 260 nm und Proteine bzw. Phenole im Bereich von 280 nm. Dadurch können Aussagen zur Reinheit der Probe hinsichtlich einer Kontamination mit Proteinen bzw. Phenolen getroffen werden. Die A260/A280 Ratio sollte im Idealfall zwischen 1,8 - 2,0 liegen [105]. Liegt der Wert unter 1,8 muss von einer Kontamination mit Proteinen und/oder Phenolen ausgegangen werden, liegt der Wert über 2 deutet dies auf einen hohen RNA-Gehalt in der Probe hin. Dies liegt daran, dass RNA im Gegensatz zur DNA Uracil als Nukleotid enthält und Uracil eine höhere A260/A280 Ratio (4.0) als das in der DNA enthaltene Thymin (1.47) aufweist [106].

Ein weiteres Problem ist die Integrität bzw. Stabilität der RNA. Dabei ist vor allem auf eine korrekte Extraktion ohne Verunreinigung mit RNasen und Lagerung der Proben bei -80°C zu achten. In diesen Versuchsaufbau wurde daher zu jeder Probe ein RNase-Inhibitor zugegeben, um einen Abbau der RNA zu verhindern. Alle verwendeten Geräte, Arbeitsplätze und Verbrauchsmaterialien wurden zudem während der Durchführung der Experimente mit RNase ZAP® gereinigt. RNase ZAP® ist eine Lösung, welche RNasen bei Kontakt zerstört. Die RNA-Qualität kann mittels Gelelektrophorese gemessen werden, dabei werden die RNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wird das Verhältnis von den ribosomalen Untereinheiten 28S und 18S rRNA zueinander ermittelt; ein 28S:18S-Verhältnis von 2 und höher wird dabei als gute Qualität gewertet. Jedoch unterliegt diese Methode starken Schwankungen, da sie nicht standardisiert und Untersucher abhängig ist. Als standardisierte, maschinell ausgewertete Methode wurde z.B. die Bestimmung der RNA Integrity Number (RIN) im

Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies entwickelt. Dabei werden die RNA-Fractionen mittels Mikrokapillar-Elektrophorese aufgetrennt, laser-fluoreszenzoptisch die Menge der verschiedenen RNA-Untereinheiten bestimmt und in einem Elektropherogramm visualisiert. Ein Algorithmus berechnet aus diesen Daten einen Zahlenwert zwischen 1 - 10 [107]. Ein Wert von 1 steht für eine komplett degradierte, fragmentierte RNA und ein Wert von 10 für eine intakte RNA [108]. Dieser Wert, der eine ergänzende Möglichkeit darstellt die Qualität der Proben genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt.

Im Rahmen der quantitativen PCR wird die zu untersuchende mRNA wie beim Western Blot mit einem Referenzgen verglichen [109]. In dieser Arbeit wurde dafür 18S rRNA verwendet. 18S rRNA ist Bestandteil der Ribosomen und daher in allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Es wird durch rtPa nicht beeinflusst und kann dadurch eine Konzentrationsveränderung des Zielgenes (Claudin-1) anzeigen. Durch diese Normierung gegen eine interne Kontrolle können Varianzen der Expressionsergebnisse reduziert werden, da mögliche Störfaktoren oder Fehler bei der Probengewinnung oder -verarbeitung gleichermaßen das Ziel- und Referenzgen betreffen [108]. In dieser Doktorarbeit wurde nur ein Gewebe (Nerv) mit Hilfe derselben Materialien und Techniken untersucht, sodass verfälschte Ergebnisse durch Varianzen von externen Faktoren ausgeschlossen sind.

In der Auswertung der PCR wird nach jedem Amplifikationszyklus der CP-Wert des Zielgenes bestimmt und in Relation zu dem CP-Wert des Referenzgenes gesetzt ($\Delta\Delta\text{CP}$ -Wert, siehe 2.4.4.). Der Berechnung der Relation zwischen Ziel- und Referenzgen liegt die Annahme zugrunde, dass die DNA-Menge bei jedem Zyklus verdoppelt wird. Diese Dynamik der DNA-Amplifikation wird als Effizienz bezeichnet, wobei eine Verdopplung als Effizienz von 100 % gilt. In der Praxis unterliegt diese Effizienz aufgrund von z.B. zu geringer Probenmenge, Verbrauch und Auswahl der Primer, den Pufferverhältnissen oder PCR-Inhibitoren wie z.B. Heparin Schwankungen, die zu Unterschieden in den Ergebnissen führen können [110].

Die Echtzeit-PCR in Kombination mit der reversen Transkription hat sich in den letzten Jahrzehnten als sensitive, robuste und reproduzierbare Methode herausgestellt um die Genexpression in Geweben zu untersuchen [104], jedoch müssen Störfaktoren und Fehlerquellen bekannt sein, um eine hohe Spezifität zu erreichen und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

4.2.4. Alternative Methoden zur Detektion von Proteinen

Das Western Blot-Verfahren gehört zu den Immunblots, einem Untersuchungsverfahren das Antigene mittels Immunfärbungen sichtbar macht. Western Blots sind sehr zeit- und materialaufwändig; während jedes Verfahrensschrittes können Fehler entstehen. So kann beispielsweise eine Luftblase in einer Bande dazu führen, dass die gesamte Membran nicht ausgewertet werden kann. Eine Alternative zu Western Blots stellen Immunoassays dar. Hierzu gehören beispielsweise Radioimmunoassays oder das ELISA-Verfahren. Mit dem ELISA-Verfahren können vor allem Proteine, aber auch Viren, Hormone und Toxine nachgewiesen werden. ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Dabei wird das zu untersuchende Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mittels eines spezifischen Antikörpers gebunden. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert, welches infolge einer weiteren Reaktion fluoresziert und folglich detektiert werden kann (direkter ELISA) [111]. Vorteil dieser Methode ist die einfache und weniger zeitaufwändige Durchführung im Vergleich zum Western Blot-Verfahren. Von Nachteil ist jedoch die geringere Spezifität: durch Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen können falsch positive Signale entstehen [112]. In dieser Arbeit war vor allem der Phosphorylierungs-Status der Proteine von Interesse. Um dies mittels ELISA untersuchen zu können sind Antikörper nötig, die eine sehr hohe Sensitivität aufweisen. Beim Western Blot ist die Trennschärfe größer da durch die Trennung nach Molekulargewicht das richtige Protein anhand der Bandenhöhe und nicht nur der Fluoreszenz ermittelt werden kann.

Eine weitere Alternative stellt die Massenspektrometrie dar. Dabei werden Proteine in die Gasphase überführt, durch ein elektrisches Feld geleitet und ihrem Masse-Ladungsverhältnis entsprechend aufgeteilt. Die Massenspektrometrie stellt dabei ein äußerst sensibles Verfahren dar. Jedoch ist auch hier die Bestimmung von phosphorylierten Proteinen problematisch, da die phosphorylierten Proteine negativ geladen sind und die Untersuchungen meist im positiven Modus durchgeführt werden [113]. Zudem können Hintergrundsignale von nicht-phosphorylierten Proteinen ein Störfaktor sein, da die phosphorylierte Form des Proteins häufig in deutlich geringerer Menge vorhanden ist [114]. Daher müssten die Proteine vor der Massenspektrometrie angereichert werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Unterstützt werden die mittels Western Blot und PCR gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit durch Verhaltenstests und immunhistochemische Färbungen, die durch andere Mitglieder dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. In den Verhaltenstests konnte die Öffnung der Barriere auch funktionell nachgewiesen werden, da nach Applikation von rtPA und DAMGO eine Erhöhung der Pfortendruckschwelle beobachtet wurde. In den immunhistochemischen Färbungen war 2 h nach Applikation von rtPA deutlich weniger Claudin-1 in der Zellmembran des Perineuriums nachzuweisen (vgl. Abbildung 7) als zum Zeitpunkt 0. Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Western Blots konnten also durch weitere Untersuchungen auf translationaler, immunhistochemischer und funktionaler Ebene bestätigt werden.

4.3. Interaktion von rtPA mit dem LRP-1-Rezeptor und Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung

Dass ein Zusammenhang zwischen tPA und Endothelbarrieren besteht konnte bereits durch F. Yang et al. in vitro gezeigt werden. In deren Arbeiten korrelierte die Dichte der Blut-Hirn-Barriere invers mit der Expression von tPA [115]. Eine Metaanalyse von 47 Studien zwischen 1979 und 2016 zeigt einen Zusammenhang zwischen der Applikation von rtPA bei Schlaganfällen und erstens dem vermehrten Auftreten von Hirnödemen und zweitens dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke [51]. Unklar bleibt jedoch weiterhin durch welche Signalwege tPA bzw. rtPA die Membranproteine im Perineurium vermindert.

Bekannt ist, dass rtPA MMP-9 stimuliert, welche ihrerseits Tight Junction-Proteine modulieren kann [116]. So zeigten Patienten, die im akuten Schlaganfall mit rtPA behandelt wurden, im Serum signifikant erhöhte MMP-9 Werte im Vergleich zu Schlaganfallpatienten, die keine rtPA-Therapie erhielten [117]. In Mausmodellen kommt es nach Simulation eines Mediainfarktes zur Stimulation der MMP-9, der Ausbildung eines zerebralen Ödems und der Degradierung von Claudin-5. Jedoch wird diese Degradierung von Claudin-5 nicht in tPA-defizienten Tieren beobachtet [56]. Daraus lässt sich eine Interaktion zwischen tPA und der MMP-9 und eine darauffolgende Degradierung von Tight Junction-Proteinen schlussfolgern. Andere Studien hingegen deuten auf eine direkte Interaktion von tPA mit dem LRP-1-Rezeptor hin:

Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren konnten die durch tPA induzierte Herabregulation von Tight Junction-Proteinen nur teilweise verhindern [118].

In dieser Arbeit wurde daher untersucht ob rtPA über eine direkte Bindung an den membranständigen LRP-1-Rezeptor zu einer vermehrten Phosphorylierung von Erk im Zytosol des Perineuriums führt. Dieser Zusammenhang wurde bereits in anderen Modellen nachgewiesen. So führt die intrathekale Applikation von rtPA in Mäusen zu einer vermehrten Erk-Phosphorylierung in den Astrozyten [119]. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es 1 und 2 h nach perineuraler Injektion von rtPA zu einer vermehrten Phosphorylierung von Erk im Zytosol der Perineuralzellen kommt. Diese Phosphorylierung konnte durch Co-Applikation von RAP, einem nicht-kompetitiven Inhibitor des LRP-1-Rezeptors, verhindert werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Induktion der intrazellulären Signalkaskade von rtPA über Interaktion mit dem membranständigen LRP-1-Rezeptor vermittelt wird. Die Co-Applikation von PD98059 verhinderte ebenfalls die Erk-Phosphorylierung, was die Effektivität des Inhibitors beweist und den pErk Anstieg nach rtPA Applikation verifiziert.

In Rattenmodellen konnten Abu Fanne et al. zeigen, dass katalytisch-inaktives rtPAi ähnlich zu katalytisch aktivem rtPA zu einer gesteigerten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führt [120], dieses Ergebnis konnte jedoch in in-vitro Modellen an Astrozyten nicht reproduziert werden [121]. In anderen Untersuchungen wurden intrazelluläre Signalwege durch rtPA unabhängig von dessen katalytischer Aktivität beeinflusst [122, 123]. Daher stellte sich die Frage, ob katalytisch inaktives rtPAi analog zu rtPA zu einer Aktivierung von LRP-1 und Phosphorylierung von Erk führt. Im Westerblot konnte die Phosphorylierung von Erk und ein verminderter Gehalt von Claudin-1 in der Zellmembran 2 h nach Applikation von rtPAi gezeigt werden, sodass die Öffnung der Blut-Nerven-Barriere unabhängig von der katalytischen Aktivität von rtPA zu sein scheint.

4.4. Claudin-1 nach rtPA Applikation

Claudin-1 wird ubiquitär in zahlreichen Organen des menschlichen Körpers exprimiert [124]. Es dient vor allem der „Abdichtung“ von Endothelien und Epithelien und spielt eine zentrale Rolle der Barrierebildung und -funktion. Dies wird anschaulich am Beispiel von Claudin-1 knock-out Mäusen aufgezeigt; diese Knock-Out-Mäuse sterben durch den transepidermalen Wasserverlust rasch nach der Geburt [39]. Die

Herabregulation von Claudin-1 ist pathophysiologischer Bestandteil vieler Erkrankungen. So zeigten Mausmodelle, in denen Claudin-1 in unterschiedlicher Ausprägung herabreguliert wurde („knock-down“), klinische und histopathologische Anzeichen der atopischen Dermatitis. Der Ausprägungsgrad war dabei abhängig vom Grad der Claudin-1 Expression [125]. In diesen Mausmodellen wurde der Genotyp verändert, sodass Claudin-1 in sämtlichen Epithelien und Endothelien vermindert ist. Es wäre anhand dieser Mausmodelle interessant auch die endotheliale Barrierefunktion anderer Organsysteme wie z.B. des Perineuriums zu untersuchen. So könnte evaluiert werden, inwiefern sich der Opioidverbrauch für eine ausreichende Analgesie zwischen den Claudin-1 Wildtyp-, Claudin-1 knock-down- und mit rtPA vorbehandelten Mäusen unterscheidet.

Die Öffnung der perineuralen Barriere mit konsekutiver Opioid-induzierter Analgesie nach rtPA Applikation ist durch die verminderte Menge von Claudin-1 in der Zellmembran zu erklären. Dies konnte im Vorfeld bereits mittels immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden. Im Western Blot bestätigte sich der verminderte Gehalt der Claudin-1-Proteine in der Zellmembran der Perineuralzellen bereits 1 h nach rtPA Applikation. Ein signifikanter Abfall zeigte sich jedoch erst nach 24 h. Auch in den Verhaltenstests zeigte sich 1 bis 72 h nach rtPA Applikation ein signifikanter Anstieg der Pfotendruckschwelle. Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach Applikation von katalytisch inaktivem rtPAi am peripheren Nerven beobachtet werden (vgl. Abbildung 18 A). Die Unstimmigkeiten dieser Zeitpunkte in den verschiedenen Messverfahren können unterschiedliche Gründe haben. So erfolgt die Regulation von Claudin-1 auf verschiedenen Ebenen. Es kann durch eine Herauf- oder Herabregulierung der Transkription, durch posttranslationale Modifikation und durch Interaktionen mit anderen Membran- oder zytoplasmatischen Proteinen beeinflusst werden [124].

Erstens sind multiple Signalwege bekannt, die die Transkription von Claudin-1 beeinflussen: unter anderen wurden Modulationen durch die MAP-Kinase-, Wnt-, TGF- β -Smad/Snail- und TNF- α /NF- κ B-Signalwege sowie MMP-9, C1C2, Cdx2, Proteinkinase-C oder den PPAR γ -Rezeptor beschrieben [124]. Beispielsweise konnten Li et al. in Rattenmodellen zeigen, dass eine Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges durch JWH133, einem Cannabinoid-2-Rezeptor-Antagonisten, die Blut-Hirn-Barriere nach einer simulierten intrazerebralen Blutung schützt [126]. Ebenso wird Snail beispielsweise in vitro in Throphoblastenzellen durch den MAP-Kinase-Signalweg (Erk) reguliert [74] und ist ein bekannter Repressor der Transkription von Claudin-1 [73].

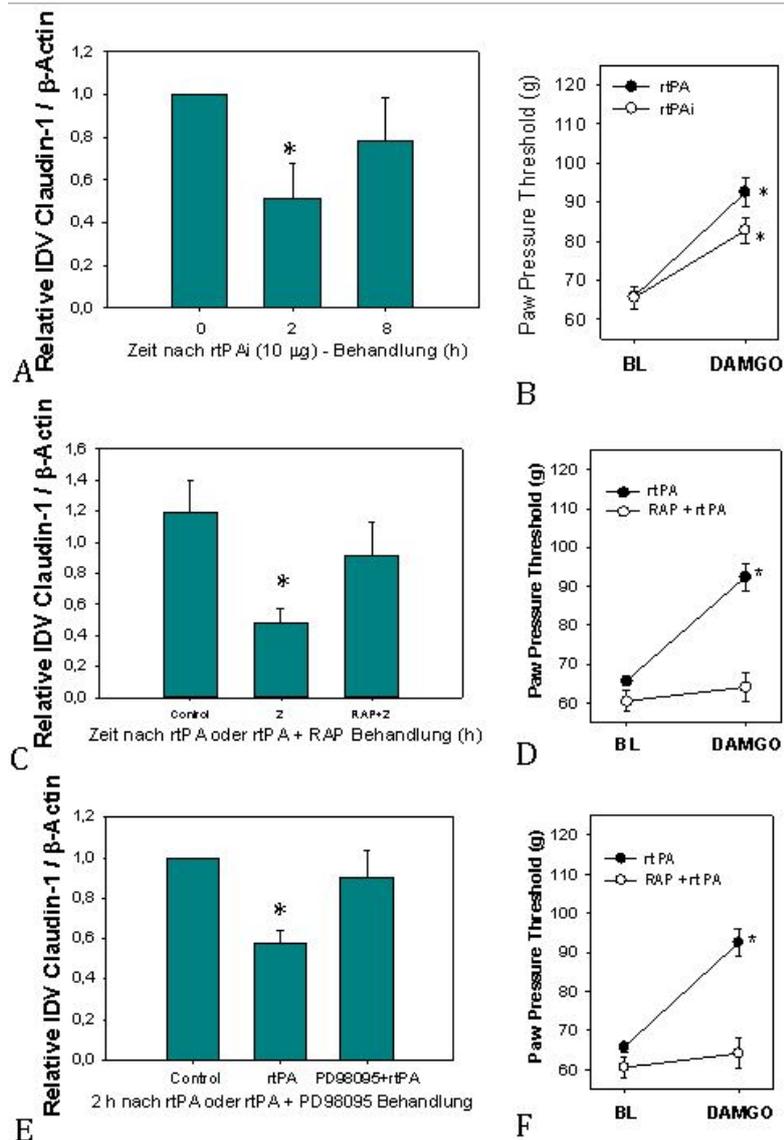


Abb. 18: rtPA und rtPAi induzieren Barriereöffnung über LRP-1 und die Phosphorylierung von Erk
 (A) Die Claudin-1 Expression vor und 2 und 8 h nach Injektion von rtPAi in der Membranfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten wurde mittels Western Blot analysiert und im Verhältnis zu b-Aktin quantifiziert (* $p = 0,004$, ONE WAY ANOVA, $n = 4$)
 (B) Wistar Ratten wurde rtPAi und eine Stunde später DAMGO perineural am Nervus ischiadicus injiziert. Der Paw pressure threshold wurde vor und 10 min nach der Injektion bestimmt (* $p < 0,05$ vs. baseline, Two-Way ANOVA, $n = 6$).
 (C) Wistar Ratten wurde der LRP-1-Antagonist RAP perineural am N. ischiadicus injiziert. 20 min später wurde rtPA ebenfalls perineural appliziert. Die Claudin-1 Expression vor sowie 2 und 8 h nach Injektion von rtPA alleine sowie rtPA und RAP in der Membranfraktion des N. Ischiadicus von Wistar Ratten wurde mittels Western Blot analysiert und im Verhältnis zu b-Aktin quantifiziert (* $p < 0,001$, ONE WAY ANOVA, $n = 8$).
 (D) Wistar Ratten wurden wie unter C beschrieben behandelt. 2 h nach der rtPA Injektion wurde den Ratten DAMGO perineural injiziert. Der Paw pressure threshold wurde vor und 10 min nach der Injektion bestimmt (* $p < 0,05$ vs. baseline, Two-Way ANOVA, $n = 6$).
 (E) Wistar Ratten wurde entweder rtPA alleine oder rtPA mit dem Erk Inhibitor PD98059 perineural am N. ischiadicus injiziert. Die Claudin-1 Expression in der Membranfraktion des N. Ischiadicus vor sowie 2 h nach Injektion wurde mittels Western Blot analysiert und im Verhältnis zu b-Aktin quantifiziert (* $p < 0,001$, ONE WAY ANOVA, $n = 8$).
 (F) Wistar Ratten wurde entweder rtPA alleine oder rtPA und PD98059 und jeweils eine Stunde später DAMGO perineural am Nervus ischiadicus injiziert. Der Paw pressure threshold wurde vor und 10 min nach der Injektion bestimmt (* $p < 0,05$ vs. baseline, Two-Way ANOVA, $n = 6$).
 Daten nicht publiziert.

Auch in in-vitro Untersuchungen an MDCK-Zellen konnte eine Erk-abhängige Reduktion des mRNA-Levels von beispielsweise Claudin-4 festgestellt werden [45]. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Verringerung der Claudin-1-mRNA und folglich eine Reduktion der Transkription 2 und 8 h nach Applikation von rtPA (vgl. Abbildung 15 C). Dies ist gemäß unseren Untersuchungen durch Stimulation des LRP-1-Rezeptors und der nachfolgenden Erk-Phosphorylierung verursacht. Jedoch scheint Snail in der Signalkaskade nach perineuraler Injektion von rtPA im Perineurium keine Rolle zu spielen, da Snail im Westernblot nicht nachgewiesen werden konnte. Ein möglicher Mediator zwischen rtPA und den Promotoren der Claudin-1 Transkription könnten MikroRNAs darstellen, s unten.

Zweitens kann Claudin-1 durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Palmitoylierung oder Ubiquitinierung beeinflusst werden. In in-vitro Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an MDCK-Zellen konnte eine durch Oubain induzierte Phosphorylierung von Erk und eine darauffolgende Endozytose und Degradierung von Tight Junction-Proteinen wie Claudin-2, -4 und Occludin gezeigt werden [45]. Jedes Claudin weist mehrere Bereiche auf, die phosphoryliert werden können. In Zellkulturen von Ratten Lungenendothelzellen führte z.B. eine Phosphorylierung von Claudin-1 an Threonin 203 durch MAP-Kinasen zu einem vermehrten Einbau in die Zellmembran [42]. Passend dazu wurde in MDCK-Zellen nach Dephosphorylierung von Claudin-1 eine Verminderung von Claudin-1 in Tight Junctions beobachtet [127]. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Claudin-1 wurde in dieser Doktorarbeit nicht bestimmt. Von Interesse wäre ob im Perineurium eine Phosphorylierung von Claudin-1 durch intrazelluläre Kinasen, wie z.B. Erk, zu einem verminderten Einbau in die Zellmembran führt. Dies zu untersuchen könnte weitere Hinweise zu den genauen intrazellulären Prozessen nach rtPA Applikation und darauffolgender Verminderung von Claudin-1 in der Zellmembran geben.

Drittens ist die Rolle der Interaktionen der Tight Junction-Proteine untereinander unklar. Furuse et al. konnten zeigen, dass Claudin-1 über PDZ-Domänen mit anderen Claudinen und weiteren Tight Junction-Proteinen wie z.B. ZO-1 interagiert [128]. Dass diese Interaktionen eine physiologische Rolle spielen, wird an Patienten, die eine Mutation der PDZ-Domäne von Claudin-16 tragen, deutlich. Sie leiden unter einer milden, selbstlimitierenden Form von familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC) [129]. Aufgrund der großen Anzahl von unterschiedlichen Tight Junction-Proteinen und der unzähligen Kombinations-

möglichkeiten miteinander sind die Auswirkungen auf die Integrität der Endothelien und Epithelien unvorhersehbar und aktuell unbekannt [124].

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Applikation von RAP, einem LRP-1 Antagonisten, die rtPA induzierte Verminderung von Claudin-1 in der Zellmembran verhinderte. In den Verhaltenstests zeigte sich nach der zusätzlichen Applikation von RAP keine Erhöhung der Pfortendruckschwelle. Ebenso blieb bei Co-Applikation von rtPA mit PD98059, einem Inhibitor der Erk Phosphorylierung, der Abfall des Claudin-1-Gehalts in der Membranfraktion aus (vgl. Abbildung 18 E). Auch in den Verhaltenstests wurde durch die Co-Applikation von rtPA und PD98059 eine Erhöhung der Schmerzschwelle des Pfortendrucktests verhindert (vgl. Abbildung 18 F). Somit ist ein Zusammenhang zwischen Aktivierung des Rezeptors und darauffolgender ERK-Phosphorylierung mit der Claudin-1 Herabregulation und Opioid-induzierter Reduktion des Schmerzes anzunehmen.

Mögliche andere Vermittler zwischen rtPA und den Promotoren der Claudin-1 Transkription könnten miR-183-5p oder miR-183-3p darstellen. MicroRNAs (miR) sind kurze, nicht kodierende RNA-Sequenzen, die unter anderem in der Genexpression eine Rolle spielen. So konnte in Versuchen dieser Arbeitsgruppe ein signifikanter Anstieg von miR-183-5p nach perineuraler Applikation von rtPA an peripheren Rattennerven gezeigt werden. Ebenfalls zeigte sich nach perineuraler Injektion von rno-miR-183-5p-Mimetika und DAMGO ein signifikanter Anstieg der Schmerzschwelle des Pfortendrucktests. Dies führen wir auf eine Reduktion der Claudin-1-Expression zurück, da nach Applikation von rno-miR-183-5p-Mimetika die Claudin-1-Transkription signifikant reduziert ist.

Sowohl Erk als auch miR-183-5p können Foxo-1 inaktivieren [130]. Foxo-1 gehört zur Familie der Forkhead-Box-Proteine und ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem Gene der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, der Zellproliferation, der Adipogenese oder des Insulinstoffwechsels reguliert. Im Rattenintestinum führt eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Foxo-4 zu einer Herabregulation von Tight Junction-Proteinen wie ZO-1 und Occludin und damit zu einer erhöhten Permeabilität der intestinalen Barriere [131]. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob Erk im peripheren Nerven zu einer Foxo-vermittelten Herabregulation von Tight Junction-Proteinen führen kann.

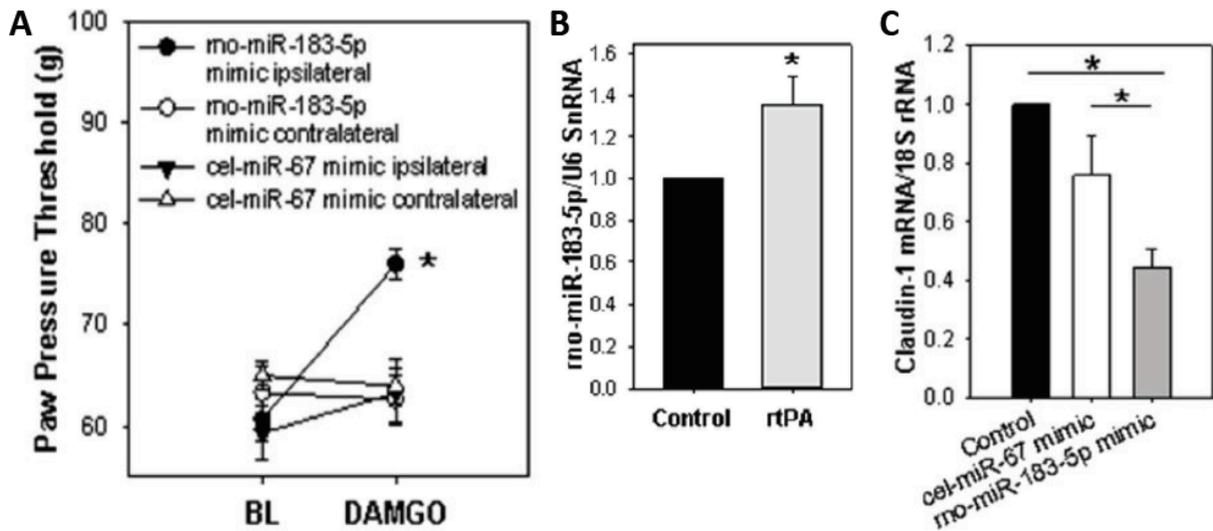


Abb. 19: rtPA vermittelt die Barriereöffnung über miR

(A) Wistar Ratten wurde entweder rno-miR-183-5p oder cel-miR-67 Mimetika (jeweils 10 μ g) in beide Pfoten perineural am Nervus ischiadicus injiziert. Jeweils eine Stunde später wurde DAMGO an jeweils einer Pfote injiziert. Der Paw pressure threshold wurde vor und 10 min nach der Injektion bestimmt. (* $p < 0.05$ vs. baseline, Two-Way ANOVA, $n = 5$).

(B) Rno-miR-183-5p im Verhältnis zu U6 SnRNA wurde mittels semiquantitativer PCR in unbehandelten (Control) und 2 h nach perineuraler Injektion von 10 μ g rtPA in N. schiadici von Wistar Ratten gemessen (* $p < 0.05$ vs. control, t-test, $n = 6$).

(C) Claudin-1 mRNA im Verhältnis zu 18S rRNA wurde nach perineuraler Behandlung mit miR Mimetika in N. schiadici von Wistar Ratten quantifiziert (* $p < 0.05$, One-Way ANOVA, $n = 5$) [80].

Eine Abbildungsgenehmigung ist als Co-Autor nicht erforderlich.

RtPA scheint im Perineurium neben Claudin-1 auch andere Proteine wie JAM-C und ZO-1 zu beeinflussen [132]. Junktionale Adhäsionsmoleküle (JAMs) gehören zu einer Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie und besitzen eine transmembran- und eine intrazelluläre Domäne, die über ihre PDZ-Domäne mit Gerüstproteinen wie ZO-1 interagiert [133]. JAM-C wird in Schwann Zellen peripherer Nerven exprimiert und trägt dort zur Bildung der Nervenscheide und zur Signaltransduktion bei. So finden sich in JAM-C knock-out Mäusen dicke, lose Myelinscheiden mit einer beeinträchtigten Signalweiterleitung, die sich klinisch durch verkleinerte Schritte und einen schwächeren Griff manifestiert [134]. Zona Occludens Protein-1 (ZO-1) ist ein Gerüstprotein, welches Tight Junction-Proteine wie Claudine, JAMs oder Occludine mit dem Actin-Zytoskelett verbindet. Es ist daher für die Barrierebildung unerlässlich – knock-out Mäuse sterben noch in der Embryonalphase [135]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl JAM-C als auch ZO-1 in Wistar Ratten nach perineuraler rtPA Injektion am peripheren Nerven herabreguliert werden [132]. Es wurde zudem beobachtet, dass nach Simulation einer Nervenverletzung endogenes tPA vermehrt ausgeschüttet wird und ebenfalls zu einer Herabregulation von JAM-C und ZO-1 führt. Jedoch wurden zusätzlich klinisch eine

vermehrte Allodynie und histologisch eine vermehrte Makrophageninvasion beobachtet, die exogener rtPA-Applikation nicht vorzufinden waren. Dies zeigt, dass rtPA zwar die Blut-Nerven-Barriere öffnet und so zu einer Opioid-vermittelten Analgesie führt, jedoch ohne Inflammation keine Hypersensitivität auslöst.

4.5. Verschluss der Blut-Nerven-Barriere

Gemäß unserer Hypothese wird in einer späteren Phase die Integrität der Blut-Nerven-Barriere durch eine Phosphorylierung von GSK, einer darauffolgenden Akkumulation von β -Catenin und Cdx2 und wiedereinsetzenden Transkription von Claudin-1 wiederhergestellt. Bekannt ist eine Interaktion zwischen Erk und GSK-3. So zeigten Versuche mit renalen Fibroblasten, dass tPA zu einer Erk- und GSK-3-Phosphorylierung führt. Diese Phosphorylierung von GSK-3 wurde durch eine Blockade der Erk-Phosphorylierung verhindert. Daher scheint die Erk-Aktivierung in der Signalkaskade oberhalb der GSK-3-Phosphorylierung zu stehen [136]. Wang et al. konnten zeigen, dass nach Infusion von rtPA bei Schlaganfall-Rattenmodellen zerebrale Blutungen nachzuweisen sind, die mit einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen. Infundierte man jedoch rtPA und TWS119, einen Inhibitor von GSK-3, so waren diese Blutungen weniger sichtbar. Western Blot Analysen zeigten einen Abfall von GSK-3, jedoch einen Anstieg von β -Catenin und Tight Junction-Proteinen wie Claudin-3 und ZO-1 [137]. Durch die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von GSK-3 wird β -Catenin nicht ubiquitiniert und konsekutiv nicht abgebaut. Dadurch akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma. β -Catenin kann dann einerseits direkt im Zellkern die Transkription bestimmter Proteine wie z. B. Claudin-1 veranlassen und reguliert andererseits die Expression von Cdx [69, [76]. Cdx-1 und -2 wiederum sind unter anderem als Promotoren der Transkription von Tight Junction-Proteinen wie beispielsweise Claudin-1 und-2 bekannt. Die Transkription von Claudin-2 kann durch Mutation der Bindestellen für LEF-1/ β -Catenin und Cdx verhindert werden [78]. So konnte in in-vitro-Untersuchungen an malignen Kolonzellen gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel von β -Catenin und Cdx-1 und -2 die Claudin-1 Transkription reguliert [77].

Folglich wäre eine vermehrte Phosphorylierung und damit Inaktivierung von GSK-3 zeitlich nach der vermehrten Erk Phosphorylierung anzunehmen gewesen. Zu den Zeitpunkten 8 bis 72 h nach Applikation von rtPA konnte entgegen unserer Annahmen

allerdings kein signifikanter Anstieg des pGSK-Gehalts nachgewiesen werden. Gemäß unserer Hypothese wird vermutet, dass β -Catenin im zeitlichen Ablauf nach der GSK Inaktivierung akkumuliert. Dieses wurde daher zu späteren Zeitpunkten gemessen. Dabei zeigte sich 72 und 120 h nach rtPA Applikation ein signifikanter Anstieg von β -Catenin im Zytoplasma der Zellen. So kann eine Interaktion von rtPA oder Erk mit β -Catenin nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheint pGSK-3 nicht das Verbindungsglied zu sein. Andere Studien vermuten eine direkte Interaktion des MAP-Kinase-Signalweges mit dem Wnt-Signalweg und β -Catenin ohne eine vorhergehende Phosphorylierung von GSK-3. Diese Studien gehen von einer direkten Phosphorylierung von LRP-6, einem bekannten Co-Rezeptoren des Wnt-Signalweges, aus [138].

Interessant ist auch ob Cdx2 in der Steigerung der Expression von Claudin-1 eine Rolle spielt. Der Cdx2-Gehalt zeigte sich in dieser Arbeit zum Zeitpunkt 120 h nach rtPA-Applikation signifikant erhöht. In der PCR zeigte sich die Claudin-1-Expression 120 h nach rtPA-Applikation wieder im Bereich des Ausgangswertes. Ein möglicher Zusammenhang mit der wiedereinsetzenden Expression von Claudin-1 ist also nicht auszuschließen. Unklar ist jedoch in wie weit noch andere Faktoren als β -Catenin und Cdx2 eine Rolle spielen. In den Western Blots ist der Claudin-1 Gehalt in der Zellmembran bereits nach 48 h wieder auf dem Ausgangsniveau. Es ist fraglich, ob rtPA den Claudin-1-Gehalt in der Plasmamembran alleine durch die Expression im Zellkern reguliert oder ob auch andere Faktoren wie beispielsweise Endozytose eine Rolle spielen. Dies würde eine Erklärung für den Claudin-1-Wiederanstieg in der Plasmamembran im Western Blot ohne zeitgleich vermehrte Expression der Claudin-1-mRNA in der PCR erklären. Es bleibt weiteren Studien überlassen dies genauer zu untersuchen.

4.6. Toxizität und Nebenwirkungen von rtPA

Die Blut-Nerven-Barriere ist zum Schutz des Nervens vor potentiell neurotoxischen Substanzen und zur Erhaltung der perineuralen Homöostase notwendig. Wird diese Barriere durch rtPA geöffnet steigt das potentielle Risiko einer Nervenschädigung. Seit längerem wird infolge des vermehrten Auftretens von beispielsweise epileptischen Anfällen und Hirnödemen diskutiert inwieweit die leitliniengerechte rtPA-Applikation zur Behandlung akuter ischämischer Schlaganfälle schädlich sein kann [139]. Es existiert

allerdings keine abschließende Bewertung, da diese Pathologien auch durch den vorhergehenden Schlaganfall und die damit verbundene Gewebeerstörung verursacht sein können. In unseren Versuchen wurde 10 µg rtPA verwendet, welches bezogen auf das Körpergewicht der Ratten einer Dosis von 50 - 100 µg/kg Körpergewicht entspricht. In Schlaganfallmodellen an Ratten wird eine 100-fach höhere Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Dies entspricht einer 11-mal höheren Dosis wie Patienten mit Schlaganfall im klinischen Alltag erhalten (0,9 mg/kg Körpergewicht) [140]. In unserem Modell wurde demnach eine 9-18-fach geringere Dosis lokal appliziert als Schlaganfallpatienten intravenös verabreicht wird.

In anderen Modellen wurde beobachtet, dass nach Nervenschädigung am Rückenmark oder bei chronischem Morphinkonsum vermehrt tPA exprimiert wird. Gleichzeitig wurde eine mechanische Hypersensitivität und Allodynie beobachtet, welche durch Inhibition von tPA unterdrückt werden konnte [141]. In unseren Experimenten zeigte sich die Schmerzschwelle des Pfotendrucktests nach alleiniger rtPA-Applikation unverändert, sodass die nach Schädigung des Rückenmarks beobachtete mechanische Hypersensitivität und Allodynie [141] nach einmaliger Applikation von rtPA nicht zu erwarten sind und unsere Ergebnisse nicht beeinflusst haben. Aufgrund der fehlenden Expression von tPA im gesunden peripheren Nerven ist davon auszugehen, dass endogenes tPA in unserem Versuchsaufbau kein Störfaktor ist.

Histologische Anzeichen einer Nervenschädigung sind unter anderem die Degeneration des Nerven, die Destruktion des Myelins sowie eine Infiltration mit CD68+ Makrophagen [142, 143]. In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte sieben Tage nach perineuraler Applikation von rtPA keine Invasion von Makrophagen, keine Nervendegeneration oder Destruktion des Myelins gesehen werden [80]. Damit ist eine akute Schädigung der Nerven durch rtPA unwahrscheinlich. Ferner wurden nach Injektion von rtPA keine Hämatombildung und keine Blutung an der Injektionsstelle beobachtet, was aufgrund der fibrinolytischen Eigenschaften des Proteins denkbar wäre. Die Verwendung von rtPAi anstatt rtPA könnte mögliche Blutungskomplikationen infolge der rtPA-induzierten Fibrinolyse verhindern.

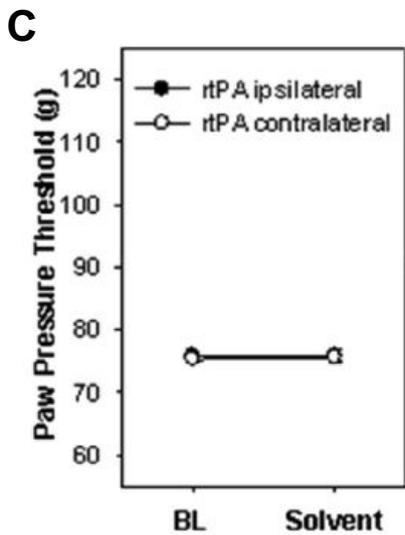
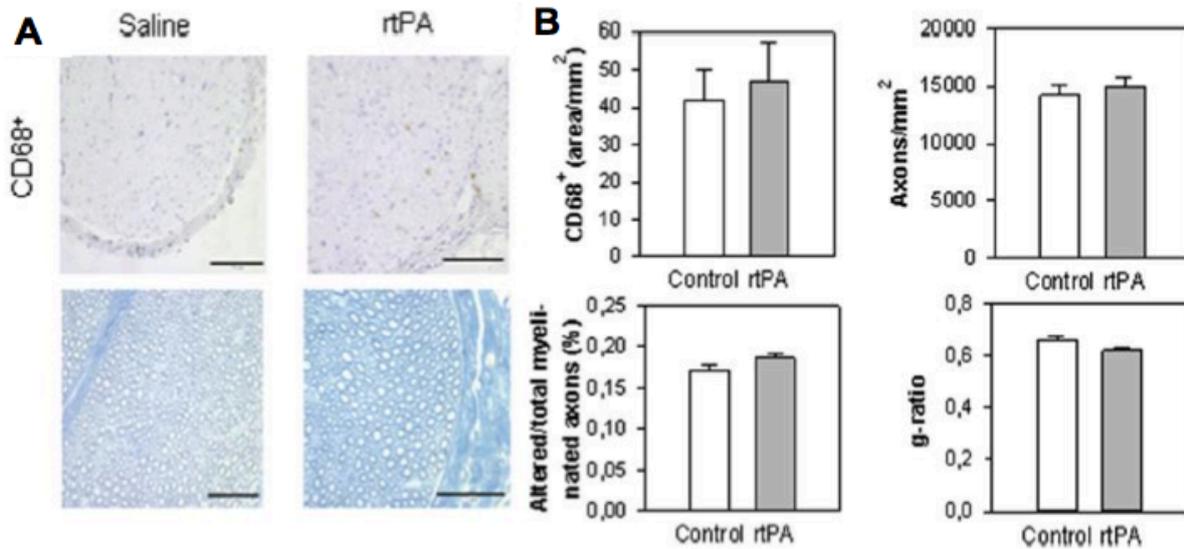


Abb. 20: Keine Schädigung des Nervs nach perineuraler rtPA Injektion

(A) 7 Tage nach der perineuralen Injektion von 10 mg rtPA oder 0,9 % NaCl wurden die N. ischiadici histologisch und mittels immunhistochemischen Färbungen (CD68 mAb) untersucht.

(B) Die Anzahl der CD68 mAb positiven Zellen pro mm² wurde gemessen, ebenso wie die Anzahl der Axone mit veränderter Myelinscheide in Relation zur totalen Anzahl der myelinisierten Fasern. Auch wurde das Verhältnis des inneren Axondurchmessers im Vergleich zum äußeren Durchmesser (g-ratio) und die totale Anzahl der Axone pro mm² ($p > 0,05$, t-test, $n = 6$) gemessen.

(C) Wistar Ratten wurden mit rtPA behandelt und 2 h danach eine Lösung (Placebo) injiziert. Es zeigte sich keine Veränderung der Pfotendruckschwelle. Die kontralaterale, nicht behandelte Seite ist als Kontrolle gezeigt [80].

Eine Abbildungsgenehmigung ist als Co-Autor nicht erforderlich.

4.7. Alternative Therapieoptionen zur Verbesserung der perioperativen Analgesie

Aktuell werden in der klinischen Praxis Lokalanästhetika wie beispielsweise Lidocain oder Bupivacain verwendet. Es ist bekannt, dass diese in Rattenmodellen zytotoxische Wirkungen an Muskel- und Nervenzellen entfalten [14, 144, 145]. Des Weiteren existieren Fallberichte von Myositiden in Patienten nach lokaler Applikation von Lokalanästhetika [146]. Alternative Therapieoptionen zur Verbesserung der perioperativen Analgesie zu entwickeln ist daher Gegenstand intensiver Forschung. Neben rtPA werden weitere Stoffe untersucht, die potentiell die perioperative Analgesie an peripheren Nerven verbessern könnten: So wurden Versuchstiere beispielsweise mit Capsaicin, einem Agonisten des TRPV1-Kanals, und dem Lokalanästhetikum Lidocain

oder seinem hydrophilen Derivat QX-314 behandelt. Dabei zeigte sich eine komplette Blockade der Hypersensitivität bis zu 72 h nach chirurgischer Inzision. Jedoch führte diese Kombinationsbehandlung zu einer verzögerten mechanischen Hypersensitivität und Neurotoxizität. Ferner führte Capsaicin bei der Injektion durch Aktivierung des TRPV1-Kanals kurzzeitig zu einem starken Schmerzreiz. In der Zusammenschau ist diese Substanz daher für die Anwendung im klinischen Alltag ungeeignet [19].

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte eine Öffnung der perineuralen Barriere nach Applikation von hypertoner Kochsalzlösung über Interaktion mit der MMP-9 gezeigt werden. Jedoch löst hypertone Kochsalzlösung bei Injektion eine Hyperalgesie aus. Eine Alternative wäre die direkte Injektion der MMP-9; aufgrund der hohen Kosten stellt dies allerdings kein wirtschaftliches Verfahren dar [37].

Eine weitere Alternative stellt C1C2 dar, ein Peptidomimetikum von Claudin-1, welches von der ersten extrazellulären Schleife des murinen Claudin-153-81 abgeleitet wird. Es ist bekannt, dass C1C2 die Barriere durch Herabregulation der Claudin-1-Expression in Caco-2-Zellen öffnen kann [147]. Es wird diskutiert ob die C1C2-Bindung an Claudin-1 zu einer Depolymerisation der Claudin-Proteine führt oder ob die Claudin-C1C2-Komplexe in der Plasmamembran sequestrieren und somit nicht in Tight Junctions integriert werden können. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe durch Sauer et al. konnte aufgezeigt werden, dass C1C2 die Expression von Claudin-1 im Perineurium von Ratten verringert und dadurch nach Co-Applikation von DAMGO zur peripheren Analgesie führen kann [36]. Der Wnt-Signalweg scheint den Effekten von C1C2 entgegenzuwirken: die Inhibition von GSK-3 führt zur Cdx2-vermittelten Hochregulation der Claudin-1-Transkription. Für C1C2 konnte bislang keine neurotoxische Wirkung nachgewiesen werden, sodass C1C2 neben rtPA eine weitere vielversprechende neue Therapieoption in der perioperativen Analgesie darstellt.

4.8. Ausblick und klinische Einordnung

Es konnte gezeigt werden, dass rtPA über die Bindung an den LRP-1-Rezeptor zu einer vermehrten Erk Phosphorylierung führt und konsekutiv Claudin-1 in der Zellmembran des Perineuriums vermindert. Dadurch wird die perineurale Barriere durchlässig für hydrophile Analgetika wie beispielsweise DAMGO. Eine periphere Analgesie ohne Einschränkung der motorischen Funktion ist die Folge. Im Folgenden sollen erstens die

Ergebnisse hinsichtlich des Einsatzes von rtPA am Menschen eingeordnet werden und zweitens wissenschaftlich und klinisch vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen identifiziert werden.

Unsicher ist ob der oben beschriebene Effekt von rtPA und DAMGO auf den Menschen übertragbar ist. Bisher wurden die Versuche ausschließlich an Wistar Ratten durchgeführt. Eine ähnliche Wirkung ist jedoch auch im Menschen denkbar, da eine Öffnung der menschlichen Blut-Hirn-Barriere durch rtPA bekannt ist.

RtPA ist ein zugelassenes Arzneimittel zur Behandlung von akuten ischämischen Schlaganfällen, sodass ein tiefreichendes Verständnis von Wirkungen und Nebenwirkungen existiert. In unserem Tiermodell konnte für rtPA keine Neurotoxizität nachgewiesen werden. Aufgrund des bekannten Nebenwirkungsspektrums ist es vertretbar die Substanz auch am Menschen zu applizieren, da die in unserem Modell verabreichte Dosis auf das Körpergewicht bezogen 9 - 18-fach geringer war als die zur Schlaganfallbehandlung verwendeten Dosierungen.

Noch nicht ausreichend bekannt ist wie phosphoryliertes Erk erstens die Claudin-1-Transkription verringert und zweitens ob die verminderte Claudin-1-Transkription alleine dafür verantwortlich ist, dass weniger Claudin-1 in der Zellmembran zu finden ist. Möglich sind weitere intrazelluläre Mechanismen, die neben der verminderten Transkription auch z.B. zu einer Endozytose der Claudin-1 Proteine führen. In der späteren Phase konnte mittels Western Blot ein erneuter Anstieg von Claudin-1 in der Zellmembran schon vor erneuter Wiederaufnahme der Claudin-1-Transkription in der PCR gezeigt werden. Dies legt nahe, dass weitere, bisher unklare und von der Transkription unabhängige Mechanismen zur Wiederherstellung der Barrierefunktion beitragen. Diese Mechanismen genauer zu untersuchen stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar.

Interessant ist ebenfalls, dass auch regulatorische T-Zellen eine Rolle in der rtPA induzierten Schrankenstörung spielen könnten. So sind regulatorische T-Zellen nach Schlaganfällen im peripheren Blut signifikant vermindert. Dieser Abfall hält nach der Therapie mit rtPA länger an und scheint zu den Nebenwirkungen von rtPA wie z. B. intrazerebralen Blutungen beizutragen. In Mausmodellen konnte die Gabe von regulatorischen T-Zellen die rtPA-induzierte Barrierestörung im Hirn vermindern. Dieser Effekt scheint durch eine Unterdrückung von MMP-9 und CCL2 (CC-Chemokine

Ligand 2) durch die regulatorischen T-Zellen verursacht zu sein [148]. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob auch die rtPA-vermittelte LRP-1-Aktivierung durch regulatorische T-Zellen beeinflusst wird. Diese T-Zellen könnten in diesem Fall beispielsweise als Antagonist von rtPA genutzt werden, sollte es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen nach Injektion von rtPA kommen.

Unklar ist auch ob rtPA weitere Signalwege anstößt, die die Blut-Nerven Barriere beeinträchtigen. So scheint z.B. in Rattenmodellen nach Simulation einer Nervenschädigung der toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) im Zusammenspiel mit dem Sonic-Hedgehog Signalweg zu einer Herabregulation von Tight Junction-Proteinen zu führen [149, 150]. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang ebenfalls eine in-vitro gesehene Interaktion mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg, der jedoch in-vivo nicht bestätigt werden konnte. In Modellen, die eine Nervenschädigung simulieren, ist häufig auch eine Veränderung des perineuralen Chemokin-Milieus zu beobachten. Palladino et al. konnten viele Chemokine identifizieren, die eine Rolle in der Homöostase des peripheren Nervens spielen [27]. So scheint u.a. oben beschriebenes CCL2 einen rtPA-vermittelten Einfluss auf die Integrität von Nervenbarrieren zu haben [148]. Ebenso sind nach der Simulation einer Nervenschädigung am peripheren Nerven von Ratten, die mit einer Herabregulation von Tight Junction-Proteinen einhergeht, CXCL5 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5) und CXCR2 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2) vermehrt im Rückenmark nachzuweisen [151]. Die genaue Untersuchung des peri- und intraneuralen Chemokinmilieus am peripheren Nerven könnte daher zum besseren Verständnis der Signalwege nach rtPA Applikation beitragen.

Es bedarf trotz all dieser vielversprechenden Ergebnisse noch weiterer Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich Nebenwirkungen und Verträglichkeit, bevor Substanzen wie rtPA bzw. rtPAi im klinischen Alltag Verwendung finden können.

5. Zusammenfassung

Zur Durchführung peripherer Nervenblockaden werden im klinischen Alltag nichtselektive Lokalanästhetika verwendet, die neben sensorischen auch motorische Nervenfasern blockieren. Diese Arbeit untersucht und beschreibt Grundlagen für die Verwendung selektiv wirksamer Co-Analgetika. Ziel dieser Arbeit war in diesem Kontext die Analyse der intrazellulären Signalwege, welche nach Applikation von rtPA am peripheren Nerven zur Öffnung der perineuralen Barriere und so zu einer opiat-vermittelten Analgesie führen. Gemäß unserer Hypothese bindet rtPA an den LRP-1-Rezeptor und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus: Erk wird phosphoryliert und inhibiert über bislang unklare Mechanismen die Claudin-1-Transkription. Claudin-1 wird weniger in die Zellmembran eingebaut und/oder verlässt durch Endozytose/Internalisierung die Zellmembran, was zur Öffnung der perineuralen Barriere führt und den Durchtritt selektiv wirksamer Analgetika erlaubt. In der späteren Phase steht die Analyse der Wiederherstellung der Barrierefunktion der Zellmembran im Vordergrund. Die ist von zentraler Bedeutung um eine Schädigung des Nervens durch das Umgebungsmilieu zu verhindern. Vermutlich wird die Wiederherstellung der Barrierefunktion über den Wnt-Signalweg gesteuert. Die Akkumulation von β -Catenin und Cdx2 führt zu einem erneuten Anstieg der Claudin-1-Transkription. Der Claudin-1-Gehalt steigt in Western Blot-Untersuchungen jedoch bereits zu einem früheren Zeitpunkt in der Zellmembran wieder an. Dies legt nahe, dass weitere von der Transkription unabhängige Mechanismen zur Wiederherstellung der Barrierefunktion beitragen. Eine mögliche Alternative zu rtPA stellt katalytisch inaktives rtPAi dar, welches in Untersuchungen ähnliche Ergebnisse wie rtPA zeigte. Dabei könnte die Verwendung von rtPAi anstatt rtPA pathophysiologisch denkbare Komplikationen wie beispielsweise Blutungen verhindern.

In Versuchen anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe wurde die Öffnung der perineuralen Barriere mittels immunhistochemischer und funktioneller Untersuchungen bestätigt. Auch konnten keine akute Neurotoxizität oder Blutungsgefahr beobachtet werden. Somit stellt rtPA in Kombination mit Opioiden eine mögliche Alternative zur Verbesserung der postoperativen Analgesie dar, die jedoch weiterer Untersuchungen hinsichtlich von Nutzen, Risiken und Nebenwirkungen bedarf.

6. Summary

Regional postoperative pain treatment with non-selective local anesthetics does not only block nociception but also the motoric function of the nerve. This thesis describes and examines principles for the utilization of selective co-analgesics. Aim of this study was to analyze the intracellular signaling-pathways after application of rtPA to the peripheral nerve. The application leads to an opening of the blood-nerve-barrier and to an opioid-mediated analgesia. We postulate that rtPA binds to the LRP-1-receptor and leads via phosphorylation of Erk to a downregulation of Claudin-1-transcription. The mechanism of downregulation is unknown. Claudin-1 is less incorporated into the cell membrane and/or it is removed by endocytosis. This leads to an opening of the blood-nerve-barrier and hydrophilic analgesics like opioids can reach the nerve. After the opening of the barrier we analyzed the mechanisms which lead to a restitution of the barrier-function. This step is important to assure that the nerve is protected from the environment. Our theory is that the Wnt-signaling-pathway is responsible for reestablishing the barrier. An accumulation of β -Catenin and Cdx2 leads to a resumption of Claudin-1-transcription. However Western Blot investigations showed an earlier rise of Claudin-1 in the cell-membrane. This indicates that there are other, from transcription independent mechanisms, that lead to restitution of the barrier-function. Catalytic inactive rtPA_i is a promising alternative to rtPA as it shows similar effects without possible side effects like bleedings.

Immunohistochemistry and behavioral tests performed by other members of the group confirmed the opening of the blood-nerve-barrier after application of rtPA. No acute neurotoxicity or bleedings have been observed. Therefore, we postulate that rtPA in combination with opioids is an interesting new alternative to mediate postoperative analgesia. However, we still need further investigations to learn more about the benefit, risks and side effects of rtPA application to the peripheral nerve.

7. Quellen

1. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. Prog Neurobiol, 1999. **57**(1): p. 1-164.
2. (UICC), U.f.I.C.C., *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*, M.K.G.E. James D. Brierley (Editor), Christian Wittekind (Editor), Editor. 2017, Wiley-Blackwell.
3. Wu, C.L. and S.N. Raja, *Treatment of acute postoperative pain*. Lancet, 2011. **377**(9784): p. 2215-25.
4. N. Roewer, H.T., *Taschenatlas Anästhesie*. Vol. 5. 2013. 86, 244, 340.
5. Rawal, N., *Current issues in postoperative pain management*. Eur J Anaesthesiol, 2016. **33**(3): p. 160-71.
6. Ong, C.K., et al., *The efficacy of preemptive analgesia for acute postoperative pain management: a meta-analysis*. Anesth Analg, 2005. **100**(3): p. 757-73, table of contents.
7. Jakobsson, J. and M.Z. Johnson, *Perioperative regional anaesthesia and postoperative longer-term outcomes*. F1000Res, 2016. **5**.
8. Ilfeld, B.M., *Continuous Peripheral Nerve Blocks: An Update of the Published Evidence and Comparison With Novel, Alternative Analgesic Modalities*. Anesth Analg, 2017. **124**(1): p. 308-335.
9. H. Beck, E.M., *Schmerztherapie*. 2002: G. Hempelmann.
10. Kehlet, H., *Surgical stress: the role of pain and analgesia*. Br J Anaesth, 1989. **63**(2): p. 189-95.
11. Ilfeld, B.M., K.B. Duke, and M.C. Donohue, *The association between lower extremity continuous peripheral nerve blocks and patient falls after knee and hip arthroplasty*. Anesth Analg, 2010. **111**(6): p. 1552-4.
12. Capdevila, X., et al., *Continuous peripheral nerve blocks in hospital wards after orthopedic surgery: a multicenter prospective analysis of the quality of postoperative analgesia and complications in 1,416 patients*. Anesthesiology, 2005. **103**(5): p. 1035-45.
13. Kandasami, M., et al., *Femoral nerve block for total knee replacement - a word of caution*. Knee, 2009. **16**(2): p. 98-100.
14. Park, C.J., et al., *Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line*. J Dent Res, 2005. **84**(9): p. 852-7.
15. Sakura, S., et al., *Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels*. Anesth Analg, 1995. **81**(2): p. 338-46.
16. Byram, S.C., et al., *Bupivacaine increases the rate of motoneuron death following peripheral nerve injury*. Restor Neurol Neurosci, 2017.
17. Binshtok, A.M., B.P. Bean, and C.J. Woolf, *Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 607-10.
18. Carnevale, V. and T. Rohacs, *TRPV1: A Target for Rational Drug Design*. Pharmaceuticals (Basel), 2016. **9**(3).
19. Peters, C.M., et al., *Nociceptor-selective peripheral nerve block induces delayed mechanical hypersensitivity and neurotoxicity in rats*. Anesthesiology, 2014. **120**(4): p. 976-86.
20. Catterall, W.A., *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **26**(1): p. 13-25.
21. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *Overview of the voltage-gated sodium channel family*. Genome Biol, 2003. **4**(3): p. 207.
22. Schmalhofer, W.A., et al., *ProTx-II, a selective inhibitor of Nav1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(5): p. 1476-84.
23. Koneru, A., S. Satyanarayana, and S. Rizwan, *Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors*. Vol. 3. 2009.
24. Dhawan, B.N., et al., *International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors*. Pharmacol Rev, 1996. **48**(4): p. 567-92.
25. Haseloff, R.F., et al., *Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **38**: p. 16-25.
26. Benninghoff, D., *Anatomie Band 1*. 2008. **17**.: p. 194/195.
27. Palladino, S.P., et al., *The Human Blood-Nerve Barrier Transcriptome*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17477.
28. Pummi, K.P., et al., *Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(8): p. 1037-46.
29. Gamble, H.J. and R.A. Eames, *An Electron Microscope Study of the Connective Tissues of Human Peripheral Nerve*. J Anat, 1964. **98**: p. 655-63.
30. Olsson, Y. and T.S. Reese, *Permeability of Vasa Nervorum and Perineurium in Mouse Sciatic Nerve Studied by Fluorescence and Electron Microscopy*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1971. **30**(1): p. 105-119.

31. Alanne, M.H., et al., *Tight junction proteins in human Schwann cell autotypic junctions*. J Histochem Cytochem, 2009. **57**(6): p. 523-9.
32. Reinhold, A.K. and H.L. Rittner, *Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review*. Pflugers Arch, 2017. **469**(1): p. 123-134.
33. Betz, A.L. and G.W. Goldstein, *Specialized properties and solute transport in brain capillaries*. Annu Rev Physiol, 1986. **48**: p. 241-50.
34. Anderson, J.M., *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport*. News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 126-30.
35. Drubin, D.G. and W.J. Nelson, *Origins of cell polarity*. Cell, 1996. **84**(3): p. 335-44.
36. Sauer, R.S., et al., *Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability*. J Control Release, 2014. **185**: p. 88-98.
37. Hackel, D., et al., *Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1257**: p. 199-206.
38. Mineta, K., et al., *Predicted expansion of the claudin multigene family*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 606-12.
39. Furuse, M., et al., *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice*. J Cell Biol, 2002. **156**(6): p. 1099-111.
40. Tian, R., et al., *The effect of claudin-5 overexpression on the interactions of claudin-1 and -2 and barrier function in retinal cells*. Curr Mol Med, 2014. **14**(9): p. 1226-37.
41. D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin, *Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26233-40.
42. Fujibe, M., et al., *Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions*. Exp Cell Res, 2004. **295**(1): p. 36-47.
43. Al-Sadi, R., et al., *Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e85345.
44. Lipschutz, J.H., et al., *Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(5): p. 3780-8.
45. Rincon-Heredia, R., et al., *Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through ERK1/2-dependent pathways*. Exp Cell Res, 2014. **320**(1): p. 108-18.
46. Kim, B. and S. Breton, c. Biol Reprod, 2016. **94**(1): p. 22.
47. Hackel, D., et al., *Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(29): p. E2018-27.
48. Steinbrocker, O., et al., *Observations on pain produced by injection of hypertonic saline into muscles and other supportive tissues*. J Clin Invest, 1953. **32**(10): p. 1045-51.
49. Graven-Nielsen, T., et al., *In vivo model of muscle pain: quantification of intramuscular chemical, electrical, and pressure changes associated with saline-induced muscle pain in humans*. Pain, 1997. **69**(1-2): p. 137-43.
50. Alessandri-Haber, N., et al., *TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator*. Pain, 2005. **118**(1-2): p. 70-9.
51. Dong, M.X., et al., *Recombinant Tissue Plasminogen Activator Induces Neurological Side Effects Independent on Thrombolysis in Mechanical Animal Models of Focal Cerebral Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158848.
52. Jaffer, H., I.M. Adjei, and V. Labhasetwar, *Optical imaging to map blood-brain barrier leakage*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3117.
53. Goto, H., et al., *Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain*. J Neurotrauma, 2007. **24**(4): p. 745-52.
54. Yepes, M., et al., *Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein*. J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1533-40.
55. Michalski, D., et al., *Interrelations between blood-brain barrier permeability and matrix metalloproteinases are differently affected by tissue plasminogen activator and hyperoxia in a rat model of embolic stroke*. Med Gas Res, 2012. **2**(1): p. 2.
56. Zhang, C., et al., *Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(12): p. 1946-54.
57. Niego, B. and R.L. Medcalf, *Plasmin-dependent modulation of the blood-brain barrier: a major consideration during tPA-induced thrombolysis?* J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(8): p. 1283-96.
58. Gurman, P., et al., *Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): a review*. Clin Pharmacol Ther, 2015. **97**(3): p. 274-85.
59. Ortolano, S. and C. Spuch, *tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP5*. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2013. **7**(1): p. 65-76.

60. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
61. Campana, W.M., et al., *The low-density lipoprotein receptor-related protein is a pro-survival receptor in Schwann cells: possible implications in peripheral nerve injury*. J Neurosci, 2006. **26**(43): p. 11197-207.
62. Herz, J. and H.H. Bock, *Lipoprotein receptors in the nervous system*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 405-34.
63. Spuch, C., S. Ortolano, and C. Navarro, *LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 269.
64. Williams, S.E., et al., *A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9035-40.
65. Bu, G., *The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family*. Int Rev Cytol, 2001. **209**: p. 79-116.
66. Gotthardt, M., et al., *Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25616-24.
67. Hu, K., et al., *Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2120-7.
68. Chen, Y., et al., *Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 849-62.
69. Reijerkerk, A., et al., *Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3567-74.
70. Mantuano, E., M.S. Lam, and S.L. Gonias, *LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 34009-18.
71. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
72. Villarejo, A., et al., *Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 930-41.
73. Martinez-Estrada, O.M., et al., *The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 2): p. 449-57.
74. Zhao, H.B., et al., *E-cadherin, as a negative regulator of invasive behavior of human trophoblast cells, is down-regulated by cyclosporin A via epidermal growth factor/extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway*. Biol Reprod, 2010. **83**(3): p. 370-6.
75. Gortazar, A.R., et al., *Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and beta-catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8168-75.
76. Lickert, H., et al., *Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine*. Development, 2000. **127**(17): p. 3805-13.
77. Bhat, A.A., et al., *Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37174.
78. Mankertz, J., et al., *Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(4): p. 1001-7.
79. Randall, L.O. and J.J. Selitto, *A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1957. **111**(4): p. 409-19.
80. Yang, S., et al., *Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier*. Biomaterials, 2016. **82**: p. 20-33.
81. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
82. Biji T. Kurien, R.H.S., *Western blotting*. Methods 2006. **38**(4): p. 283-293.
83. Walker, J.M., *The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 5-8.
84. J.M., W., *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation.*, in Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. 2002: Humana Press.

85. Gallagher, S., Winston (tank transfer systems), S. E., Fuller (tank transfer systems), S. A. and Hurrell (tank transfer systems; reversible staining of proteins), J. G., *Immunoblotting and Immunodetection*. Current Protocols in Molecular Biology, 2008. **83**(III): p. 10.8.1–10.8.28.
86. SF., G., *The Embryological Origins of the Gene Theory*, in *Developmental Biology 6th Edition*, S.M.S. Associates, Editor. 2000, Sinauer Associates.
87. Holzapfel, B.a.W., L. , *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**: p. 120–126.
88. Biosystems, A., *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*. 2008.
89. Mambretti, E.M., et al., *Functional and structural characterization of axonal opioid receptors as targets for analgesia*. Mol Pain, 2016. **12**.
90. Boecker, A., *Intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse bei der Öffnung des Perineuriums*, in *Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg*. 2014, Würzburg: Würzburg. p. 76.
91. Tondeleir, D., et al., *Beta-actin is required for proper mouse neural crest ontogeny*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85608.
92. Kang, Y., et al., *Evaluation of reference genes for gene expression studies in mouse and N2a cell ischemic stroke models using quantitative real-time PCR*. BMC Neurosci, 2018. **19**(1): p. 3.
93. Gorzelniak, K., et al., *Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes*. Horm Metab Res, 2001. **33**(10): p. 625-7.
94. Nystrom, K., et al., *Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells*. J Virol Methods, 2004. **118**(2): p. 83-94.
95. Bemeur, C., et al., *Decreased beta-actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat*. Neurosci Lett, 2004. **357**(3): p. 211-4.
96. Lin, J. and C. Redies, *Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression*. Dev Genes Evol, 2012. **222**(6): p. 369-76.
97. Ruan, W. and M. Lai, *Actin, a reliable marker of internal control?* Clin Chim Acta, 2007. **385**(1-2): p. 1-5.
98. Liu, N.K. and X.M. Xu, *beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury*. J Neurotrauma, 2006. **23**(12): p. 1794-801.
99. Romero-Calvo, I., et al., *Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots*. Anal Biochem, 2010. **401**(2): p. 318-20.
100. Wittwer, C.T., et al., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. Biotechniques, 1997. **22**(1): p. 130-1, 134-8.
101. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
102. Suzuki, M.T. and S.J. Giovannoni, *Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(2): p. 625-30.
103. Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, and G.S. Dveksler, *General concepts for PCR primer design*. PCR Methods Appl, 1993. **3**(3): p. S30-7.
104. Smith, C.J. and A.M. Osborn, *Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology*. FEMS Microbiol Ecol, 2009. **67**(1): p. 6-20.
105. Glasel, J.A., *Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios*. Biotechniques, 1995. **18**(1): p. 62-3.
106. LEHNINGER, A.L., *Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function (2nd Edition)*. . 1975, New York: Worth Publ. Inc.
107. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
108. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
109. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
110. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
111. Van Weemen, B.K. and A.H. Schuurs, *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Lett, 1971. **15**(3): p. 232-236.
112. Woolley, C.F., et al., *Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(28): p. 8605-15.
113. Mann, M., et al., *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 261-8.
114. Leitner, A., M. Sturm, and W. Lindner, *Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review*. Anal Chim Acta, 2011. **703**(1): p. 19-30.

115. Yang, F., et al., *Tissue plasminogen activator expression and barrier properties of human brain microvascular endothelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(4): p. 631-8.
116. Jin, R., G. Yang, and G. Li, *Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator*. Neurobiol Dis, 2010. **38**(3): p. 376-85.
117. Golab, P., et al., *The rtPA increases MMP-9 activity in serum during ischaemic stroke*. Neurol Neurochir Pol, 2014. **48**(5): p. 309-14.
118. Mishiro, K., et al., *A broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor prevents hemorrhagic complications induced by tissue plasminogen activator in mice*. Neuroscience, 2012. **205**: p. 39-48.
119. Berta, T., et al., *Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1beta and ERK signaling in the spinal cord of mice*. Neuroscience, 2013. **247**: p. 376-85.
120. Abu Fanne, R., et al., *Blood-brain barrier permeability and tPA-mediated neurotoxicity*. Neuropharmacology, 2010. **58**(7): p. 972-80.
121. Niego, B., et al., *t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes*. Blood, 2012. **119**(20): p. 4752-61.
122. Nassar, T., et al., *In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone*. Blood, 2004. **103**(3): p. 897-902.
123. Armstead, W.M., D.B. Cines, and A.A. Higazie, *Plasminogen activators contribute to age-dependent impairment of NMDA cerebrovasodilation after brain injury*. Brain Res Dev Brain Res, 2005. **156**(2): p. 139-46.
124. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. Physiol Rev, 2013. **93**(2): p. 525-69.
125. Tokumasu, R., et al., *Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(28): p. E4061-8.
126. Li, L., et al., *A cannabinoid receptor 2 agonist reduces blood-brain barrier damage via induction of MKP-1 after intracerebral hemorrhage in rats*. Brain Res, 2018.
127. Nunbhakdi-Craig, V., et al., *Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex*. J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 967-78.
128. Furuse, M., H. Sasaki, and S. Tsukita, *Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands*. J Cell Biol, 1999. **147**(4): p. 891-903.
129. Muller, D., et al., *A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(6): p. 1293-301.
130. Xie, L., et al., *FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3503-11.
131. Chang, B., et al., *The role of FoxO4 in the relationship between alcohol-induced intestinal barrier dysfunction and liver injury*. Int J Mol Med, 2013. **31**(3): p. 569-76.
132. Reinhold, A.K., et al., *Tissue plasminogen activator and neuropathy open the blood-nerve barrier with upregulation of microRNA-155-5p in male rats*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019.
133. Ebnet, K., et al., *Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 1): p. 19-29.
134. Scheiermann, C., et al., *Expression and function of junctional adhesion molecule-C in myelinated peripheral nerves*. Science, 2007. **318**(5855): p. 1472-5.
135. Katsuno, T., et al., *Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2465-75.
136. Lin, L., et al., *tPA activates LDL receptor-related protein 1-mediated mitogenic signaling involving the p90RSK and GSK3beta pathway*. Am J Pathol, 2010. **177**(4): p. 1687-96.
137. Wang, W., et al., *GSK-3beta inhibitor TWS119 attenuates rtPA-induced hemorrhagic transformation and activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway after acute ischemic stroke in rats*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(10): p. 7028-7036.
138. Krejci, P., et al., *Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/beta-catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct beta-catenin phosphorylation*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35826.
139. Balami, J.S., B.A. Sutherland, and A.M. Buchan, *Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischaemic stroke*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013. **12**(2): p. 155-69.
140. Neurologie, H.v.d.K.L.d.D.G.f.r., *Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Rekanalisierende Therapie (Ergänzung 2015)*, H.P.D.R.V. rof. Dr. Peter A. Ringleb, London, Editor. Online seit: 29. Februar 2016; Gültig bis: 5. Oktober 2020.
141. Kozai, T., et al., *Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury*. Glia, 2007. **55**(6): p. 595-603.

142. Soderberg, L., et al., *Ultralong peripheral nerve block by lidocaine:prilocaine 1:1 mixture in a lipid depot formulation: comparison of in vitro, in vivo, and effect kinetics*. *Anesthesiology*, 2006. **104**(1): p. 110-21.
143. Dyhre, H., et al., *Local anesthetics in lipid-depot formulations--neurotoxicity in relation to duration of effect in a rat model*. *Reg Anesth Pain Med*, 2006. **31**(5): p. 401-8.
144. Sakura, S., et al., *The comparative neurotoxicity of intrathecal lidocaine and bupivacaine in rats*. *Anesth Analg*, 2005. **101**(2): p. 541-7, table of contents.
145. Irwin, W., et al., *Bupivacaine myotoxicity is mediated by mitochondria*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(14): p. 12221-7.
146. Neal, J.M., F.V. Salinas, and D.S. Choi, *Local Anesthetic-Induced Myotoxicity After Continuous Adductor Canal Block*. *Reg Anesth Pain Med*, 2016. **41**(6): p. 723-727.
147. Zwanziger, D., et al., *A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia*. *Mol Pharm*, 2012. **9**(6): p. 1785-94.
148. Mao, L., et al., *Regulatory T cells ameliorate tissue plasminogen activator-induced brain haemorrhage after stroke*. *Brain*, 2017. **140**(7): p. 1914-1931.
149. Moreau, N., et al., *Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development*. *Pain*, 2016. **157**(4): p. 827-39.
150. Moreau, N., et al., *Could an endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/beta-catenin and Sonic Hedgehog pathways underlie the early disruption of the infra-orbital blood-nerve barrier following chronic constriction injury?* *Mol Pain*, 2017. **13**: p. 1744806917727625.
151. Xu, W., et al., *Spinal CXCL5 contributes to nerve injury-induced neuropathic pain via modulating GSK-3beta phosphorylation and activity in rats*. *Neurosci Lett*, 2016. **634**: p. 52-59.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokine Ligand 2
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
Cdx	Caudalhomeobox Protein
CXCL5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DAMGO	(D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol)-Enkephalin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Erk	Extrazellular Regulated Kinase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FOXO	Forkhead-Box-Protein O
GSK	Glycogensynthase Kinase
HRP	horseradish peroxidase
IDV	Intensity densitiy value
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
LEF-1	Lymphoid Enhancer Binding Factor-1
LRP-1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
MAP	Mitogen-activated Protein
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDCK	Mardin-Darby canine kidney
miR	microRNA
Mek	Synonym: MAP-Kinase
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N2a	Neuro 2a Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRK-49F	normal rat kidney fibroblasts-49F Zellen
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitoren
PC12	Pheochromocytoma12 Zellen

PCR	Polychainreaction
PNS	peripheres Nervensystem
PPT	Pfotendrucktest
RAP	receptor associated protein
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rtPA	rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
rtPAi	katalytisch inaktiver rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
rtPCR	real-time PCR
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR-4	toll-like Rezeptor-4
TrK	Tyrosin-Kinase
TRPV-1	Transient Receptor Potential Cation Channel Unterfamilie Vanilloid
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1	Zona Occludens-1

8.2. Abbildungsverzeichnis

Die Abbildungen 8 – 10 wurden mit Hilfe von smart Servier medical art erstellt.

Die Genehmigungen zur Verwendung der Abbildungen wurden - soweit erforderlich – eingeholt. Die jeweilige Ursprungsquelle wird in der Abbildungslegende aufgeführt.

Abb. 1. Anatomie der Blut-Nerven Schranke.....	7
Abb. 2. Transepithelialer Stoffaustausch.....	7
Abb. 3: Schrankenstörung durch rtPA.....	10
Abb. 4: Plasmin Aktivierung und Degradierung.....	11
Abb. 5: Co-Rezeptoren des LRP-1-Rezeptors.....	13
Abb. 6: RtPA öffnet funktionell die Blut-Nerven-Schranke.....	15
Abb. 7: RtPA reduziert Claudin-1 in der Zellmembran.....	16
Abb. 8: Signalweg in der frühen Phase.....	17
Abb. 9: Signalweg in der späten Phase.....	18
Abb. 10: Interaktion mit dem Signalweg.....	19
Abb. 11. Western Blot.....	24
Abb. 12. Aufbau des Blots.....	29

Abb. 13: Methode zu Herstellung von cDNA.....	33
Abb. 14. Typisches Temperaturprofil einer PCR-Reaktion	34
Abb. 15: rtPA führt zu einer vermehrten Phosphorylierung von Erk und einer Reduktion von Claudin-1..	39
Abb. 16: rtPA führt nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung von GSK, aber zu einem späten Anstieg von β -Catenin und Cdx2	40
Abb. 17: Veränderung von Erk nach Interaktion mit dem Signalweg	42
Abb. 18: rtPA und rtPAi induzieren Barriereöffnung über LRP-1 und die Phosphorylierung von Erk	53
Abb. 19: rtPA vermittelt die Barriereöffnung über miR	56
Abb. 20: Keine Schädigung des Nervs nach perineuraler rtPA Injektion.....	60

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper und Primer	20
Tabelle 2: Inhibitoren und Enzyme	21
Tabelle 3: Geräte I.....	21
Tabelle 4: Geräte II.....	22
Tabelle 5 und 6: EP- und RIPA-Puffer.....	25
Tab. 7: Pipettierschema der Standardreihe	26
Tab. 8 und 9: Zusammensetzung von 3 und 0,5 M Tris	27
Tab. 10 und 11: Zusammensetzung 10 % APS und 20 % SDS	27
Tabellen 12 und 13: Zusammensetzung der Acrylamid-Trenngele mit 10 und 12 % Acrylamid.....	28
Tabellen 14 und 15: Zusammensetzung des Acrylamid-Sammelgels und von Lämmli.....	28
Tab. 16 und 17: Zusammensetzung der SDS-Laufpuffer	29
Tab. 18: Zusammensetzung des Semi-Dry Transferpuffers.....	30
Tab. 19 und 20: Zusammensetzung von TBS-T Waschlösung	30
Tab. 21 und 22: Zusammensetzung von Coomassie- und Entfärber Lösung	30
Tab. 23 und 24: Zusammensetzung von Blockier Lösung und Blockier Lösung mit 2,5 % BSA.....	31

8.4. Reagenzien

Reagenz	Firma	Katalognummer	Volumen
Acylamid/Bisacrylamid 30:2	Carl Roth	3029.2	500 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth	9592.3	50 g
β -Mercaptoethanol	Sigma	T9281	100 ml
Bromphenolblau	Sigma	B0126	25 g
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma	A7906	50 g
cDNA Kit (High capacity cDNA reverse transcriptase)	AppliedBiosystems	4368814	200 reactions
Chloroform	Roth	UN1888	1000 ml
Complete Tablette	Roche	05892970	30 Tbl.
Essigsäure	Sigma Aldrich	33209	1 L
Ethanol	Merck	1.00980.0500	500 ml
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth	3619.1	1 kg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma	E4378	25 g
Glycerol	Invitrogen	15514-011	
Glycin	AppliChem	A1377	1 kg
H ₂ O Aqua	B. Braun	0082479E	1 L
25% HCL (Salzsäure)	AppliChem	A0658	1L
Hepes Puffer	AppliChem	A1069	500 g
Isopropanol	Merck	1.09634.1000	1000 ml
Lumi-Light Western Blotting Substrate (ECL Lösung)	Roche	12015200001	2 x 100 ml
Magermilch	AppliChem	A0830	1 kg
Methanol	Sigma Aldrich	32213	1 L
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma Aldrich	31434	1 kg
NaF (Natriumfluorid)	Sigma Aldrich	450022	25 g
Nuklease freies Wasser	Ambion	9937	50 ml

Reagenz	Firma	Katalognummer	Volumen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher	23225	1 L
Proteinmarker V	Peqlab	27-2210	250 µl
RNA „Storage-solution“	Ambion	7000	1 ml
RNase-freies Wasser	Promega	P119C	25 ml
RNase Zap	Ambion	AM 9780	
RNA later	Quiagen	MatNo 1018087	250 ml
1% SDS (Natriumlaurylsulfat) ultrapure	AppliChem	A1112	500 g
Serva-Blau G	SERVA	35050.03	100 g
SYBR Green	Thermo Fisher	AB 1162	1,25 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma	T9281	100 ml
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth	5429.3	1 kg
Triton X	Sigma	T8787	100 ml
Trizol	Invitrogen	15596-026	100 ml
Tween 20	Sigma	P7949	100 ml

Nicht aufgeführt sind mit Hilfe der gelisteten Chemikalien selbst angesetzte Lösungen. Auf diese wurde an der Stelle ihrer jeweiligen Verwendung einzeln eingegangen werden. Soweit nicht anders erwähnt wird steriles Wasser verwendet.

9. Eidesstattliche Erklärung

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Signaling pathway of rtPA for drug delivery to the peripheral nerve for nociception-specific regional analgesia” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Signaltransduktionsweg nach rtPA-Behandlung im peripheren Nerven zur Barrierenöffnung für hydrophile Analgetika in der Regionalanästhesie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

11. Veröffentlichungen

1. "Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier"

von Shaobing Yang, Susanne M. Krug, Johanna Heitmann, Liu Hu, Ann Kristin Reinhold, Solange Sauer, Judith Bosten, Claudia Sommer, Michael Fromm, Alexander Brack, Heike L. Rittner

veröffentlicht in Biomaterials; Vol 82, March 2016, p. 20–33

2. „Das Merkelzellkarzinom: Ätiopathogenese und Management/ Merkel Cell Carcinoma: Aetiopathogenesis and Management“

von J. Heitmann, R. Houben, D. Schrama, M. Goebeler, A. Gesierich, B. Schilling

veröffentlicht in Aktuelle Dermatologie 2019; 45 (01/02): p. 60-66

12. Danksagung

Professor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer danke ich, dass ich die Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. H. L. Rittner für die angenehme Zusammenarbeit, für die geduldige und zielgerichtete Betreuung im Rahmen der Durchführung dieser Arbeit und für die zeitnahe Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

Danken möchte ich auch Frau Dr. J. Bosten, Herrn Dr. A. Boecker, Frau Dr. S. Sauer und Herrn S. Yang für die unterstützende und produktive Zusammenarbeit in der Vorbereitung und während der Durchführung der Versuche und der Erstellung dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir meine Ausbildung ermöglichten und mich stets finanziell und moralisch unterstützt und angespornt haben. Ebenso danke ich meinen Brüdern für unsere gemeinsame Kindheit und unseren Zusammenhalt. Des Weiteren gilt mein Dank Moritz Huttelmaier, der mich immer motiviert hat und mir mit Rat und Tat zur Seite steht.