



**Die Veränderungen der Tight Junction-Proteine der
Blut-Rückenmarkschranke in einem neuropathischen Schmerzmodell
bei Ratten**

Tight junction proteins in the blood-spinal cord barrier in neuropathic pain

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von
Juliane Kirchner

aus
Nördlingen

Würzburg, 2020

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

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

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Tobias Langenhan

3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Erhard Wischmeyer

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

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

*Für meine lieben Eltern
Helga & Peter*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
1 Einleitung	1
1.1 Schmerz und Nozizeption	1
1.2 Neuropathischer Schmerz	4
1.2.1 Neuropathischer Schmerz im klinischen Alltag	5
1.3 Tiermodelle des neuropathischen Schmerzes	6
1.4 Blut-Rückenmarkschranke	8
1.4.1 Tight Junction-Proteine	9
1.4.2 Erkrankungen mit Störung der Blut-Rückenmarkschranke	11
1.4.3 Blut-Rückenmarkschranke und Neuropathie	11
1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	13
1.6 Fragestellung der Dissertation	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere	17
2.2 CCI	17
2.3 mRNA-Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR	17
2.3.1 Prinzip	17
2.3.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	18
2.3.3 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR	20
2.4 Western Blot	22
2.4.1 Probengewinnung und Proteinbestimmung	22
2.4.2 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer	23
2.4.3 Immundetektion	25
2.4.4 Densitometrie	27
2.5 Immunfluoreszenzfärbung	28
2.5.1 Prinzip	28
2.5.2 Probenaufarbeitung	28
2.5.3 Protokoll der Claudin-5- und ZO-1-Färbung	29
2.6 Verwendete Chemikalien und Kits	31
2.7 Geräte	33
2.8 Sonstige Materialien	34
2.9 Statistik und Auswertung	35

3	Ergebnisse	36
3.1	CCI im peripheren Nerv führt zu einer Herabregulation der mRNA der Tight Junction-Proteine im lumbalen Rückenmark	36
3.2	Keine Veränderung der Tight Junction-Protein-mRNA in Endothelzellen der Kapillaren im Rückenmark	37
3.3	CCI vermindert die Proteinexpression der Membranfraktion von Occludin, wohingegen andere Tight Junction-Proteine unverändert bleiben	38
3.4	CCI führt zu einer Reduktion der Claudin-5-mRNA und zu einer verminderten Immunreaktivität in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks	40
3.5	CCI führt zu einer reduzierten ZO-1-Expression im lumbalen Rückenmark und verminderter Immunreaktivität in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks	42
3.6	Ergebnisse im Überblick	44
4	Diskussion	45
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4.2	Diskussion der Methoden	45
4.2.1	PCR	45
4.2.2	Western Blot	47
4.2.3	Kapillarisolierung und immunhistochemische Färbung	47
4.3	Diskussion der Ergebnisse	48
4.3.1	Tight Junction-Proteine in der Blut-Rückenmarkschranke	48
4.3.2	Tight Junction-Proteine und Neuroinflammation	54
4.4	Ausblick	55
5	Anhang	57
5.1	Literaturverzeichnis	57
5.2	Abbildungsverzeichnis	65
5.3	Tabellenverzeichnis	66
5.4	Abkürzungsverzeichnis	67
5.5	Publikation	69
5.6	Eidesstattliche Erklärung/Affidavit	71
5.7	Danksagung	73

Zusammenfassung

Neuropathische Schmerzen treten in der klinischen Praxis häufig auf und beeinträchtigen in hohem Maße die Lebensqualität der Patienten. Bedingt durch eine Schädigung somatosensorischer Nervenstrukturen im peripheren oder zentralen Nervensystem ist der Schmerz meist durch eine Allodynie, Hyperalgesie oder einschießende Schmerzen charakterisiert. Diese Symptome lassen sich durch gängige Schmerzmittel kaum lindern. In jüngerer Zeit rückte die Blut-Rückenmarkschranke immer mehr in den Fokus verschiedener Untersuchungen, da auch einige nicht-schmerzhaftes Erkrankungen (z.B. Multiple Sklerose und Amyotrophe Lateralsklerose) zur Veränderung dieser Barriere mit folgender Permeabilitäts-erhöhung durch reduzierte Tight Junction-Protein-Expression führen. Die Blut-Rückenmarkschranke dichtet Gefäße des Rückenmarks ab und verhindert das Eindringen toxischer oder proanalgetischer Mediatoren in das zentrale Nervensystem. Dafür ist die Funktion der Tight Junction-Proteine zur Aufrechterhaltung dieser Barriere essentiell. Dennoch konnte die Rolle der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie noch nicht vollständig erörtert werden. Die Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass eine lockere Ligatur des N. ischiadicus bei Ratten (CCI; chronic constriction injury) zur Entwicklung einer thermischen und mechanischen Hyperalgesie sowie eingeschränkten motorischen Funktionen führt. Zudem konnte eine Störung der Blut-Rückenmarkschranke nach einer CCI nachgewiesen werden, da es Tracern unterschiedlicher molekularer Größe möglich war das Rückenmark zu penetrieren. Daher sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden, inwieweit es zu einer Veränderung unterschiedlicher Tight Junction-Proteine nach peripherer Nervenverletzung (CCI) kommt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine CCI zu einer Herabregulation der mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-19, Tricellulin und Occludin im Rückenmark führt, wobei diese Veränderungen insbesondere 7 und 14 d nach der CCI auftraten. Die membranäre Expression dieser Proteine im Rückenmark blieb bis auf Occludin unverändert, das 7 d nach der CCI signifikant reduziert war. Am deutlichsten waren jedoch Claudin-5 und ZO-1 verändert. Folglich vermindert eine CCI signifikant die Claudin-5-mRNA sowie die Immunreaktivität in isolierten Kapillaren des Rückenmarks. Das Ankerprotein ZO-1 war sogar auf allen Ebenen, also in der Gen- als auch Proteinexpression, und darüber hinaus in den Rückenmarkskapillaren signifikant reduziert.

Die Interpretation dieser Ergebnisse legt nahe, dass ZO-1, und zum Teil auch Claudin-5, für die gestörte Blut-Rückenmarkschranke verantwortlich sind und die anderen untersuchten Proteine vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die Bedeutung der Tight Junction-Proteine in der Blut-Rückenmarkschranke konnte somit weiter untermauert werden. In zukünftigen Untersuchungen wäre es wichtig den Signalweg, der zur Veränderung der Tight Junction-Proteine führt sowie die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, um Möglichkeiten zum Wiederverschluss der Barriere zu finden. Somit könnten Therapien zur Aufrechterhaltung der Blut-Rückenmarkshomöostase den neuropathischen Schmerz unter Umständen kausal, und nicht nur symptomatisch, behandelbar machen.

Summary

Chronic neuropathic pain is common in clinical practice and it greatly impairs the quality of life of patients. Due to a lesion or disease of the peripheral or central nervous system neuropathic pain is characterized by allodynia, hyperalgesia and spontaneous pain. The treatment of neuropathic pain remains a challenge since conventional pain treatment is not effective in alleviating most types of neuropathic pain. Lately a lot of research has focussed on the function of the blood-spinal cord barrier (BSCB) since some non-painful diseases (e.g. multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis) compromise the barrier and lead to reduced tight junction protein expression. The BSCB prevents leakage of molecules such as pronociceptive and toxic mediators into the spinal cord. Tight junction proteins are essential in maintaining this barrier by restricting the paracellular diffusion pathway. Nevertheless, the pathophysiology of neuropathic pain is not completely understood. Recently, this scientific work group observed that rats with a loose ligation of the sciatic nerve (CCI) developed thermal and mechanical hypersensitivity and reduced motor performance. The BSCB became permeable for small and large tracers indicating a breakdown of the barrier. This study was therefore designed to explore selected tight junction proteins after nerve injury using CCI. The mRNA expression of claudin-1, claudin-19, tricellulin and occludin was significantly reduced at 7 and 14 days after CCI. No alteration in protein expression was observed at any chosen time point except for occludin which was significantly decreased 7 days after CCI. In addition, CCI leads to a reduction of tight junction proteins most pronounced for claudin-5 and ZO-1. Claudin-5 mRNA expression and immunoreactivity in spinal cord capillaries is significantly reduced after CCI. The

anchor protein ZO-1 is even downregulated at mRNA and protein levels in the whole lumbar spinal cord as well as in the spinal cord capillaries. In conclusion, this research shows that ZO-1 and in part claudin-5 are necessary for maintaining the BSCB while other tight junction proteins possibly play a minor role for the tightness of the barrier. These results further emphasize the importance of tight junction proteins in the BSCB. In future research the signaling pathway and regulation of these tight junction proteins should be explored as barrier sealing could be a possibility for pain relief in the future.

1 Einleitung

1.1 Schmerz und Nozizeption

Die Fähigkeit Schmerz zu empfinden ist für das Überleben und zum Schutz des menschlichen Organismus essentiell und dient deshalb als Warnsignal, das auf eine Verletzung oder Gewebeschädigung hinweist. Sowohl die physische als auch psychische Empfindung von Schmerz macht ihn zu einer komplexen Sinneswahrnehmung mit multidimensionalen Aspekten. Verdeutlicht wird dies durch die allgemeine Definition von Schmerz durch die internationale Fachgesellschaft zur Erforschung des Schmerzes: „Ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung assoziiert ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ (International Association for the Study of Pain (IASP) Taxonomy 2017, 14.12.2017, www.iasp-pain.org). Der Prozess, bei dem thermische, mechanische oder chemische Schmerzreize wahrgenommen werden nennt sich Nozizeption. Dabei werden nozizeptive Stimuli durch eine spezialisierte Gruppe von afferenten Nervenfasern, den so genannten Nozizeptoren, registriert, in elektrische Signale umgewandelt und durch primär afferente Nervenfasern weitergeleitet (Basbaum, Bautista et al. 2009). Nozizeptoren umfassen zwei Klassen von primär afferenten peripheren Nervenfasern, die sich anhand ihres Schmerzcharakters und ihrer Leitgeschwindigkeit unterscheiden. A δ -Fasern besitzen eine schwach ausgeprägte Myelinscheide, sind ca. 30–40 μm dick und leiten mit einer Geschwindigkeit von etwa 15 m/s. Im Gegensatz dazu sind C-Fasern unmyelinisiert, dünner ($< 30 \mu\text{m}$) und in ihrer Schmerzweiterleitung mit ca. 1 m/s wesentlich langsamer (Whitwam 1976). Der frühe, gut lokalisierbare Schmerz wird vor allem durch A δ -Fasern vermittelt und agiert als Schutz- und Fluchtreflex, wohingegen C-Fasern für den schlecht lokalisierbaren späten Schmerz verantwortlich sind. Die Wahrnehmung nicht-schmerzhafter mechanischer Stimuli (z.B. leichte Berührung) erfolgt durch myelinisierte, schnell leitende A β -Fasern (Basbaum, Bautista et al. 2009).

Einleitung

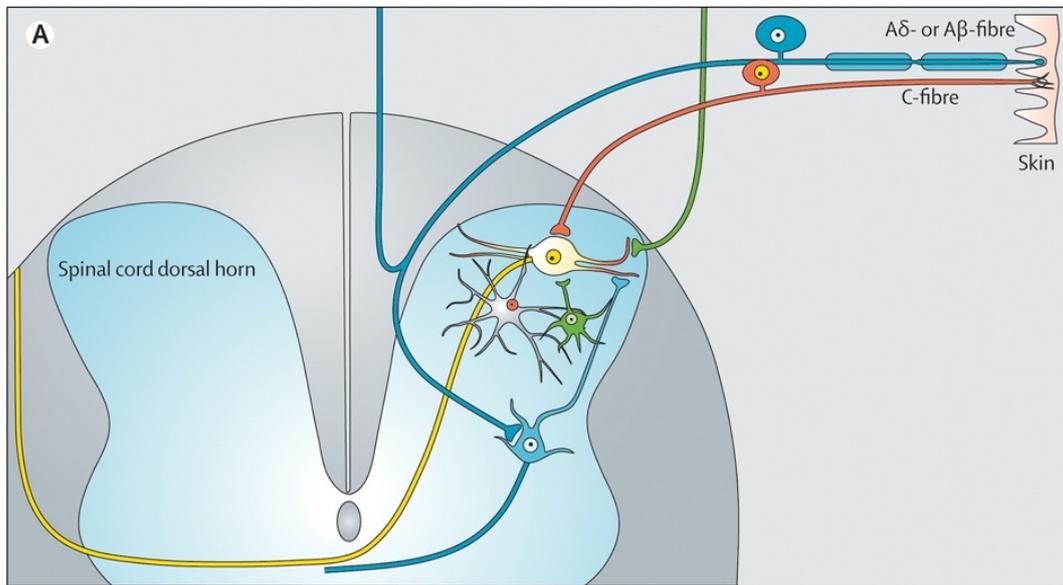


Abbildung 1: Verbindungen zwischen primär afferenten Nervenfasern und dem Rückenmark

Nozizeptive C-Fasern (rot) projizieren in spinothalamische Neurone (gelb) des Rückenmarks. WDR (wide dynamic range) Neurone (blau) empfangen Informationen von nozizeptiven A δ -Fasern und von Mechanorezeptoren über A β -Fasern. Dabei haben GABAerge Interneurone (grün) einen hemmenden Einfluss auf WDR-Neurone. Durch eine Interaktion mit Mikroglia (grau) wird die synaptische Transmission erleichtert (Baron, Binder et al. 2010).

Wie alle somatosensorischen Bahnen besitzen die aufsteigenden nozizeptiven Bahnen der Schmerzweiterleitung drei Neurone. Die Zellkörper des ersten pseudo-unipolaren primär afferenten Neurons befinden sich im Ganglion spinale sowie Ganglion trigeminale und innervieren den Kopf und den Körper. Während sich das Ganglion trigeminale ausschließlich auf die kranialen Nervenfasern beschränkt und sich von der Verschaltung auf Hirnstammebene vom Rest des Körpers unterscheidet, sind die Spinalganglien eine Ansammlung mehrerer tausend sensorischer Nervenzellkörper, die für die segmentale Innervation des Körpers verantwortlich sind. Von den Spinalganglien gelangen die zentralen Fortsätze in das Hinterhorn des Rückenmarks (2. Neuron), kreuzen in der Commissura alba zur Gegenseite und werden im Tractus spinothalamicus lateralis über die lateralen und medialen Thalamuskern (3. Neuron) zum primär motorischen Kortex und limbischen System weitergeleitet (Schaible und Richter 2004, Basbaum, Bautista et al. 2009). Die Schmerzwahrnehmung kann über eine Modulation vermindert (deszendierende Hemmung) oder verstärkt (periphere und zentrale Sensibilisierung) werden. Die Freisetzung inhibitorischer Transmitter wie Glycin, GABA und Endorphine in das Hinterhorn des Rückenmarks verursacht eine Schmerzsignalhemmung. Eine verstärkte Schmerzwahrnehmung erfolgt im Gegensatz dazu über eine periphere Sensibilisierung der

Einleitung

Nozizeptoren durch freigesetzte Schmerzmediatoren (z.B. Prostaglandine oder Bradykinin) und Neuropeptide (z.B. Substanz P oder CGRP). Auf zentraler Ebene führen Veränderungen im Rückenmark, durch zum Beispiel eine vermehrte Freisetzung von Glutamat, zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Hinterhornneurone. Längerfristig wird diese Übererregbarkeit durch genetische Veränderungen in nozizeptiven Neuronen aufrecht erhalten (Ossipov, Dussor et al. 2010, von Hehn, Baron et al. 2012). Eine graphische Darstellung der aufsteigenden Schmerzbahn wird in Abb. 2 verdeutlicht.

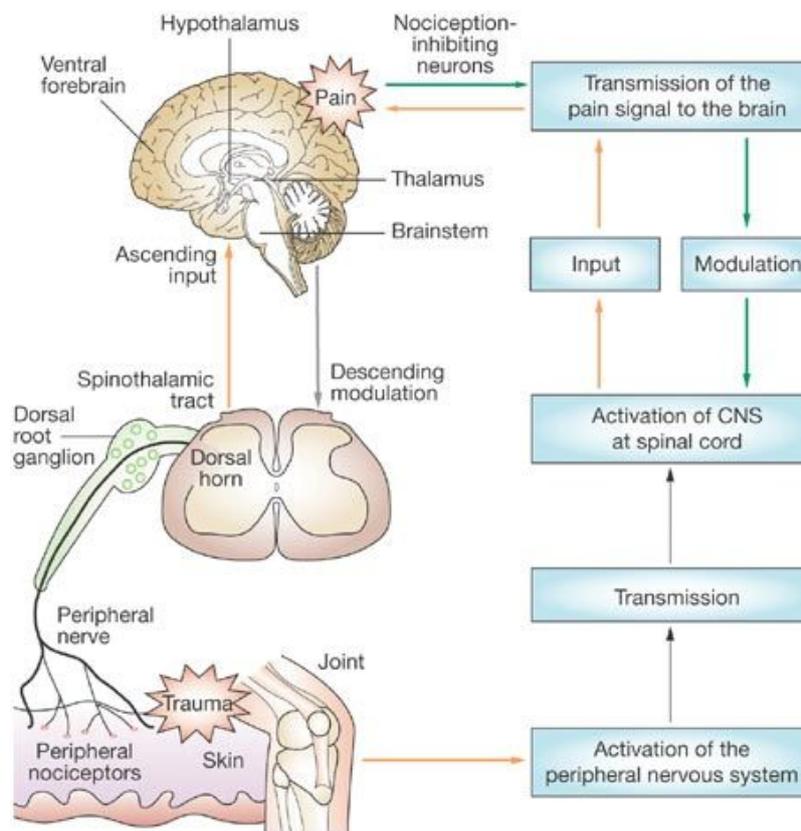


Abbildung 2: Die aufsteigende Schmerzbahn

Schmerzsignale werden vom peripheren Ort der Schmerzentstehung über afferente Nervenfasern zum Spinalganglion bzw. Rückenmark weitergeleitet. Von dort aus gelangt der Schmerzstimulus entlang des Hirnstamms in das Großhirn. Die Schmerzempfindung und -weiterleitung kann durch supraspinal gelegene Zentren moduliert werden (Bingham, Ajit et al. 2009).

1.2 Neuropathischer Schmerz

Entgegen einer Warnfunktion kann Schmerz auch spontan oder durch einen normalerweise nicht-schmerzhaften Reiz provoziert werden. Aufgrund der neuronalen Pathologie zählt dieser Schmerz zu den neuropathischen Schmerzen und wird deshalb durch die internationale Fachgesellschaft zur Erforschung des Schmerzes als „Schmerz, der durch eine Schädigung oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems verursacht wird“ definiert (International Association for the Study of Pain (IASP) Taxonomy 2017, 14.12.2017, www.iasp-pain.org). Dabei können sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem von dieser Läsion betroffen sein, wobei die Ursache eine erworbene oder genetische Erkrankung ist. Im Allgemeinen lassen sich schmerzhafte Neuropathien in vier Kategorien einteilen:

1. Periphere fokale oder multifokale Neuropathien

- Phantomschmerz
- Postherpetische Neuralgie
- Diabetische Mononeuropathie
- Posttraumatische Neuropathie

2. Periphere generalisierte Neuropathien (Polyneuropathien)

- Diabetes mellitus
- Alkohol
- HIV-Neuropathie

3. Zentrale Neuropathien

- Rückenmarksverletzung
- Multiple Sklerose
- Syringomyelie

4. Komplexe neuropathische Funktionsstörung

- Komplexes regionales Schmerzsyndrom (CRPS)

Tabelle 1: Ursachenbasierte Klassifikation von schmerzhaften Neuropathien mit einer Auswahl möglicher Differentialdiagnosen (Baron 2006)

Beispielsweise schädigen insbesondere mechanische, metabolische, entzündliche oder toxische Noxen die peripheren Nerven, wohingegen bei zentralen Neuropathien

Einleitung

(z.B. Rückenmarksverletzung oder Multiple Sklerose) primäre Prozesse im ZNS verantwortlich sind. Gekennzeichnet ist dieser Schmerz durch Hyperalgesie (gesteigertes Schmerzempfinden), Allodynie (Schmerzempfindung auf einen üblicherweise nicht-schmerzhaften Reiz) und spontan einschießende Schmerzen, die durch pathophysiologische Mechanismen im peripheren und zentralen Nervensystem zu Stande kommen. Die Nervenverletzung bedingt eine inflammatorische Reaktion und es kommt folglich zu einer erleichterten Erregbarkeit der Nozizeptoren durch molekulare Veränderungen (Baron 2006). Diese inflammatorische Reaktion ist die Folge einer Freisetzung von immunologischen Mediatoren (ATP, Prostaglandin E₂, Bradykinin) sowie proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) aus nicht-neuronalen Zellen und primär afferenten Nervenendigungen. Darauf folgende Signalkaskaden führen zu reduzierten Reizschwellen mit einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit und ektopter Impulsenstehung. Dieser Prozess wird auch als periphere Sensibilisierung bezeichnet. Auf zentraler Ebene führt die gesteigerte Aktivität der Nozizeptoren zu sekundären Veränderungen der Neurone im Rückenmark mit nachfolgender Schmerzpotenzierung. Ein wichtiger Aspekt dieser zentralen Sensibilisierung ist die Einbeziehung der synaptischen Transmission von nicht-schmerzvermittelten Afferenzen (A β -Fasern) in den Schmerzsignalweg (Cheng und Ji 2008, von Hehn, Baron et al. 2012).

1.2.1 Neuropathischer Schmerz im klinischen Alltag

Der neuropathische Schmerz stellt mit einer Prävalenz von 7–10 % in der Allgemeinbevölkerung ein relevantes Problem dar und betrifft vor allem Patienten ab dem 50. Lebensjahr (Bouhassira, Lanteri-Minet et al. 2008, Jensen und Finnerup 2014, van Hecke, Austin et al. 2014, Colloca, Ludman et al. 2017). Neben den Kardinalsymptomen Allodynie, Hyperalgesie und spontan einschießende Schmerzen leiden die Patienten auch unter Schlafstörungen, Angstzuständen und Depressionen. Dieser oftmals chronische Zustand beeinträchtigt die Lebensqualität der Patienten erheblich (Colloca, Ludman et al. 2017). Ebenso ist durch vermehrte Arztbesuche und Rezeptierungen die gesundheitsökonomische Problematik nicht außer Acht zu lassen (Attal, Lanteri-Minet et al. 2011). Aufgrund der Heterogenität des neuropathischen Schmerzes ist vor allem die Symptomkontrolle mittels Pharmakotherapie und weniger die Behandlung des kausalen Problems von Bedeutung. Dennoch sollte an erster Stelle nach einer kausalen Behandlungsmöglichkeit gesucht werden, wie zum Beispiel

Einleitung

ein gut eingestellter Diabetes mellitus bei Polyneuropathie. Ebenso ist es hilfreich zusammen mit dem Patienten realistische Therapieziele anzustreben: Schmerzreduktion um ca. 30–50 %, Verbesserung der Schlaf- und Lebensqualität sowie Erhalt der Arbeitsfähigkeit und sozialer Interaktionen (Schlereth 2019). Damit lassen sich Enttäuschungen, die wiederum zur Schmerzverstärkung führen können, vermeiden. Zur Basistherapie des neuropathischen Schmerzes werden vorwiegend Antikonvulsiva, Antidepressiva und Opioide eingesetzt, wobei eine Kombination dieser Wirkstoffklassen sinnvoll und unter Umständen durch eine topische Therapie (Lidocain, Capsaicin) ergänzt werden kann (Crucchi und Truini 2017, Fornasari 2017). Nicht-Opioide-Analgetika (NSAR, Paracetamol und Metamizol) sind aufgrund fehlender Evidenz nicht in den Therapiealgorithmen enthalten. Trotz leitliniengerechter Therapie kann eine völlige Schmerzfreiheit fast nie erreicht werden und es ist deshalb sinnvoll neue medikamentöse Angriffspunkte für die Behandlung neuropathischer Schmerzen zu finden.

1.3 Tiermodelle des neuropathischen Schmerzes

Der Großteil der Daten zur Pathophysiologie des neuropathischen Schmerzes bezieht sich auf molekulare Grundlagenforschung im Sinne von präklinischen Versuchen an Tieren (in vivo Experimente) sowie patientenbezogenen Studien (Baron, Binder et al. 2010). Demnach wurde eine Vielzahl von ätiologiebasierten Schmerzmodellen für Tiere entwickelt, um einen klinischen Schmerzzustand zu erreichen (Jaggi, Jain et al. 2011). Die neuropathischen Schmerzmodelle zielen auf reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich einer Allodynie bzw. thermischer oder mechanischer Hyperalgesie sowie des Tierverhaltens bei spontan einschießenden Schmerzen ab. Die vier am häufigsten verwendeten Schmerzmodelle sind die chronic constriction injury (CCI), die partial sciatic nerve ligation (PSL), die spinal nerve ligation (SNL), sowie die spared nerve injury (SNI).

Einleitung

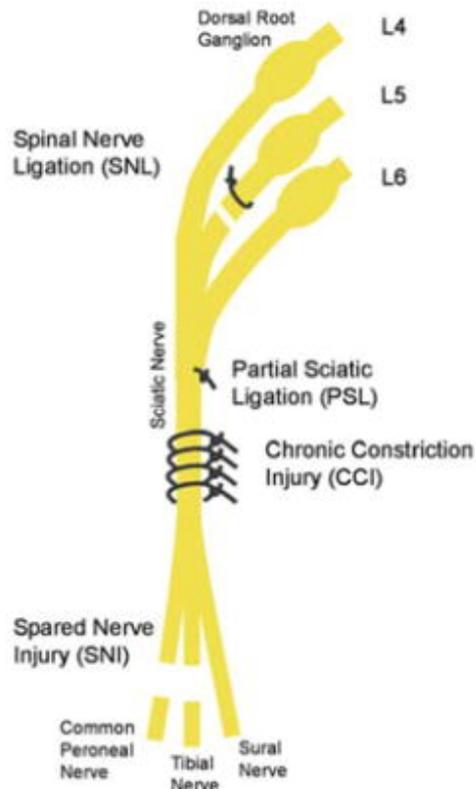


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Schmerzmodelle

Zur Erzielung eines neuropathischen Schmerzzustandes wurde in dieser Arbeit die chronic constriction injury (CCI) verwendet (Campbell und Meyer 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Induktion des neuropathischen Schmerzes die CCI verwendet. Bei der CCI wird der N. ischiadicus mit einem Faden locker ligiert, wodurch die meisten A- und C-Fasern, sowie einige Zellkörper untergehen. Über eine Dauer von ca. zwei Monaten entwickelten die Tiere spontane Schmerzen, Allodynie, sowie Hyperalgesie (Bennett und Xie 1988, Bridges, Thompson et al. 2001). Mit dieser unilateralen peripheren Mononeuropathie ist die CCI ein valides und vielfach verwendetes Schmerzmodell, das die klinische Symptomatik gut widerspiegelt. Neben der neuropathischen Komponente weist das Modell auch inflammatorische Aspekte auf. Wagner et al. zeigten, dass die Applikation eines antiinflammatorischen Peptids zur Reduktion der Schmerzsymptomatik führt (Wagner, Janjigian et al. 1998). Ein anderes Modell ist die PSL, bei der ca. die Hälfte des N. ischiadicus ligiert wird. Innerhalb weniger Stunden nach der Operation kann ebenfalls ein spontaner Schmerz, der durch das Belecken der Pfote zum Ausdruck kommt und eine Hyperalgesie oder Allodynie festgestellt werden. Dieser Zustand hält mehrere Monate an (Seltzer, Dubner et al. 1990). Bei der SNL werden im Gegensatz zum N. ischiadicus die Spinalnerven auf Höhe L5/L6 ligiert was ebenfalls zu neuropathischen Schmerzerscheinungen über

Einleitung

ca. vier Monate führt (Kim und Chung 1992). Ein Modell der partiellen Denervation ist die SNI bei dem der N. tibialis und N. peroneus communis ligiert und durchtrennt werden, wohingegen der N. suralis intakt bleibt (Decosterd und Woolf 2000). Bei diesem Modell bestehen die Symptome einer mechanischen Allodynie und thermischen Hyperalgesie im Innervationsgebiet des N. suralis über einen Zeitraum von länger als sechs Monaten.

1.4 Blut-Rückenmarkschranke

Das Rückenmark ist Bestandteil des zentralen Nervensystems und verbindet das Gehirn mit dem peripheren Nervensystem. Während sich in der grauen Substanz die Nervenzellkörper und Gliazellen befinden, besteht die weiße Substanz aus Axonen. Die Blut-Rückenmarkschranke ist essentiell, um das Rückenmark vor schädigenden Einflüssen zu schützen und den molekularen Austausch zwischen Bestandteilen des Blutes und dem Rückenmark zu regulieren (Bartanusz, Jezova et al. 2011, Reinhold und Rittner 2017).

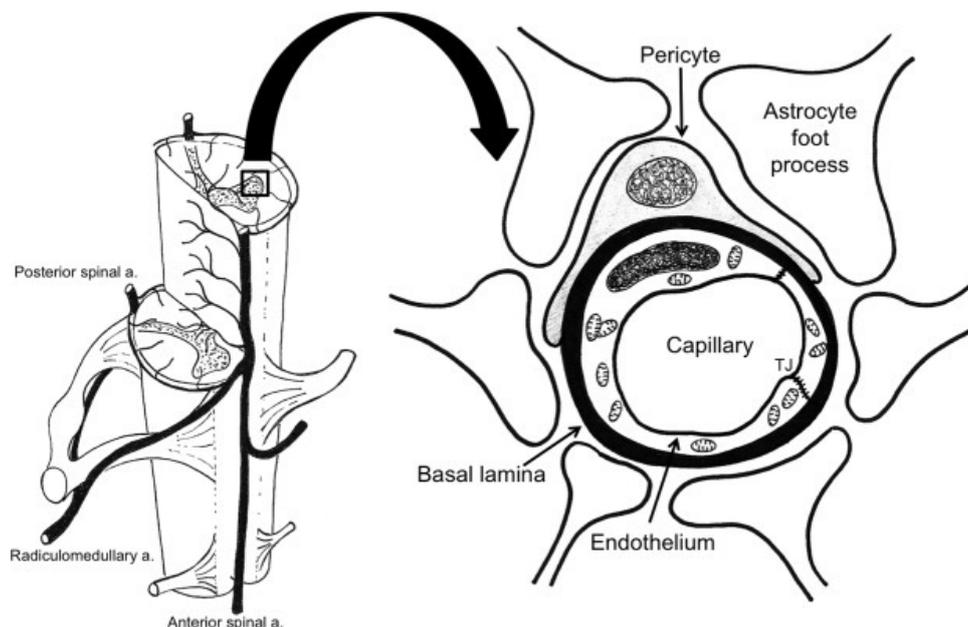


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bestandteile der Blut-Rückenmarkschranke (Bartanusz, Jezova et al. 2011)

Die Blut-Rückenmarkschranke setzt sich aus kapillaren Endothelzellen, einer Basallamina, Perizyten und Endfortsätzen der Astrozyten zusammen. Die Endothelzellen sind durch die fehlende Fenestrierung, fehlende pinozytische Vakuolen und eine große Anzahl an zytosolischen Mitochondrien gekennzeichnet. Tight

Einleitung

Junction-Proteine dichten die Endothelzellen untereinander ab (Bartanusz, Jezova et al. 2011, Reinhold und Rittner 2017). Perizyten sind Gefäßwand-assoziierte Zellen und werden durch die Basallamina von dieser getrennt. Sie regulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen. Wahrscheinlich sind die Perizyten auch für die Synthese von Bestandteilen der Basallamina (z.B. Proteoglykane und Laminin) verantwortlich (Engelhardt und Sorokin 2009). Die äußerste Schicht der Blut-Rückenmarkschranke bilden die Endfortsätze der Astrozyten. Sie dienen vor allem der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und übernehmen regulatorische Funktionen im Wasser- und Elektrolythaushalt, weshalb Astrozyten eine hohe Konzentration an Aquaporin-4-Kanälen aufweisen (Abbott, Ronnback et al. 2006). Im Vergleich zur Blut-Hirnschranke ist die Blut-Rückenmarkschranke durchlässiger gegenüber Molekülen und Zytokinen. Grund dafür ist wahrscheinlich eine verminderte Expression von ZO-1 und Occludin sowie eine verringerte Perizytenanzahl (Prockop, Naidu et al. 1995, Pan, Banks et al. 1997, Winkler, Sengillo et al. 2012).

1.4.1 Tight Junction-Proteine

Tight Junctions, welche benachbarte Epithelzellen untereinander abdichten, sind von herausragender physiologischer Bedeutung. Auf der einen Seite bilden sie eine semipermeable Barriere und limitieren den Durchtritt von Ionen, gelösten Stoffen und Zellen durch den parazellulären Raum. Auf der anderen Seite stellen sie eine apikal-basolaterale Zellpolarität her und sind bei Signalwegen der Genexpression, Zellproliferation und -differenzierung beteiligt (Guillemot, Paschoud et al. 2008). Abb. 5 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie eine dreidimensionale Schemadarstellung der Tight Junctions.

Einleitung

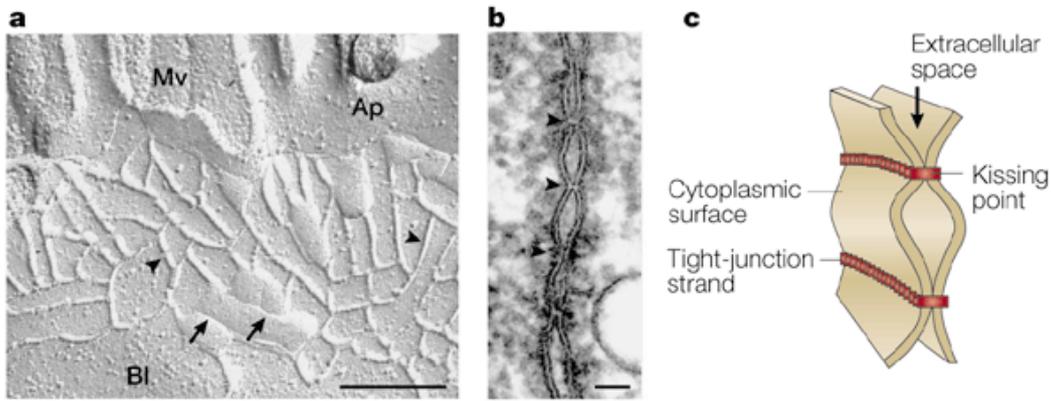


Abbildung 5: Struktur der Tight Junctions

a) Elektronenmikroskopischer Gefrierschnitt von Darmepithelzellen: Die Pfeilspitzen markieren die Tight Junctions als kontinuierliche intermembranös anastomosierende Stränge. (Mv = Mikrovilli, Ap = Apikale Membran, Bl = Basolaterale Membran, Maßstabsleiste: 200 nm) b) Aufnahme der Tight Junctions im Ultradünnschnitt: Die Pfeilspitzen markieren die Obliteration des parazellulären Spalts, den sogenannten „kissing point“ (Maßstabsleiste: 50 nm) c) Dreidimensionale schematisierte Darstellung der Tight Junctions: Tight Junction Stränge benachbarter Zellen lagern sich aneinander und dichten den parazellulären Spalt ab (Tsukita, Furuse et al. 2001).

Die Tight Junction-Proteine können in Claudine und Tight Junction-assoziierte MARVEL Proteine unterteilt werden. Zu den MARVEL Proteinen zählen Occludin, Tricellulin und MARVELD3. Occludin war das erste integrale Transmembranprotein, das von Furuse et al. 1993 entdeckt wurde (Furuse, Hirase et al. 1993). Es hat ein Molekulargewicht von 65 kDa und weist vier transmembranäre Domänen auf. Das Gerüstprotein ZO-1 bildet über eine COOH-zytoplasmatische Domäne das Rückgrat von Occludin (Furuse, Itoh et al. 1994). Tricellulin ist überwiegend an trizellulären Zellkontakten lokalisiert (Ikenouchi, Furuse et al. 2005). Interessanterweise kann Tricellulin bei einem Verlust von Occludin dessen Funktion teilweise kompensieren und die Schrankenfunktion somit aufrecht erhalten (Ikenouchi, Sasaki et al. 2008).

Die Familie der Claudine nimmt eine entscheidende Stellung in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion ein. Claudin-1 war das erste Protein, das im Jahr 1998 durch die Arbeitsgruppe von Furuse et al. identifiziert wurde (Furuse, Fujita et al. 1998). Seitdem ist die Anzahl der Claudine auf eine Gesamtanzahl von 27 gewachsen. Sie haben ein Molekulargewicht von 21–34 kDa und vier Transmembrandomänen, weisen jedoch keine Ähnlichkeiten mit der Aminosäuresequenz von Occludin auf (Furuse, Fujita et al. 1998). Das Verteilungsmuster der Claudine variiert je nach Gewebetyp und einige Claudine werden nur in spezifischen Zelltypen exprimiert. Beispielsweise ist Claudin-5 primär in Endothelzellen von Blutgefäßen vorhanden (Morita, Sasaki et al. 1999). Die Tight Junction-Proteine sind über die sogenannten MAGUK-Proteine wie etwa ZO-1,

Einleitung

ZO-2 und ZO-3 mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden (Anderson, Fanning et al. 1995, Gunzel und Yu 2013). Sie sind insbesondere für die Organisation der Tight Junctions verantwortlich. Zum Beispiel bestimmen ZO-1 und ZO-2 die Verteilung der Claudine in der basolateralen Membran (Umeda, Ikenouchi et al. 2006). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass insbesondere Claudin-5, Occludin und ZO-1 wichtig für die Blut-Rückenmarkschranke sind (Winkler, Sengillo et al. 2012).

1.4.2 Erkrankungen mit Störung der Blut-Rückenmarkschranke

Es gibt zunehmend Evidenz, dass die Blut-Rückenmarkschranke eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progression von Erkrankungen des zentralen Nervensystems einnimmt (Bartanusz, Jezova et al. 2011). Neben einer Schädigung der Blut-Rückenmarkschranke tragen auch andere pathophysiologische Phänomene zum klinischen Bild beziehungsweise letztendlich der Erkrankung bei. In diesem Kontext wurde die traumatische Rückenmarksverletzung am häufigsten untersucht. Eine Schädigung der Gefäßversorgung und in Folge dessen ein Zusammenbruch der Blut-Rückenmarkschranke ist in klinischen sowie Tiermodellen eine direkte Konsequenz traumatischer Einwirkung (Bartanusz, Jezova et al. 2011). Innerhalb weniger Minuten ist die Barriere für Blutbestandteile und -zellen passierbar, welche sich im verletzten Parenchym anreichern. Komplexe sekundäre Pathomechanismen führen in unverletzten Segmenten des Rückenmarks zu einer zusätzlichen Schädigung (Bartanusz, Jezova et al. 2011). Andere Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der Barriere assoziiert sind, sind beispielsweise die Multiple Sklerose, ALS, posttraumatische Syringomyelie und eine Ischämie des Rückenmarks.

1.4.3 Blut-Rückenmarkschranke und Neuropathie

Eine Verletzung des peripheren oder zentralen Nervensystems, welche einen neuropathischen Schmerz nach sich zieht, löst multidimensionale Veränderungen entlang des Schmerzsignalweges aus. Dabei ist die inflammatorische Reaktion eine bemerkenswerte Beobachtung. Zum einen werden proinflammatorische Mediatoren von verletzten Nervenfasern und angrenzenden Immunzellen freigesetzt, zum anderen kommt es auf Rückenmarksebene zu einer Mikroglia- und Astrozytenaktivierung (Scholz und Woolf 2007). Zusätzlich führt die periphere Nervenverletzung zum Übertritt von Immunzellen aus der Blutzirkulation in das Rückenmarkparenchym (Zhang, Shi et al. 2007, Cao und DeLeo 2008). Diese neuroinflammatorischen

Einleitung

Interaktionen sind Teil der Pathogenese von chronischen Schmerzzuständen. Inwieweit dabei die Blut-Rückenmarkschranke eine Rolle spielt ist noch nicht abschließend erforscht. Eine erhöhte Permeabilität der Blut-Rückenmarkschranke konnte bereits in verschiedenen neuropathischen Schmerzmodellen nachgewiesen werden: In einem neuropathischen Schmerzmodell, der L4/L5 Spinalnervenligatur, wiesen Gordh et al. eine erhöhte Immunreaktivität des Serumproteins Albumin im Rückenmark von Ratten nach. Diese Beobachtung deutet auf einen Zusammenbruch der Blut-Rückenmarkschranke hin, der für die Aktivierung von Astrozyten verantwortlich ist (Gordh und Sharma 2006). Echeverry et al. zeigten, dass eine partial sciatic nerve ligation zu einer frühen Extravasation von unterschiedlich großen Molekülen (Evans Blue, Natriumfluorescein) in das lumbale Rückenmark führt. Übereinstimmend dazu konnte eine Herabregulation der Tight Junction-Proteine ZO-1 und Occludin beobachtet werden, die möglicherweise durch eine spinale Entzündungsreaktion bedingt ist. Als direkte Konsequenz war es den T-Zellen möglich aus dem Blut in das Parenchym des Rückenmarks einzuwandern. Das Maximum der Permeabilität wurde dabei am dritten Tag festgestellt (Echeverry, Shi et al. 2011). In einem anderen Schmerzmodell, der SNI, wurde durch Cahill et al. der zeitliche Verlauf der Permeabilität der Blut-Rückenmarkschranke in lebenden Mäusen mittels Magnetresonanzperfusionsbildgebung dargestellt. Insbesondere 9 und 21 h nach der SNI konnte eine erhöhte Signalintensität im thorakalen und lumbalen Rückenmark festgestellt werden, was für eine Störung der Blut-Rückenmarkschranke spricht. Konkordant dazu konnte das Kontrastmittel Gadolinium, für das die Blut-Rückenmarkschranke normalerweise undurchlässig ist, im Rückenmark mittels T1-gewichteter MRT-Bilder nachgewiesen werden (Cahill, Laliberte et al. 2014). Es existieren bisher allerdings wenige Studien, welche die Tight Junction-Proteine der Blut-Rückenmarkschranke im Zusammenhang mit Neuropathie untersucht haben, da sich die Arbeitsgruppen vielmehr auf deren Barrierefunktion und Permeabilität konzentriert haben. Dabei standen vor allem die Proteine ZO-1 und Occludin im Vordergrund. Innerhalb des zentralen Nervensystems konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Verminderung von Claudin-5, das als wichtigstes und dominierendes Tight Junction-Protein der Blut-Hirnschranke agiert, zu einer erhöhten Durchlässigkeit führt (Argaw, Gurfein et al. 2009). Inwieweit jedoch andere Tight Junction-Proteine für den Erhalt der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie eine Rolle spielen bleibt ungeklärt.

1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In vorangegangenen Untersuchungen befasste sich diese Arbeitsgruppe bereits mit der Permeabilität und den Tight Junction-Proteinen des Perineuriums, welches als Teil der Blut-Nervenschranke periphere Nerven umgibt. Dabei konnte in einem inflammatorischen Schmerzmodell, bei dem CFA (complete Freund's adjuvant) intraplantar in die Pfote der Ratte injiziert wurde, gezeigt werden, dass es bei gleichzeitiger Gabe eines μ -Rezeptor-Agonisten zu erhöhten mechanischen Schmerzschwellen kommt. Gleichermäßen erzielte die Injektion einer hypertonen Kochsalzlösung (NaCl 10 %) zusammen mit einem MOR-Agonist denselben Effekt. Grund dafür ist eine Herabregulation des Tight Junction-Proteins Claudin-1, wohingegen Claudin-5 und Occludin unverändert blieben (Hackel, Krug et al. 2012). In einer anderen Untersuchung wies die Arbeitsgruppe nach, dass die Tight Junction-Proteine Claudin-19, Tricellulin und ZO-1 ebenfalls im Perineurium exprimiert sind und somit auch potentielle Angriffspunkte der Barrierefunktion sein könnten (Sauer, Krug et al. 2014). Voruntersuchungen für diese Arbeit im Rahmen der Barrierefunktion der Blut-Rückenmarkschranke zeigten, dass eine durch CCI verursachte Neuropathie sowohl zu einer mechanischen Allodynie, thermalen Hyperalgesie sowie zur Öffnung der Blut-Rückenmarkschranke führt (Sauer, Kirchner et al. 2017). Als direkte Folge ist es Molekülen unterschiedlicher Größe möglich das Rückenmark zu penetrieren. Zur Testung der mechanischen Allodynie wurde die Methode nach von Frey angewandt, bei der standardisierte Filamente unterschiedlicher Stärke in aufsteigender Reihenfolge auf der Plantarseite der Pfote bis zum Zurückziehen derselben präsentiert wurden (Chaplan, Bach et al. 1994). Bereits einen Tag nach der CCI bestand eine signifikante Reduktion der mechanischen Schmerzschwelle, die sich bis 14 d nach der CCI weiter fortsetzte. Für die Messung der thermischen Schmerzschwelle wurde der Test nach Hargreaves verwendet. Dazu wurde eine definierte warme Lichtquelle unter die Hinterpfote gehalten und die Zeit bis zum Zurückziehen der Pfote gemessen (Hargreaves, Dubner et al. 1988). Im Gegensatz zur mechanischen Allodynie war die thermische Schmerzschwelle erst 7 d nach der CCI signifikant reduziert. Die Ergebnisse der verschiedenen Schmerzverhaltenstests werden in folgender Abbildung graphisch dargestellt.

Einleitung

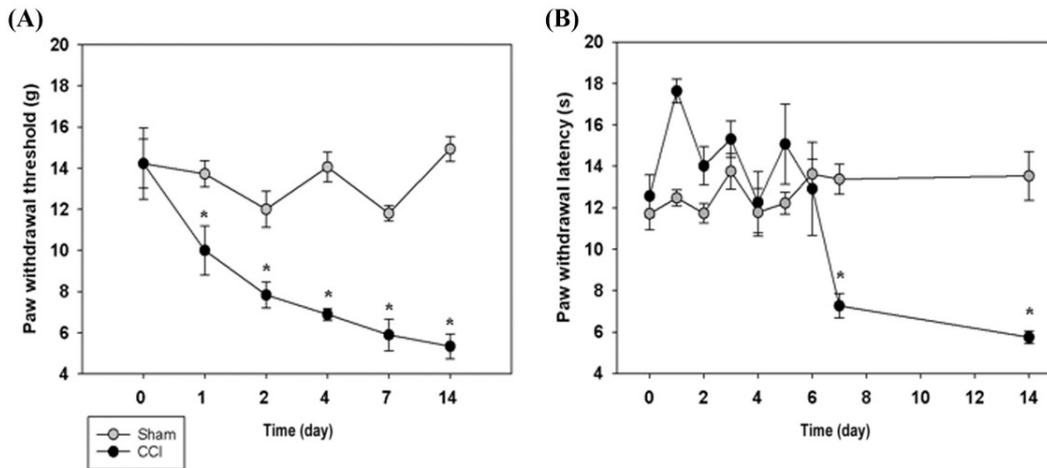


Abbildung 6: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mechanischen und thermischen Reizen

(A) Nach CCI wurde die Pfotenrückzugsschwelle von mechanischen Stimuli gemessen indem von Frey Filamente auf die Plantarseite der Hinterpfote appliziert wurden. (B) Die Pfotenrückzugslatenz von thermalen Stimuli wurde mit Hilfe des Hargreaves Test bis 14 d nach CCI oder Scheinoperation gemessen (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 6$, * $P < 0,05$, two-way RM ANOVA, Bonferroni t-test) (Sauer, Kirchner et al. 2017).

Zur Überprüfung der Dichtigkeit der Blut-Rückenmarkschranke wurden zwei unterschiedlich große Tracer verwendet. Zum einen Natriumfluorescein mit einem Molekulargewicht von 376 Da und zum anderen Evans Blue (68500 Da). Unter physiologischen Bedingungen können die Tracer, bis auf Fluorescein im geringen Maße, die Blut-Rückenmarkschranke nicht passieren. Dies änderte sich allerdings nach einer CCI. Bereits einen Tag nach der CCI konnte eine Anreicherung beider Moleküle im Rückenmark nachgewiesen werden, mit einem Maximum an Tag 7. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Rückenmarkshälften festgestellt werden (Sauer, Kirchner et al. 2017). Nachfolgende fluoreszenzmikroskopische Abbildung stellt die Extravasation von Natriumfluorescein und Evans Blue in das Rückenmark dar.

Einleitung

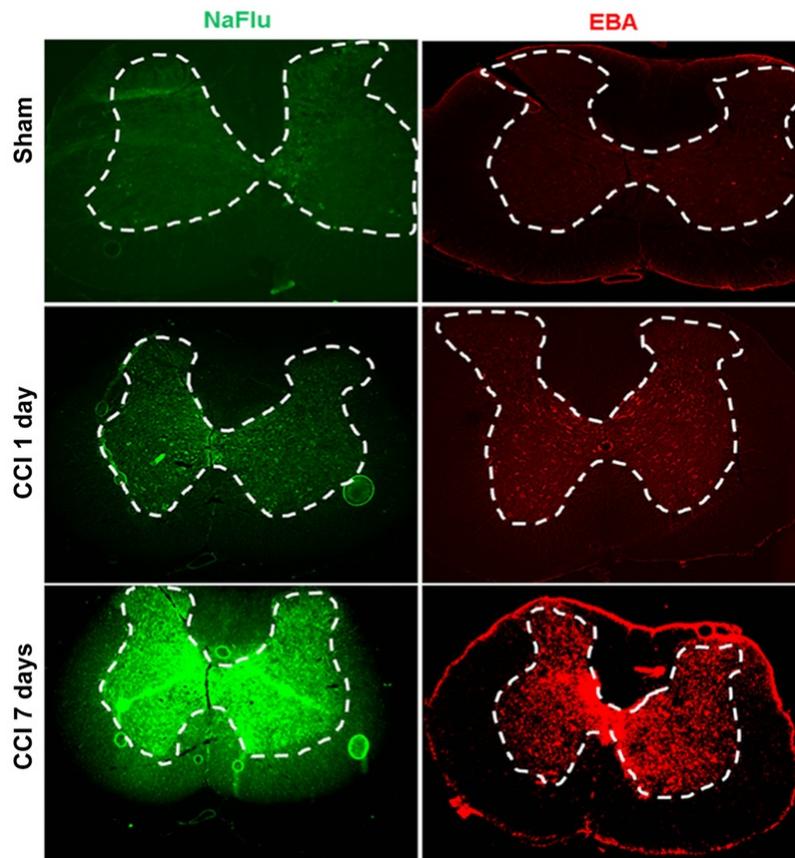


Abbildung 7: Vermehrte Anreicherung von Natriumfluorescein (NaFlu) und Evans Blue (EBA) im Rückenmark der Ratten nach CCI

Natriumfluorescein (grün, 376 Da) wurde 1 und 7 d nach CCI oder Scheinoperation intravenös appliziert. Nach 15 min wurde das Rückenmark entnommen und quer geschnitten (linkes Bild mit der Dorsalseite am oberen Bildrand). Das Rückenmark von Tieren nach CCI oder Scheinoperation ($n = 3$) wurde am ersten und siebten Tag entnommen und ex vivo in Evans Blue (68500 Da) inkubiert (rechtes Bild). Die weiße gestrichelte Linie markiert die graue Substanz des Rückenmarks (Sauer, Kirchner et al. 2017).

Durch ihre Untersuchungen erbrachte die Arbeitsgruppe den Nachweis, dass eine CCI die mechanische und thermische Schmerzschwelle bei Ratten mit Neuropathie absenkt und es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Rückenmarkschranke gegenüber unterschiedlich großen molekularen Markern kommt (Sauer, Kirchner et al. 2017).

1.6 Fragestellung der Dissertation

Die Blut-Rückenmarkschranke ist essentiell, um das Rückenmark vor Molekülen aus dem Blut wie zum Beispiel pronozizeptiven Mediatoren zu schützen. Dabei nehmen Tight Junction-Proteine eine wichtige Rolle ein, um die Integrität der Barriere aufrecht zu erhalten. Inwieweit verschiedene Tight Junction-Proteine zur Aufrechterhaltung dieser Barriere beitragen ist allerdings ungeklärt. Die Hypothese lautet daher wie folgt (s. Abb. 8): Eine periphere Nervenverletzung (CCI) führt zu einer reduzierten Tight Junction-Protein-Expression in der Blut-Rückenmarkschranke, die nachfolgend eine erhöhte Permeabilität gegenüber Immunzellen aufweist. Über eine Freisetzung neurotoxischer Substanzen in das Rückenmark werden nozizeptive Signalwege stimuliert und neuropathischer Schmerz vermittelt.

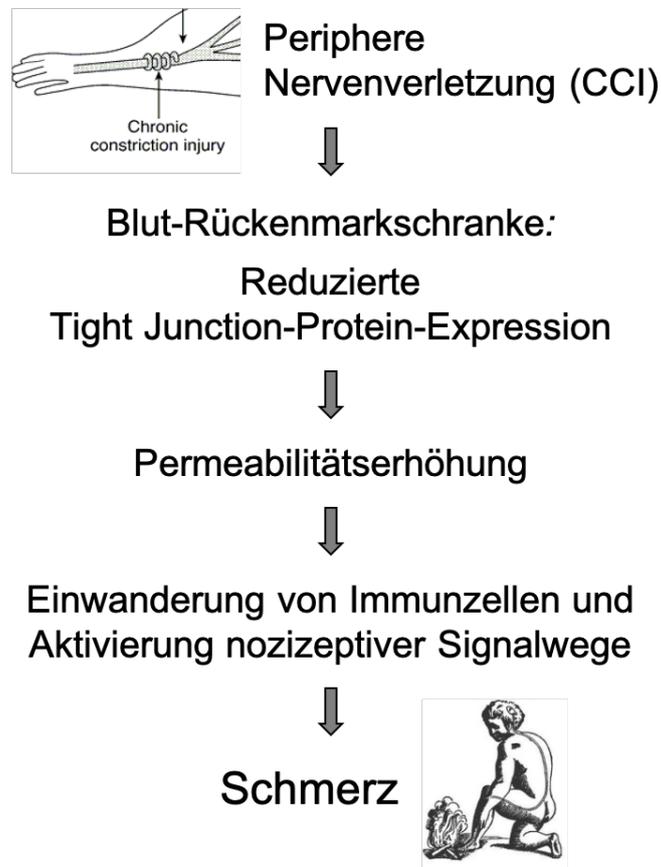


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hypothese

Bildquellen: (Bridges, Thompson et al. 2001, Handwerker 2007)

Im Rahmen der Hypothese ist das Ziel dieser Studie die Expressionsmuster verschiedener Tight Junction-Proteine im Rückenmark im Zeitverlauf (6 h, 1 d, 7 d, 14 d) bei CCI-induzierter Neuropathie zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden mit männlichen Wistar Ratten (Gewicht 180–220 g) nach der Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken (Protokollnummer REG 6-13 und 44-14) und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der internationalen Fachgesellschaft zur Erforschung des Schmerzes (IASP) durchgeführt (Zimmermann 1983). Unter kontrollierten Bedingungen hatten die Tiere einen 12 h Tag-Nacht-Rhythmus sowie freien Zugang zu Futter und Wasser. Der operative Eingriff erfolgte unter Isofluran-Kurznaarkose ohne zusätzliche Schmerzmedikation.

2.2 CCI

Um neuropathischen Schmerz bei den Ratten zu induzieren, wurde das Schmerzmodell der chronic constriction injury (CCI) verwendet. Unter Isofluran-Kurznaarkose wurde der rechte N. ischiadicus freigelegt und drei Mal mit einem Faden (4/0) in einem Abstand von 1 mm ligiert. Abschließend wurde die Wunde mit einer Naht verschlossen. Die Experimente zum Schmerzverhalten erfolgten dann 6 h bis 14 d nach der operativen Prozedur und wurden, wie auch die CCI, durch Frau Dr. rer. nat. Sauer durchgeführt.

2.3 mRNA-Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR

2.3.1 Prinzip

Die quantitative Echtzeit-PCR (rt-qPCR) ist eine Methode, um die Expression eines Gens zu untersuchen. Im ersten Schritt kann die dafür notwendige Ribonukleinsäure (RNA) isoliert werden und mit Hilfe der reversen Transkription in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Im zweiten Schritt können dann spezifische Sequenzen der cDNA amplifiziert und analysiert werden (Garibyan und Avashia 2013). Im Gegensatz zur traditionellen PCR, die nach der Amplifizierung weitere Untersuchungsschritte benötigt (z.B. Gelelektrophorese), kann bei der Echtzeit-PCR die Vervielfachung der cDNA durch einen fluoreszenzmarkierten Farbstoff direkt nach jedem Zyklus sichtbar gemacht werden. Dadurch können Rückschlüsse auf die initial vorhandene Menge an DNA gezogen werden (Higuchi, Fockler et al. 1993). Der verwendete SybrGreen-Fluoreszenzmarker interkaliert mit

der kleinen Furche der DNA. Das Fluoreszenzsignal eines an die DNA gebundenen SybrGreen-Moleküls ist wesentlich stärker als ein ungebundenes SybrGreen-Molekül (s. Abb. 9). Letztendlich korreliert die Zunahme der PCR-Produkte mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal. Um die mögliche Variabilität der Experimente zu neutralisieren und die Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurde als Referenzgen in allen Versuchen GAPDH verwendet. Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet.

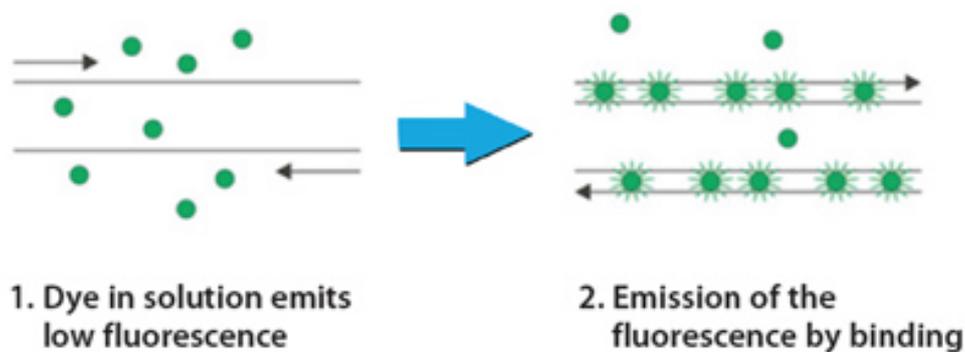


Abbildung 9: Graphische Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffs

Nach Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen mit der DNA wird grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html> Stand 08.01.2020).

2.3.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die Isolierung von RNA aus dem Rückenmarksgewebe erfolgte nach der Methode von Chomczynski et al. (Chomczynski 1993). Bei dieser single-step Methode wird eine monophasische Lösung bestehend aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat verwendet, die es ermöglicht Gewebe zu lysieren und im selben Schritt daraus RNA, DNA oder Proteine zu gewinnen. Nach der Homogenisation des Gewebes und durch Zugabe von Chloroform teilt sich das Lysat in drei Phasen: Eine obere wässrige Phase mit RNA, die Interphase bestehend aus DNA und eine organische Phase mit Proteinen und DNA. Anschließend wird die obere wässrige und RNA-haltige Phase mit Isopropanol präzipitiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Die Verwendung von Filter-tip Spitzen und RNase-freiem Wasser waren obligat. Die Zwischenlagerung des Gewebes nach Probengewinnung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Material und Methoden

Das Gewebe wurde unmittelbar mit 1 ml Trizol-Reagens sowie einer Metallkugel versetzt und im Tissue Lyser für 4 min mit einer Frequenz von 20/s homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgte die Phasentrennung. Die in der oberen wässrigen Phase enthaltene RNA wurde sorgfältig abpipettiert und in Isopropanol überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA über Nacht bei -20 °C. Nach erneuter Zentrifugation setzte sich das RNA-Pellet ab. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte anschließend die Waschung des RNA-Pellets mit 75 % Ethanol. Der nochmaligen Zentrifugation mit Entsorgung des Überstandes schloss sich die Trocknung des RNA-Pellets bei 37 °C an. Das Pellet wurde daraufhin mit 45 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und im Thermomixer für 10 min bei 57 °C inkubiert. Die RNA wurde dann bei -80 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Nano Drop 2000 Spectrophotometer verwendet.

Der RNA-Extraktion schloss sich die cDNA-Synthese an, bei der RNA in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden kann. Die reverse Transkription erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Die Verwendung von Random Primers ermöglicht eine Umschreibung aller RNA-Spezies (rRNA, mRNA).

Mastermix	
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase-Inhibitor	1 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung Mastermix

Entsprechend der benötigten Menge an Reaktionen wurde der Mastermix auf Eis hergestellt. Pro Reaktionsansatz wurden jeweils 6,8 µl Mastermix (s. Tab. 2) vorpipettiert. Das Volumen von 1 µg RNA wurde individuell für jede RNA-Probe berechnet und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Synthese der cDNA erfolgte anschließend im 2720 Thermal Cycler mit folgenden Einstellungen:

Material und Methoden

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis und unter der Verwendung von Filter-tip Pipettenspitzen statt. Ebenso wurden alle Reaktionskomponenten vor der Verwendung kurz gevortext und abzentrifugiert. Die bei -20 °C eingefrorenen cDNA-Proben und Primer wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Verdünnung der cDNA im Verhältnis 1:10 und der verschiedenen Primer im Verhältnis 1:12 mit Nuklease-freiem Wasser. Die Herstellung des Mastermix pro well für das Ziel- und Referenzgen richtete sich nach den Herstellerangaben des PowerUp SybrGreen Mastermix (s. Tab. 3).

SybrGreen Mastermix	
PowerUp SybrGreen Mastermix	10 µl
Forward Primer 1:12	1 µl
Reverse Primer 1:12	1 µl
DNase-freies Wasser	3 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung SybrGreen Mastermix

Material und Methoden

Gen	Forward Primer 5'–3'	Reverse Primer 5'–3'
Claudin-1	GGGACAACATCGT– GACTGCT	CCACTAAT– GTCGCCAGACCTG
Claudin-5	AAATT– CTGGGTCTGGTGCTG	GCCGGTCAAGG– TAACAAAGA
Claudin-19	TGCTGAAGGAC– CCATCTG	TGTGCTTGCTGT– GAGAACTG
ZO-1	CACGATGCTCA– GAGACGAAGG	TTCTACATATG– GAAGTTGGGGATC
Occludin	TGGGCAGTCGGGTT– GACT	GGGCATCATGGTGTT– CATTG
Tricellulin	TGAATGGCCACCAGT– GACCGA	AGTCAGGCATTACGAT– GGGCTTAG
GAPDH	AGTCTACTGGCGTCTT– CAC	TCATATTTCTCGTGGTT– CAC

Tabelle 4: Verwendete Primer für die rt-qPCR

Pro Probe und Gen (s. Tab. 4) fand eine Dreifachbestimmung statt. In eine 96-well PCR-Platte wurde der jeweilige Mastermix mit einem Volumen von 15 µl revers vorpipettiert und anschließend 5 µl der verdünnten cDNA eingesetzt. Die Negativkontrolle enthielt Mastermix, jedoch keine cDNA um eine Kontamination auszuschließen. Zum Schluss erfolgte die Abdichtung der PCR-Platte mit einer optischen Folie sowie ein kurzer Zentrifugationsschritt zur Entfernung etwaiger Luftblasen. Die rt-qPCR erfolgte anschließend unter folgenden Einstellungen im LightCycler:

50 °C	2 min	
95 °C	2 min	
95 °C	3 s	40 Zyklen
60 °C	30 s	

2.4 Western Blot

Die Methode des Western Blots wurde erstmals 1979 von Towbin et al. beschrieben und ist seitdem eine gängigsten Methoden zur Detektion und Analyse von Proteinen in der Forschung (Towbin, Staehelin et al. 1979). Hierfür werden Proteine nach ihrer Auftrennung auf einer Membran immobilisiert und über spezifische Antikörper sichtbar gemacht.

2.4.1 Probengewinnung und Proteinbestimmung

Das Rückenmarksgewebe wurde unmittelbar nach Entnahme aus dem -80 °C Gefrierschrank in 1 ml eiskalten EP-Lysepuffer (s. Tab. 5) zusammen mit Protease-Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml Puffer) überführt. Die Proben wurden anschließend unter Zugabe einer Metallkugel für 3 min mit einer Frequenz von 30/s im Quiagen Tissue Lyser homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt der Proben für 12 min bei 450 g (4 °C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 60 min bei 20.000 g erneut zentrifugiert. Im abgenommenen Überstand befand sich nun die zytosolische Fraktion des Proteins, während das Pellet die Membranproteine enthielt. Die Resuspendierung des Pellets fand im RIPA-Lysepuffer (s. Tab. 5) mit Protease-Inhibitor statt.

EP-Lysepuffer		RIPA-Lysepuffer	
NaCl	120 mM	HEPES pH 7,6	25 mM
HEPES pH 7,6	25 mM	EDTA	2 mM
EDTA	2 mM	NaF	25 mM
NaF	25 mM	SDS ultrapure	1 %
Triton X-100	1 %		

Tabelle 5: Zusammensetzung EP- und RIPA-Lysepuffer

Der Proteingewinnung schloss sich die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Smith et al. mittels BCA-Assay an (Smith, Krohn et al. 1985). Bei dieser Kombination aus Biuretreaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) binden zweiwertige Kupferionen an die Peptidbindungen und reagieren in alkalischer Lösung zu einem violetten Farbkomplex (s. Abb. 10). Dabei ist die Intensität der Färbung proportional zur Konzentration des Proteins.

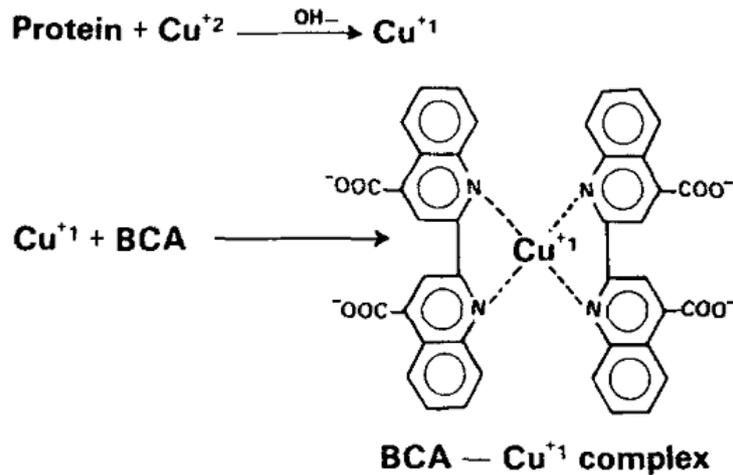


Abbildung 10: Prinzip der Biuretreaktion

Bei der Biuretreaktion bildet Bicinchoninsäure (BCA) mit zweiwertigen Kupferionen einen violetten Farbkomplex (Smith, Krohn et al. 1985).

Hierfür wurde jeweils 3 μl der Probe mit 22 μl dest. Aqua verdünnt und als Zweifachbestimmung auf eine 96-well Platte aufgetragen. Ebenso 25 μl der Standardproteinkonzentrationen (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Nach Zugabe von 200 μl BCA-Reagens pro well und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C, folgte ein Farbumschlag, der dann mittels Plattenreader (Tecan Plate Reader) gemessen wurde.

2.4.2 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Zunächst erfolgte die Herstellung der Polyacrylamid-Gele, die typischerweise aus einem Trenn- und Sammelgel (s. Tab. 6) bestehen. Polyacrylamid-Gele sind quervernetzende Strukturen, deren Porengröße weitestgehend dem Durchmesser der Proteine entspricht. Dadurch werden große Proteine stärker zurückgehalten als kleinere Proteine. Die Größe der Poren wird maßgeblich über den Acrylamidgehalt bestimmt und ist dem Molekulargewicht des untersuchten Proteins angepasst (Laemmli 1970).

Material und Methoden

	10% Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	4 ml	3,48 ml
Acrylamid	3,4 ml	850 µl
3M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
1M Tris pH 6,8	-	625 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Die Proben (25 µg Protein) wurden mit dest. Aqua und 5-fach konzentriertem Lämmli-Puffer (denaturierende Bedingung) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung in die Geltaschen, wobei die erste Tasche für den Proteinmarker bestimmt war. Die Elektrophorese startete mit 60 V für 30 min und anschließend mit 120 V für ca. 90 min in Elektrophoresepuffer.

Elektrophoresepuffer		Lämmli-Puffer (5x)	
Tris	25 mM	Tris pH 6,8	62,5 mM
Glycin	192 mM	SDS	2 %
SDS	0,1 %	Glycerol	10 %
dest. Aqua	variabel	MSH	1 %
		Bromphenolblau	1 %

Tabelle 7: Zusammensetzung Elektrophorese- und Lämmli-Puffer

Der Elektrophorese folgte die Fixierung der Proteine mittels Wet-Transfers (Kammer TankBlot) auf einer Nitrocellulose-Membran. Nach Entfernung der Taschen des Sammelgels wurden die Gele zunächst für 3 min in Towbin-Puffer (s. Tab. 8) äquilibriert. Danach folgte die Befeuchtung der Nitrocellulose-Membran, Schwämme und Filterpapiere in Towbin-Puffer, ehe das Gel-Membran-Sandwich nach folgendem Schema zusammengebaut wurde:



Abbildung 11: Aufbau des Gel-Membran-Sandwich
 (<https://www.abcam.co.jp/protocols/general-western-blot-protocol> Stand 27.01.2020)

Nach vorsichtiger Entfernung der Luftblasen fand die Überführung der Gel-Membrankassette in den Wet-Transfer Tank statt, welcher anschließend mit Towbin-Puffer aufgefüllt wurde. Das Blotting erfolgte im Kühlraum (4 °C) bei 200 mA für 90 min.

Towbin-Puffer	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
SDS	10 %

Tabelle 8: Zusammensetzung Towbin-Puffer

2.4.3 Immundetektion

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran aus dem Sandwich unter Zuhilfenahme von Pinzetten entfernt und 5 min in TBST gewaschen, um überschüssigen Towbin-Puffer zu entfernen. Dem schloss sich die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in Blockierungspuffer an (s. Tab. 9).

Material und Methoden

TBST		Blockierungspuffer	
Tris	10 mM	BSA	2,5 %
NaCl	15 mM	Magermilchpulver	2,5 %
Tween 20	0,05 %	in TBST gelöst	

Tabelle 9: Zusammensetzung des TBST und Blockierungspuffer

Nun konnte die Membran zusammen mit den in Tabelle 10 aufgeführten Antikörpern, gelöst in Blockierungspuffer, in eine Plastikfolie eingeschweißt werden.

Antigen	Antikörper
Claudin-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #51-9000 1:1000 in Blockierungspuffer
Claudin-5	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #34-1600 1:400 in Blockierungspuffer
Claudin-19	Polyklonaler AK Ziege Santa Cruz Biotechnology sc-162689 1:500 in Blockierungspuffer
ZO-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #61-7300 1:200 in Blockierungspuffer
Occludin	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #71-1500 1:200 in Blockierungspuffer
Tricellulin	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #48-8400 1:200 in Blockierungspuffer
β-Actin	Monoklonaler AK Maus Sigma-Aldrich #A3854 1:20000 in Blockierungspuffer

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper

Material und Methoden

Die eingeschweißte Membran wurde daraufhin zwischen zwei Glasplatten gespannt und über Nacht im Kühlraum (4 °C) auf einem Rüttler belassen, um die gleichmäßige Verteilung der Antikörper zu gewährleisten. Der Antikörper-Inkubation über Nacht schlossen sich drei 5-minütige Waschschriffe mit TBST an, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein POD-markierter Zweitantikörper (s. Tab. 11) benutzt (Anti-Kaninchen IgG bzw. Anti-Ziege IgG), der für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer auf der Membran verblieb. Nach einem erneuten Waschschriff (3 x 5 min mit TBST) konnte das ECL-Reagens im Verhältnis 1:1 auf den Blot gegeben und nach 5 min Einwirkzeit letztendlich im Imager visualisiert werden. Als Ladungskontrolle diente β -Actin.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Claudin-1, Claudin-5, ZO-1, Occludin, Tricellulin	Anti-Kaninchen IgG Sigma Aldrich #12015218001 1:3000 in Blockierungspuffer
Claudin-19	Anti-Ziege IgG Santa Cruz Biotechnology sc-2056 1:3000 in Blockierungspuffer

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper passend zum Primärantikörper

2.4.4 Densitometrie

Zur semiquantitativen Auswertung der Western Blots wurde eine densitometrische Analyse mit Hilfe der Software Alpha View durchgeführt. Hierfür wurde das Intensitätsverhältnis der IDVs (integrated density value) zwischen den untersuchten Proteinen und β -Actin ermittelt. Dabei ist β -Actin ein in konstanter Menge vorhandenes Protein. Die Quantifizierung der Blots erfolgte dann mit Hilfe der Software ImageJ (NIH; National Institutes of Health).

2.5 Immunfluoreszenzfärbung

2.5.1 Prinzip

Die biochemische Methode der immunhistochemischen Färbung basiert auf der Erkennung spezifischer Proteine mit Hilfe eines Antikörpers, die entweder direkt oder indirekt als Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können. Bei der direkten Immunfluoreszenzmethode ist der Antikörper bereits enzym- oder fluorphorgekoppelt, während bei der indirekten Methode ein enzym- bzw. fluorphorkonjugierter Sekundärantikörper an einen Primärantikörper bindet (Betterle und Zanchetta 2012).

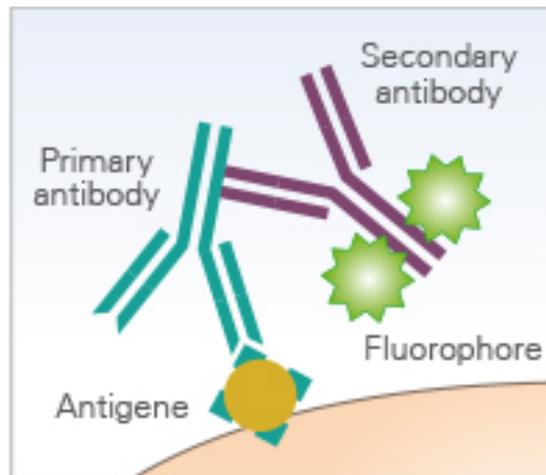


Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Ein enzym- oder fluorphorgekoppelter Antikörper bindet an den Antigen-Antikörper Komplex (https://ibidi.com/img/cms/applications/immunofluorescence/IF_principle_direct_indirect.jpg Stand 08.01.2020).

2.5.2 Probenaufarbeitung

Die Methode der Kapillarisolierung nach Winkler et al. wurde für die Zwecke dieser Studie modifiziert (Winkler, Sengillo et al. 2012).

Zunächst wurde 2 % FBS (fetal bovine serum) in PBS (phosphate buffered saline) hergestellt, was im Folgenden als FBS-Puffer bezeichnet wird. Zusätzlich erfolgte die Herstellung von 18 % Dextran gelöst in FBS-Puffer, das in 15 ml Falcons à 10 ml aliquotiert wurde. Das bei -80 °C gelagerte Rückenmark wurde in einen Dounce-Homogenisator, der bereits 500 µl FBS-Puffer enthielt überführt und mit Hilfe eines Douncers bei 400 rpm (revolutions per minute) vollständig homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat auf die Dextran Lösung (10 ml) gegeben und für 20 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert (Beckman Avanti Zentrifuge). Nach dem Zentrifugationsschritt befanden sich Gliazellen und neuronale Komponenten in der oberen Phase, wohingegen die Kapillaren das Pellet bildeten. Durch vorsichtiges Abpi-

Material und Methoden

pettieren der oberen Phase blieb das Pellet bestehen, das wiederum mit FBS-Puffer resuspendiert wurde. Ein 100 µm Zellsieb diente zur Entfernung größerer Blutgefäße und Debris. Für diesen Zweck wurde das Sieb auf ein 50 ml Falcon platziert und anschließend das in FBS-Puffer gelöste Pellet aufgetragen. Das Zellsieb konnte entsorgt werden, während der Durchfluss auf ein 40 µm Zellsieb gegeben wurde, um rote Blutzellen zu entfernen. Die Kapillaren befanden sich nun im Sieb. Um die Kapillaren zu erhalten wurde das Sieb um 180° invertiert, auf ein 50 ml Falcon platziert und so lange mit FBS-Puffer gespült bis das Sieb leer war. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 4000 g für 10 min und 4 °C, um das Kapillarpellet zu erhalten. Für die Isolierung von RNA aus den Kapillaren war ein Pooling von insgesamt drei Rückenmarkspalten notwendig, wohingegen für die immunhistochemische Färbung nur ein Rückenmark verwendet wurde. Das Kapillarpellet wurde dann entweder zur RNA-Isolierung mittels NucleoSpin® miRNA Kit in Lysepuffer aufgenommen und nach Herstellerprotokoll aufbereitet oder für eine immunhistochemische Färbung in FBS-Puffer resuspendiert.

2.5.3 Protokoll der Claudin-5- und ZO-1-Färbung

Nachdem das Kapillarpellet in 150 µl FBS-Puffer resuspendiert wurde, erfolgte die Fixierung der Kapillaren auf einem Objektträger mittels der Cytospin Zentrifuge von Thermo Shandon. Hierfür wurden jeweils 50 µl der Probe pro Objektträger verwendet, welche dann bei 540 rpm für 2 min auf den Objektträger zentrifugiert wurden. Der Objektträger trocknete für ca. 30 min bevor die Fixierung zur Konservierung der Kapillaren mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min begann. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation der Objektträger in einer mit Aceton (-20 °C) befüllten Glaskammer an, um die Kapillaren auf den Objektträgern zu fixieren. Um überschüssiges Aceton zu entfernen, folgte ein Waschschriff mit PBS (10 min). Zur Permeabilisierung der Kapillaren wurden die Objektträger in einer lichtgeschützten Inkubationskammer platziert und mit jeweils 300 µl 1 % Triton X-100 in PBS für 2 h bedeckt. Zur Entfernung von überschüssigem Triton X-100 fanden zwei 10-minütige Waschungen mit PBS statt. Der nächste Schritt beinhaltete die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Kapillaren. Hierfür inkubierten die Objektträger für mindestens 30 min in 3 % BSA (bovine serum albumin) und 1 % NGS (normal goat serum) in PBS. Die Blockierungslösung wurde anschließend entfernt und der Primärantikörper konnte aufgetragen werden. Für den Zweck dieser Studie waren

Material und Methoden

jeweils zwei Primärantikörper notwendig. Der ZO-1- und Claudin-5-Antikörper wurden jeweils 1:100 in PBS verdünnt, der von-Willebrand-Antikörper zum Nachweis der Kapillaren 1:200 in PBS. Pro Objektträger waren 100 µl der kombinierten Antikörperlösung notwendig, die dann bei 4 °C über Nacht inkubierte. Am nächsten Tag wurde überschüssiger Antikörper durch drei Waschschriffe à 10 min in PBS entfernt und die Objektträger mit folgenden Zweitantikörpern bedeckt: Alexa 488 gegen ZO-1 und Claudin-5 und Alexa 594 gegen von-Willebrand-Faktor, jeweils 1:600 in PBS. Pro Objektträger waren 100 µl des Zweitantikörpergemisches notwendig, das für eine Stunde inkubierte. Nach der Entfernung der Zweitantikörper wurde DAPI 1:3000 in PBS für 10 min auf die Objektträger gebracht. Zum Schluss fand ein 4-maliger Waschschriff (10 min) der Objektträger in einer mit PBS gefüllten Glaskammer statt. Die Objektträger trockneten und konnten dann mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 evaluiert werden. Die Immunreaktivität wurde mittels ImageJ Software quantifiziert.

Antigen	Antikörper
Claudin-5	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #34-1600 1:100 in PBS
ZO-1	Polyklonaler AK Kaninchen Invitrogen #61-7300 1:100 in PBS
von-Willebrand-Faktor	Polyklonaler AK Ziege Santa Cruz Biotechnology sc-8068 1:200 in PBS
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland 1:3000 in PBS

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Claudin-5, ZO-1	Polyklonaler Alexa Fluor 488 Affe Anti-Kaninchen Thermo Fisher scientific #A-2120 1:600 in PBS
von-Willebrand-Faktor	Polyklonaler Alexa Fluor 594 Affe Anti-Ziege Thermo Fisher scientific #A-11058 1:600 in PBS

Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper

2.6 Verwendete Chemikalien und Kits

2-Propanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Complete ULTRA Tablets protease inhibitor	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz
Dextran 70	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FBS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glycerol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCl 32%	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaF	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NGS	Vector Laboratories LTD., Peterborough, UK
Nuclease-free water	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin® miRNA Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
PowerUp SybrGreen Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Protein-Marker V	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
RNAse away	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS Ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Western Blot kit – Lumi Light ^{PLUS}	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien und Kits

2.7 Geräte

2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Beckman Avanti J-30 I	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Combi-Spin	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
Cytospin 4 – Thermo Shandon	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Eppendorf centrifuge 5418R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
FluoroChem FC2 Multi Image II	Alpha-InnoTech Corp., Santa Clara, USA
Heizblock Techne Dri-Block DB2A	Techne, Staffordshire, UK
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Krups Vacupack plus	Krups GmbH, Frankfurt, Deutschland
Labotect Inkubator C60	Belotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Mixer uzusio VTX-3000L	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Olympus BX51	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
PerfectSpin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Power supply unit – Peq Power 300	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Rührer IKA ^R RW 14 basic	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
StepOnePlus Real-time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Taumler	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
TissueLyser Qiagen	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 15: Verwendete Geräte

2.8 Sonstige Materialien

0.2 ml semi-skirted 96-well PCR Plate	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Adhesive sealing sheets	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Biosphere FilterTips (10, 100, 1000)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Blotting Membran Whatman Protran BA83	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Blotting tank Peqlab	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Cellstar tubes (20 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
Falcons (20 ml, 50 ml) Cellstar®Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filter cards	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Gelkammer – mini Protean Tetra cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Homogenisator 2 ml mit Glaskolben	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
IsoFreeze® PCR®-Cooler	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mikrotestplatten 96-well	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Material und Methoden

Optical 96-well FastGreen Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
PCR soft tube 0,2 ml	Biozym scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipette mit Spitze (10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
SafeSeal ReagiergefäÙe (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Steal bead Metallkugel	Sturm Präzision GmbH, Oberndorf am Neckar, Deutschland
Super Frost Plus Objektträger	L. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Zellsieb 100 µm	SPL Life Sciences Co., Korea
Zellsieb 40 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle 16: Sonstige verwendete Materialien

2.9 Statistik und Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in Excel 2003 (Microsoft) tabellarisch aufgelistet und mit dem Programm SigmaPlot (Systat Software Inc.) statistisch ausgewertet sowie graphisch dargestellt. Dabei sind in den Abbildungen jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Auswertung von zwei unabhängigen Gruppen wurde bei normalverteilten Daten und Varianzhomogenität der ungepaarte t-Test verwendet. Eine Varianzanalyse (ANOVA) wurde bei mehr als zwei Gruppen abhängig vom Experiment als one- oder two-way ANOVA durchgeführt. Dem schloss sich bei einem signifikanten Effekt eine post-hoc Analyse mit der Student-Newman-Keuls Methode an. Zur Interpretation wurden die Ergebnisse bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine CCI zu einer Reduktion der mechanischen und thermischen Schmerzschwellen führt, was folglich mit einer Neuropathie vereinbar ist. Dadurch kam es zu einer Anreicherung verschieden großer molekularer Marker (Natriumfluorescein, Evans Blue) im lumbalen Rückenmark. Um die Ursache dieser erhöhten Permeabilität besser verstehen zu können, wurden die Expressionsmuster der verschiedenen Tight Junction-Proteine untersucht.

3.1 CCI im peripheren Nerv führt zu einer Herabregulation der mRNA der Tight Junction-Proteine im lumbalen Rückenmark

Die Tight Junction-Proteine Claudin-1, Claudin-5, Claudin-19, Tricellulin, Occludin und ZO-1 sind bekanntermaßen in der Blut-Nervenschranke exprimiert und reguliert, jedoch wurde nie getestet inwieweit eine CCI Einfluss auf diese Proteine im Rückenmark der Tiere hat (Hackel, Krug et al. 2012, Sauer, Krug et al. 2014). Aus diesem Grund wurde zunächst die mRNA-Expression der Tight Junction-Proteine Claudin-1, Claudin-19, Tricellulin und Occludin 6 h, 1 d, 7 d und 14 d nach einer CCI im lumbalen Rückenmark untersucht und mit scheinoperierten Tieren verglichen (s. Abb. 13). Claudin-1- und Claudin-19-mRNA waren bereits zu früheren Zeitpunkten herabreguliert. Zusätzlich waren alle vier Tight Junction-Proteine 7 und 14 d nach der CCI vermindert.

Ergebnisse

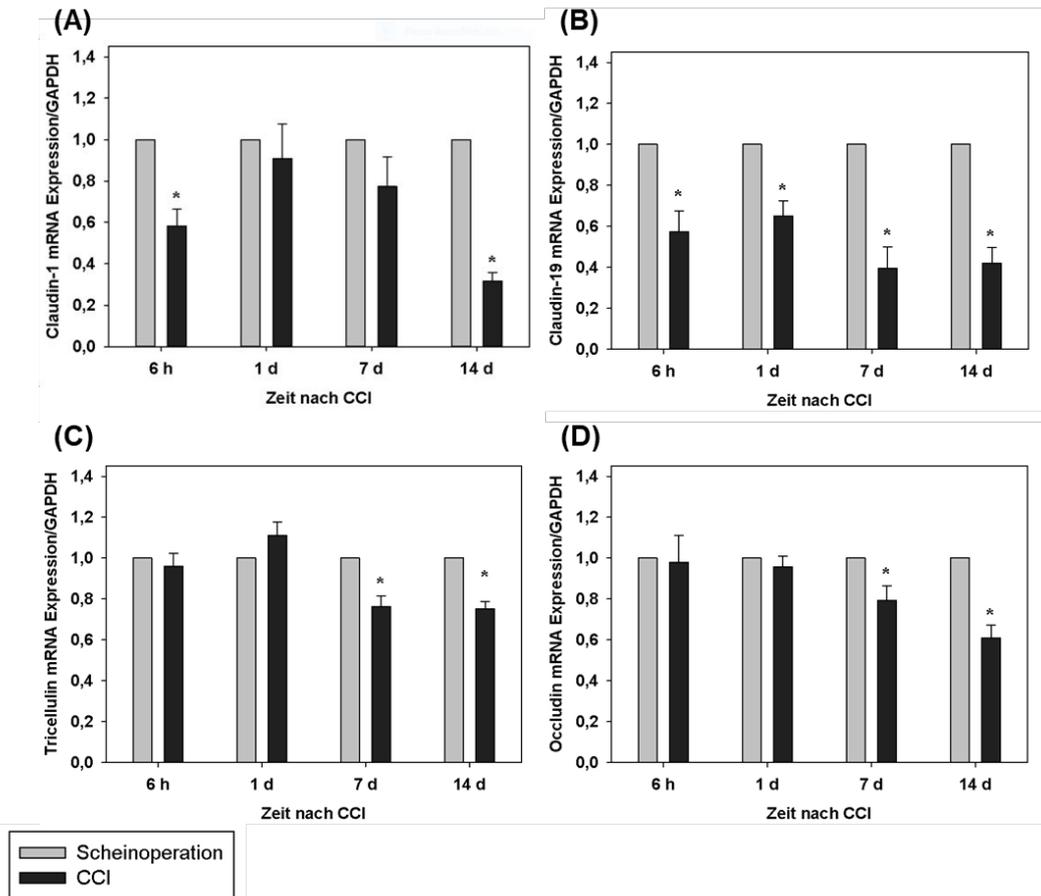


Abbildung 13: Reduzierte Expression der Tight Junction-Protein-mRNA im lumbalen Rückenmark nach CCI

Die mRNA-Expression der Tight Junction-Proteine (A) Claudin-1, (B) Claudin-19, (C) Tricellulin und (D) Occludin wurde 6 h, 7 d und 14 d nach CCI oder Scheinoperation mittels rt-qPCR im Vergleich zu GAPDH im lumbalen Rückenmark der Tiere untersucht. Die Ergebnisse wurden gegenüber den scheinoperierten Tieren normalisiert ($n = 6$, Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler, $*P < 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode).

3.2 Keine Veränderung der Tight Junction-Protein-mRNA in Endothelzellen der Kapillaren im Rückenmark

Um herauszufinden, ob die Herabregulation von Claudin-1, Claudin-19, Tricellulin und Occludin auf die Endothelzellen innerhalb des kapillären Netzwerks beschränkt ist, wurden im nächsten Schritt Kapillaren aus dem lumbalen Rückenmark isoliert. Jedoch konnte 7 d nach der CCI keine signifikante Reduktion der mRNA im Vergleich zu scheinoperierten Tieren festgestellt werden (s. Abb. 14).

Ergebnisse

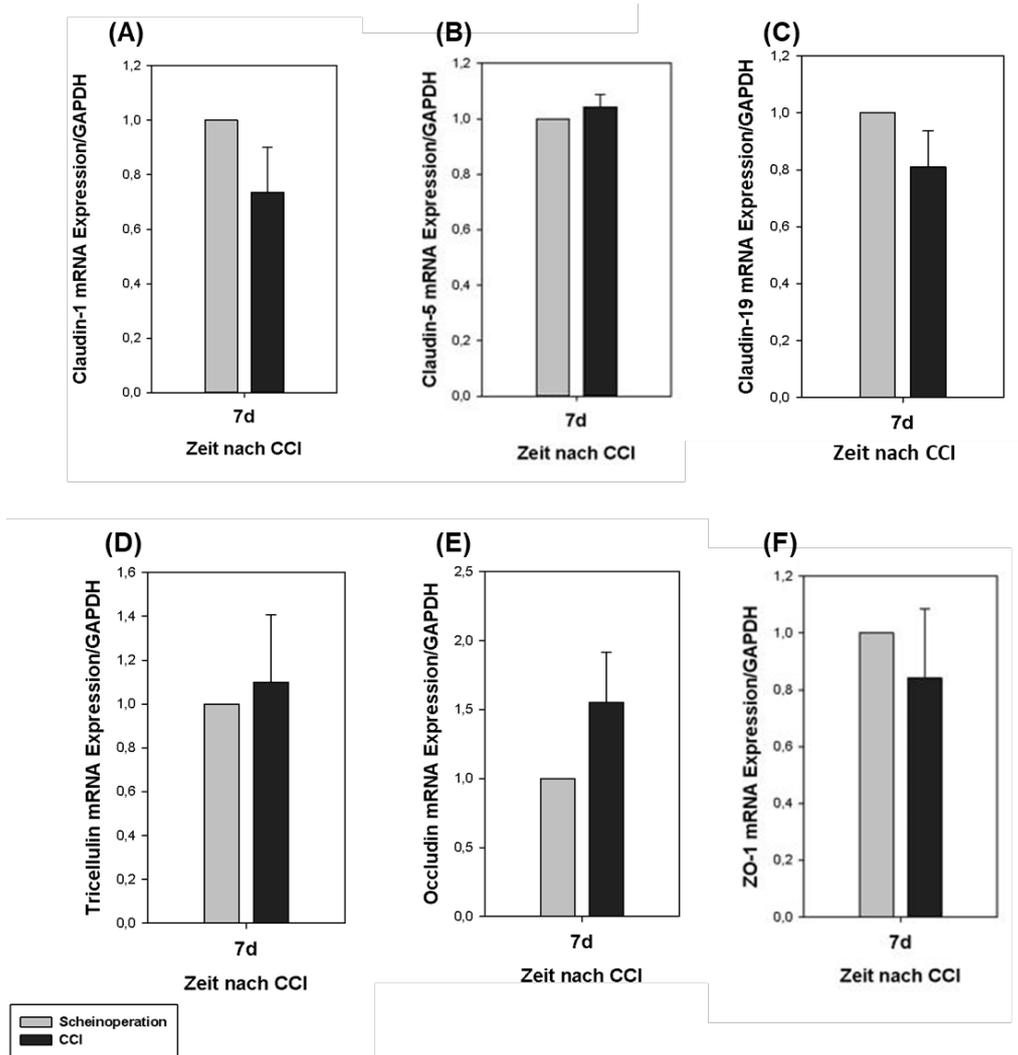


Abbildung 14: Keine Veränderung der Tight Junction-Protein-Expression 7 d nach CCI in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks im Vergleich zu scheinoperierten Tieren
Die mRNA-Expression der Tight Junction-Proteine (A) Claudin-1, (B) Claudin-5, (C) Claudin-19, (D) Tricellulin, (E) Occludin und (F) ZO-1 wurde 7 d nach CCI oder Scheinoperation mittels rt-qPCR im Vergleich zu GAPDH in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks der Tiere untersucht. Die Ergebnisse wurden gegenüber den scheinoperierten Tieren normalisiert ($n = 6$, Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler, $*P < 0,05$; t -Test).

3.3 CCI vermindert die Proteinexpression der Membranfraktion von Occludin, wohingegen andere Tight Junction-Proteine unverändert bleiben

Um zu untersuchen, ob es nach einer CCI tatsächlich zur Degradierung der Tight Junction-Proteine kommt, wurden Claudin-1, Claudin-19, Tricellulin und Occludin mittels Western Blot analysiert. Bis auf Occludin, das 7 d nach der CCI (verglichen mit scheinoperierten Tieren) signifikant reduziert war, zeigte sich zu den ausgewählten Zeitpunkten keine Veränderung der anderen Proteine. Als Referenzprotein diente

Ergebnisse

β -Actin. Da β -Actin unter anderem für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und Integrität verantwortlich ist, wurde es zusätzlich quantifiziert, um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse der Tight Junction-Proteine nicht durch eine Veränderung von β -Actin selbst zu Stande kamen. Dabei zeigte sich zwischen Tieren mit einer CCI und scheinoperierten Tieren keine Veränderung der Expression (relative IDV: $1,34 \pm 0,209$ und $1,22 \pm 0,1$; $1,16 \pm 0,13$ und $1,15 \pm 0,14$; $1,20 \pm 0,171$ und $1,18 \pm 0,2$ für CCI und scheinoperierte Tiere zu den Zeitpunkten 6 h, 7 d, 14 d).

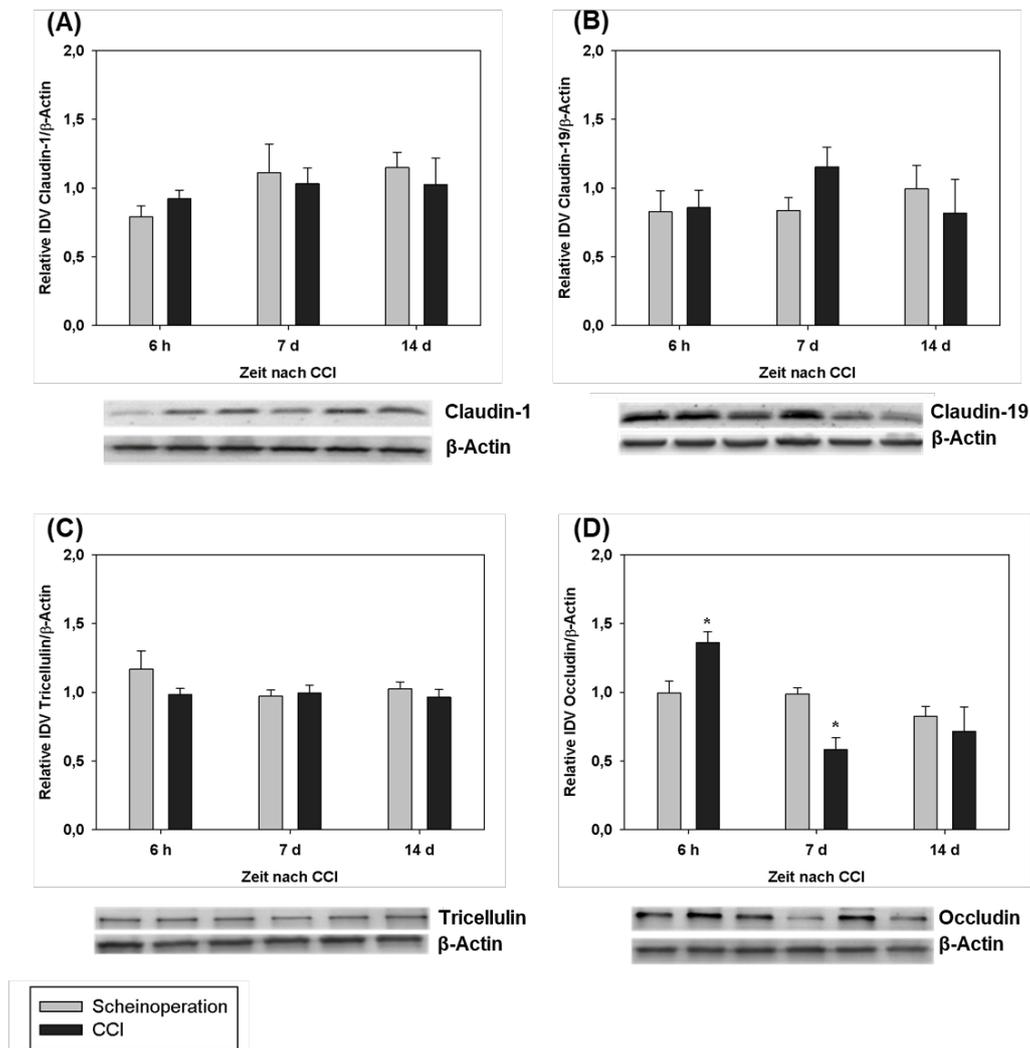


Abbildung 15: Keine Veränderung von ausgewählten Tight Junction-Proteinen nach CCI im lumbalen Rückenmark, außer Occludin (7 d nach CCI)

Die Protein-Expression der Tight Junction-Proteine (A) Claudin-1, (B) Claudin-19, (C) Tricellulin und (D) Occludin wurden 6 h, 7 d, 14 d nach CCI in der Membranfraktion des lumbalen Rückenmarks der Tiere mittels Western Blot analysiert und mit scheinoperierten Tieren verglichen. Proteine wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert ($n = 6$, Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler, * $P < 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode). Die repräsentativen Blots befinden sich unterhalb der graphischen Darstellung analog zur Achsenbeschriftung.

3.4 CCI führt zu einer Reduktion der Claudin-5-mRNA und zu einer verminderten Immunreaktivität in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks

Claudin-5 ist ein wichtiges Tight Junction-Protein, das Endothelzellen der Gefäße im Rückenmark abdichtet und somit zur Barrierefunktion und Schutz des Rückenmarks beiträgt (Bartanusz, Jezova et al. 2011). Die mRNA-Expression von Claudin-5 war 7 d nach der CCI im gesamten Rückenmark vermindert, wohingegen die Proteinexpression zu jedem Zeitpunkt unverändert blieb. Im nächsten Schritt wurde die Claudin-5-Expression in isolierten Kapillaren mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. In den Kapillaren konnte 7 d nach der CCI eine um 48,5 % signifikant reduzierte Claudin-5-Immunreaktivität im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nachgewiesen werden. Die Immunreaktivität 6 h nach der CCI blieb unverändert. Zusammenfassend war Claudin-5 7 d nach der CCI in den Kapillaren des Rückenmarks vermindert, jedoch nicht im gesamten lumbalen Segment (s. Abb. 16).

Ergebnisse

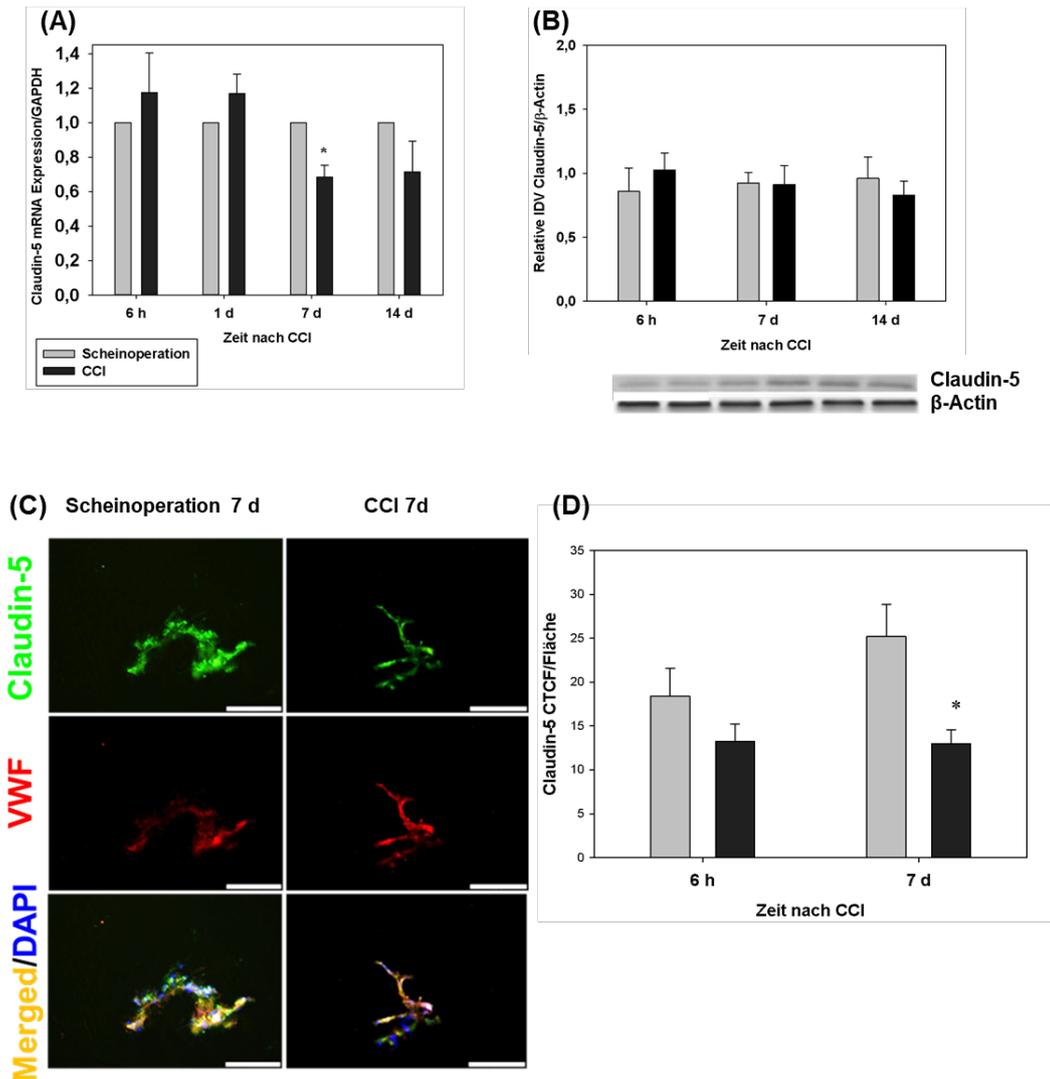


Abbildung 16: Reduzierte Claudin-5-mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark und verminderte Immunreaktivität in Rückenmarkskapillaren 7 d nach CCI

(A) Die mRNA von Claudin-5 wurde 6 h, 1 d, 7 d und 14 d nach CCI oder Scheinoperation im gesamten lumbalen Rückenmark mittels rt-qPCR analysiert. (B) Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des Westerns Blots untersucht und anschließend densitometrisch quantifiziert. Der repräsentative Blot befindet sich unterhalb der graphischen Darstellung analog zur Achsenbeschriftung. (C) Immunfluoreszenzfärbung der Kapillaren aus dem lumbalen Rückenmark mit von-Willebrand-Faktor (Marker für Endothelzellen, vWF (rot)) und Claudin-5 (grün). (D) Quantifizierung der Immunreaktivität mit der Image J Software ($n = 6$, Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler, * $P < 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode).

3.5 CCI führt zu einer reduzierten ZO-1-Expression im lumbalen Rückenmark und verminderter Immunreaktivität in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks

ZO-1 als zytoplasmatisch lokalisiertes Tight Junction-Protein übernimmt die wichtige Rolle eines Ankerproteins, das für die physiologische Verteilung der Claudine in der basolateralen Membran verantwortlich ist (Umeda, Ikenouchi et al. 2006, Reinhold und Rittner 2017). Insbesondere 7 und 14 d nach der CCI war eine signifikante Reduktion der ZO-1-mRNA aus dem lumbalen Rückenmark zu beobachten. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis war der zytoplasmatische Proteingehalt ebenfalls 7 und 14 d nach der CCI signifikant vermindert. In den isolierten Kapillaren des Rückenmarks fand sich 7 d nach der CCI ein signifikant abgeschwächtes Immunfluoreszenzsignal, das sich bereits 6 h danach abzeichnete, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Gesamtheit war sowohl die mRNA also auch das Protein im lumbalen Rückenmark und in den Kapillaren 7 und 14 d nach der CCI reduziert (s. Abb. 17).

Ergebnisse

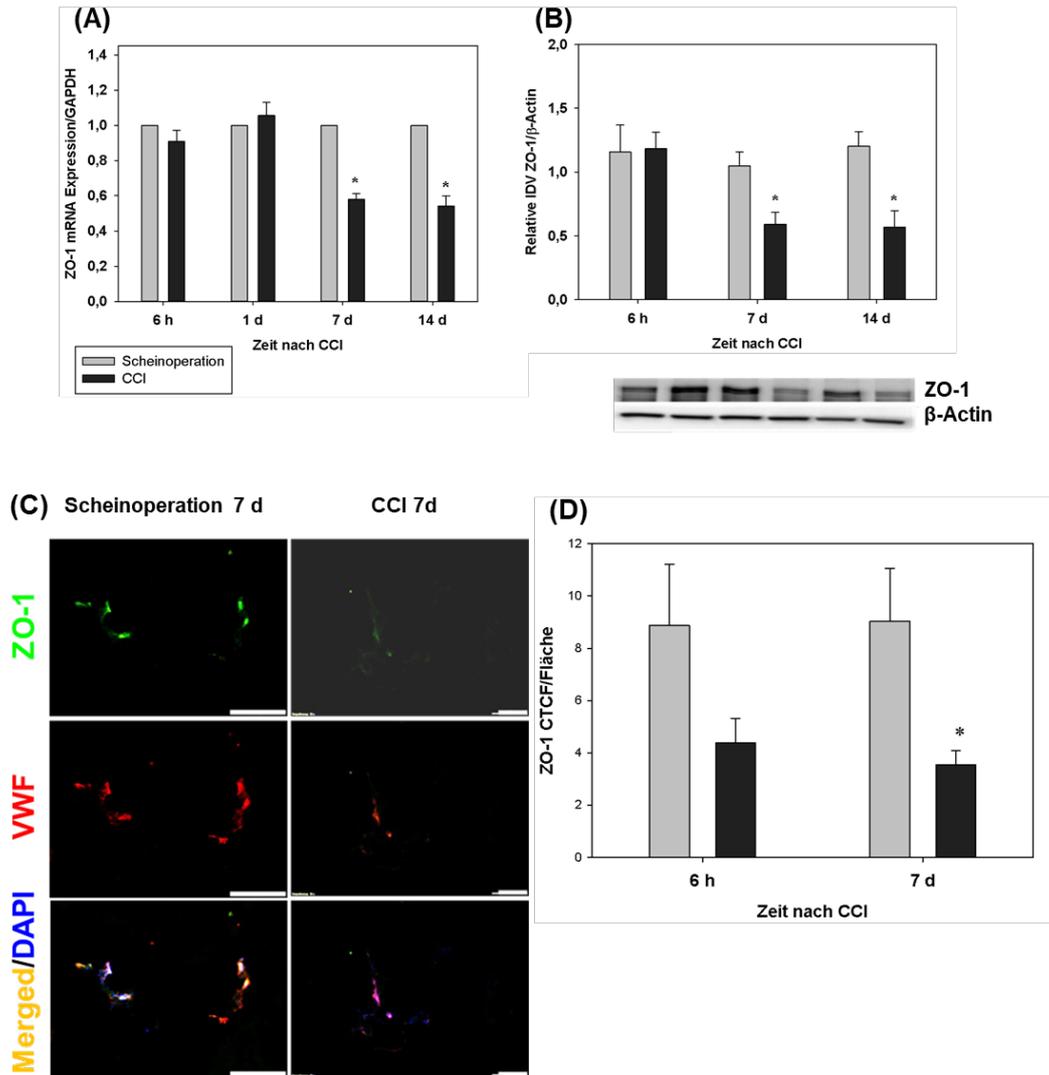


Abbildung 17: Herabregulation von ZO-1-mRNA und -Proteinlevel im Rückenmark 7 und 14 d nach CCI

(A) Die mRNA von ZO-1 wurde 6 h, 1 d, 7 d und 14 d nach CCI oder Scheinoperation im gesamten lumbalen Rückenmark mittels rt-qPCR analysiert. (B) Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des Westerns Blots untersucht und anschließend densitometrisch quantifiziert. Der repräsentative Blot befindet sich unterhalb der graphischen Darstellung analog zur Achsenbeschriftung. (C) Immunfluoreszenzfärbung der Kapillaren aus dem lumbalen Rückenmark mit von-Willebrand-Faktor (Marker für Endothelzellen, vWF (rot)) und ZO-1 (grün). (D) Quantifizierung der Immunreaktivität mit der Image J Software (n = 6, Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± Standardfehler, *P < 0,05; ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode).

Ergebnisse

3.6 Ergebnisse im Überblick

Folgende Tabelle stellt alle Ergebnisse übersichtlich dar, um einen besseren Überblick über die Veränderungen der Tight Junction-Proteine nach der CCI im Vergleich zu scheinoperierten Tieren zu erhalten.

	6 h			1 d		7 d			14 d	
	Prt.	RNA	Kpl.	RNA	Prt.	RNA	cRNA	Kpl.	Prt.	RNA
ZO-1	-	-	-	-	↓	↓	-	↓	↓	↓
Tricellulin	-	-	n.u.	-	-	↓	-	n.u.	-	↓
Occludin	↑	-	n.u.	-	↓	↓	-	n.u.	-	↓
Claudin-1	-	↓	n.u.	-	-	-	-	n.u.	-	↓
Claudin-5	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	-
Claudin-19	-	↓	n.u.	↓	-	↓	-	n.u.	-	↓

Tabelle 17: Ergebnisübersicht

Prt. Protein

Kpl. Kapillaren

cRNA capillary RNA (dt. kapilläre RNA)

↑ signifikante Erhöhung

↓ signifikante Verringerung

- keine signifikante Veränderung

n.u. nicht untersucht

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie sollten die Fragestellungen im Bezug auf die Veränderungen der Tight Junction-Proteine der Blut-Rückenmarkschranke in einem neuropathischen Schmerzmodell bei Ratten (CCI) beantwortet werden. Vorab konnte durch die Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass eine CCI bei Ratten eine thermische und mechanische Hyperalgesie induziert und die Blut-Rückenmarkschranke für Moleküle unterschiedlicher Größe permeabel wird. Diese Undichtigkeit der Barriere ist auf molekularer Ebene insbesondere mit einer Reduktion der Tight Junction-Proteine ZO-1 und Claudin-5 assoziiert. Des Weiteren waren die mRNA von Claudin-1, Claudin-19 und Occludin reduziert, wohingegen Tricellulin unverändert blieb. Es konnte jedoch keine Veränderung der mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-5, Claudin-19, Occludin, ZO-1 und Tricellulin in isolierten Kapillaren des Rückenmarks festgestellt werden. Die Expression der Tight Junction-Proteine in der Membran war bis auf ZO-1 gleichbleibend, das als Ankerprotein in der zytoplasmatischen Fraktion signifikant vermindert war. Sowohl ZO-1 als auch Claudin-5 waren in Kapillaren des Rückenmarks signifikant reduziert. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass eine Neuropathie über eine verminderte Expression von Claudin-5 und ZO-1 zur Öffnung der Blut-Rückenmarkschranke führt.

4.2 Diskussion der Methoden

Um die Fragestellung hinsichtlich der Funktion der Tight Junction-Proteinen in der Blut-Rückenmarkschranke nach einer CCI zu beantworten, wurden verschiedene Methoden aus der Molekularbiologie angewandt, die aber nur in Kombination valide Aussagen ermöglichen.

4.2.1 PCR

Die rt-qPCR bzw. der Nachweis von mRNA ist eine sehr sensitive Methode, um die relative Expression eines Gens, nicht aber den tatsächlichen Gehalt an mRNA zu ermitteln und hat den Vorteil, dass bereits kleinste Veränderungen der mRNA-Level detektiert werden können (Livak und Schmittgen 2001). Um jedoch zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist eine hohe Quantität und Qualität der RNA eine Grundvoraussetzung, da hiervon die Genauigkeit der Bestimmung der Genexpression

Diskussion

abhängt. Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Extraktion der RNA aus dem lumbalen Rückenmark konnte eine ausreichende Menge und sehr gute Reinheit erzielen. Im Gegensatz dazu ist die Isolation der RNA aus den Kapillaren des lumbalen Rückenmarks eine anspruchsvollere Methode, da das Gewebepellet der Kapillaren trotz Verwendung von drei Rückenmarksproben nur einige Millimeter groß ist. Aus diesem Grund konnten hinsichtlich der Konzentration und der Reinheit nur zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden. Des Weiteren können Fehler während der Extraktion bis hin zur Lagerung die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Aus diesem Grund ist es notwendig diverse Vorsichtsmaßnahmen (Reinigung der Instrumente mit RNase-Inhibitor, Verwendung von RNase-freiem Wasser, Arbeiten auf Eis) zu ergreifen, um eine Degradation der RNA zu vermeiden (Fleige und Pfaffl 2006). Ebenso wichtig ist die Auswahl von Primern mit einer hohen Spezifität, um die Amplifikation von unspezifischen Genprodukten bzw. Nebenprodukten zu verringern. Grundsätzlich unterliegt diesbezüglich die rt-qPCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen der PCR mit Verwendung von Sonden deutlich, da möglicherweise gebildete Nebenprodukte ebenfalls ein Fluoreszenzsignal erzeugen können. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die mRNA nicht den tatsächlichen Gehalt an Protein widerspiegelt, da die mRNA möglicherweise entweder nicht translatiert wird oder Modifikationen während oder nach dem Prozess auftreten. Bisher sind über 100 biochemische Modifikationen der RNA bekannt (Boccaletto, Machnicka et al. 2018). Capping und Polyadenylierung (Tailing) tragen zur Stabilität des Transkripts bei und sind bei der Initiierung der Translation beteiligt. Neben diesen Hauptregulatoren zählen das Splicing und das RNA-Editing zu den internen Modifikationen der RNA (Roundtree, Evans et al. 2017, Zhao, Roundtree et al. 2017). Abschließend sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Ergebnisse auf ein Referenzgen (GAPDH) bezogen werden, das ebenso Expressionsschwankungen unterliegen kann. Generell sollte ein Referenzgen eine konstante Expression unter experimentellen Bedingungen aufweisen. In einer Studie von Suzuki et al. konnte gezeigt werden, dass in Genexpressionsstudien insbesondere die Referenzgene GAPDH, β -Actin und 18s-rRNA verwendet wurden (Suzuki, Higgins et al. 2000). Es ist allerdings bekannt, dass die Expression unter experimentellen Umständen in vitro und in vivo stark reguliert wird. So wurde beispielsweise GAPDH in Zellkulturen unter hypoxämischen Bedingungen um 21,2–75,1 % im Vergleich zu Zellkulturen unter

Normoxämie hoch reguliert (Zhong und Simons 1999). Ebenso variiert die Expression von GAPDH in unterschiedlichen Gewebetypen (Barber, Harmer et al. 2005).

4.2.2 Western Blot

In der Proteinanalytik hat der Western Blot den großen Vorteil, dass der Proteingehalt im Vergleich zur mRNA für die biologische Funktion verantwortlich ist. Nach der Quantifizierung ist es demnach möglich die Menge des Proteins zwischen zwei Proben zu vergleichen. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse des Western Blots deutlich stärker berücksichtigt werden als Ergebnisse der rt-qPCR. Nichtsdestotrotz bringt diese Methodik einige Nachteile mit sich. Es bedarf sehr spezifischer primärer und sekundärer Antikörper, um das zu untersuchende Protein zu detektieren bzw. zu identifizieren. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass sich das Referenzprotein β -Actin durch die CCI ebenfalls ändert. Aus diesem Grund wurde die Expression von β -Actin zwischen CCI und scheinoperierten Tieren verglichen, wobei aber kein Unterschied festgestellt werden konnte. Des Weiteren werden die Proteine mittels Chemolumineszenzreaktion detektiert, bei der mittels enzymatischer Reaktion Licht emittiert wird. Da es sich hierbei um einen dynamischen Prozess handelt der Schwankungen unterliegen kann, ist es notwendig die Inkubations- und Belichtungszeiten anzupassen. Am Ende kann allerdings keine Aussage über die Lokalisation des Proteins getroffen werden und geringe Unterschiede im Proteingehalt sind nur schwer nachweisbar.

4.2.3 Kapillarisolierung und immunhistochemische Färbung

Das kapillare Netzwerk, der zentrale Sitz der Tight Junction-Proteine der Blut-Rückenmarkschranke, leistet zur Beantwortung der Fragestellung ebenfalls einen erheblichen Beitrag. Dabei ist die Durchführung der Kapillarisolation aus dem Rückenmark der Tiere eine anspruchsvolle Methode und beeinflusst wesentlich den Erfolg der anschließenden immunhistochemischen Färbung. Zum einen führte die Verwendung des Rückenmarks nur einer Ratte zu einem geringeren Ertrag an Kapillaren. Zum anderen ist es denkbar, dass während des Isolierungsprozesses, der maßgeblich mechanisch geprägt ist (Zentrifugation, Verwendung von Zellsieben mit verschiedenen Durchmessern) eine Verunreinigung durch andere Zellestandteile auftritt. Die sich anschließende immunhistochemische Färbung (der zuvor isolierten Kapillaren) ist jedoch eine gut etablierte Methode, um Makromoleküle, insbesondere

Proteine, histologisch darzustellen und anhand der Fluoreszenzintensität zu quantifizieren. Gleichwohl ist die Immunfluoreszenzfärbung mit Schwachstellen behaftet, die die Ergebnisqualität beeinflussen. Der Waschschrift zur Entfernung überschüssigen Acetons, das zur Fixierung der Kapillaren verwendet wurde, könnte zu einem Verlust von Kapillaren geführt haben. Wie auch beim Western Blot spielt sowohl die Spezifität der Antikörper eine Rolle als auch die Autofluoreszenz des fluorophorkonjugierten Sekundärantikörpers. Diese beiden Aspekte können Ursache eines unspezifischen Fluoreszenzsignals sein. Abschließend ist außerdem zu beachten, dass die Fluoreszenzintensität im Laufe der Zeit abnimmt, was durch eine lange Belichtungszeit im Mikroskop zusätzlich verstärkt wird. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden die Objektträger direkt nach der Antikörperinkubation mikroskopiert.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Tight Junction-Proteine in der Blut-Rückenmarkschranke

Obwohl die Funktion der Blut-Rückenmarkschranke bereits untersucht wurde, liegen nur wenige Erkenntnisse bezüglich der Tight Junction-Proteine in der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie vor. Die meisten Arbeiten fokussierten sich auf ZO-1, Occludin und Claudin-5 in Erkrankungen, die mit einer Störung der Blut-Rückenmarkschranke einhergehen (Zhong, Deane et al. 2008, Reinhold und Rittner 2017). Die ALS ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sowohl das erste als auch das zweite Motorneuron betrifft und zu Muskelparesen inklusive Parese der Atemmuskulatur führt. In Mäusen mit SOD1-mutiertem Gen konnte eine Reduktion von ZO-1, Occludin und Claudin-5 nachgewiesen werden. Folglich akkumulierten im Rückenmark neurotoxische Produkte des Hämoglobins und es konnte eine chronische Hypoperfusion beobachtet werden (Zhong, Deane et al. 2008, Reinhold und Rittner 2017). Die Wiederherstellung der Barriere hat dabei den Ausbruch und das Fortschreiten der Erkrankung verzögert (Winkler, Sengillo et al. 2014). In einem Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) kommt es insbesondere zu Beginn der Erkrankung zu einer Undichtigkeit der Barriere mit darauf folgender Neuroinflammation und Demyelinisierung (Schellenberg, Buist et al. 2007). Echeverry et al. konnten in der Blut-Rückenmarkschranke die Herabregulation von ZO-1 und Occludin in einem neuropathischen Schmerzmodell (partial sciatic nerve ligation) nachweisen (Echeverry, Shi et al. 2011). Inwieweit jedoch andere Tight Junction-Proteine für die Funktion der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie verant-

Diskussion

wortlich sind ist unbekannt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit weitere Tight Junction-Proteine nach einer Nervenverletzung (CCI) zu identifizieren. Dabei erfolgte die Auswahl der Tight Junction-Proteine anhand der Literatur, die Tight Junction-Proteine im peripheren und zentralen Nervensystem beschreibt: Claudin-1 dichtet die Blut-Nervenschranke einschließlich des Perineuriums ab und verhindert den Durchtritt analgetischer Arzneimittel durch diese Barriere, wie auch bei der Blut-Hirnschranke (Hirakawa, Okajima et al. 2003, Hackel, Krug et al. 2012). In kapillären Endothelzellen des Gehirns von Mäusen ist die mRNA-Expression von Claudin-1 gering, weshalb Claudin-1 für die Funktion der Blut-Hirnschranke wohl eine untergeordnete Rolle spielt (Ohtsuki, Yamaguchi et al. 2008). Tatsächlich war es verschiedenen Arbeitsgruppen nicht möglich die Claudin-1 Immunreaktivität in Kapillaren des zentralen Nervensystems oder in Endothelzellen des Gehirns von Menschen und Mäusen nachzuweisen, nachdem die Kreuzreaktivität des Anti-Claudin-1-Antikörpers mit Claudin-3 ausgeschlossen wurde (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2003, Hamm, Dehouck et al. 2004, Coisne, Dehouck et al. 2005). Dennoch führt in einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis eine ektope Tetrazyklin-regulierte Überexpression von Claudin-1 in Kapillaren des Gehirns zu einer erhöhten Dichtigkeit gegenüber exogenen Markern und endogenen Plasmaproteinen. Dabei hatte die ektope Expression von Claudin-1 aber keinen Einfluss auf die Infiltration von Immunzellen (Pfeiffer, Schafer et al. 2011). Folglich nimmt Claudin-1 eine bedeutende Rolle im Erhalt der Barrierefunktion ein. Im Rückenmark wurde Claudin-1 bisher aber nicht untersucht. In Bezug auf die Blut-Rückenmarkschranke konnte in dieser Studie eine Reduktion der mRNA von Claudin-1 insbesondere 6 h und 14 d nach einer CCI nachgewiesen werden, wobei die Proteinexpression unverändert blieb. Inwieweit die Funktion von Claudin-1 einen Beitrag zur Blut-Rückenmarkschranke leistet, sollte aber weiter aufgeklärt werden.

Claudin-5 als vorherrschendes Tight Junction-Protein der Blut-Hirnschranke ist, wie auch für die Blut-Rückenmarkschranke, maßgeblich für den Erhalt der Barriere verantwortlich (Ohtsuki, Sato et al. 2007, Zhong, Deane et al. 2008). Dabei dichtet es die Blut-Hirnschranke stärker ab als die Endothelzellen anderer Gewebe. Diese Tatsache wird durch einen KO-Phänotyp untermauert: Mäuse, die kein Claudin-5 exprimieren zeigen eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke für Moleküle die ca. 800 Da groß sind. Und obwohl die Mäuse makroskopisch normal sind, sterben sie innerhalb der ersten 10 h nach Geburt (Nitta, Hata et al. 2003). Innerhalb der

Diskussion

peripheren Nerven ist Claudin-5 sowohl in Endothelzellen endoneuraler Gefäße als auch in Mesaxonen und Myelininzisuren exprimiert (Poliak, Matlis et al. 2002). Es ist außerdem bekannt, dass Claudin-5 im Rückenmark einer Superoxiddismutase-assoziierten amyotrophen Lateralsklerose reduziert ist (Zhong, Deane et al. 2008). Gleichwohl zeigte diese Untersuchung, dass sowohl in einer CCI-induzierten Neuropathie die Claudin-5-mRNA des gesamten Rückenmarks vermindert ist als auch die Immunreaktivität in isolierten Kapillaren des Rückenmarks. Im Kontext zu Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die bei einer CCI eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Rückenmarkschranke gegenüber Evans Blue und Natriumfluorescein nachgewiesen haben, könnte die Reduktion von Claudin-5 im Rückenmark als auch in den Kapillaren eine mögliche Erklärung dafür sein.

Occludin war das erste Tight Junction-Protein, das entdeckt wurde (Furuse, Hirase et al. 1993). Es ist in der Blut-Hirnschranke, in peripheren Nerven und auch in der Blut-Rückenmarkschranke vorhanden. Zunächst wurde allgemein angenommen, dass es als zentrales Protein für die Formation der Tight Junctions verantwortlich ist, weil eine Überexpression von Occludin zu einem erhöhten transepithelialen Widerstand führte. Trotzdem konnte in Occludin-Knockout-Mäusen ein physiologischer transepithelialer Widerstand und eine korrekte Anordnung der Tight Junctions festgestellt werden (Saitou, Furuse et al. 2000). Als Folge dessen ist Occludin zwar wichtig für den Aufbau der Zell-Zell-Kontakte in den Tight Junctions, diese Funktion kann allerdings auch durch andere Proteine übernommen werden. Ikenouchi et al. zeigten, dass Tricellulin, ein Protein das vorrangig an trizellulären Kontakten lokalisiert ist, teilweise die Funktion von Occludin an bizellulären Kontakten übernehmen kann (Ikenouchi, Furuse et al. 2005, Ikenouchi, Sasaki et al. 2008). Tricellulin (MARVELD2), als zentraler Bestandteil der trizellulären Tight Junctions, ist insbesondere für die Restriktion von Makromolekülen durch die Barriere verantwortlich und ist auch Bestandteil in peripheren myelinisierten Schwann-Zellen (Krug, Amasheh et al. 2009, Kikuchi, Ninomiya et al. 2010). Obwohl Tricellulin-mRNA im Rückenmark nachweisbar ist, konnte keine Immunreaktivität in Mäusen detektiert werden (Kikuchi, Ninomiya et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie Tricellulin mittels Western Blot im Rückenmark von Ratten nachgewiesen werden, auch wenn es nach einer CCI unverändert blieb. Möglicherweise ist dieses Vorhandensein von Tricellulin durch die Tierspezies bedingt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Echeverry et al., die in einem neuropathischen Schmerzmodell (PSL) eine Reduktion von Occludin

Diskussion

nachweisen konnten, zeigte sich in dieser Studie ebenfalls eine reduzierte mRNA- und Proteinexpression im lumbalen Rückenmark.

Claudin-19 ist das einzige Tight Junction-Protein, das nur im peripheren und nicht im zentralen Nervensystem exprimiert ist. Als Bestandteil des Perineuriums konnte in einem Tiermodell der hereditären Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (HNPP = Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies) eine gestörte Verteilung von Claudin-19 in der Membran nachgewiesen werden (Guo, Wang et al. 2014, Sauer, Krug et al. 2014). Der Nachweis von Claudin-19 (mRNA und Protein) in dieser Arbeit ist demnach widersprüchlich zur aktuellen Literatur. Vermutlich stammt es von Teilen der Spinalnervenwurzeln. Auch sind Unterschiede bezüglich der Tierspezies möglich. Nichtsdestotrotz konnte hier der Nachweis erbracht werden, dass die Claudin-19-mRNA im gesamten Rückenmark nach einer CCI signifikant zu allen untersuchten Zeitpunkten bei unveränderter Proteinexpression vermindert ist.

Das Ankerprotein ZO-1 gehört zu den zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen und verbindet das Aktinskelett der Zelle mit den integralen Tight Junction-Proteinen der Membran. Demnach spielt es für die Organisation von Claudinen und Occludin eine entscheidende Rolle. Umeda et al. konnten zeigen, dass ZO-1 und ZO-2 unabhängig voneinander festlegen, ob und wie Claudine in der Zellmembran verteilt werden (Umeda, Ikenouchi et al. 2006). In ZO-1-Knockout-Mäusen führt der Verlust von ZO-1 zu embryonalen und extraembryonalen Dottersackdefekten gefolgt von embryonaler Letalität. Ebenso konnte eine Fehllokalisierung von JAM-A (junctional adhesion molecule-A) mit einhergehender Störung der parazellulären Barrierefunktion festgestellt werden (Katsuno, Umeda et al. 2008). Viele neurologische Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose, ALS oder Rückenmarksverletzungen sind mit einer Reduktion von ZO-1 assoziiert (Bartanusz, Jezova et al. 2011). Echeverry et al. zeigten in einem neuropathischen Schmerzmodell, dass eine PSL die Expression von Occludin und ZO-1 reduziert, was folglich zu einem Zusammenbruch der Blut-Rückenmarkschranke führt (Echeverry, Shi et al. 2011). Zusammenfassend beeinträchtigt eine Reduktion von ZO-1 in hohem Maße die Funktion der Tight Junction-Proteine und somit auch die parazelluläre Barriere. Konkordant mit den Ergebnissen von Echeverry et al. konnte für das Schmerzmodell (CCI) in dieser Studie eine Veränderung von ZO-1 gezeigt werden. Unter allen untersuchten Proteinen waren die mRNA, der zytoplasmatische Proteingehalt und auch die Expression in den Kapillaren des Rückenmarks 7 und 14 d nach der CCI am stärksten reduziert. Diese

Diskussion

Tatsache könnte die Undichtigkeit der Barriere erklären, obwohl die anderen Tight Junction-Proteine unverändert in der Zellmembran nachweisbar sind. Möglicherweise kommt es durch die Reduktion von ZO-1 zu einer gestörten Verteilung der untersuchten Claudine sowie Occludin in der Zellmembran, wodurch diese Tight Junction-Proteine ihre Funktion verlieren.

Auffällig ist, dass die mRNA im lumbalen Rückenmark von allen untersuchten Proteinen 7 und 14 d nach der CCI deutlich reduziert ist, wobei die Proteinexpression bis auf ZO-1 im weiteren Sinne konstant bleibt. Dabei könnten zwei Hypothesen die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression erklären. Zum einen könnte die Degradation der Proteine unter pathologischen Bedingungen im Sinne der CCI reduziert sein, um eine ausreichende Menge an Tight Junction-Proteinen in der Membran zu gewährleisten. In vitro Untersuchungen von Zellkulturen der Proteine Claudin-4, Occludin und Claudin-5 betrug die Halbwertszeit dieser Proteine 4, 6 und 14 h (Van Itallie, Colegio et al. 2004, Ramirez, Fan et al. 2013). Leider existieren keine endgültigen Daten in vivo. Ebenso wurden die Halbwertszeiten von Occludin und Claudin-1 nicht näher untersucht (Kyoko, Kono et al. 2014). Zum anderen führt eine reduzierte mRNA zwar zu einer geringeren Translation der Proteine, Reparaturmechanismen der Zelle könnten allerdings eine Translokation transmembranärer Tight Junction-Proteine aus dem zytoplasmatischen Pool forcieren, um die Barrierefunktion aufrecht zu erhalten. Dennoch zeigen die Permeabilitätstests von Sauer et al. eine Undichtigkeit gegenüber Natriumfluorescein und Evans Blue, obwohl in dieser Arbeit keine Veränderung der Proteinexpression von Claudin-1, Claudin-19 und Occludin festgestellt werden konnte. Eine mögliche Interpretation wäre, dass diese Proteine für die Barrierefunktion der Blut-Rückenmarkschranke eine deutlich untergeordnete Rolle spielen und lediglich ZO-1 und zum Teil auch Claudin-5 in den Kapillaren relevant sind. Auf Grund der kurzen Halbwertszeit ist die Expression von Claudinen in der Membran und die damit verbundene Barrierefunktion ein dynamischer Prozess. Ursächlich dafür sind vielfache Phosphorylierungsprozesse wie zum Beispiel die Phosphorylierung von Claudin-5 durch die Proteinkinase $C\alpha$ und ζ mit resultierendem Wegfall aus der Zellmembran (Krause, Winkler et al. 2008). Die paraendotheliale Permeabilität ist folglich durch die Aktivierung der Proteinkinase $C\alpha$ erhöht (Stamatovic, Dimitrijevic et al. 2006). Auch Occludin wird phosphoryliert und führt abhängig von der phosphorylierten Hydroxygruppe zu einer erhöhten oder verringerten Barriere-dichtigkeit (Dorfel, Westphal et al. 2013, Muthusamy, Lin et al. 2014). In Zellkulturen

Diskussion

(humane renale HK-2 und MDCK-II von Kaninchen) führt eine hypotone Osmolalität zur Dephosphorylierung, Clathrin-abhängiger Endozytose und Degradation von Claudin-1 und Claudin-2 in Lysosomen mit nachfolgender Störung der Tight Junction-Funktion (Fujii, Matsuo et al. 2016). Zusammenfassend führt eine Phosphorylierung von Tyrosin zu einer Destabilisierung der Tight Junctions, wohingegen insbesondere die Phosphorylierung von Threonin durch atypische Proteinkinasen C einen Zusammenschluss der Tight Junction-Proteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-5, Tricellulin und Occludin bedingt. Über Claudin-19 ist allerdings nichts bekannt (Dorfel und Huber 2012). Demnach schließt die Expression der Tight Junction-Proteine in der Membran, wie in dieser Studie gezeigt werden konnte, eine veränderte Funktion der Blut-Rückenmarkschranke nicht aus. Entgegen der Erwartungen lieferten die rt-qPCR-Daten aus isolierten Kapillaren des lumbalen Rückenmarks keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Regulation der Tight Junction-Proteine nach der CCI. Übereinstimmend mit den PCR-Daten aus dem gesamten lumbalen Rückenmark wäre in Kapillaren ebenfalls eine Reduktion der Tight Junction-Proteine zu erwarten gewesen, da diese benachbarte Endothelzellen untereinander abdichten. Jedoch war die mRNA von Claudin-1, Claudin-19 und ZO-1 nach der CCI im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nur tendenziell verringert, wohingegen Claudin-5, Tricellulin und Occludin unverändert blieben. Eine mögliche Interpretation wäre, dass aufgrund der anspruchsvollen Methodik die Qualität und Quantität der RNA nicht ausreichend war und somit Unterschiede zwischen den Gruppen nicht hinreichend detektiert werden konnten. Weitere Versuche mit Erhöhung der Anzahl der Tiere wären notwendig, um die Ergebnisse zu konkretisieren. Ebenso wäre es denkbar, dass mögliche Unterschiede aufgrund der Verwendung des gesamten lumbalen Rückenmarks nicht nachweisbar sind. In einer Studie, bei der die Funktion der Blut-Rückenmarkschranke nach spinal nerve lesion (SNL) untersucht wurde, ergaben sich zwar Hinweise, dass die Extravasation von Albumin in das Rückenmark beide Hälften des Rückenmarks betrifft, jedoch die Anreicherung auf der ipsilateralen Seite der SNL deutlich ausgeprägter war (Gordh, Chu et al. 2006). Obwohl diese Arbeitsgruppe im Rahmen der Permeabilitätstests nach einer CCI keine Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralem Rückenmark festgestellt hat, könnte es dennoch sinnvoll sein die mRNA-Expression der Tight Junction-Proteine in den Kapillaren des ipsilateralen Rückenmarks zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede zu scheinoperierten Tieren aufzuzeigen. In dieser Studie wurde davon abgesehen, da andere Studien bereits

gezeigt hatten, dass neurodegenerative Veränderungen im Rückenmark in Folge einer gestörten Blut-Rückenmarkschranke nach peripherer Nervenverletzung beide Hälften des Rückenmarks betreffen (Gordh, Sharma et al. 1998, Gordh, Sharma et al. 2000, Gordh und Sharma 2006).

4.3.2 Tight Junction-Proteine und Neuroinflammation

Es ist bekannt, dass periphere und zentrale Sensibilisierungsmechanismen zur Entstehung chronisch neuropathischer Schmerzen beitragen. Im Zusammenhang mit dieser sogenannten neuronalen Plastizität wird die synaptische Transmission in Neuronen in Richtung Exzitation verschoben, was zur Aufrechterhaltung der Hyperalgesie führt (Tsuda 2018). Neben weiteren multidimensionalen Veränderungen entlang des Schmerzsignalweges ergab sich in den letzten Jahren zunehmend Evidenz, dass nicht-neuronale Zellen (Makrophagen, Monozyten, Glia-Zellen, T-Zellen) und Neuroinflammation im ZNS zu chronischen Schmerzzuständen beitragen (Basbaum, Bautista et al. 2009, Ji, Xu et al. 2014). In diesem Kontext kommt es nach einer peripheren Nervenverletzung zu einer Einwanderung von Immunzellen in das Rückenmark sowie zu einer Aktivierung von Mikroglia (Zhang, Shi et al. 2007, Costigan, Moss et al. 2009). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Mikrogliaaktivierung im Rückenmark und neuropathischen Schmerzen konnte erstmals 2003 durch die Aktivierung und Hochregulation der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase, ein Mikroglia-spezifisches Signalprotein, nach einer SNL nachgewiesen werden (Jin, Zhuang et al. 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Zusammenbruch der Blut-Rückenmarkschranke eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Mikroglia spielt. Echeverry et al. konnten zeigen, dass die Freisetzung von Chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) aus geschädigten Neuronen, nach peripherer Nervenverletzung, zu einer Beeinträchtigung der Blut-Rückenmarkschranke führt. Des Weiteren ist MCP-1 ein wichtiger Trigger der Mikrogliaaktivierung (Zhang, Shi et al. 2007, Echeverry, Shi et al. 2011). Die erhöhte Permeabilität der Blut-Rückenmarkschranke durch eine Herabregulation von ZO-1 und Occludin ermöglicht eine Penetration proinflammatorischer Moleküle und Immunzellen (Echeverry, Shi et al. 2011). In dieser Arbeit wurden weitere Tight Junction-Proteine in einem neuropathischen Schmerzmodell untersucht, um festzustellen inwieweit andere Tight Junction-Proteine zur Aufrechterhaltung der Blut-Rückenmarkschranke beitragen. Die erhöhte Permeabilität lässt sich insbesondere durch eine Herabregulation von

Claudin-5 und ZO-1 erklären. Zusätzlich ist die mRNA von Claudin-1, Claudin-19 und Occludin bei gleichzeitig unveränderter Membranproteinexpression reduziert. Somit konnte die Rolle der Tight Junctions in der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie weiter entschlüsselt und deren vitale Funktion zur Separierung von Immunsystem und ZNS unterstrichen werden.

4.4 Ausblick

Nach wie vor stellt die Therapie des neuropathischen Schmerzes eine klinische Herausforderung dar. Dabei fokussiert sich die Therapie vorrangig auf die Symptomlinderung, da die Ursache nur in den seltensten Fällen behoben werden kann. Erschwerend kommt hinzu, dass die Pathophysiologie der Neuropathie nicht vollständig verstanden ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zu einem besseren Verständnis des Pathomechanismus beitragen und wurden zum Teil im wissenschaftlichen Fachmagazin *Annals of the New York Academy of Science* mit Co-Autorschaft veröffentlicht (Sauer, Kirchner et al. 2017). Zusammen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Neuropathie zur Öffnung der Blut-Rückenmarkschranke durch Reduktion der Expression von ZO-1 und Claudin-5 in Kapillaren führt. Dabei scheint die subzelluläre Lokalisation der Tight Junction-Proteine als auch deren Regulation eine wichtige Rolle zu spielen und sollte in weiteren Untersuchungen präzisiert werden. Klinisch relevant könnten die Ergebnisse in der Therapie des neuropathischen Schmerzes im Sinne einer Schmerzreduktion durch Wiederherstellung der Barriere werden. Dabei könnte ein GSK-3-Inhibitor denkbar sein. Generell sind Proteinkinasen in der Regulierung vieler biologischer Prozesse, einschließlich Signaltransduktion, Genexpression und zellulärer Abläufe beteiligt. Taucht dabei eine Mutation oder Dysregulation auf, kann dies ursächlich für viele Erkrankungen sein (Manning, Whyte et al. 2002, Licht-Murava, Paz et al. 2016). Die Inhibierung der GSK-3 als therapeutisches Target bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Parkinson oder M. Alzheimer, rückte zunehmend in den Vordergrund (Duda, Wisniewski et al. 2018). In einer klinischen Phase-2-Studie konnte bereits der irreversible GSK-3-Inhibitor Tideglusib die kognitive Funktion bei Patienten mit M. Alzheimer verbessern (del Ser, Steinwachs et al. 2013). In der Pathogenese des M. Parkinson führt die Entzündungsreaktion durch proinflammatorische Zytokine aus aktivierten Mikroglia konsekutiv zu einem Verlust dopaminerger Neurone. Dabei fördert eine Aktivierung der GSK-3 die

Diskussion

Inflammation nach Mikrogliaaktivierung. Die entzündungsbedingte Toxizität der Neurone kann folglich durch die Inhibierung der GSK-3 verhindert werden (Li, Liu et al. 2014). Innerhalb der Signalkaskade hat eine erhöhte Aktivität der GSK-3 β eine reduzierte Stabilität von β -Catenin zur Folge und führt durch eine Ubiquitinierung zu dessen Degradation mit fehlender Translokation in den Zellkern und daraus resultierender verminderter Expression von Tight Junction-Proteinen (Ramirez, Fan et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um diese Studie wies bereits den Effekt eines GSK-3 β -Inhibitors in der Blut-Nervenschranke nach, der die Öffnung dieser Barriere durch ein Claudin-1-Peptidmimetika verhinderte (Sauer, Krug et al. 2014). Es wäre daher denkbar einen GSK-3 β -Inhibitor für den Verschluss der Blut-Rückenmarkschranke zu verwenden, um auf diese Weise neuropathischen Schmerz zu lindern (Mazzardo-Martins, Martins et al. 2012). Weitere Untersuchungen sollten unternommen werden, um dieser Hypothese nachzugehen. Einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt zur Wiederherstellung der Blut-Rückenmarkschranke könnten die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) darstellen. Die MMP sind Zink-abhängige Endopeptidasen mit proteolytischen Eigenschaften, die Bestandteile der Extrazellulärmatrix sowie Chemokine und Zytokine abbauen (Lakhan und Avramut 2012). Bemerkenswert ist, dass MMP die Permeabilität der Blut-Hirnschranke durch Degradation von Tight Junction-Proteinen erhöhen (Yang, Estrada et al. 2007). Die Arbeitsgruppe von Rittner et al. konnte bereits in der perineuralen Barriere die Signalkaskade von MMP-9 mit nachfolgender Degradation von Claudin-1 nachweisen (Hackel, Brack et al. 2012). In der Entstehung von neuropathischen Schmerzen nehmen die MMP-9 und MMP-2 eine zentrale Rolle ein. Nach peripherer Nervenverletzung induziert die MMP-9 eine Mikrogliaaktivierung über eine Aktivierung des Zytokins Interleukin-1 β , wohingegen die MMP-2 für die Aufrechterhaltung des neuropathischen Schmerzes verantwortlich ist (Kawasaki, Xu et al. 2008). Zudem haben mehrere Studien nachgewiesen, dass ZO-1 und Occludin durch die MMP-9 degradiert werden (Kumar, Jo et al. 2018). Weitere Versuche wären notwendig, um den Effekt eines MMP-9-Inhibitors auf die Tight Junction-Proteine der Blut-Rückenmarkschranke bei Neuropathie und daraus resultierende Schmerzlinderung nachzuweisen.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.

Anderson, J. M., et al. (1995). "Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction." Biochem Soc Trans **23**(3): 470-475.

Argaw, A. T., et al. (2009). "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1977-1982.

Attal, N., et al. (2011). "The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey." Pain **152**(12): 2836-2843.

Barber, R. D., et al. (2005). "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." Physiol Genomics **21**(3): 389-395.

Baron, R. (2006). "Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective." Nat Clin Pract Neurol **2**(2): 95-106.

Baron, R., et al. (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment." Lancet Neurol **9**(8): 807-819.

Bartanusz, V., et al. (2011). "The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications." Ann Neurol **70**(2): 194-206.

Basbaum, A. I., et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-284.

Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**(1): 87-107.

Betterle, C. and R. Zanchetta (2012). "The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases." Autoimmunity Highlights **3**(2): 67-78.

Bingham, B., et al. (2009). "The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology." Nat Clin Pract Rheumatol **5**(1): 28-37.

Boccaletto, P., et al. (2018). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update." Nucleic Acids Res **46**(D1): D303-D307.

Bouhassira, D., et al. (2008). "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." Pain **136**(3): 380-387.

Bridges, D., et al. (2001). "Mechanisms of neuropathic pain." Br J Anaesth **87**(1): 12-26.

Anhang

- Cahill, L. S., et al. (2014). "Quantifying blood-spinal cord barrier permeability after peripheral nerve injury in the living mouse." Mol Pain **10**: 60.
- Campbell, J. N. and R. A. Meyer (2006). "Mechanisms of neuropathic pain." Neuron **52**(1): 77-92.
- Cao, L. and J. A. DeLeo (2008). "CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain." Eur J Immunol **38**(2): 448-458.
- Chaplan, S. R., et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." J Neurosci Methods **53**(1): 55-63.
- Cheng, J. K. and R. R. Ji (2008). "Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain." Neurochem Res **33**(10): 1970-1978.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**(3): 532-534, 536-537.
- Coisne, C., et al. (2005). "Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium." Lab Invest **85**(6): 734-746.
- Colloca, L., et al. (2017). "Neuropathic pain." Nat Rev Dis Primers **3**: 17002.
- Costigan, M., et al. (2009). "T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity." J Neurosci **29**(46): 14415-14422.
- Cruccu, G. and A. Truini (2017). "A review of Neuropathic Pain: From Guidelines to Clinical Practice." Pain Ther **6**(Suppl 1): 35-42.
- Decosterd, I. and C. J. Woolf (2000). "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain." Pain **87**(2): 149-158.
- del Ser, T., et al. (2013). "Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study." J Alzheimers Dis **33**(1): 205-215.
- Dorfel, M. J. and O. Huber (2012). "Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin." J Biomed Biotechnol **2012**: 807356.
- Dorfel, M. J., et al. (2013). "CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity." Cell Commun Signal **11**(1): 40.
- Duda, P., et al. (2018). "Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging." Expert Opin Ther Targets **22**(10): 833-848.
- Echeverry, S., et al. (2011). "Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway." J Neurosci **31**(30): 10819-10828.

Anhang

Engelhardt, B. and L. Sorokin (2009). "The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction." Semin Immunopathol **31**(4): 497-511.

Fleige, S. and M. W. Pfaffl (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." Mol Aspects Med **27**(2-3): 126-139.

Fornasari, D. (2017). "Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review." Pain Ther **6**(Suppl 1): 25-33.

Fujii, N., et al. (2016). "Hypotonic Stress-induced Down-regulation of Claudin-1 and -2 Mediated by Dephosphorylation and Clathrin-dependent Endocytosis in Renal Tubular Epithelial Cells." J Biol Chem **291**(47): 24787-24799.

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

Furuse, M., et al. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-1788.

Furuse, M., et al. (1994). "Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1617-1626.

Garibyan, L. and N. Avashia (2013). "Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)." J Invest Dermatol **133**(3): e6.

Gordh, T., et al. (2006). "Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat." Pain **124**(1-2): 211-221.

Gordh, T. and H. S. Sharma (2006). "Chronic spinal nerve ligation induces microvascular permeability disturbances, astrocytic reaction, and structural changes in the rat spinal cord." Acta Neurochir Suppl **96**: 335-340.

Gordh, T., et al. (1998). "Spinal nerve lesion induces upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord. An immunohistochemical investigation in the rat." Amino Acids **14**(1-3): 105-112.

Gordh, T., et al. (2000). "Spinal nerve lesion induces upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase in the spinal cord. An immunohistochemical investigation in the rat." Amino Acids **19**(1): 373-381.

Guillemot, L., et al. (2008). "The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 601-613.

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

Anhang

Guo, J., et al. (2014). "Abnormal junctions and permeability of myelin in PMP22-deficient nerves." Ann Neurol **75**(2): 255-265.

Hackel, D., et al. (2012). "Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control." Ann N Y Acad Sci **1257**: 199-206.

Hackel, D., et al. (2012). "Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): E2018-2027.

Hamm, S., et al. (2004). "Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts." Cell Tissue Res **315**(2): 157-166.

Handwerker, H. O. (2007). "[From Descartes to fMRI. Pain theories and pain concepts]." Schmerz **21**(4): 307-310, 312-307.

Hargreaves, K., et al. (1988). "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." Pain **32**(1): 77-88.

Higuchi, R., et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.

Hirakawa, H., et al. (2003). "Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins." Exp Cell Res **284**(2): 196-210.

Ikenouchi, J., et al. (2005). "Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells." J Cell Biol **171**(6): 939-945.

Ikenouchi, J., et al. (2008). "Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin." Mol Biol Cell **19**(11): 4687-4693.

Jaggi, A. S., et al. (2011). "Animal models of neuropathic pain." Fundam Clin Pharmacol **25**(1): 1-28.

Jensen, T. S. and N. B. Finnerup (2014). "Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms." Lancet Neurol **13**(9): 924-935.

Ji, R. R., et al. (2014). "Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain." Nat Rev Drug Discov **13**(7): 533-548.

Jin, S. X., et al. (2003). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain." J Neurosci **23**(10): 4017-4022.

Anhang

- Katsuno, T., et al. (2008). "Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells." Mol Biol Cell **19**(6): 2465-2475.
- Kawasaki, Y., et al. (2008). "Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain." Nat Med **14**(3): 331-336.
- Kikuchi, S., et al. (2010). "Tricellulin is expressed in autotypic tight junctions of peripheral myelinating Schwann cells." J Histochem Cytochem **58**(12): 1067-1073.
- Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." Pain **50**(3): 355-363.
- Krause, G., et al. (2008). "Structure and function of claudins." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 631-645.
- Krug, S. M., et al. (2009). "Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability." Mol Biol Cell **20**(16): 3713-3724.
- Kumar, H., et al. (2018). "Matrix Metalloproteinase-8 Inhibition Prevents Disruption of Blood-Spinal Cord Barrier and Attenuates Inflammation in Rat Model of Spinal Cord Injury." Mol Neurobiol **55**(3): 2577-2590.
- Kyoko, O. O., et al. (2014). "Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis." PLoS One **9**(5): e98016.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lakhan, S. E. and M. Avramut (2012). "Matrix metalloproteinases in neuropathic pain and migraine: friends, enemies, and therapeutic targets." Pain Res Treat **2012**: 952906.
- Li, D. W., et al. (2014). "Association of glycogen synthase kinase-3beta with Parkinson's disease (review)." Mol Med Rep **9**(6): 2043-2050.
- Licht-Murava, A., et al. (2016). "A unique type of GSK-3 inhibitor brings new opportunities to the clinic." Sci Signal **9**(454): ra110.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Manning, G., et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.

Anhang

- Mazzardo-Martins, L., et al. (2012). "Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action." Neuroscience **226**: 411-420.
- Morita, K., et al. (1999). "Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells." J Cell Biol **147**(1): 185-194.
- Muthusamy, A., et al. (2014). "Ischemia-reperfusion injury induces occludin phosphorylation/ubiquitination and retinal vascular permeability in a VEGFR-2-dependent manner." J Cereb Blood Flow Metab **34**(3): 522-531.
- Nitta, T., et al. (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-660.
- Ohtsuki, S., et al. (2007). "Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells." J Cell Physiol **210**(1): 81-86.
- Ohtsuki, S., et al. (2008). "mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting." J Neurochem **104**(1): 147-154.
- Ossipov, M. H., et al. (2010). "Central modulation of pain." J Clin Invest **120**(11): 3779-3787.
- Pan, W., et al. (1997). "Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons." J Neuroimmunol **76**(1-2): 105-111.
- Pfeiffer, F., et al. (2011). "Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." Acta Neuropathol **122**(5): 601-614.
- Poliak, S., et al. (2002). "Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells." J Cell Biol **159**(2): 361-372.
- Prockop, L. D., et al. (1995). "Selective permeability of [3H]-D-mannitol and [14C]-carboxyl-inulin across the blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in the rabbit." J Spinal Cord Med **18**(4): 221-226.
- Ramirez, S. H., et al. (2013). "Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5." PLoS One **8**(2): e55972.
- Reinhold, A. K. and H. L. Rittner (2017). "Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review." Pflugers Arch **469**(1): 123-134.
- Roundtree, I. A., et al. (2017). "Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation." Cell **169**(7): 1187-1200.

Anhang

- Saitou, M., et al. (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." Mol Biol Cell **11**(12): 4131-4142.
- Sauer, R. S., et al. (2017). "Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy." Ann N Y Acad Sci **1405**(1): 71-88.
- Sauer, R. S., et al. (2014). "Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability." J Control Release **185**: 88-98.
- Schaible, H. G. and F. Richter (2004). "Pathophysiology of pain." Langenbecks Arch Surg **389**(4): 237-243.
- Schellenberg, A. E., et al. (2007). "Magnetic resonance imaging of blood-spinal cord barrier disruption in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." Magn Reson Med **58**(2): 298-305.
- Schlereth, T. (2019). "Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie." Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-1368.
- Seltzer, Z., et al. (1990). "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury." Pain **43**(2): 205-218.
- Smith, P. K., et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Stamatovic, S. M., et al. (2006). "Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability." J Biol Chem **281**(13): 8379-8388.
- Suzuki, T., et al. (2000). "Control selection for RNA quantitation." Biotechniques **29**(2): 332-337.
- Towbin, H., et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Tsuda, M. (2018). "Microglia in the CNS and Neuropathic Pain." Adv Exp Med Biol **1099**: 77-91.
- Tsukita, S., et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 285-293.
- Umeda, K., et al. (2006). "ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation." Cell **126**(4): 741-754.
- van Hecke, O., et al. (2014). "Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies." Pain **155**(4): 654-662.

Anhang

- Van Itallie, C. M., et al. (2004). "The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability." J Membr Biol **199**(1): 29-38.
- von Hehn, C. A., et al. (2012). "Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms." Neuron **73**(4): 638-652.
- Wagner, R., et al. (1998). "Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression." Pain **74**(1): 35-42.
- Whitwam, J. G. (1976). "Classification of peripheral nerve fibres. An historical perspective." Anaesthesia **31**(4): 494-503.
- Winkler, E. A., et al. (2012). "Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability." J Cereb Blood Flow Metab **32**(10): 1841-1852.
- Winkler, E. A., et al. (2014). "Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(11): E1035-1042.
- Wolburg, H., et al. (2003). "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **105**(6): 586-592.
- Yang, Y., et al. (2007). "Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat." J Cereb Blood Flow Metab **27**(4): 697-709.
- Zhang, J., et al. (2007). "Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain." J Neurosci **27**(45): 12396-12406.
- Zhao, B. S., et al. (2017). "Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(1): 31-42.
- Zhong, H. and J. W. Simons (1999). "Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia." Biochem Biophys Res Commun **259**(3): 523-526.
- Zhong, Z., et al. (2008). "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration." Nat Neurosci **11**(4): 420-422.
- Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." Pain **16**(2): 109-110.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbindungen zwischen primär afferenten Nervenfasern und dem Rückenmark*	2
Abbildung 2: Die aufsteigende Schmerzbahn*	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Schmerzmodelle*	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bestandteile der Blut-Rückenmarkschranke*	8
Abbildung 5: Struktur der Tight Junctions*	10
Abbildung 6: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mechanischen und thermischen Reizen*	14
Abbildung 7: Vermehrte Anreicherung von Natriumfluorescein (NaFlu) und Evans Blue (EBA) im Rückenmark der Ratten nach CCI*	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hypothese*	16
Abbildung 9: Graphische Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffs	18
Abbildung 10: Prinzip der Biuretreaktion*	23
Abbildung 11: Aufbau des Gel-Membran-Sandwich	25
Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	28
Abbildung 13: Reduzierte Expression der Tight Junction-Protein-mRNA im lumbalen Rückenmark nach CCI	37
Abbildung 14: Keine Veränderung der Tight Junction-Protein-Expression 7 d nach CCI in Kapillaren des lumbalen Rückenmarks im Vergleich zu scheinoperierten Tieren	38
Abbildung 15: Keine Veränderung von ausgewählten Tight Junction-Proteinen nach CCI im lumbalen Rückenmark, außer Occludin (7 d nach CCI)	39
Abbildung 16: Reduzierte Claudin-5-mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark und verminderte Immunreaktivität in Rückenmarkskapillaren 7 d nach CCI	41
Abbildung 17: Herabregulation von ZO-1-mRNA und -Proteinlevel im Rückenmark 7 und 14 d nach CCI	43

* Abdruckgenehmigung eingeholt

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachenbasierte Klassifikation von schmerzhaften Neuropathien mit einer Auswahl möglicher Differentialdiagnosen (Baron 2006).....	4
Tabelle 2: Zusammensetzung Mastermix	19
Tabelle 3: Zusammensetzung SybrGreen Mastermix.....	20
Tabelle 4: Verwendete Primer für die rt-qPCR.....	21
Tabelle 5: Zusammensetzung EP- und RIPA-Lysepuffer	22
Tabelle 6: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel	24
Tabelle 7: Zusammensetzung Elektrophorese- und Lämmli-Puffer	24
Tabelle 8: Zusammensetzung Towbin-Puffer	25
Tabelle 9: Zusammensetzung des TBST und Blockierungspuffer	26
Tabelle 10: Verwendete Primäantikörper.....	26
Tabelle 11: Verwendete Sekundäantikörper passend zum Primäantikörper.....	27
Tabelle 12: Verwendete Primäantikörper.....	30
Tabelle 13: Verwendete Sekundäantikörper.....	31
Tabelle 14: Verwendete Chemikalien und Kits	33
Tabelle 15: Verwendete Geräte	34
Tabelle 16: Sonstige verwendete Materialien	35
Tabelle 17: Ergebnisübersicht.....	44

5.4 Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	analysis of variance (dt. Varianzanalyse)
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	bicinchoninic acid assay (dt. Bicinchoninsäure-Assay)
BSA	bovine serum albumin (dt. Rinderserumalbumin)
BSCB	blood-spinal cord barrier
CCI	chronic constriction injury
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CFA	complete Freund's adjuvant (dt. Freund's Adjuvans)
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CRPS	complex regional pain syndrome (dt. Komplexes regionales Schmerzsyndrom)
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
EBA	Evans Blue
ECL	enhanced chemiluminescence (dt. signalverstärkende Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	fetal bovine serum (dt. fetales Kälberserum)
GABA	gamma-aminobutyric acid (dt. Gamma-Aminobuttersäure)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 β
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK-2	human kidney-2 (dt. menschliche Tubuluszellen der Niere)
HRP	horseradish peroxidase (dt. Meerrettichperoxidase)
IDV	integrated density value (dt. integrierter Dichtewert)
KO	knockout
MAGUK	membrane-associated guanylate kinases
MARVEL	MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MDCK-II	Madin-Darby Canine Kidney II
mM	Millimolar
MOR	μ -Opioid-Rezeptor
mRNA	messenger ribonucleic acid (dt. Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaFlu	Natriumfluorescein
NGS	normal goat serum (dt. Ziegenserum)
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	phosphate buffered saline (dt. Phosphat-gepufferte Salzlösung)

Anhang

PCR	polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
POD	Peroxidase
PSL	partial sciatic ligation
RIPA	radioimmunoprecipitation assay (dt. Radioimmunpräzipitationsassay)
rpm	revolutions per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (dt. ribosomale Ribonukleinsäure)
rt-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction (dt. quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dt. Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean (dt. Standardfehler)
SNI	spared nerve injury
SNL	spinal nerve ligation
SOD1	Superoxiddismutase 1
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1/2/3	Zonula occludens-1/2/3

5.5 Publikation

Sauer, R. S., J. Kirchner, S. Yang, L. Hu, M. Leinders, C. Sommer, A. Brack and H. L. Rittner (2017).
"Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy." Ann N Y Acad Sci **1405**(1): 71-88

5.6 Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Die Veränderungen der Tight Junction-Proteine der Blut-Rückenmarkschranke in einem neuropathischen Schmerzmodell bei Ratten* 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.

München, 01.07.2020

Juliane Kirchner

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled *Tight junction proteins in the blood-spinal cord barrier in neuropathic pain* 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.

München, 01.07.2020

Juliane Kirchner

5.7 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Heike Rittner für die hervorragende Betreuung und den wertschätzenden Umgang als Teil der Arbeitsgruppe bedanken. Durch Ihre wertvollen Anregungen und konstruktive Kritik konnte ich eine wissenschaftliche Ausbildung auf hohem Niveau genießen.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Dr. rer. nat. Reine-Solange Sauer, die mir während meiner Zeit im Labor mit Rat und Tat zu Seite stand. Ihre unablässige Hilfsbereitschaft, Bemühungen und Geduld wusste ich sehr zu schätzen.

Herr Prof. Dr. rer. nat. Erhard Wischmeyer und Herr Prof. Dr. med. Tobias Langenhan danke ich herzlichst für Ihre Expertise und Unterstützung während meines Promotionsvorhabens.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner lieben Familie und Till.

