



**Netrin-1 und seine Rezeptoren beeinflussen die Tight Junction
Expression bei neuropathischen Schmerzen**

Netrin-1 and its receptors regulate tight junction protein expression in
peripheral neuropathy

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Christina Rayka Schürger

aus

Würzburg

Würzburg 2022



Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Professor Dr. Uwe Gbureck

1. Betreuer: Professor Dr. med. Heike Rittner

2. Betreuer: Professor Dr. med. Claudia Sommer

3. Betreuer: Professor Dr. Philip Tovote

4. Betreuer: Dr. rer. nat. Jeremy Chen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	Inhaltsverzeichnis	
2	Einleitung	1
2.1	Neuropathischer Schmerz	1
2.1.1	Definition	1
2.1.2	Komplexe neuropathische Schmerzen - Complex Regional Pain Syndrome	2
2.1.3	Tiermodell für neuropathische Schmerzen - Chronic Constriction Injury	5
2.2	Schmerz und Barrierestörung	7
2.3	Netrin-1	9
2.3.1	Netrinfamilie	9
2.3.2	Rezeptoren	9
2.3.3	Funktion von Netrin-1	10
2.3.4	VI-V-Fragment	11
2.4	Vorergebnisse der Arbeitsgruppe	13
2.5	Hypothese und Fragestellung der Promotion	14
3	Methoden	16
3.1	Versuchstiere Ethik- und Tierversuchsvotum	16
3.1.1	Chronic Constriction Injury	16
3.1.2	Inhibition der Netrin-1 Rezeptoren	16
3.2	Patienten	17
3.2.1	Plasmaproben	17
3.2.2	Hautproben	18
3.3	mRNA Bestimmung	18
3.3.1	RNA Extraktion	18
3.3.2	Reverse Transkription	20
3.3.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	21
3.3.4	mRNA Analyse	22
3.3.5	Taq Man Assay	23
3.4	Western Blot	24
3.4.1	Proteinisolation	24
3.4.2	Gel	25
3.4.3	SDS Gelelektrophorese	25
3.4.4	Wet-Transfer	26
3.4.5	Proteindetektion	28
3.4.6	Entwicklung	28
3.4.7	Densitometrie	28
3.5	ELISA	28
3.6	BCA Assay	31
3.7	Statistische Auswertung	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Analysen im Tiermodell	32

Inhalt

4.1.1	Netrin-1 Expression im CCI Modell der Ratte	32
4.1.2	Reziproke Regulation der Netrinrezeptoren nach CCI	35
4.1.3	Einfluss von Netrin-1 über Neogenin-1 und Unc5b auf die Tight Junction Protein Expression.....	36
4.1.4	Kein Einfluss von Netrin-1-Injektion auf <i>Tnfa</i> Expression	40
4.2	Analysen von Plasma und Haut von CRPS Patientinnen und Patienten...	41
4.2.1	Erniedrigtes Netrin-1 Level im Patientenplasma	41
4.2.2	Pilotexperimente: Trend zu geringerer Netrin-1 und Claudinexpression in Patientenhautproben	43
5	Diskussion	45
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
5.2	Diskussion der Ergebnisse	45
5.2.1	Erniedrigter Netrin-1-Spiegel bei Neuropathie und CRPS	45
5.2.2	Erniedrigte Tight Junction Protein Expression in Neuropathie und CRPS	49
5.2.3	Erhöhte Tight Junction Protein Expression durch Netrin-1 Injektion	49
5.2.4	Veränderte Netrin-1 Rezeptor Expression durch Neuropathie	50
5.2.5	Erhöhte Tight Junction Protein Expression durch Unc5b Rezeptor Blockade bei Neuropathie	51
5.2.6	Keine rein antiinflammatorische Wirkung des Netrin-1	52
5.3	Kritikpunkte und Grenzen der vorliegenden Arbeit	53
5.3.1	Methodische Limitationen	53
5.3.2	Limitationen im Studiendesign	55
5.4	Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	55
6	Zusammenfassung	57
7	Summary	59
8	Anhang	61
8.1	Literaturverzeichnis	61
8.2	Materialien	71
8.3	Abkürzungsverzeichnis.....	77
8.4	Abbildungsverzeichnis	79
8.5	Tabellenverzeichnis	80
8.6	CRPS Kriterien nach IASP	81
9	Danksagung	82
10	Eidesstattliche Erklärung.....	83

2 Einleitung

2.1 Neuropathischer Schmerz

2.1.1 Definition

Die „International Association for the Study of Pain“ (IASP) definiert Schmerz als „Ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht oder einer solchen ähnelt“. Dies verdeutlicht, dass Schmerz eine physiologische Warnfunktion besitzt und vor schädlichen Verhaltensweisen bewahrt. Pathologisch wird Schmerz erst dann, wenn er diese Funktion durch ständiges Vorhandensein verliert. Eine aktuelle Überarbeitung der Definition bezieht auch die emotionale Komponente des Schmerzes mit ein (Raja et al., 2020).

Neuropathischen Schmerz beschreibt die IASP als einen „Schmerz, der von einer Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems ausgeht“. Dies unterscheidet ihn von anderen Schmerzen, die durch eine Gewebsschädigung entstehen, welche die Nerven aktiviert. Im Gegensatz hierzu entsteht der neuropathische Schmerz also direkt im Nervensystem oder durch assoziierte, nicht neuronale Zellen. Eine Einteilung ist in periphere (von Schäden des peripheren Nervensystems verursachte) und zentrale (vom zentralen Nervensystem ausgehende) chronische neuropathische Schmerzen möglich (Scholz et al., 2019). Baron et al. unterteilten die neuropathischen Schmerzen nach ihrer Ursache weiter in schmerzhafte periphere Neuropathie, generalisierte (Polyneuropathien), komplexe schmerzhafte Störungen und gemischte Schmerzsyndrome (Baron et al., 2010). Die generalisierten Neuropathien werden hierbei wiederum als peripher (beispielsweise diabetische Polyneuropathie, toxische Schäden) und zentral (z.B. Multiple Sklerose, Tumor) klassifiziert. Die Ursachen für neuropathische Schmerzen sind insgesamt heterogen und erstrecken sich über chemische und traumatische bis hin zu genetischen Schädigungen des Nervensystems.

2.1.2 Komplexe neuropathische Schmerzen - Complex Regional Pain Syndrome

2.1.2.1 Definition

„Complex Regional Pain Syndrome“ (CRPS) ist ein chronisches Schmerzsyndrom, dessen Ursache bisher nicht endgültig geklärt ist. Lange nach einem Trauma persistieren anhaltende Schmerzen und gelegentlich auch trophische Störungen meist einer Extremität. Die Zuordnung zu den neuropathischen Schmerzen ist vor allem für CRPS Typ I (ohne Nervenschädigung) aufgrund der noch immer unklaren Pathophysiologie umstritten (Naleschinski and Baron, 2010) wird aber in der Literatur vorgenommen (Baron et al., 2010; Dey et al., 2022; Di Pietro et al., 2020)

2005 erschienen zur Diagnosestellung des CRPS die von einer Expertengruppe erstellten „Budapest Kriterien“, die seitdem überarbeitet wurden (Harden et al., 2007):

1. Anhaltende Schmerzen, die dem auslösenden Ereignis nicht entsprechen
2. In der Anamnese werden drei von folgenden vier Kategorien erfüllt:
 - Sensorisch: Hyperästhesie und/oder Allodynie
 - Vasomotorisch: Temperaturasymmetrie und/oder Veränderung der Hautfarbe oder Hautfarbenasymmetrie
 - Sudomotorisch: Ödem und/oder asymmetrische Veränderungen der Schweißsekretion
 - Motorisch/Trophik: reduzierte Beweglichkeit und/oder motorische Dysfunktion (Schwäche, Tremor, Dystonie) und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)
3. In der Untersuchung werden zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt:
 - Sensorisch: Nachweis von Hyperalgesie auf spitze Reize, und/oder Allodynie (leichte Berührung und/oder tiefer Druck und/oder Gelenkbewegung)
 - Vasomotorisch: Nachweis von Temperaturasymmetrie und/oder Veränderung der Hautfarbe oder Hautfarbenasymmetrie
 - Sudomotorisch: Nachweis von Ödem und/oder Veränderungen der Schweißsekretion, Asymmetrie
 - Motorisch/Trophik: Nachweis von reduzierter Beweglichkeit und/oder

motorische Dysfunktion (Schwäche, Tremor, Dystonie) und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)

4. Keine andere Diagnose erklärt die Symptome

Die „Budapest Kriterien“ fordern neben den Angaben in der Anamnese zwingend auch Symptome in der aktuellen Untersuchung. In dieser Arbeit werden der Diagnose des CRPS die Forschungskriterien der „Budapest Kriterien“ zugrunde gelegt.

Die aktuellen Leitlinien fordern zur Diagnose anhaltenden Schmerz sowie klinische und anamnestische Kriterien aus den Symptomkategorien „Hyperalgesie, Allodynie“, „Asymmetrische Hauttemperatur, -farbe“, „Asymmetrie im Schwitzen, Ödem“, „Reduzierte Beweglichkeit, Asymmetrie Nagelwachstum“ (Birklein et al., 2018). Zur Therapie werden Physio- und Ergotherapie sowie symptomatische pharmakologische Schmerztherapie empfohlen.

Nach einer Konsensus-Konferenz in Valencia wurden die IASP Diagnosekriterien aktualisiert. Hierbei werden nun zur Diagnosestellung ebenfalls die „Budapest Kriterien“ verwendet. Es wird eine Klassifikation als „chronischer primärer Schmerz“ und nicht wie zuvor im ICD-11 genannt „autonome Störung“ gefordert. Es erfolgt eine Einteilung und Ergänzung der CRPS Typen neben I (ohne Nervenschaden) und II (mit Nervenschaden) um „Not Otherwise Specified (NOS)“ für Patientinnen und Patienten, die nicht alle Kriterien erfüllen, bei denen keine andere Diagnose die Erkrankung erklärt und „with Remission of some Features“, d.h. die im Krankheitsverlauf nicht mehr alle CRPS Kriterien erfüllen. Des Weiteren werden die Diagnosemethoden genau dargestellt und objektiviert (Goebel et al., 2021).

2.1.2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des CRPS wird in verschiedenen Studien unterschiedlich angegeben. Dies ist mutmaßlich den verschiedenen Diagnosekriterien geschuldet (Birklein and Dimova, 2017). Dabei geben große Studien eine Inzidenz zwischen 5,5 (Sandroni et al., 2003) und 26,6 (de Mos et al., 2007) pro 100.000 Einwohner an. Hierbei tritt bei 1-2 % der Menschen, die eine Fraktur erleiden ein CRPS auf, in besonderem Maße nach Radiusfraktur und nach einer Nervenläsion (11 % bzw. 2-5 %) (Sandroni et al., 2003).

Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Dies könnte auch dadurch bedingt sein, dass Frauen häufiger Radiusfrakturen erleiden (Jerrhag et al., 2017).

2.1.2.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Erkrankung ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird ein Zusammenspiel vieler Faktoren angenommen. In den meisten Arbeiten werden sympathikoafferente Effekte, Veränderungen des zentralen Nerven Systems (ZNS) und überschießende neurogene Entzündung diskutiert (Maihöfner and Birklein, 2007). Ebenfalls werden genetische Faktoren und Barrierestörungen untersucht. Die älteste Theorie ist, aufgrund der in der Erkrankung beobachteten autonomen Störungen, die der pathologischen sympathikoafferenten Kopplung. In der Haut betroffener Patienten wurde eine erhöhte Dichte von α Adrenorezeptoren gefunden (Drummond et al., 1996; Finch et al., 2014). Hieraus ergibt sich ein Therapieversuch durch ein lokale anästhetische Sympathikusblockade. Die Effektivität dieses Therapieansatzes wird allerdings angezweifelt (Stanton et al., 2013). Ebenfalls wichtige Bestandteile der Pathophysiologie sind zentralnervöse Veränderungen. Hierzu zählen Einflüsse der Psyche (Cho et al., 2013), aber auch strukturelle ZNS Veränderungen (Maihöfner et al., 2003), welche sich nach Besserung der Symptomatik reversibel zeigen (Maihöfner et al., 2004). Viele Arbeiten beschäftigen sich auch mit der Theorie einer überschießenden neurogenen Inflammation und deren Folgen. Diese lassen sich in lokale Untersuchungen von Haut sowie Nervengewebe und systemische Untersuchungen von Serum oder Plasma betroffener Patientinnen und Patienten aufteilen. Lokal wurden in der Haut der betroffenen Extremität von CRPS Patientinnen und Patienten vermehrt Mastzellen (Huygen et al., 2004) sowie proinflammatorische Zytokine (Wesseldijk et al., 2008) und $\text{TNF}\alpha$ (Krämer et al., 2011) nachgewiesen. Eine lokale Lactat-Erhöhung lässt eine Hypoxie vermuten (Birklein et al., 2000). Es wurde bilateral in der Haut eine erhöhte Konzentration der proinflammatorischen Cytokine im Vergleich zu Kontrollen mit anderen Schmerzen beschrieben (Lenz et al., 2013). Systemisch wurden im Blut von CRPS Patientinnen und Patienten ebenfalls erhöhte proinflammatorische Cytokinkonzentrationen (Uçeyler et al., 2007) sowie vermehrt $\text{TNF}\alpha$ (Maihöfner et al., 2005) nachgewiesen. All diese Untersuchungen konnten in CRPS eine erhöhte Entzündungsaktivität nachweisen und bestärken die Annahme von sowohl lokalen als auch systemischen Veränderungen der Erkrankung.

In einem weiteren Ansatz lassen sowohl das Vorhandensein eines Ödems (Kottke and Walters, 2016), als auch der chronische Schmerz in dieser Erkrankung auf eine Barriestörung schließen. In CRPS wird, wie bei manchen anderen Formen neuropathischer Schmerzen (siehe Kapitel 2.2), eine Barriestörung beschrieben (Reinhold et al., 2021).

Zusammenfassend handelt es sich bei CRPS um eine multifaktorielle Erkrankung, wobei sowohl eine entzündliche, sympathische sowie zentrale Komponente als auch eine Barriestörung des peripheren Nervensystems nachgewiesen wurden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Pathomechanismen des CRPS weiter zu charakterisieren.

2.1.3 Tiermodell für neuropathische Schmerzen - Chronic Constriction Injury

Zur Darstellung und Untersuchung der Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen im Tiermodell existieren, analog zur heterogenen Entstehungsweise neuropathischer Schmerzen im Menschen, viele verschiedene Modelle (Jaggi et al., 2011). Es gibt einige Modelle, welche traumatische Einflüsse auf das periphere Nervensystem (PNS) mittels Kompression, Ligatur oder Durchtrennung simulieren und darüber hinaus auch Tiermodelle, in denen die Schmerzen metabolisch oder chemisch induziert werden (Burma et al., 2017). Beispielsweise sind hier das „tibia fracture“ (Guo et al., 2004) oder auch das „Chronic post-ischemic pain“ (CPIP) Modell (Coderre et al., 2004) zu erwähnen. Im „IgG transfer Trauma Modell“ wird Ratten nach Trauma IgG Immunglobulin von CRPS Patientinnen und Patienten injiziert (Helyes et al., 2019). Jedes Modell kann hierbei immer nur einzelne Aspekte des CRPS abbilden (siehe Tabelle 1). In dieser Arbeit wird ein traumatisches Schmerzmodell, die Chronic Constriction Injury (CCI) des Nervus Ischiadicus verwendet (Bennett and Xie, 1988)

Tabelle 1 Verschiedene Modelle für CRPS Tabelle modifiziert nach Liu et al. 2021 Lizenz CC-BY NC 3.0

Modell	Mechanismus	Methode	Wirkung	Referenz
CPIP (chronic post ischemic pain)	Ischämie - Reperfusion	Anlegen eines Rings oder Gummibands, um den Blutfluss für 3 Stunden zu unterbinden	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperalgesie • Allodynie • Erhöhte Temperatur der Extremität • Ödem 	Coderre et al., 2004

Einleitung

Tibia fracture Modell	Bruch und Ruhigstellung einer Extremität	Tibiafraktur mit anschließender langer Ruhigstellung	<ul style="list-style-type: none"> • Allodynie • Erhöhte Temperatur der Extremität • Ödem • Osteopenie 	Guo et al., 2004
IgG transfer Trauma Modell	Autoimmunität und Trauma	Injektion von IgG von CRPS Patientinnen und Patienten nach Trauma	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperalgesie • Allodynie • Ödem 	Cuhadar et al., 2019; Guo et al., 2020
NNI Modell Needlestick Nerve Injury	Verletzung kleiner Nervenfasern	Verletzung des Tibianerves durch Längsspaltung mit einer Nadel	<ul style="list-style-type: none"> • Allodynie • Ödem • Ungewöhnliche Haltung der Extremität 	Siegel et al., 2007

Das CCI Modell ist ein häufig verwendetes und standardisiertes Modell zur Abbildung neuropathischer Schmerzen (siehe Abbildung 1). Die Tiere entwickeln innerhalb einer Woche nach CCI-Operation sowohl eine Allodynie, mechanische und thermische Hyperalgesie, als auch schmerzassoziierte Verhaltensweisen (Austin et al., 2012). Zusätzlich werden weitere trophische Störungen der Krallen und überwärmte bzw. kalte Extremitäten beschreiben (Bennett and Xie, 1988). Dies imitiert die Klinik des untersuchten Schmerzsyndroms CRPS, da auch hierbei beim Menschen Allodynie, Hyperalgesie und Temperaturregulationsstörungen auftreten.

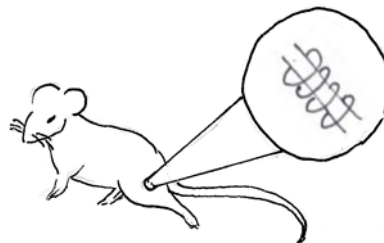


Abbildung 1 Chronic Constriction Injury

Um den Ischiasnerv der Ratte werden in Kurznarkose Ligaturen gelegt, welche zu einer Irritation des Nerven und anhaltender Schmerzreaktion führen. Eigene Abbildung

2.2 Schmerz und Barrierestörung

Bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielt der Nerv eine essenzielle Rolle. Ein Nerv setzt sich aus einer Vielzahl an Axonen zusammen, diese sind von Myelin umhüllt, welches durch Schwannzellen gebildet wird. Ein Faszikel wiederum besteht aus vielen dieser Nervenfasern, die von einem Perineurium umgeben sind. Mehrere Faszikel bilden umgeben von Epineurium einen Nerv (siehe Abbildung 2A). Da es sich um einen immunprivilegierten Raum handelt, ist ein Aufrechterhalten einer Barriere als Schutzfunktion für die Funktion des Nervens essenziell. Zu dieser Barriere tragen sowohl die Blut-Nerven- als auch die Myelin-Nerven-Schranke bei (Reinhold and Rittner, 2020). Eine gestörte Barriere, die gehäuft bei Neuropathien nachgewiesen wurde (Reinhold et al., 2018), führt zum Einwandern von Immunzellen (Malong et al., 2019). Weiterhin konnten verschiedene Modelle für neuropathische Schmerzen einen Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke aufzeigen (Lim et al., 2014; Moreau et al., 2016; Reinhold et al., 2018).

Die Barrierefunktion der Blut-Nerven- bzw. Myelin-Nerven-Schranke wird durch sogenannte „Tight Junctions“ aufrechterhalten. Übersetzt bedeutet dieser Begriff „dichte Verbindung“, was die Funktion dieser Proteinkomplexe verdeutlicht. Im Lateinischen bezeichnet man diese als „Zona occludens“ oder im Deutschen auch als „Schlussleiste“. Wie der deutsche Name vermuten lässt, handelt es sich um Verbindungsproteinkomplexe, die gürtelförmig um die Epithel- oder Endothelzellen laufen und diese zusammenhalten. Hierdurch wird der parazelluläre Transport reguliert. Durch diesen Zusammenhalt formen die Schwannzellen und Endothelzellen, die durch Tight Junctions verbunden sind, die natürlichen Schutzbarrieren unseres Nervensystems (Castro Dias et al., 2019). Sind die Tight Junctions vermindert vorhanden, öffnet dies die Blut-Nerven-Schranke und erleichtert so das Eindringen verschiedener Substanzen (Hackel D, 2012). Gebildet werden diese Tight Junctions von verschiedenen Transmembranproteinen, den Tight Junction Proteinen (TJP), zu denen Claudine (Cldn), Occludine, Tricelluline und viele andere gehören. Jede Tight Junction besteht hierbei aus einem extrazellulären Anteil, der die Zellen untereinander abdichtet, und einem intrazellulären Anteil, der den Proteinkomplex in der Zelle verankert (siehe

Einleitung

Abbildung 2D). In verschiedenen Geweben werden verschiedene Tight Junction Proteine exprimiert. Im Tiermodell für neuropathische Schmerzen zeigt sich eine erniedrigte Expression von Tight Junction Proteinen (Hirakawa et al., 2003).

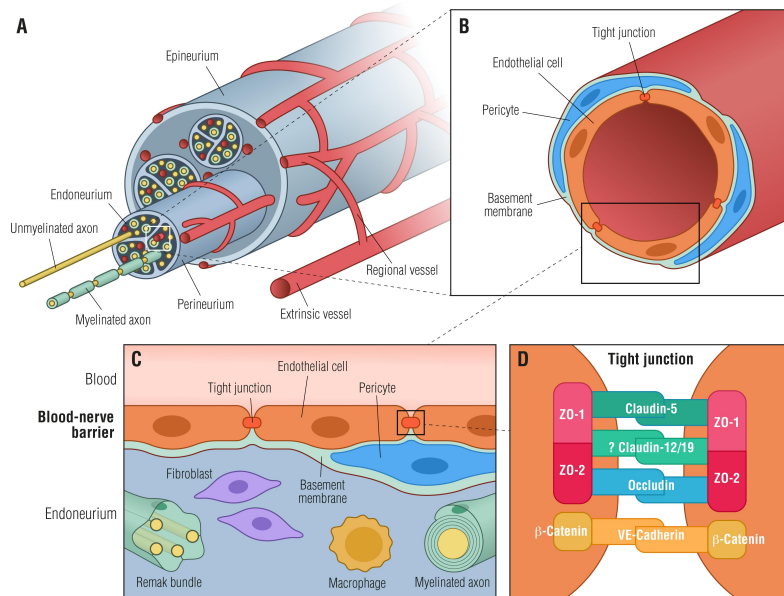


Abbildung 2 Blut-Nerven-Schranke

Ein insgesamt von Epineurium umgebener Nerv besteht aus einzelnen von Perineurium umgebenen Faszikeln, welche wiederum einzelne von Endoneurium umgebene Nervenfasern enthalten (A). Die Versorgung erfolgt über Gefäße (B). Diese haben eine Barriere durch Endothelzellen (C) und den dazwischenliegenden Tight Junctions (D). Lizenz CC BY 4.0 (Richner et al., 2018)

In dieser Arbeit werden *Cldn1*, *5*, *12* und *19* betrachtet. *Cldn1* ist typisch für nahezu impermeable („tight“) Epithelien und bildet parazelluläre Barrieren. Es ist im Perineurium, in endoneuralen Gefäßen, im Mesaxon, in Schmidt-Lantermann Inzisuren sowie an paranodalen Regionen von Ranvierschen Schnürringen zu finden. *Cldn5* ist in vielen Geweben zu finden und spielt besonders in der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige barrierestabilisierende Rolle (Nitta et al., 2003), wird aber auch in der Blut-Nerven-Schranke beschrieben (Kashiwamura et al., 2011). Im Nerv befindet sich *Cldn5* in Endothelzellen endoneuronaler Gefäße, im Mesaxon und an Schmidt-Lantermann Inzisuren. *Cldn12* ist im Interstitium, in der Blut-Hirn- und in der Blut-Nerven-Schranke lokalisiert. Es spielt eine Rolle bei der Ca^{2+} Permeabilität (Fujita et al., 2008; Plain et al., 2020). *Cldn19* ist das einzige Claudin, das nur im PNS und nicht im ZNS exprimiert wird. Es findet sich in den myelinisierenden Schwannzellen und ist hier an der Bildung der paranodalen Barriere beteiligt (Reinhold and Rittner, 2017). *Cldn19*-

Knock Out (KO) Mäuse entwickeln eine Art der peripheren Neuropathie (Miyamoto et al., 2005).

Der Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke bei neuropathischen Schmerzen ist assoziiert mit einer Herabregulierung der Tight Junction Proteine (Hirakawa et al., 2003).

2.3 Netrin-1

2.3.1 Netrinfamilie

Alle Netrine sind Proteine aus der Lamininfamilie. Es gibt bei Säugetieren fünf verschiedene bekannte Arten von Netrinen. Dabei unterscheidet man zwischen sekretorischen Netrinen (Netrin-1, -3, -4) und den zwei durch Glycophosphatidylinositol verankerten Transmembranproteinen G1 und G2.

Das Wort „Netrin“ kommt aus dem Sanskrit „Netr“, das „Führer“ bedeutet. Dieser Begriff leitet sich aus der Aufgabe von Netrin in der Entwicklung des Nervensystems in der Embryonalphase ab. Je nach Rezeptor werden die wachsenden Nervenfasern durch den Netringradienten entweder auf diesen zu oder von ihm weg geleitet (Chemoattraktion und Chemorepulsion)(Rajasekharan and Kennedy, 2009).

2.3.2 Rezeptoren

Netrin-1 bindet an zwei verschiedene Rezeptorfamilien (siehe Abbildung 3). Die Rezeptoren der „deleted in colorectal carcinoma“ (DCC) Subfamilie, DCC und Neogenin, sind für Chemoattraktion verantwortlich. Rezeptoren der Familie UNC5 hingegen sind für Chemorepulsion zuständig (Alcantara et al., 2000; Burgess et al., 2006). Neogenin, DCC und UNC5B gehören zu den „dependence receptors“. Mit gebundenem Ligand setzen sie antiapoptotische, ohne Ligandenbindung apoptotische Signalkaskaden in Gang (Goldschneider and Mehlen, 2010).

Einleitung

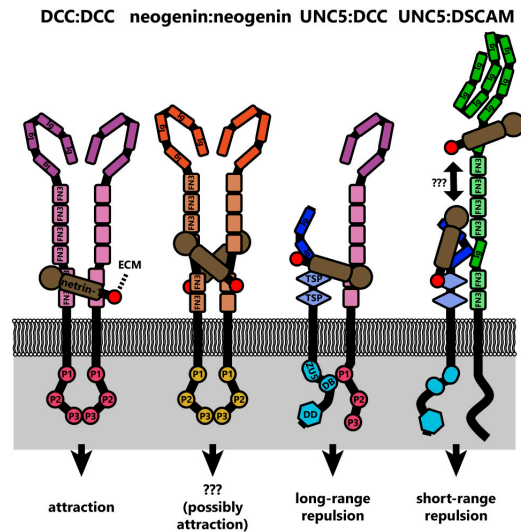


Abbildung 3 Verschiedene Netrin-1 Rezeptoren

DCC bzw. Neogenin Rezeptoren haben eine gegenteilige Wirkung zu UNC5 Rezeptoren. .Lizenz CC BY 4.0 (Boyer and Gupton, 2018)

2.3.2.1 *Neogenin-1*

Neogenin-1 (*Neo1*) ist wie DCC ein proliferationsfördernder Rezeptor in der Entwicklung des ZNS. Bei Magenkarzinom und Neuroblastom erhöht eine verstärkte Expression von Neogenin-1 die Motilität und Proliferation der Zellen (Goldschneider and Mehlen, 2010; Kim et al., 2014). In Patientinnen und Patienten mit schmerzhafter Polyneuropathie wurde eine verminderte *NEO1* Expression in Hautproben festgestellt (Schubert et al., 2019).

2.3.2.2 *UNC5B/Unc5b*

UNC5B (*UNC5b*) ist an vielen Signalprozessen beteiligt (Bhat et al., 2019). Beispielsweise verhindert Netrin-1 über diesen Rezeptor Leukozytenmigration und wirkt somit antiinflammatorisch (Ly et al., 2005). Der Rezeptor wird mit zentraler Sensibilisierung und damit neuropathischen Schmerzen durch Netrin-4 in Verbindung gebracht (Hayano et al., 2016)

2.3.3 Funktion von Netrin-1

In der Embryonalentwicklung des Gehirns spielt Netrin-1 (*Ntn1*) eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Axone im Myelon (Kennedy et al., 1994). Netrin-1 verhindert in dieser Entwicklungsphase in nicht-neuronalen Zellen über *Unc5b* Gefäßsprossung (Lu et al., 2004) und fördert über den DCC Rezeptor Proliferation und Migration von

Einleitung

vaskulären Endothelzellen (Park et al., 2004)(siehe Abbildung 4). Auch bei ausgewachsenen Tieren wurde ein Einfluss von Netrin-1 auf die Neuroregeneration gezeigt (Quintá, 2021). Außerhalb des Nervensystems inhibiert Netrin-1 die Leukozytenmigration (Ly et al., 2005) und vermindert entzündungsbedingte Gewebsschäden (Aherne et al., 2013).

Im erwachsenen Organismus reguliert Netrin-1 unter anderem die Blut-Hirn-Schranke und Neuroinflammation (Podjaski et al., 2015). Entsprechend wurde bei Patientinnen und Patienten mit Multipler Sklerose (MS) ein erniedrigter Netrin-1-Spiegel nachgewiesen. (Mulero et al., 2017). Auch bei der Entwicklung von Krebs ist Netrin-1 als antiapoptotischer Faktor in einigen Studien erhöht messbar (Li et al., 2020a; Yildirim et al., 2016). In Hautproben von Patientinnen und Patienten mit neuropathischen Schmerzen wird Netrin-1 vermindert exprimiert (Schubert et al., 2019).

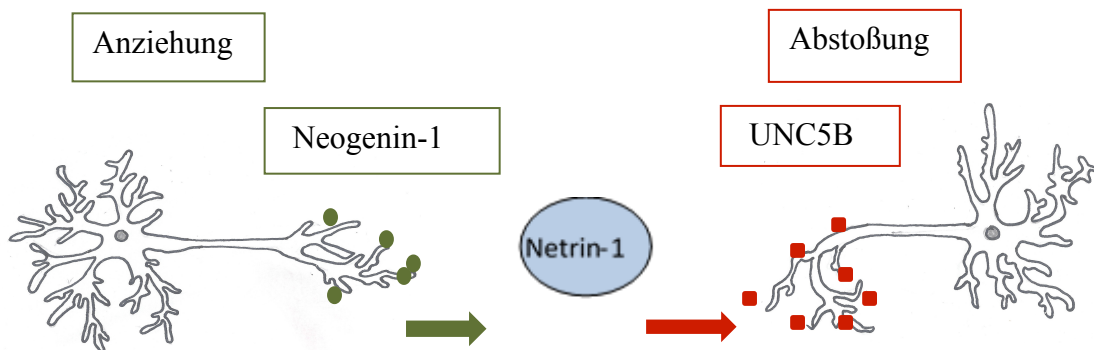


Abbildung 4 Funktion Netrin-1

Netrin-1 leitet wachsende Axone entlang eines Konzentrationsgradienten. Eigene Abbildung modifiziert nach (Ko et al., 2012)

2.3.4 VI-V-Fragment

Die unterschiedliche Wirkung von Netrin-1-Protein und seinem durch Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) abgespaltenen Proteinfragment wurde gezeigt (Miloudi et al., 2016). Im Glaskörper des Auges von Patienten mit diabetischer Retinopathie wurde mittels Western Blot vermehrt das 55 kDa schwere VI-V-Fragment nachgewiesen. Die Menge dieses Fragments korrelierte in dieser Studie mit der Schwere des Ödems. Diese Ergebnisse bestätigen sich auch in der Retina diabetischer Mäuse. Die Injektion des Fragments erhöhte im Mausmodell die Permeabilität der Retinagefäße. Auch in einer Zellkultur konnte durch das Fragment die Barrierefunktion herabgesetzt werden. Es

Einleitung

wurde gezeigt, dass Netrin-1 VI-V-Fragment durch MMP9 abgespalten wird. Um den verantwortlichen Rezeptor zu finden, wurde der Effekt nach Ausschaltung verschiedener Netrin-1 Rezeptoren untersucht. Durch Inhibition des Unc5b Rezeptors ergab sich in der Zellkultur eine geringere Barriere durchlässigkeit. Somit wurde gezeigt, dass das VI-V-Fragment über den Unc5b Rezeptor zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels beiträgt. Im Gegensatz dazu wird in der Studie von Miloudi et al. vermutet, dass sich das unfragmentierte Netrin-1 weniger stark an diesen Rezeptor bindet. Würde sich diese Hypothese bestätigen, könnte das Fragment als Target für barrierestärkende Medikamente dienen. Analog werden in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der Netrin-1 Rezeptoren durch Ausschalten derselben und die Fragment-Expression im Ischiasnerv bei Neuropathie untersucht.

2.4 Vorergebnisse der Arbeitsgruppe

In unserer Arbeitsgruppe wurde zuvor zur Analyse der Blut-Nerven-Schranke unter Einfluss von Netrin-1 die Expression der Tight Junction Proteine im Ischiasnerv von Ratten nach CCI bestimmt. An Tag 7 nach CCI war die mRNA Expression aller bestimmten Claudine um ca. die Hälfte erniedrigt. Die Injektion von Netrin-1 führte zu einer Heraufregulierung der Tight Junction Protein mRNA, wobei dieser Unterschied für *Cldn19*, *Cldn1* und *Cldn5* signifikant war (Chen et al., 2021).

Die Netrin-1-Injektion hatte auch Einfluss auf das Schmerzverhalten der Versuchstiere. Die Ratten zeigten nach Netrin-1-Injektion eine höhere Toleranz gegenüber mechanischer Stimulation als Ratten nach Injektion von Saline. Auch die Blockade der Netrin-1-Rezeptoren veränderte das Verhalten der Ratten (siehe Abbildung 5). Während Unc5b-Blockade die Schmerzantwort verringerte, wurde diese durch Neogenin-1-Inhibition verstärkt (Chen et al., 2021).

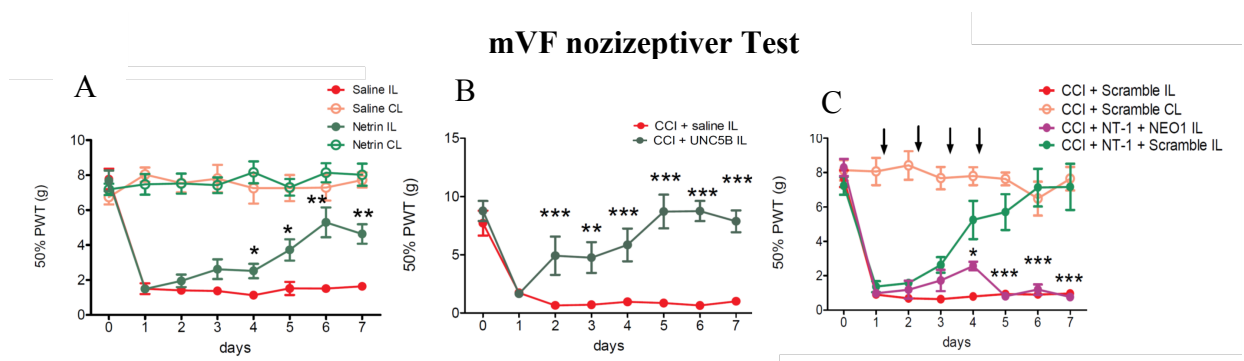


Abbildung 5 Verhalten von Ratten nach CCI und Netrin-1-Injektion bzw. Rezeptorblockierung

Verhalten kontralateral (CL) und ipsilateral (IL) der Verletzung. (A) Netrin-1 verringert die Allodynie nach CCI bei Ratten. Tägliche Untersuchung der Allodynie mittels mechanischem *von Frey* Test (mVF) nach CCI und Angabe des „Paw withdraw threshold“ (PWT). Die mit Netrin-1 behandelten Ratten zeigten eine Verbesserung der Allodynie gegenüber unbehandelten Ratten. (B) Ein ähnlicher Effekt konnte nach Unc5b Rezeptorblock beobachtet werden. (C) Inhibition des Neogenin-1 Rezeptors (durch Injektion von Neogenin-1 siRNA an Tag 1, 2, 3 und 4) verringerte die schmerzlindernde Wirkung von Netrin-1. Lizenz CC BY 4.0 (Chen et al., 2021) *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

2.5 Hypothese und Fragestellung der Promotion

In der Arbeit von Reinhold et al. wurde gezeigt, dass die Integrität der Blut-Nerven Schranke und auch die Tight Junction Protein Expression bei CCI, einem Modell für neuropathischen Schmerz, vermindert ist (Reinhold et al., 2018). Netrin-1-Spiegel oder Netrin-1 Expression werden in Erkrankungen mit Barrierestörung sowie entzündlichen Erkrankungen im ZNS und PNS, wie beispielsweise Multiple Sklerose (Mulero et al., 2017) oder schmerzhaften peripheren Polyneuropathien (Schubert et al., 2019) verändert nachgewiesen. Bei CCI zeigte sich in vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine deutliche Verminderung des Schmerzverhaltens nach Netrin-1-Gabe (Chen et al., 2021). Über die Wirkung und Wirkmechanismen von Netrin-1 bei peripheren neuropathischen Schmerzen ist wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Effekts im Tiermodell besser zu verstehen. Es soll eine Verbindung von Netrin-1 mit Tight Junction Protein Genexpression festgestellt werden.

Wir stellten folgende Hypothesen auf:

Netrin-1 reguliert über seine Rezeptoren Unc5b und Neogenin-1 die Tight Junction Protein Expression (siehe Abbildung 6).

Die Netrin-1-Spiegel im Plasma von Patientinnen und Patienten mit CRPS, sowie die Expression von Netrin-1 und seiner Rezeptoren in Hautproben unterscheiden sich im Vergleich zu Kontrollpatienten (siehe Abbildung 7).

Einleitung

Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die Netrin-1-Expression bzw. die Expression des Fragments in CCI verändert?
- Werden die Rezeptoren *Unc5b* und *Neol* in CCI verändert exprimiert?
- Erhöht Netrin-1 Injektion die Tight Junction Protein Expression?
- Vermindert das Blockieren des *Unc5b*-Rezeptors die Tight Junction Protein Expression?
- Verstärkt das Blockieren des Neogenin-1-Rezeptors die Tight Junction Protein Expression?
- Verändert Netrin-1 die $\text{TNF}\alpha$ Expression?
- Haben CRPS-Patientinnen und Patienten einen erniedrigten Netrin-1-Spiegel?
- Sind *NTN1*, *UNC5B*, *CLDN1* und *CLDN5* in CRPS Hautproben verändert exprimiert?

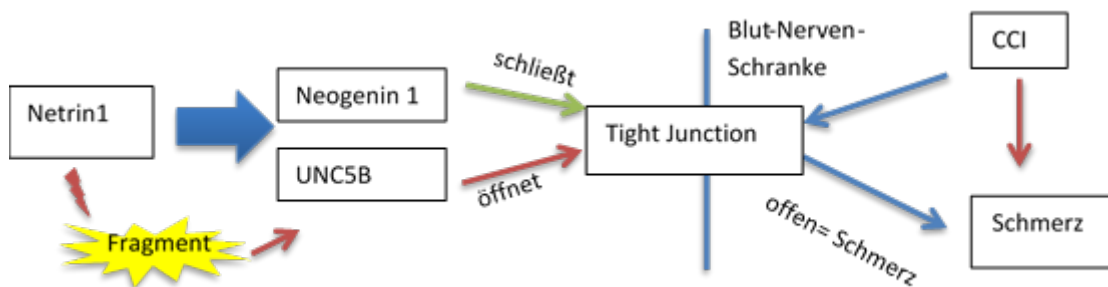


Abbildung 6 Hypothese

Netrin-1 wirkt über Neogenin-1 und Unc5b auf die Tight Junctions welche die Blut-Nerven-Schranke bilden und eine entscheidende Rolle in der Schmerzentstehung spielen.

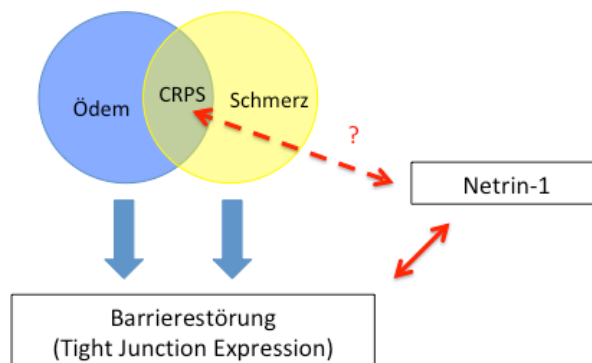


Abbildung 7 Hypothese

Ödem und Schmerz in CRPS weisen auf eine gestörte Barrierefunktion hin, welche mit veränderten Netrin-1-Spiegeln vergesellschaftet ist.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere Ethik- und Tierversuchsvotum

Die Tierversuche wurden von der Regionalregierung Würzburg unter der Antragsnummer 55.2.2-2532-2-612, 06.04.2018 genehmigt und gemäß der ARRIVE-Kriterien (Percie du Sert et al., 2020) durchgeführt

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 180-220 g wurden unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall des Zentrums für Experimentelle molekulare Medizin, Zinklesweg 10, 97078 Würzburg, gehalten. Bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und Raumtemperatur (20-25 °C) hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter. Die Behandlung der Versuchstiere und Präparation des Gewebes wurden von Herrn Dr. rer. nat. Jeremy Chen durchgeführt.

3.1.1 Chronic Constriction Injury

Als Modell für neuropathischen Schmerz wurde das Chronic Constriction Injury (CCI)-Modell verwendet. Hierzu wurden unter Isofluran-Kurznaarkose der rechte Ischiasnerv freigelegt und 4 lockere Ligaturen (4/0) mit etwa 1 mm Abstand um den Nerv gelegt. Die Wunde wurde mit einer Naht verschlossen. In der Kontrollgruppe erfolgte eine Sham Operation, in welcher die Haut nach Freilegen des Nerven ohne Anbringen der Ligaturen geschlossen wurde.

3.1.2 Inhibition der Netrin-1 Rezeptoren

Unter Kurznaarkose mit Isofluran wurde zur perineuralen Injektion der Ischiasnerv unter Verwendung einer 22G atraumatischen Nadel mit einem Nervenstimulator lokalisiert. Durch elektrische Stimulation wurde der Ischiasnerv gereizt. Die Nähe zum Nerven zeigte sich dabei durch die Plantarflexion der Rattenpfote synchron zu den Impulsen des Nervenstimulators. Der maximale Ausschlag zeigte die ideale Position.

Methoden

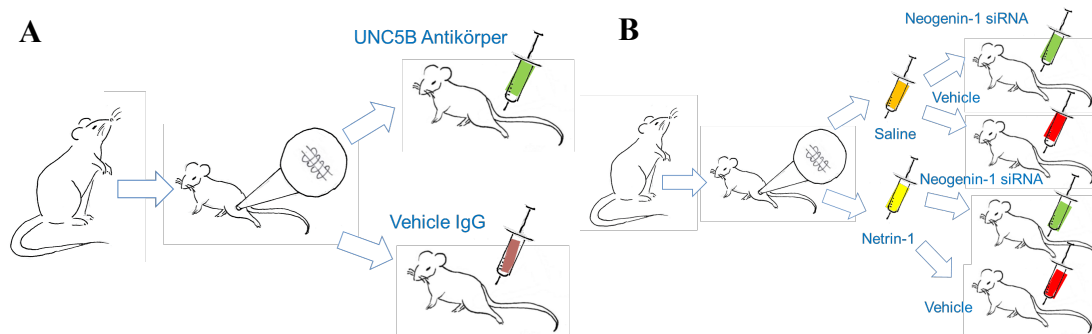


Abbildung 8 Versuchsaufbau Tiermodell

(A) Unc5b Antikörper. Es erfolgte eine lokale Injektion von Unc5b AK oder IgG. (B) *Neogenin* siRNA. In intraperitoneal entweder mit Saline (physiologische Kochsalzlösung) oder Netrin-1 behandelten Ratten wurde eine lokale *Neo*-siRNA bzw. vehicle Injektion durchgeführt.

Den Ratten wurden täglich für 7 Tage jeweils 10 µg Unc5b Antikörper (AK) oder IgG perineural injiziert. Die Injektion der *Neogenin* siRNA oder negativen siRNA („Scramble“) erfolgte intraneural. Es wurden an Tag 0, 1, 2 und 4 jeweils 2 µg siRNA injiziert. Die Applikation von 10 µg Netrin-1 bzw. Kochsalzlösungsinjektion erfolgte einmal täglich intraperitoneal (i.p.) (siehe Abbildung 8). Der Ischiasnerv wurde ipsi- und kontralateral (CL) entnommen.

3.2 Patienten

3.2.1 Plasmaproben

Plasmaproben wurden von Patientinnen und Patienten aus der größeren *ncRNAPain* Studie (<http://www.ncrna-pain.eu>) nach Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg für diese Studie verwendet (Antragsnummer: AZ-52/14). Es wurden 18 Patientinnen und Patienten mit CRPS Typ I an den Händen und 18 alters- sowie geschlechtsgleiche Kontrollpatienten eingeschlossen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren die Patientinnen und Patienten nüchtern. In der folgenden Tabelle 2 sind Ein- und Ausschlusskriterien der CRPS Patientinnen und Patienten gelistet:

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der CRPS Patientinnen und Patienten

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
„Budapest-Kriterien“ erfüllt	Tumor in der Anamnese in den letzten fünf Jahren
	Polyneuropathie

Methoden

	Auffällige klinische Untersuchung
	Operation in den letzten vier Wochen
	Klinische Infektion
	Alkoholkonsum (mehr als 2 Standardgetränke/Tag)
	Am Vortag <ul style="list-style-type: none">• Alkoholkonsum• Sport• Schweres Essen

Patientinnen und Patienten der Kontrollgruppe sollten klinisch infektfrei sein und am Vortag keinen Sport getrieben haben. Ausschlusskriterium war außerdem eine Operation in den letzten vier Wochen.

3.2.2 Hautproben

Die Hautproben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Universitätsklinik Mainz.

Nach einem Ethikvotum (Votum Nummer: 837.050.04) und entsprechender Aufklärung wurde den Patientinnen und Patienten eine Hautprobe entnommen. Eingeschlossen wurden auch hier CRPS Patientinnen und Patienten nach den Budapest Kriterien. Die Gewinnung der Hautproben erfolgte an der jeweils betroffenen Extremität sowie kontralateral jeweils an den lateralen Zeigefingern bzw. den Innenknöcheln mittels Stanzbiopsie unter Lokalanästhesie. Die Blutstillung erfolgte im Anschluss mittels Kompression. Die Proben der Kontrollpatienten wurden von der Hautklinik der Universitätsklinik Mainz von Patientinnen nach Brustverkleinerung zur Verfügung gestellt. Die Hautproben wurden bis zur RNA Gewinnung bei -80 °C gelagert.

3.3 mRNA Bestimmung

3.3.1 RNA Extraktion

3.3.1.1 RNA Isolation aus Rattenschiasnerv

Männlichen Wistar-Ratten wurde nach CCI für 7 Tage und täglicher lokaler Injektion von Unc5b Antikörper, *Neogenin* siRNA bzw. Vehikel (IgG, Scranbele) der Ischiasnerv

Methoden

entnommen. Dieser wurde sofort in flüssigen Stickstoff verbracht und bei -80 °C bis zur RNA Gewinnung gelagert.

Zu jeder Gewebeprobe wurde direkt 1 ml TRIzol Reagent gegeben und dies anschließend mit einer sterilisierten Stahlkugel (d = 5 mm) homogenisiert. Hierzu wurde der Tissuelyser in 28 Hz Frequenz für 4 min eingesetzt. Folgend wurde die Probe 5-10 min bei Raumtemperatur aufbewahrt, um die Lösung der Nucleoproteinkomplexe zu fördern. Hinterher wurden 200 µl Chloroform dazu pipettiert und die Mischung 15 sec kräftig geschüttelt. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 12.000 g, 4 °C zentrifugiert, um Protein, DNA und RNA komplett zu trennen. Die oberste farblose Phase enthielt die RNA. Von dieser Phase wurden nun 475 µl in ein neues Reaktionsgefäß mit ca 5 µl GlycoBlue™ Coprecipitant gegeben. Nach 4 Stunden bei -20 °C wurden anschließend 500 µl Isopropanol hinzugefügt und gut gemischt. Hierdurch bildet sich nach 10 min bei Raumtemperatur und erneuter Zentrifugation bei 12.000 g, 4 °C ein Aggregat der gelösten RNA. Die übrige Flüssigkeit wurde entfernt. Das resultierende Pellet wurde zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Probe bei 57 °C getrocknet. Zu der getrockneten Probe wurden 20 µl Nuklease freies Wasser gegeben und dies 15 min bei 57 °C gelagert. Daraufhin wurde die Lösung mit DNase aus dem Ambion DNA-free™ Kit versetzt. Nach 20 min wurde die DNase inaktiviert und nach wiederholter Zentrifugation bei 10.000g 1,5 min, 4 °C die obere durchsichtig bläuliche Phase abgenommen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration gemessen. Bis zur cDNA Transkription wurde die Probe bei -80 °C gelagert.

Die übrige Lösung wurde bei -20 °C für spätere Proteinisolation aufbewahrt.

3.3.1.2 RNA Isolation aus humaner Haut

Bei der RNA Isolation aus menschlichen Hautproben wurde das miRNeasy Micro Kit nach Herstellerprotokoll verwendet.

Zu den Proben wurden jeweils 700 µl QIAzol Lysis Reagenz gegeben. Analog zu den Tierproben wurde der Tissuelyser hier jedoch 10 min, 30 1/s verwendet, um die Proben zu homogenisieren. Das Lysat wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Nach Inkubation für 5 min wurden 140 µl Chloroform zugegeben und nach kräftigem 1,5-sekündigem Schütteln drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 12.000 g und 4 °C für 15 min wurde die obere wässrige Phase, wie vorher (siehe

S.18) beschrieben, separiert. Anschließend wurde diese Lösung mit 525 µl 100 % Ethanol durch fünfmaliges Hoch- und Runterpipettieren gemischt. Bis zu 700 µl der gemischten Probe wurden in eine RNeasy MinElute Säule in ein 2 ml Röhrchen pipettiert (bereitgestellt durch Qiagen miRNeasy Micro Kit) und bei 22 °C 15 sec mit 8.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Säule 700 µl Puffer RWT (bereitgestellt durch Qiagen miRNeasy Micro Kit) zugesetzt und für 15 sec bei 8.000 g und 22 °C zentrifugiert; Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 500 µl Puffer hinzugefügt und dasselbe Protokoll befolgt. 500 µl 80 % Ethanol wurden dazu pipettiert und für 2 min bei 8.000 g, 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Die Säule wurde auf ein neues 2 ml Röhrchen gesteckt, der Deckel geöffnet und bei 5 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die hieraus resultierende Säule wurde wieder in ein neues 1,5 ml Röhrchen gesteckt. Hierzu wurden 14 µl Nuklease freies Wasser direkt in die Mitte der „Spin column membrane“ zugefügt und 1 min inkubiert. Anschließend wurde das Ergebnis erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die RNA zu lösen. Die resultierende Suspension enthielt die gesamte RNA und wurde vor der cDNA Transkription aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die übrige Lösung wurde bei -20 °C für die spätere Proteinisolation aufbewahrt.

3.3.2 Reverse Transkription

Durch eine Polymerase wird RNA zu cDNA transkribiert. Hierzu wird eine Reverse Transkriptase eingesetzt, ein Enzym, das in Viren aus RNA DNA herstellen kann. Die Transkription erfolgt entlang der RNA Stränge unter Verwendung bereitgestellter Nucleotide.

Die RNA Konzentration und Reinheit wurde durch das Nanodrop ND 2000 Spektrometer bestimmt, um eine OD_{260/280} von 1,9 oder höher zu gewährleisten.

Die gesamte RNA Probe wurde unter Verwendung von „High capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit“ (mit zufälligen Primern und RNase Inhibitor) nach Herstellerprotokoll revers transkribiert.

Die PCR Reaktion wurde im 2720 Thermal Cycler durchgeführt. Das cDNA Produkt wurde vor der PCR Amplifikation bei -20 °C aufbewahrt.

Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt vorbereitet:

Methoden

2,0 µl	10x RT Buffer
2,0 µl	Random Primer
0,8 µl	dNTP Mix (4mM)
1,0 µl	Reverse Transkriptase (2,5U/ µl)
1,0 µl	RNAse Inhibitor (1U/ µl)
13,2 µl	RNA Probe (RNA mit Nuklease freiem Wasser)

Der folgende Temperaturverlauf wurde für die Transkription verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3 Temperaturverlauf Transkription

Temp.	25,0 °C	37,0 °C	37,0 °C	85,0 °C	4,0 °C	4,0 °C
Zeit	10 min	60 min	60 min	5 min	7 min	∞
Zweck	Aufwärmen	Reaktion	Reaktion	Deakti- vierung	Abkühlen	Aufbewahren

Die Transkription der aus den Hautbiopsien gewonnenen RNA wurde analog durchgeführt.

3.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Polymerase Kettenreaktion, welche zeitgleich die Quantifizierung der DNA ermöglicht. Da diese zuvor aus der mRNA gewonnen wird, können Rückschlüsse auf die mRNA Konzentration im Gewebe gezogen werden.

Durch anfängliches Erhitzen wird die cDNA in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). An diese Einzelstränge lagern sich im nächsten Schritt die Primer an (Primerhybridisierung). Schließlich verlängert die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden ausgehend von den angelagerten Primern. Es entsteht Doppelstrang-DNA (dsDNA) und der Zyklus beginnt von neuem. Durch die Anlagerung von SYBR[®]Green an Doppelstränge verstärkt sich die Lumineszenz mit der Menge der vorhandenen dsDNA.

Eine quantitative Echtzeit PCR wurde unter Verwendung von PowerUp[™] SYBR[®]Green Master Mix gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde hierbei als interne Kontrolle verwendet. Um die Anzahl der Kopien einzuschätzen, wurden die aus der reversen Transkription übernommenen cDNA Proben 1:10 mit Nuclease freiem Wasser verdünnt und jede Probe als Triplet (3 Wiederholungen) analysiert.

Methoden

Die Messungen wurden mit dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) vorgenommen. Eine Tabelle der hier verwendeten Primersequenzen findet sich in der Materialliste im Anhang (Tabelle 17).

Das Reaktionsgemisch wurde für eine Reaktion vorbereitet wie folgt:

2,0 µl	cDNA (1:10 verdünnt) (10 ng)
5,0 µl	Absolute QPCR SYBR [®] Green Mix
0,5 µl	forward Primer (500 nM)
0,5 µl	reverse Primer (500 nM)
2,0 µl	HPLC H ₂ O (Nuklease frei)

Der folgende Temperaturverlauf wurde für die Genamplifikation der Proben verwendet (Tabelle 4):

Tabelle 4 Temperaturverlauf Genamplifikation

Temp.	50 °C	95 °C	95° C	60 °C	→ Schritt 3+4 wiederholen bis 50 Zyklen
Zeit	2 min	2 min	3 sec	30 sec	
Zweck	1.Aufwärmen	2.Denaturierung	3.Primer- hybridisierung	4. Elongation	

Bei Unc5b und Cld5 wurde der Temperaturverlauf wie folgend angepasst (Tabelle 5):

Tabelle 5 Temperaturverlauf Genamplifikation

Temp.	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	→ Schritt 3+4 wiederholen bis 50 Zyklen
Zeit	2 min	2 min	15 sec	1 min	
Zweck	1.Aufwärmen	2.Denaturierung	3.Primer- hybridisierung	4. Elongation	

3.3.4 mRNA Analyse

Die relative RNA Quantifizierung zu GAPDH wurde semiquantitativ durch die $\Delta\Delta C_t$ Methode gemäß der Formel: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet. Dabei beschreibt der C_t -Wert den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einer Probe erstmals über einen bestimmten Schwellenwert steigt. Der Schwellenwert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Diesen Wert bezeichnet man als „Threshold Cycle“. Da sich SYBR[®]Green in DNA-Doppelstränge einlagert, ist die Fluoreszenz linear zur Menge

der vorhandenen Amplikons. Die Analyse der Zielgenexpression erfolgt relativ zu einem Referenzgen („Housekeeping gene“) hier GAPDH, (Ct Zielgen-Ct Referenzgen). Alle Proben werden anschließend auf naive oder kontralaterale Proben als Referenz normalisiert ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (Versuchsgruppe)} - \Delta Ct \text{ (Kontrollgruppe)}$). So kann die Genexpression relativ zur Kontrollgruppe angegeben werden (relative Genexpression).
 Relative Genexpression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.3.5 Taq Man Assay

Zur Analyse der Hautproben wurde ein Taq Man Assay angewandt. Dieser beruht auf der Bindung einer TaqMan-Sonde an die Einzelstrang DNA. Die Sonde hat dabei VIC Dye (Farbstoff) und einen Quencher gebunden. Der Quencher inhibiert den Farbstoff. Wird der DNA-Strang bis zur gebundenen Sonde polymerisiert, wird der Farbstoff freigesetzt (siehe Abbildung 9).

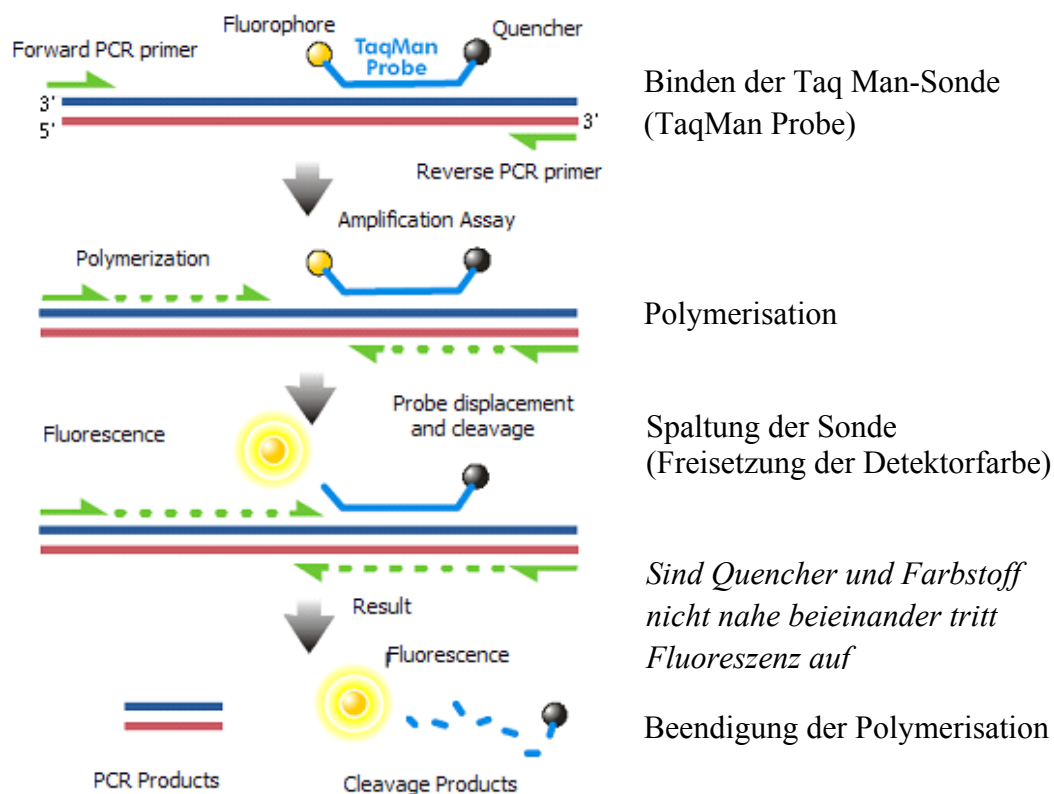


Abbildung 9 Prinzip TaqMan Assay

Die DNA wird polymerisiert wobei durch Trennung des Quenchers vom Farbstoff dieser anfängt zu fluoreszieren.
 CC0 1.0 Lizenz

Methoden

Für die RT-PCR wurde hier TaqMan Assay und entsprechend statt „Absolute QPCR SYBR[®]Green Mix“ „PCR ROX Mix“ verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Reaktion vorbereitet wie folgt:

2,5 µl cDNA (1:10 verdünnt)

5,0 µl PCR ROX Mix

0,5 µl TaqMan

2,0 µl HPLC H₂O (nuklease frei)

3.4 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach ihrer Molekülgröße in einem Gel aufgetrennt. Die separierten Proteine werden mithilfe einer Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen („Blotten“). Hier können sie mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Protein, der mit einem Enzym markierte Sekundärantikörper am konstanten, unspezifischen Teil des Primärantikörpers. Das Enzym vermittelt eine Chemilumineszenz-Reaktion und macht so die Proteinbanden sichtbar.

3.4.1 Proteinisolation

Zu den Proteinproben aus der RNA Gewinnung (siehe RNA Extraktion S.18) wurde 1 ml Isopropanol pipettiert. Nach 10 min Lagerung bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 1.200 g und 20 °C zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde durch Zugabe von 0,5 M Guanidin Hydrochloride (700 µl je Probe) für 20 min und anschließendes fünfminütiges Zentrifugieren bei 1200 g und 20 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde so drei mal gewaschen. Es wurden je 700 µl 100 % Ethanol zugegeben und nach 20 min bei Raumtemperatur erneut 5 min bei 750 g und 20 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert. Das Pellet wurde 5-10 min bei 57 °C getrocknet. 4 % CHAPS wurde mit gelöstem Thiourea gemischt. Davon wurden 90 µl pro Probe zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 40 °C stehen gelassen, bis das Pellet sich vollständig gelöst hatte. Die Proben wurden nun über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurde die Proteinkonzentration mittels BCA Assay (siehe S.31) bestimmt.

3.4.2 Gel

Zur Herstellung eines zwölfprozentigen Gels wurden folgende Chemikalien genutzt (Tabelle 6):

Tabelle 6 Gelherstellung

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	3,35 ml	3,48 ml
Acrylamid/Bis (30:2)	12 %	17 %
3 M Tris pH8,8	750 mM	
1 M Tris pH6,8		8,125 mM
10 % SDS	0,1 %	0,1 %
10 % APS	0,1 %	0,1 %
THEMED	0,06 %	0,1 %

Das Trenngel wurde in die Form gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Blasen zu vermeiden und eine gerade Oberfläche zu garantieren. Nach etwa 20 min war das Gel fest und das Sammelgel wurde zubereitet. Das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel wurde auf das Trenngel geschichtet. Um Taschen für die Proben zu bilden, wurde ein 1,5 mm Kamm verwendet. Nach 30 min war das Gel fest.

3.4.3 SDS Gelelektrophorese

Durch das Anlegen einer Spannung werden in der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu muss sowohl die Tertiärstruktur, als auch die spezifische Ladung der Proteine verloren gehen. Dies wird durch SDS ermöglicht. Zum einen löst es die Wasserstoffbrückenbindungen und damit die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Die Denaturierung wird durch Erhitzen der Proben auf 50-60 °C und Zugabe von β -Mercaptoethanol verstärkt. Zum anderen maskiert SDS durch seine stark negative Ladung die Ladung der Proteine.

Die denaturierten Proteine werden in Taschen eines Polyacrylamidgels geladen. Durch Anlegen einer Spannung durchwandern die nun negativ geladenen Proteine das Gel in Richtung Anode. Je kleiner die Proteine, desto schneller durchwandern sie die

Methoden

Gelporen. Größere Proteine werden zurückgehalten und haben eine geringere Laufgeschwindigkeit.

Die Proben wurden nach einem auf die bestimmte Proteinkonzentration normalisierten Pipettierschema mit Daten aus der Proteinbestimmung verdünnt. Es wurde jeweils das im BCA Assay bestimmte Volumenäquivalent von 25 µl Protein verwendet. Es wurden Lämmli-puffer (Tabelle 8) und β-Mercaptoethanol hinzugefügt (Tabelle 7).

Tabelle 7 Vorbereitung der Proteinproben

Protein	Nach Schema	
H ₂ O	Nach Schema	
4x Lämmli	7	µl
β-Mercaptoethanol	1,5	µl

Anschließend wurde das Gemisch für 5 min auf 60 °C erhitzt.

Die Gele wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 6 hergestellt, in eine Laufkammer eingespannt und diese mit Laufpuffer (Tabelle 8) gefüllt.

Tabelle 8 Zusammensetzung der Puffer

Elektrophoresepuffer (SDS Laufpuffer)		Ladepuffer (Lämmli-puffer)	
250 mM	Tris	0,25 M	Tris HCL
2,5 M	Glycin	40 %	Glycerol
1 %	SDS	8 %	SDS
	H ₂ O		
		0,004 %	Bromphenolblau
		pH 6,8	
		6 %	B-Mercaptoethanol

Die Probenmischung wurde in die Vertiefungen des Gels aufgetragen. Bis die Proben das Sammelgel verlassen hatten, wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Dann wurde die Spannung auf 100 V gesteigert. Nach ca. 1 h hatten die Proteinproben das Ende des Gels erreicht.

3.4.4 Wet-Transfer

Anschließend wurden die Proteine mittels einer angelegten Spannung auf eine Membran transferiert.

Tabelle 9 Transfer Puffer

Towbin Puffer		
25	mM	Tris
192	mM	Glycine
20	%	Methanol
0,04	%	SDS
		H ₂ O
	pH	8,8

Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran in Transfer Puffer (siehe Tabelle 9) auf das Gel gelegt. Durch Anlegen eines Stroms von 100 mA über Nacht wurden die Proteine auf die Membran übertragen.

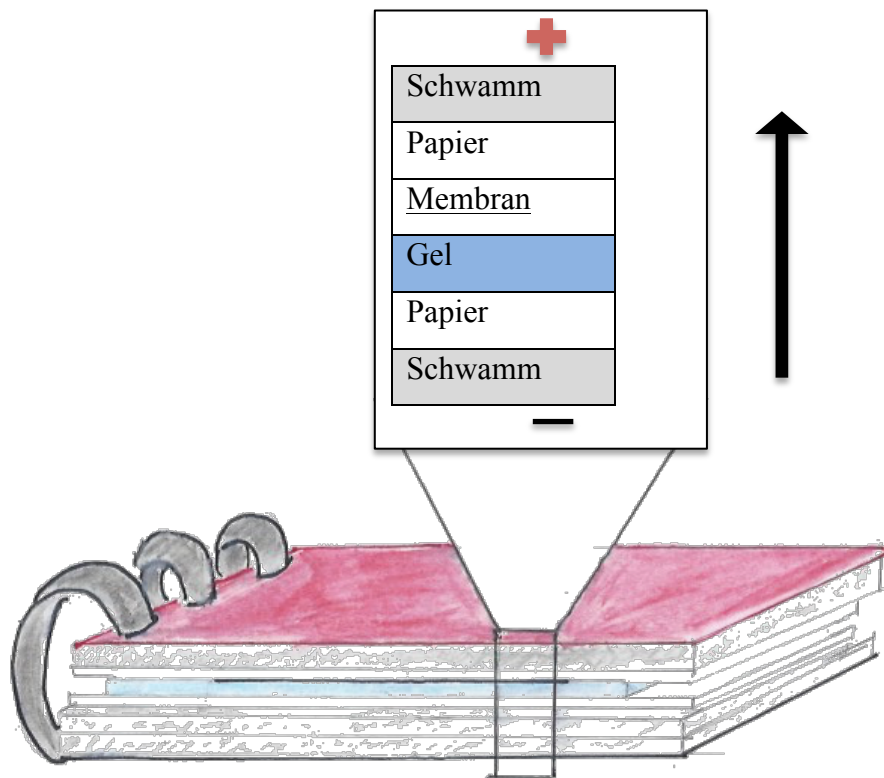


Abbildung 10 Western Blot Transfer

Die angelegte Spannung zieht die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran. Eigene Abbildung

3.4.5 Proteindetektion

Nach dreimaligem Waschen in PBS/Tween wurde die Membran mit 5 % Milchpulverlösung und 5 % BSA eine Stunde geblockt. Anschließend wurde der Antikörper (AK) (siehe Abbildung 11) in 2,5 % BSA 1:1000 über Nacht zugegeben.

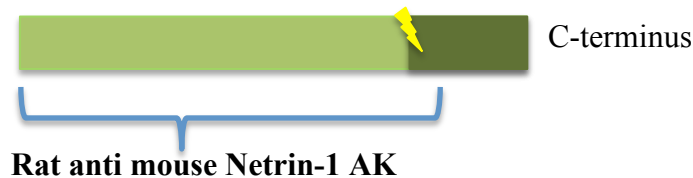


Abbildung 11 Antikörperbindungsstelle

Da der Antikörper am nicht abgespaltenen Ende bindet, können sowohl Netrin-1 als auch sein VI-V Fragment angefärbt werden. Eigene Abbildung

3.4.6 Entwicklung

Zum Sichtbarmachen der Banden wurden ein sekundärer AK und ECL-Lösung verwendet. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP vermittelt die Oxidation von Luminol. Dies führt zur Chemolumineszenz, welche detektiert werden kann.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern wurde, nach erneutem dreimaligem Waschen, der zweite HRP gekoppelte AK in 1 % BSA 1:2000 eine Stunde inkubiert. Vor der Zugabe von ECL wurde dreimal gewaschen. Nach 2 min in ECL wurde das Bild generiert.

3.4.7 Densitometrie

Zur semiquantitativen Analyse des Proteins auf der Western Blot Membran wurde die Densitometrie verwendet. Hier wird mithilfe des Computers die Farbmenge pro Flächeneinheit der Proteinbanden bestimmt. Dies entspricht der optischen Dichte (Integrated Density Value, IDV). Diese steht in linearem Zusammenhang mit der Proteinmenge. Hierzu wurde das Programm ImageJ verwendet. Zur Normalisierung wurde β -Aktin verwendet. Hierzu wurde das Intensitätsverhältnis zwischen β -Aktin und dem Protein nach der Formel $IDV \text{ Protein}/IDV \beta\text{-Aktin}$ bestimmt.

3.5 ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie Immunfluoreszenz. Auf eine Platte mit fest verankerten Antikörpern wird ein Antigen aufgetragen. Hierdurch wird das Antigen an die Platte gebunden.

Methoden

Anschließend wird analog der Immunfärbung erst ein Primärantikörper und dann ein Immunfluoreszenz vermittelnder Sekundärantikörper aufgetragen. Das Verwenden dieser beiden Antikörper bezeichnet man als indirekten ELISA.

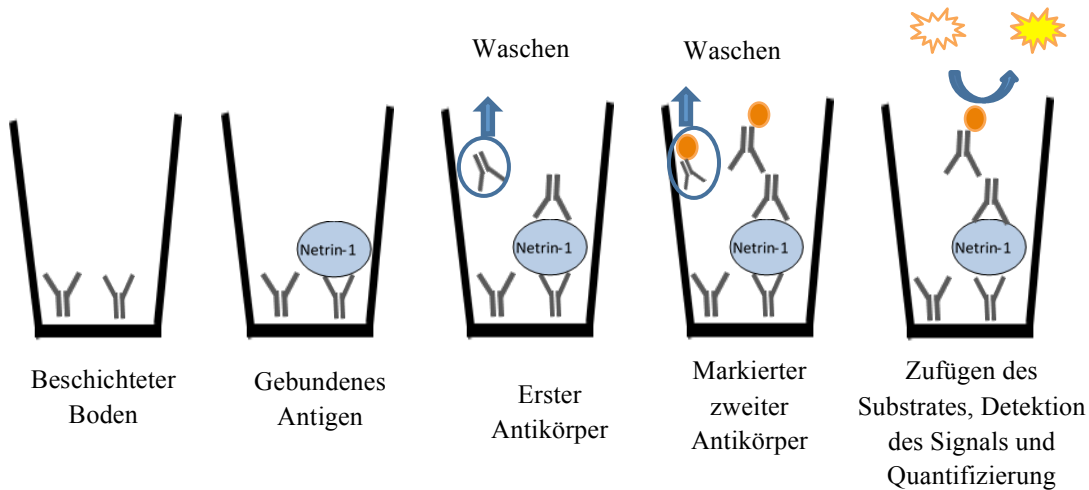


Abbildung 12 Prinzip ELISA

Der beschichtete Boden bindet das Antigen, welches mittels Antikörpern und Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

Eigene Abbildung

Im gesamten Prozess wurde das Cusabio ELISA Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. 80 µl einer Plasmaprobe wurden hierzu zunächst mit je 20 µl 1 N HCL 10 min lang inkubiert und durch anschließendes Zufügen von 16 µl 1,2 N NaOH/0,5 HEPES aktiviert. Um eine quantitative Analyse zu ermöglichen, wurde in jedem Versuch eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des Antigens aufgetragen. Zur Erstellung der Verdünnungsreihe wurden in 6 Eppendorf-Röhrchen je 250 µl „Sample Diluent“ vorgelegt. Der im Kit enthaltene Standard wurde mit 1,0 ml „Sample Diluent“ gelöst und von dieser Lösung wurden 250 µl in das erste Reaktionsgefäß gegeben, von dieser Mischung 250 µl in das zweite Eppendorf. Dies wurde bis in das letzte Reaktionsgefäß fortgeführt (siehe Abbildung 13). Das „Sample Diluent“ diente als Nullstandard.

Es ergaben sich folgende Verdünnungen (Tabelle 10):

Methoden

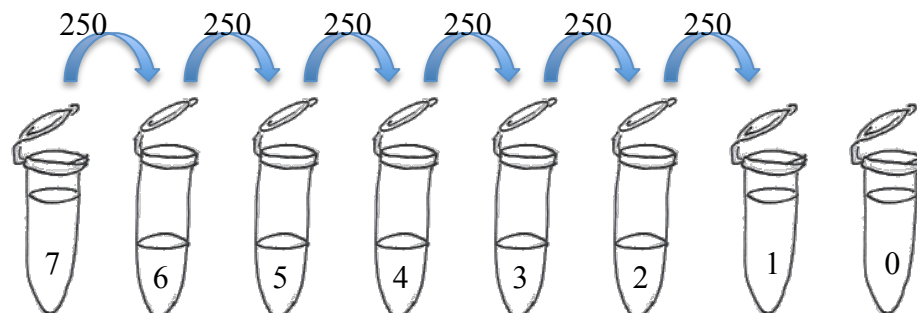


Abbildung 13 Verdünnungsreihe

Der im Kit enthaltene Standard wurde schrittweise mit „sample diluent“ verdünnt. Eigene Abbildung

Tabelle 10 Konzentrationen

Gefäß	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	0

Nicht genutzte Vertiefungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. In jede Vertiefung der 96 Well Platte (Mikrotiterplatte) wurden 100 µl der Probe bzw. des Standards gegeben und diese zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Flüssigkeit abgesaugt, 100 µl des 100-fach verdünnten Biotin Antikörpers zugegeben und die Platte eine Stunde bei 37 °C im Inkubator belassen. Diese Flüssigkeit wurde erneut abgesaugt und die Wells dreimal mit „Wash buffer“ gewaschen. Dann wurden je 100 µl 100-fach verdünntes HRP-Avidin dazugegeben und dies erneut eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde schließlich 90 µl TMB Substrat in jedes Well gegeben und 18 min bei 37 °C bebrütet, bis sich eine abgestufte blaue Verfärbung zeigte. Während dieses Schrittes wurde Licht vermieden. Schlussendlich wurde die Reaktion durch Hinzufügen von je 50 µl Stop Solution des Kits gestoppt.

Innerhalb der nächsten 5 min wurde die optische Dichte bestimmt. Hierzu wurde ein „Microplate Reader“ bei 450 nm Wellenlänge und Referenz 540 bzw. 0 nm Wellenlänge verwendet.

Zur Bestimmung der Netrin-1-Level in Rattenserum wurde analog vorgegangen. Die Blutproben wurden aus dem linken Ventrikel entnommen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur war die Probe geronnen und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 g wurde das Serum gewonnen. Dieses wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die ELISA-Prozedur wurde ohne Aktivierung gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.6 BCA Assay

Mittels der Biuretreaktion wird in diesem Assay die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Hierbei entstehen durch Zugabe von Proteinen in eine alkalische kupferhaltige Lösung einwertige Kupferionen (Cu^+). Nach Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) bilden die Kupferionen mit BCA einen blau-violetten Farbstoffkomplex, dessen Menge bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Es wurde ein BCA Assay Kit verwendet. Dabei wurde ein Proteinstandard aus dem Kit aufgetragen. Jeweils 10 μl der 1:100 verdünnten Probe bzw. 10 μl der Verdünnungsreihe bzw. des Proteinstandards wurden mit 200 μl Mixer (Reagent A + Reagent B) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve generiert, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe berechnet wurde.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte durch das Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software).

In den gezeigten Grafiken sind der Mittelwert und Standardfehler abgebildet. PCR Daten wurden zu GAPDH, densitometrische Daten des Western Blots wurden zu β -Aktin normalisiert. Bei erfüllter Normalverteilung der alters- und geschlechtsgepaarten Proben wurde zur statistischen Auswertung der Plasma ELISA Werte ein gepaarter t-Test durchgeführt. Die Analyse der Western Blot und PCR Ergebnisse erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of variance). Als Post-hoc-Test wurde ein Tukey's HSD Test verwendet. Die Daten der menschlichen Hautproben wurden mittels Mann-Whitney-Test ausgewertet. Alle Daten wurden als „scatter plot“ mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Unterstützung durch Dr. rer. Nat. Jeremy Chen.

4 Ergebnisse

4.1 Analysen im Tiermodell

4.1.1 Netrin-1 Expression im CCI Modell der Ratte

Alle Ratten wurden mit CCI und Unc5b Blockade oder Neo1 siRNA bzw. zusätzlichen Netrin-1 Injektionen behandelt, wie auf S. 16 beschrieben. Die *Ntn1* Expression wurde sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene im Ischiasnerv der Ratten gemessen. Zum Betrachten der systemischen Netrin-1 Spiegel erfolgte die Bestimmung mittels ELISA.

4.1.1.1 Erhöhte Expression der *Ntn1* im Rattennerv

In der qPCR des Ischiasnerven des Ratten-CCI-Modells zeigte sich eine deutliche, etwa siebenfache Erhöhung der *Ntn1*. Eine Blockade des Unc5b-Rezeptors reduzierte *Ntn1* im Ischiasnerven der Ratten nach CCI. Nach der Gabe von intraperitonealem Netrin-1 war ebenfalls eine verminderte Expression nachweisbar. Die Injektion von Ratten *Neogenin-1* siRNA erhöhte die *Ntn1* (siehe Abbildung 14).

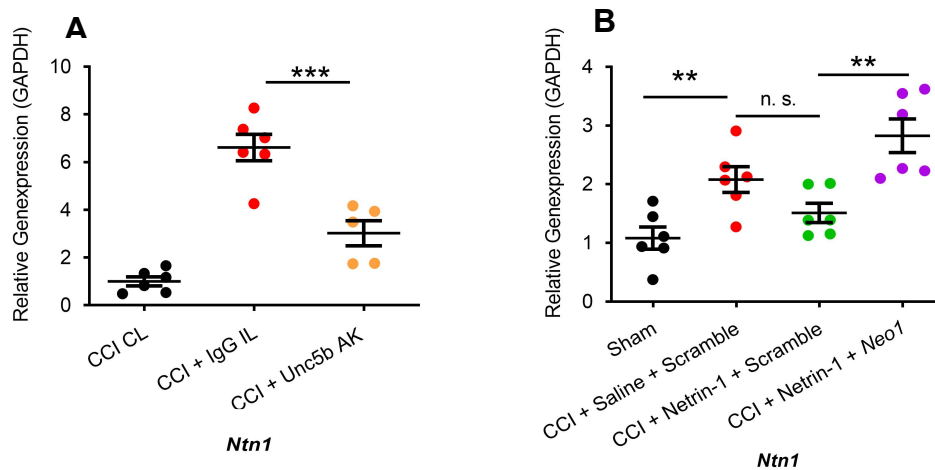


Abbildung 14 Erhöhte Unc5b oder Netrin-1 abhängige *Ntn1* Expression im Ischiasnerv der Ratte nach CCI.

Männliche Wistar Ratten unterzogen sich einer CCI Operation und wurden entweder täglich perineurial mit einem Antikörper gegen Unc5b (A) oder täglich mit Netrin-1 intraperitoneal zusammen mit regelmäßigen perineurialen Injektionen einer siRNA gegen Neo1 (B), sowie den entsprechenden Kontrollen, behandelt. Nach einer Woche CCI wurde der Ischiasnerv entnommen und *Ntn1* per qPCR quantifiziert. (A, n = 6; B, n = 5). ANOVA, ***p<0,001, **p<0,01; n.s.= keine Signifikanz.

4.1.1.2 Tendenziell erniedrigtes Netrin-1-Protein im Rattennerven

In einem Western Blot zur Bestimmung des Netrin-1-Gehalts auf Proteinebene zeigte sich bei Ratten sieben Tage nach CCI tendenziell weniger Netrin-1-Protein (70kDa) als bei Tieren nach Sham Operation (siehe Abbildung 15). Eine intraperitoneale Netrin-1-Injektion führte zu einer erhöhten Proteinkonzentration von Netrin-1 im Ischiasnerv. Das 55 kDa Fragment war im Ischiasnerv nach CCI signifikant niedriger nachweisbar als in der Sham Operation Kontrollgruppe. Seine Konzentration blieb von der Netrin-1-Injektion unbeeinflusst.

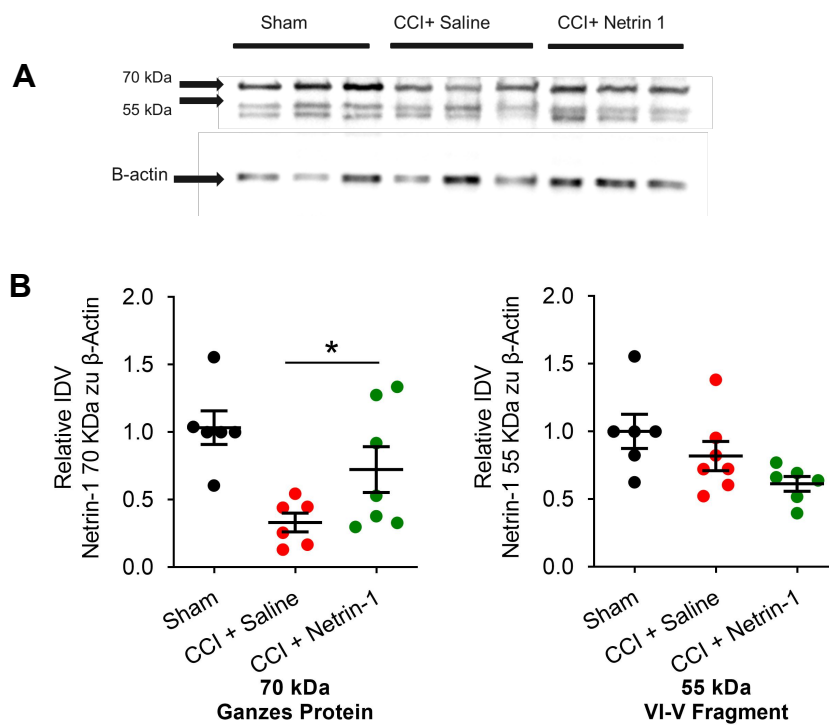


Abbildung 15 Erniedrigte Netrin-1 Proteinlevel nach CCI im Rattenschiasnerv, Erhöhung des Proteinlevels durch Netrin-1 Injektion.

Nach einer Woche CCI mit oder ohne Netrin-1-Injektion bzw. naiven Tieren wurde der Ischiasnerv entnommen und ein Western Blot durchgeführt. Proteinbanden (A), densitometrische Analyse (B). Sham (n = 6), CCI (n = 6), CCI und Netrin-1 Injektion (n = 6) ANOVA, *p<0,05.

Ergebnisse

4.1.1.3 Unveränderte Netrin-1-Serumspiegel

Um die systemische Netrin-1 Konzentration zu bestimmen, erfolgte ein ELISA mit Verwendung von Serum nach einer, drei oder sechs Wochen. Die längeren Zeiträume wurden gewählt, um auch den bei Patientinnen und Patienten vorkommenden chronischen Verlauf abzubilden. Im Serum der Ratten zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied des Netrin-1-Spiegels (Abbildung 16). Tendenziell scheint der Netrin-1-Spiegel am Anfang leicht anzusteigen, um dann nach 6 Wochen ein leicht niedrigeres Niveau im Vergleich zur Shamoperationsgruppe zu erreichen.

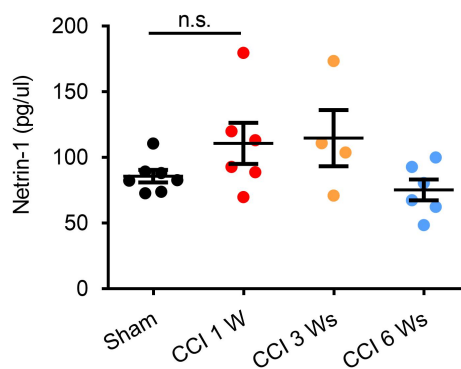


Abbildung 16 Unveränderte Netrin-1 Konzentration im Rattenserum 1, 3 und 6 Wochen nach CCI.

Mittels ELISA wurde der Serum Netrin-1-Spiegel der Ratten nach Sham Operation (n = 6) nach einer (n = 6), drei (n = 4) und sechs (n = 6) Wochen CCI bestimmt. ANOVA, n.s.= keine Signifikanz.

4.1.2 Reziproke Regulation der Netrinrezeptoren nach CCI

Nach CCI wurde *Neo1* herabreguliert (siehe Abbildung 17 A). Systemische Netrin-1-Injektion verhinderte das in unseren Experimenten. Im Gegensatz dazu wurde *Unc5b* verstärkt exprimiert, was ebenfalls durch Netrin-1 verhindert wurde (siehe Abbildung 17 B).

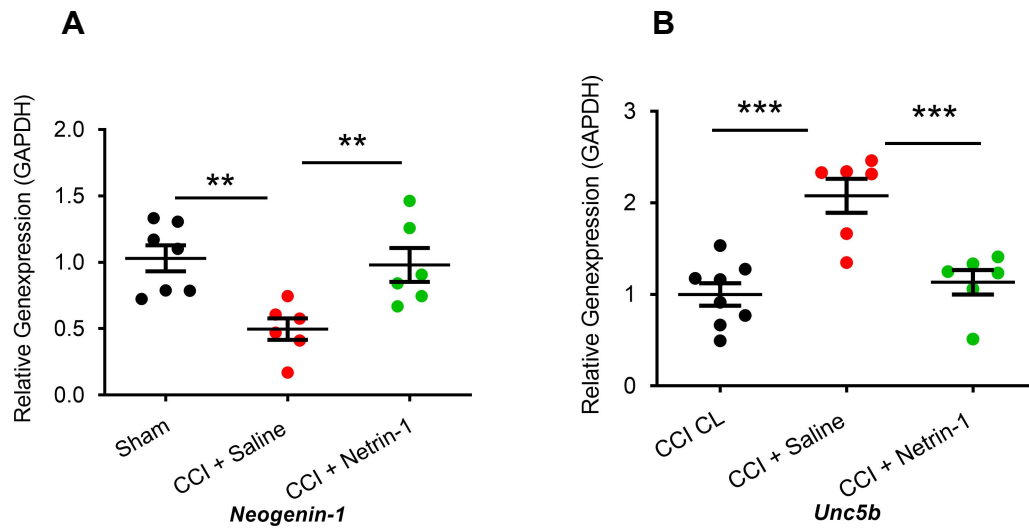


Abbildung 17 Verstärkte Expression des *Unc5b*, verminderte des *Neo1* nach CCI und Verhinderung des Effekts durch Netrin-1 Injektion.

Naiven Tieren (n = 7) oder Tieren nach CCI mit täglicher intraperitonealer Netrin-1 (n = 6) oder Saline (n = 6). Injektion wurde der Ischiasnerv entnommen und wie vorher beschrieben aufgearbeitet. Es wurde eine rtPCR zur Bestimmung der Rezeptorexpression von Neogenin-1 (A) oder *Unc5b* (B) durchgeführt. ANOVA, ***p<0,001, **p<0,01.

4.1.3 Einfluss von Netrin-1 über Neogenin-1 und Unc5b auf die Tight Junction Protein Expression

4.1.3.1 Erhöhte Tight Junction Protein mRNA Expression nach Unc5b-Rezeptor-Blockade

In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Netrin-1 die Tight Junction Protein mRNA Expression steigert (Chen et al., 2021). Zur Untersuchung der Wirkungsweise der einzelnen Netrin-1-Rezeptoren wurden durch eine lokale Injektion von Unc5b-Antikörper die jeweiligen Rezeptoren geblockt. So sollte die Wirkung von Netrin-1 vor allem über den komplementären Rezeptor Neogenin-1 erreicht werden (siehe Abbildung 18). Die Rezeptorblockade führte zu einer vermehrten Expression von *Cldn 19* und *Cldn 12* (siehe Abbildung 19). Auf die *Cldn5* Expression hatte die Unc5b-AK-Injektion jedoch keinen Einfluss.

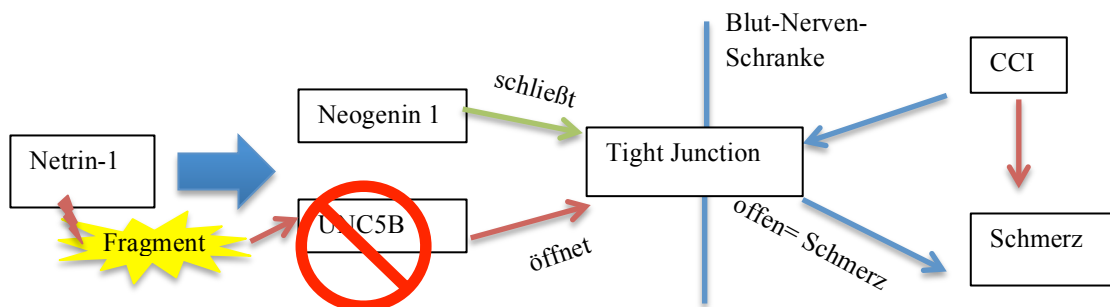


Abbildung 18 Durch Ausschalten des Unc5b Rezeptors mithilfe eines Antikörpers wirkt Netrin-1 über seinen komplementären Neogenin-1 Rezeptor und damit stabilisierend auf die Blut-Nerven-Schranke

Ergebnisse

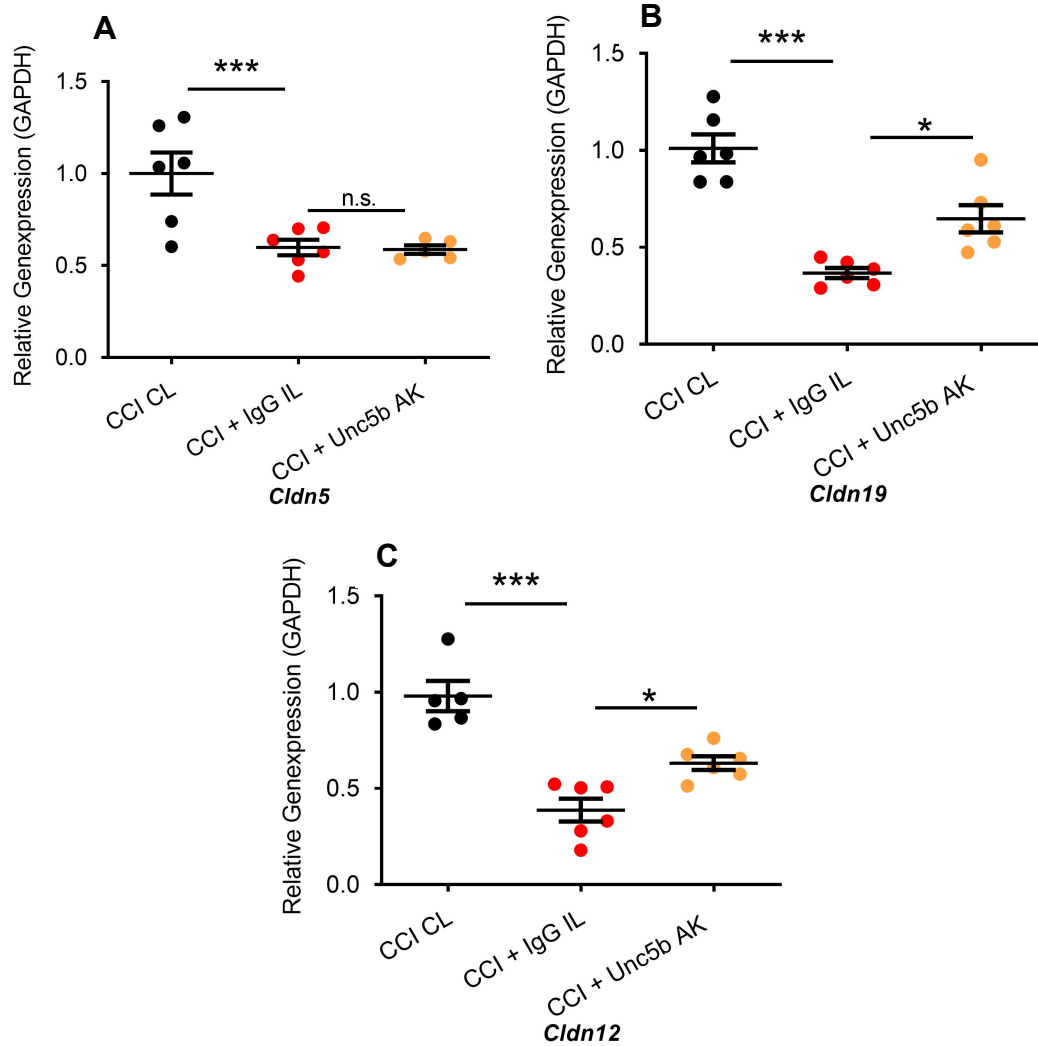


Abbildung 19 Gesteigerte Expression von *Cldn12* und *Cldn 19* unter Rezeptorblock gegenüber CCI

Aus kontralateralen Ischiasnerven (n = 6) und ipsilateralen Ischiasnerven von Tieren mit einer Woche CCI und Unc5b AK Injektion (n = 5) bzw. IgG als „Vehicle“ Kontrolle (n = 6) wurde die Expression von *Cldn 5* (A), *Cldn19* (B) und *Cldn12* (C) mittels qPCR quantifiziert. ANOVA ***p<0,001, *p<0,05, n.s. = keine Signifikanz

4.1.3.2 Verminderte die Tight Junction Protein mRNA Expression nach Neogenin-1 Rezeptor Blockade

Im umgekehrten Fall wurde der Neogenin-1-Rezeptor durch *Neogenin-1* siRNA-Injektionen ausgeschaltet (siehe Abbildung 20). Unter Applikation von Netrin-1 bzw. Saline intraperitoneal wurde *Neo*-siRNA oder scramble siRNA (Kontrolle) gespritzt. Netrin-1-Gabe führte zu einer Erhöhung der Expression von *Cldn5* und von *Cldn 19* sowie tendenziell von *Cldn12*. *Neo1* siRNA-Injektion führte zu einer tendenziellen Verringerung der Expression von *Cldn5* und *Cldn12* (siehe Abbildung 21). Bei keinem der getesteten Claudine war diese Veränderung signifikant.

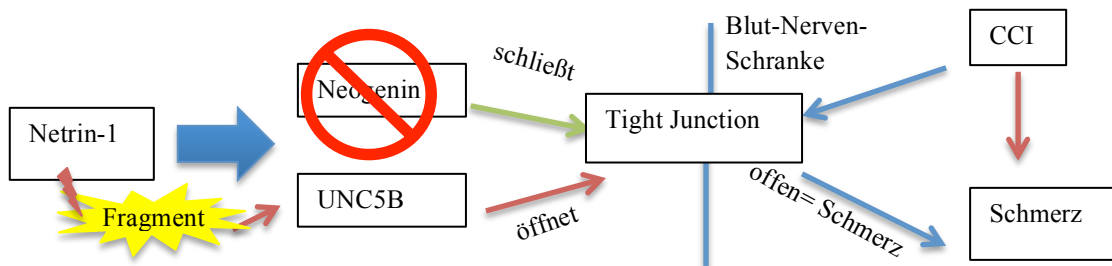


Abbildung 20 Durch Ausschalten des Neogenin-1 Rezeptors durch Injektion von *Neo1* siRNA, die die Expression des Rezeptors verhindert, wirkt Netrin-1 über den Unc5b Rezeptor und öffnet die Blut-Nerven-Schranke

Ergebnisse

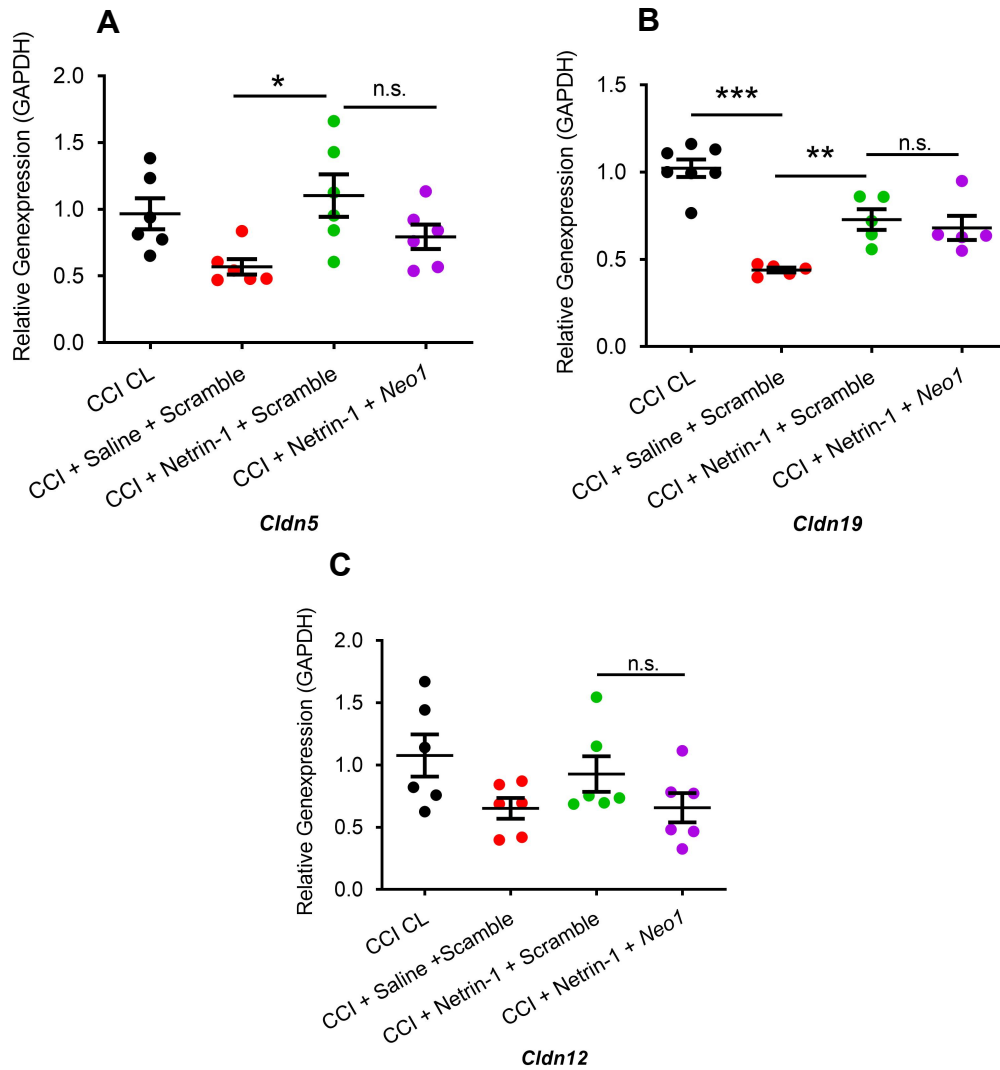


Abbildung 21 Keine signifikante Veränderung der *Cldn* Expression durch Blockierung des Neogenin-1 Rezeptors, verstärkte Expression durch Netrin-1 Injektion.

Tieren nach CCI mit Netrin-1 bzw. Saline i.p. Injektion wurde lokal siRNA bzw. „Scramble“ injiziert (n = jeweils 6). Die Proben wurden mit der kontralateralen Seite verglichen. Es erfolgte eine Analyse der Expression von *Cldn5* (A), *Cldn19* (B) und *Cldn12* (C) mittels rtPCR. ANOVA *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, n.s. = keine Signifikanz.

4.1.4 Kein Einfluss von Netrin-1-Injektion auf *Tnfa* Expression

Um eine rein antiinflammatorische Wirkungsweise des Netrin-1 auszuschließen, wurde die TNF α -Expression als Entzündungsmarker untersucht. *Tnfa* zeigte nach CCI ipsilateral eine höhere Expression als in kontralateralen Ischiasnerven. Diese erhöhte Expression persistierte auch bei Netrin-1-Injektion. Injektion von Unc5b AK veränderte die Expression nicht. *Neogenin-1* siRNA-Injektion führte zu einer gesteigerten *Tnfa*-Expression (siehe Abbildung 22).

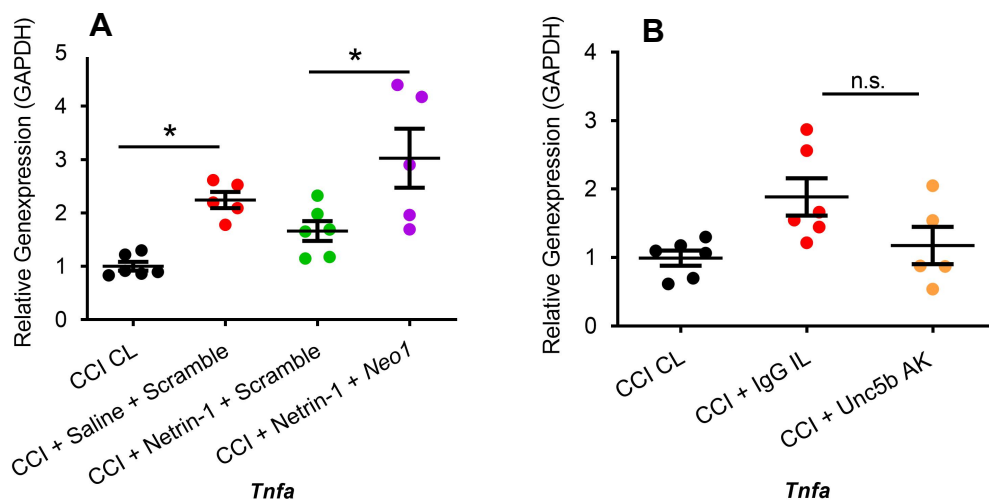


Abbildung 22 Gesteigerte *Tnfa* Expression nach CCI, keine Veränderung durch Netrin-1.

Es erfolgte die Bestimmung der *Tnfa*-Expression in allen Versuchsgruppen (CCI, Injektion von Unc5b AK, Neogenin-1-siRNA und/ oder Netrin-1 i.p.) mittels rtPCR (n = jeweils 6) ANOVA *p<0,05 , n.s.= keine Signifikanz.

4.2 Analysen von Plasma und Haut von CRPS Patientinnen und Patienten

4.2.1 Erniedrigtes Netrin-1 Level im Patientenplasma

4.2.1.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurde Plasma von jeweils 18 Patientinnen und Patienten sowie 18 alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen aus der Kohorte der ncRNAPain-Studie (ncRNAPain, 2022). Es wurden die Patientinnen und Patienten ausgewählt, denen eine alters- und geschlechtsgematchte Kontrolle zugeordnet werden konnte. Aufgrund des jüngeren Alters der Kontrollgruppe ist die hier ausgewählte Patientengruppe etwas jünger als das Kollektiv der ncRNAPain Kohorte. Die Eigenschaften der untersuchten Patientinnen und Patienten zeigt Tabelle 11. Insgesamt ergibt sich ein Patientenkollektiv mit mehr weiblichen als männlichen Patienten. Die Patientinnen und Patienten hatten im Durchschnitt eine Krankheitsdauer von ca. 2,25 Jahren. Bestimmt wurden der mittlere Schmerz der letzten Woche auf einer Skala von null bis zehn, der CSS (CRPS severity score) mittels Anamnese und klinischer Untersuchung, die GCPS (graded chronic pain scale) Beeinträchtigung (disability) und CRPS Schmerzstärke (pain intensity) sowie neuropathic pain symptom inventory (NPSI) mittels Fragebogen.

Tabelle 11 Beschreibung der CRPS Patientinnen und Patienten und Kontrollen

Mittelwert und Standardabweichung

Variablen	CRPS	Kontrollen
Stichprobengröße (n)	18	18
Geschlecht (n männlich/ n weiblich)	3 / 15	3 / 15
Alter (Jahre)	46,0 ± 10,3	46,6 ± 10,4
CRPS Krankheitsdauer (Jahre)	2,25 ± 2,4 (0,2 ; 8)	-
Durchschnittlicher Schmerz in letzter Woche (NRS 0-10)	6,1 ± 1,7 (2 ; 8)	-
NPSI Summe (neuropathic pain symptom inventory)	0,4 ± 0,2 (0 ; 0,8)	-
CSS (CRPS severity score)	10,9 ± 2,2 (8 ; 15)	-
GCPS disability (graded chronic pain scale)	53,8 ± 20,1 (3,3 ; 83,3)	-
GCPS pain intensity (graded chronic pain scale)	68,9 ± 18,4 (13,3 ; 90)	-

4.2.1.2 Geringere Netrin-1 Spiegel im Patientenplasma

Die Proteinkonzentration von Netrin-1 im Blutplasma wurde mittels ELISA bestimmt. Unsere Voruntersuchungen zeigten, dass grundsätzlich im Serum höhere Netrin-1-Spiegel zu finden waren als im Plasma, dass die relativen Unterschiede zwischen den Proben aber korrelierten. Plasma wurde durch Hämolyse geringer beeinflusst, weshalb es in dieser Untersuchung verwendet wurde. Um eine Beeinflussung durch die Probenaufbereitung oder unterschiedliche Flüssigkeitsaufnahme der Patientinnen und Patienten auszuschließen, wurde in den Proben der gesamte Proteingehalt im Plasma mittels BCA-Assay bestimmt. Im Durchschnitt zeigten die Patientinnen und Patienten um etwa 17 % signifikant niedrigere Netrin-1-Level als die Kontrollpersonen (siehe Abbildung 23). Auch normalisiert auf das Gesamtprotein zeigte sich ein signifikant niedrigerer Netrin-1-Spiegel im Patientenplasma.

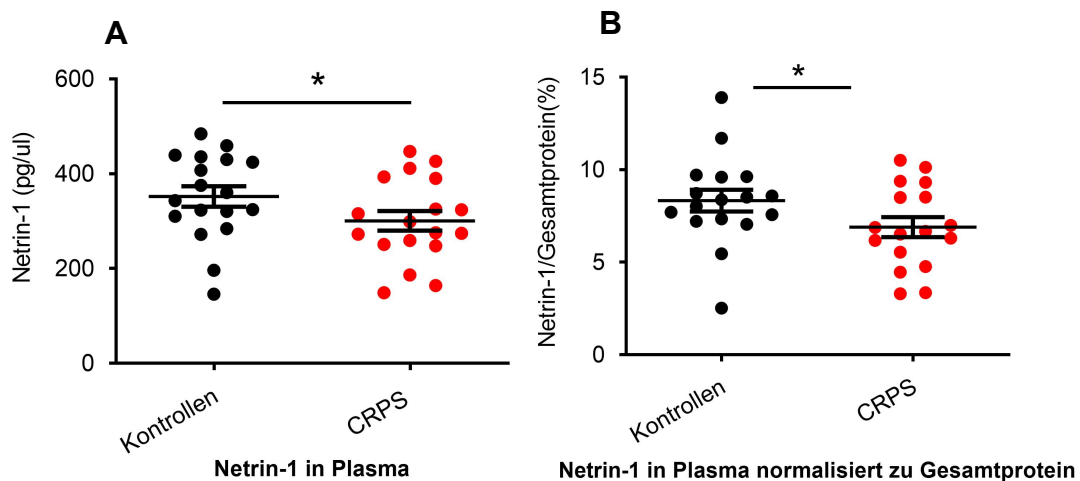


Abbildung 23 Geringere Proteinkonzentration von Netrin-1 in Patientenplasma im Vergleich zu Kontrollplasma

Die Proteinkonzentration wurde im Plasma mittels ELISA bestimmt (A) und auf das Gesamtprotein normalisiert (B). Patienten (n = 18), Kontrollen (n = 18),. Gepaarter t-Test, * p<0,05.

4.2.2 Pilotexperimente: Trend zu geringerer Netrin-1 und Claudinexpression in Patientenhautproben

4.2.2.1 *Patientenkollektiv*

Es wurden Hautproben von gesunden Kontrollen und Patientinnen und Patienten mit CRPS untersucht (siehe Tabelle 12). Patientenhautproben wurden kontra- und ipsilateral wie unter Methoden beschrieben gewonnen. Die Kontrollhautproben stammten von Patientinnen mit Brustverkleinerung, sodass hier keine klinischen Daten vorliegen.

Tabelle 12 Beschreibung der CRPS Patienten und Kontrollen Mittelwert und Standardabweichung

Variablen	CRPS	Kontrollen
Stichprobengröße (n)	4	6
Geschlecht (n männlich/ n weiblich)	2/2	0/6
Alter (Jahre)	54 ± 3	-
Zeitpunkt nach auslösendem Ereignis (Tage)	108 ± 61	-
Stärkster Schmerz in letzter Woche (NRS 0-10)	5 ± 2	-

4.2.2.2 *Trend zu niedrigerer NTN1 , UNC5B und Claudin Expression in CRPS Patientenhautproben*

Tendenziell war *NTN1* in den CRPS-Hautbiopsien beider Extremitäten (ipsi- und kontralateral) erniedrigt. Dabei war die Erniedrigung ipsilateral stärker als in der kontralateralen Extremität. Der Unterschied war nicht signifikant (siehe Abbildung 24 A). Die Expression des Netrin-1 Rezeptors *UNC5B* zeigte sich in den oben genannten Hautproben vermindert. Der Unterschied war ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 24 B). Um die Tight Junction Protein Expression bei CRPS zu untersuchen, wurde die *CLDN1* und *CLDN5*-Expression in Patientenhautbiopsien bestimmt. Tendenziell lässt sich eine erniedrigte Expression der Tight Junction mRNA sowohl ipsi- als auch kontralateral für beide Claudine erkennen (siehe Abbildung 24 C und D).

Ergebnisse

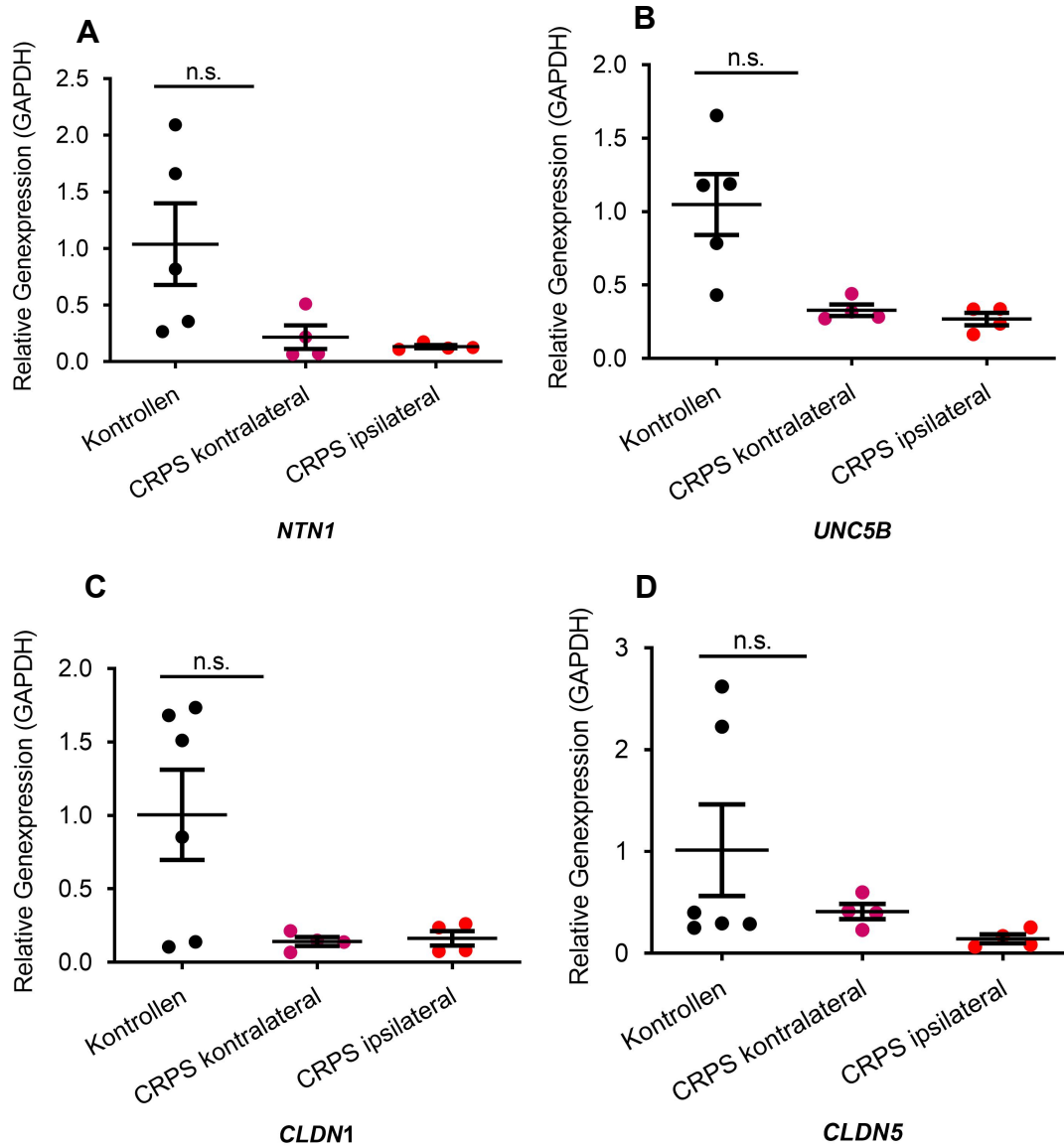


Abbildung 24 Pilotexperimente: Erniedrigte Expression von *NTN1*, *UNC5b* und der Tight Junction Proteine *CLDN1* und *CLDN5* in CRPS Patientenhautbiopsien.

Bestimmung des mRNA Gehaltes der Proben mittels TaqMan Sonden. (A) *NTN1*, (B) *UNC5B*, (C) *CLDN1*, (D) *CLDN5* Mann-Whitney-Test, n.s.= keine Signifikanz.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass sieben Tage nach CCI Netrin-1 mRNA im Rattennerv verstärkt exprimiert wird, wohingegen das Protein selbst tendenziell vermindert exprimiert wird. Nach intraperitonealer Netrin-1 Injektion konnte eine vermehrte lokale *Cldn 5* und *Cldn19* Expression nachgewiesen werden .

Die Expression der untersuchten Netrin-1 Rezeptoren in CCI ist reziprok. Während der *Unc5b* nach CCI verstärkt exprimiert wurde, verminderte sich die Expression des *Neogenin-1*. Ausschalten der Rezeptoren veränderte die *Cldn* Expression. Die Blockade des *Unc5b*-Rezeptors steigerte die *Cldn 12* und *Cldn19* Expression, wohingegen diese durch *Neogenin-1* siRNA Injektion tendenziell herabreguliert wurde.

Im Plasma von CRPS Patientinnen und Patienten konnten wir weniger Netrin-1 Protein nachweisen als bei gesunden Kontrollen. Tendenziell waren *NTN1*, *UNC5B*, *CLDN1* und *CLDN5* in CRPS Hautproben vermindert nachweisbar.

Die Ergebnisse unserer Experimente legen nahe, dass Neuropathie im Tiermodell zu einer Herabregulierung von Netrin-1 führen kann, sowie dass Netrin-1 über die Stabilisierung der Blut-Nerven-Schranke einen Effekt auf neuropathische Schmerzen haben könnte. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass im Plasma von CRPS Patientinnen und Patienten dieses Protein vermindert nachweisbar war.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Erniedrigter Netrin-1-Spiegel bei Neuropathie und CRPS

5.2.1.1 Ergebnisse bei CCI-Tiermodell

Entsprechend unserer Ergebnisse der vermehrten *Ntn1* Expression im Rattenschiasmerv nach CCI konnte auch in der Literatur eine erhöhte Expression von *Ntn1* nach CCI im Rückenmark nachgewiesen werden (Li et al., 2020b). Dies widerspricht den Ergebnissen in menschlichen Hautproben (Schubert et al., 2019). Möglicherweise spricht die in unseren Untersuchungen gezeigte Erhöhung der mRNA Expression für einen gesteigerten Abbau des Netrin-1-Proteins und dadurch kompensatorisch erhöhte

Ntn1 Produktion. Eine eindeutige Korrelation zwischen mRNA und Protein ist nicht immer gegeben, da von mRNA zu Protein noch verschiedene Schritte durchlaufen werden (Fortelny et al., 2017; Greenbaum et al., 2003). Diesen Schluss legt die mittels Western Blot bestimmte, tendenziell verminderte Netrin-1 Proteinkonzentration im Rattenschiasnerv nach CCI nahe. Die unterschiedliche mRNA- und Proteinexpression wurde für *NTN1* bereits in menschlichen Hautproben gezeigt (Kreß et al., 2021). Zusammenfassend nehmen wir bei CCI eine lokale Verminderung der Netrin-1 Proteinexpression an. Dies postulieren wir als einen Mechanismus der Schmerzentstehung und vermuten eine neuroprotektive und schmerzlindernde Wirkung des Netrin-1. Passend zu dieser Vermutung zeigen Ratten nach i.p. Netrin-1 Injektion ein geringeres Schmerzverhalten (Chen et al., 2021). Die neuroprotektive Wirkung von Netrin-1 über Stärkung der Blut-Hirn Schranke wurde bereits beschrieben (Podjaski et al., 2015). Wir vermuten in der niedrigeren Proteinkonzentration von Netrin-1 einen Pathomechanismus des neuropathischen Schmerzes.

Durch Blockade des Netrin-1 Rezeptors *Unc5b* konnte die *Ntn1* gesteigert und durch Blockade des Neogenin-1 Rezeptors im Vergleich zur Netrin-1 Injektion alleine bei CCI gesenkt werden. In einem *Neo1* KO Modell wurde eine erniedrigte *Ntn1* Expression in Astrozyten entsprechend der vorliegenden Ergebnisse beschrieben (Yao et al., 2020). Möglicherweise werden auch hierdurch die schmerzlindernde Wirkung des *Unc5b* Rezeptor Blocks bzw. die Schmerz verstärkende Wirkung der *Neogenin* siRNA Injektion beeinflusst. Somit ist eine Wirkung der Rezeptorverfügbarkeit auf die Menge an exprimiertem Liganden zu vermuten. Dies zeigt einen neuen Aspekt der Wirkungsweise neben der oben postulierten Wirkung des Netrins über seine Rezeptoren auf die Blut-Nerven Schranke. Die unterschiedliche Beeinflussung der *Ntn1* Expression durch Blockade seiner Rezeptoren bedarf weiterer Untersuchungen.

Netrinspiegel im Serum waren bei CCI und Sham unabhängig vom Zeitpunkt der Neuropathie gleich. Möglicherweise ist CCI in seinen systemischen Auswirkungen nicht mit CRPS vergleichbar, weil die Inflammation geringer ist. Es handelt sich bei CCI um ein häufig verwendetes Modell für CRPS Typ II und Neuropathie (Reinhold et al., 2021), jedoch gibt es mehrere dem CRPS in bestimmten Aspekten besser entsprechende Modelle (siehe Tabelle 1). In einem möglicherweise physiologischeren

Modell entwickeln die Ratten Allodynie, Ödeme und Veränderungen des Knochens nach einer Tibiafraktur (Guo et al., 2004). In weiterführenden Studien sollte in diesem Modell die Netrin-1 Konzentration im Rattenserum evaluiert werden. Das CCI-Modell kann die Pathophysiologie des CRPS nicht genau nachbilden (Finke, 2008). Des Weiteren ist es möglich, dass Veränderungen des Netrin-1-Spiegels zu einem früheren Zeitpunkt ausgeprägter sind. Gegebenenfalls würden sich auch im Vergleich mit naiven Tieren ohne Sham Operation Unterschiede ergeben.

5.2.1.2 Ergebnisse bei CRPS-Patientinnen und Patienten

Zur klinischen Korrelation der im Tiermodell postulierten erniedrigten Netrin-1 Konzentration erfolgte eine Messung im Plasma von CRPS-Patientinnen und Patienten. Der Netrin-1-Spiegel war im Vergleich zu alters- und geschlechtsgleichen Kontrollpersonen ebenfalls erniedrigt. Ein erniedrigter Netrin-1-Spiegel im Rahmen des neuroinflammatorischen Geschehens (Mulero et al., 2017) könnte die Blut-Nerven-Schranke destabilisieren und so neuropathische Schmerzen begünstigen. Patientinnen und Patienten mit niedrigeren Netrin-1-Spiegeln könnten nach einem Trauma leichter ein CRPS entwickeln.

Bei verschiedenen Erkrankungen wurde bereits Netrin-1 im Serum oder Plasma von Patientinnen und Patienten untersucht. Einen Überblick bietet Tabelle 13. In den auf Netrin-1 untersuchten Erkrankungen handelt es sich zum Großteil um solche mit gestörter Barrierefunktion. Bei diversen dieser Erkrankungen werden Netrin-1 oder dessen Rezeptoren aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften auch als Therapietarget diskutiert (Bongo and Peng, 2014; Mehlen and Guenebeaud, 2010). Möglicherweise ist dies auch ein Ansatz bei der Therapie neuropathischer Schmerzen.

Tabelle 13 Bestimmung des Netrin-1 Spiegels bei verschiedenen Erkrankungen Literaturzusammenstellung zu Untersuchungen der Netrin-1 Spiegel in Patientenkollektiven

Erkrankung	Heraufreguliert	Herunterreguliert
Diabetes mellitus II	Ay et al., 2016 (n = 60)	Liu et al., 2016 (n = 30)
Übergewicht		Ramkhelawon et al., 2014- Expression in Adipozyten

Diskussion

Krebs	Ramesh et al., 2011	
Artherosklerose	Kizmaz et al., 2016 (Raucher)	Munoz et al., 2017 (subklinisch)
MS	Podjaski et al., 2015 (n = 16)	<ul style="list-style-type: none"> • Mulero et al., 2017 (n = 120) • Voortman et al., 2017 (nur im aktiven Stadium) (n = 109)
Praeclampsie	Cekmez et al., 2017	
Endometriose	Ding et al., 2021	
CO Vergiftung	Gedikli et al., 2019	
Subarachnoidalblutung		Chen et al., 2019a, (n = 104)
Schlaganfall	Guo et al., 2019, bessere Prognose bei höherem Netrin-1-Spiegel	

In Patientenhautproben war die *NTNI* passend zu den Ergebnissen im Plasma tendenziell erniedrigt. Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Pilotstudie können keine sicheren Aussagen getroffen werden, die Tendenz erscheint jedoch mit den Plasmaproben schlüssig. Auch in Hautproben von Patientinnen und Patienten mit schmerzhafter Polyneuropathie war Netrin-1 erniedrigt (Schubert et al., 2019). Dies stützt die Tendenz der vorliegenden Ergebnisse zu niedrigeren Netrin-1 Spiegel in CRPS.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit bei CRPS eine erniedrigte Netrin-1 Expression in Hautproben, sowie ein vermindertes Netrin-1 Proteinlevel im

Patientenplasma gefunden werden, woraus wir eine niedrigere Netrin-1 Konzentration in allen Geweben bei CRPS Patientinnen und Patienten postulieren. Dies entspricht den vorliegenden lokalen Ergebnissen im Rattenmodell. Wir vermuten hier entsprechend des Rattenmodells einen Zusammenhang mit der Schmerzempfindung möglicherweise durch eine gestörte Barrierefunktion. Die Wirkungsweise des Netrin-1 wurde im Tiermodell weiter untersucht.

5.2.2 Erniedrigte Tight Junction Protein Expression in Neuropathie und CRPS

In den oben gezeigten Untersuchungen war die Tight Junction Protein Expression durch CCI in den Rattennerven reduziert., was die Ergebnisse früherer Studien repliziert (Hirakawa et al., 2003; Ohta et al., 2005; Reinhold et al., 2018). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CCI somit die Blut-Nerven-Schranke stört, welche durch Tight Junction Proteine gebildet wird, ähnlich wie es bereits für die Blut-Rückenmarksschranke beschrieben wurde (Sauer et al., 2017).

In Hautproben von Patientinnen und Patienten war entsprechend tendenziell *Cldn1* und *Cldn5* mRNA sowohl kontra- als auch ipsilateral vermindert exprimiert. Dies ist konsistent mit der erniedrigten Tight Junction Expression bei schmerzhaften Neuropathien (Reinhold et al., 2018). Die erniedrigte Expression weist auf eine gestörte Barrierefunktion in dieser Erkrankung hin (Förster, 2008). Möglicherweise wird durch die geringere *Cldn5* Expression auch die Bildung eines Ödems begünstigt (Jang et al., 2011). Die beidseitige Veränderung könnte auch durch eine systemische Beteiligung bei CRPS erklärt werden. In unserer Pilotstudie ließen sich in menschlichen Hautproben jedoch vor allem aufgrund der geringen Fallzahl lediglich Tendenzen, jedoch keine signifikanten Ergebnisse nachweisen. Weitere Studien mit größeren Stichproben sind hier sinnvoll.

5.2.3 Erhöhte Tight Junction Protein Expression durch Netrin-1 Injektion

Wie für die Blut-Hirn-Schranke schon in Studien gezeigt (Podjaski et al., 2015), vermuten wir in unseren Experimenten eine Stabilisierung der Blut-Nerven-Schranke durch Netrin-1. Wie bereits zuvor beschrieben zeigte sich eine Herabregulierung der Tight Junction Proteine bei Neuropathie im Tiermodell (Reinhold and Rittner, 2017). Eine intraperitoneale Injektion von Netrin-1 steigerte die Expression von *Cldn19* und *Cldn5*, sowie tendenziell von *Cldn12*. Hiermit konsistent konnte in einer Studie in der

Zellkultur eine verstärkte Expression von Tight Junction Proteinen nach Behandlung mit Netrin-1 nachgewiesen werden (Podjaski et al., 2015). Ebenfalls übereinstimmend wird eine Applikation von Netrin-1 auch bei anderen Erkrankungen wie einem Schlaganfall mit einer Symptombesserung durch stabilere Barrieren beschrieben (Yu et al., 2017). Die untersuchten Tight Junction Proteine stabilisieren die Blut-Nerven-Schranke (Reinhold and Rittner, 2017) und ihre verstärkte Expression nach Netrin-1 Injektion ist möglicherweise ein Grund für die Verringerung der Allodynie (siehe Abbildung 5)(Chen et al., 2021). Die Steigerung der Expression fällt am stärksten für *Cldn19* aus. Hierbei handelt es sich um ein vor allem in Nervenzellen exprimiertes *Cldn*, dessen Fehlen mit Neuropathie in Verbindung gebracht wird (Miyamoto et al., 2005). Wir vermuten hier deshalb im Speziellen eine schmerzlindernde Wirkung durch Wiederherstellung der *Cldn19* Expression. Entgegen unserer Erwartungen zeigte sich für *Cldn12* nur eine leichte Tendenz der Beeinflussbarkeit durch Netrin-1, obwohl auch hier eine Neuropathie im Knockout Modell beschrieben ist (Chen et al., 2019b). Netrin-1 hat somit auf verschiedene Proteine am ehesten über verschiedene Rezeptoren eine jeweils unterschiedliche Wirkung. Im Folgenden wird die Wirkungsweise mittels dieser Rezeptoren näher diskutiert.

5.2.4 Veränderte Netrin-1 Rezeptor Expression durch Neuropathie

Um die Wirkungsweise von Netrin-1 genauer zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der Rezeptoren betrachtet. Hier zeigte sich eine erniedrigte Expression des *Neol*-Rezeptors nach CCI. Dieser Rezeptor ist bekannt für seine barriestabilisierenden Eigenschaften (O'Leary et al., 2017). Übereinstimmend mit dieser Studie lässt sich auch in der vorliegenden Untersuchung ein Mangel an Neogenin-1 Rezeptoren mit einer gestörten Barrierefunktion der Blut-Nerven-Schranke in Verbindung bringen. Injektion von Netrin-1 steigert die Expression von *Neol* und stabilisiert möglicherweise auf diesem Weg die Blut-Nerven-Schranke.

Die *Unc5b* mRNA zeigte sich nach CCI erhöht im Vergleich zu Kontrollen. Der *Unc5b*-Rezeptor ist in der Rattenretina als barrieredestabilisierend beschrieben (Miloudi et al., 2016). Die Expression des Rezeptors wurde im Hinterhorn von Ratten in einem Schmerzmodell (Partial sciatic nerve ligation model - PSL) ebenfalls vermehrt nachgewiesen (Hayano et al., 2016). Auch in unseren Experimenten ist eine

Herabsetzung der Barrierefunktion durch eine verstärkte Expression des Rezeptors anzunehmen. Möglicherweise ist die verstärkte Bildung des *Unc5b*-Rezeptors ein Pathomechanismus der Neuropathie. Wir konnten eine verringerte Expression des Rezeptors nach Netrin-1 Injektion nachweisen. Dies ist ein weiterer möglicher Mechanismus für die barriestabilisierende Wirkung.

5.2.5 Erhöhte Tight Junction Protein Expression durch Unc5b Rezeptor Blockade bei Neuropathie

Inwiefern die Wirkung von Netrin-1 auf die Expression der Tight Junction Proteine vom Rezeptor abhängt, wurde mithilfe von blockierender Antikörper- und siRNA-Injektion evaluiert.

Wurde der *Unc5b*-Rezeptor durch einen Antikörper ausgeschaltet, zeigte sich eine verstärkte Expression von *Cldn12* und *Cldn19* im Vergleich zur alleinigen CCI-Bedingung. In *Cldn5* ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Es ist anzunehmen, dass Netrin-1 über Neogenin-1 wirkt und die Bildung von *Cldn12* und *19* verstärkt, womit es die Blut-Nerven-Schranke stabilisiert. Im Rattenmodell wurde durch die Blockade des *Unc5b* Rezeptors die Schmerzreaktion der Tiere nach CCI vermindert (Chen et al., 2021). Somit postulieren wir, dass die durch die Bindung von Netrin-1 an Neogenin-1 hervorgerufene verstärkte Claudinexpression die Schmerzempfindung verringert. Die barriestabilisierenden Eigenschaften des Neogenin-1 Rezeptors sind bereits beschrieben (O'Leary et al., 2017; Yao et al., 2020). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen der Stabilisierung der Barriere über Neogenin-1. Dieser Effekt zeigt sich am stärksten bei *Cldn 12* und *Cldn19*, welche beide vor allen in neuronalen Zellen exprimiert werden. Ein Fehlen von *Cldn12* und *19* zeigt im KO Modell jeweils den Phänotyp der Neuropathie (Chen et al., 2019b; Miyamoto et al., 2005). *Cldn5* wird in Endothelzellen der Blut-Nerven-Schranke exprimiert und sorgt für deren Stabilität (Chiba et al., 2021; Nitta et al., 2003). Folglich vermuteten wir auch hier eine Veränderung. Jedoch zeigte sich keine signifikante Beeinflussbarkeit durch Blockade des *Unc5b* Rezeptors. Möglicherweise exprimieren Endothelzellen weniger *Neol* Rezeptoren. Hierzu sollte in weiteren Studien die Wirkung von Netrin-1 auf verschiedene Zellarten, beispielsweise in Zellkulturen, untersucht werden.

Bei Blockade des Neogenin-1-Rezeptors durch *Neo* siRNA Injektion vermuteten wir eine Herabregulierung der Claudine, da beschrieben ist, dass Netrin-1 über Unc5b die Blut-Retina Schranke öffnet (Miloudi et al., 2016). Im Rattenmodell zeigten Ratten nach Blockade des Neogenin-1 Rezeptors eine verstärkte Schmerzreaktion (Chen et al., 2021). Entsprechend wird in einem Modell für *Neol*-KO eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke beschrieben (Yao et al., 2020). Eine Erniedrigung der Expression trat jedoch nicht signifikant auf. Eine entsprechende Tendenz war bei *Cldn5* und *Cldn19* sichtbar. Möglicherweise wird nach CCI die Tight Junction Protein Expression bereits soweit herabreguliert, dass eine weitere Senkung nicht mehr möglich oder messbar ist.

5.2.6 Keine rein antiinflammatorische Wirkung des Netrin-1

Die Schmerzreaktion im CCI Rattenmodell besteht durch die traumatische Ursache aus einer entzündlichen sowie einer neuropathischen Komponente. Da eine rein antiinflammatorische Wirkung des Netrin-1 ausgeschlossen werden sollte, wurde die TNF α Expression untersucht. Wie erwartet ist dessen Expression nach CCI gegenüber naiven Ratten erhöht, da eine lokale Entzündung stattfindet (Wagner et al., 1998). Eine Erhöhung der *Tnfa* mRNA und des TNF α Proteins durch akute Entzündungen ist bekannt (Zelová and Hošek, 2013), jedoch veränderte die Netrin-1-Injektion diese erhöhte *Tnfa* nicht. Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass intraperitoneal appliziertes Netrin-1 nach CCI die Entzündungsreaktion kaum beeinflusst und vor allem über den Schluss der Barriere wirkt. Wir postulieren damit eine rein antineuropathische und keine rein antientzündliche Wirkungsweise des Netrin-1. Hiermit eröffnen sich vor allem bei der Therapie neuropathischer Schmerzen neue Ansätze. Dass eine Injektion von Neogenin-siRNA die *Tnfa* Expression erhöht, kann möglicherweise durch eine Reizung des Gewebes aufgrund der lokalen Injektion erklärt werden (Kirchmair et al., 2016).

5.3 Kritikpunkte und Grenzen der vorliegenden Arbeit

5.3.1 Methodische Limitationen

5.3.1.1 CCI Modell

Zur Nachbildung der Neuropathie wurde ein CCI-Modell (Bennett and Xie, 1988) verwendet. Dies führt zu mit CRPS vergleichbarer Allodynie und Hyperalgesie. Es handelt sich um ein häufig verwendetes und gut etabliertes Modell für neuropathischen Schmerz. Die Reaktion auf die Ligation (siehe S.16) führt zu einem lokalen Schmerzverhalten vergleichbar mit CRPS. Jedoch handelt es sich bei CRPS um eine systemische Erkrankung, was durch das CCI Modell nicht ausreichend nachgebildet werden kann. Für das lokale Geschehen sind Rückschlüsse über Veränderungen in der Neuropathie möglich. Zur verbesserten systemischen Darstellung sollte in weiteren Studien beispielsweise die Verwendung des „Tibia fracture“-Modells erwogen werden, dessen Konzept näher an der tatsächlichen Ätiologie des CRPS gelegen ist (Guo et al., 2004). Des Weiteren gibt es, wie anfangs erläutert, verschiedene andere mögliche CRPS Modelle, die verschiedene Aspekte des CRPS besser nachbilden und deren Verwendung deshalb in Erwägung zu ziehen ist (siehe Tabelle 1).

5.3.1.2 Limitationen der qPCR

Zur Untersuchung der Tight Junction Expression wurde eine qPCR-Analyse verwendet. Diese beruht auf der indirekten Bestimmung der mRNA durch reverse Transkription in cDNA, welche mittels PCR quantifiziert werden kann. Über die Expression der mRNA können Vermutungen über die Proteinexpression angestellt werden. Eine exakte Übereinstimmung ist nicht in jedem Fall gegeben, da von der mRNA zum Protein noch einige Schritte durchlaufen werden, welche die endgültige Proteinexpression beeinflussen können (Schwanhäusser et al., 2011). Möglich ist ein Abbau der RNA oder des Proteins selbst. Es gibt Studien zur Korrelation der mRNA mit der Proteinkonzentration (Greenbaum et al., 2003), welche nicht immer eindeutig sein muss. Dies zeigt, dass eine zusätzliche Bestimmung auf Proteinebene durch ELISA, Western Blot oder Immunfluoreszenz oft sinnvoll ist. Bei einem Teil der Versuche wurde deshalb eine Proteinbestimmung durchgeführt.

5.3.1.3 Limitationen von proteinbasierten Messungen

5.3.1.3.1 ELISA

Um die Konzentration des Netrin-1 im Plasma festzustellen, wurde ein ELISA verwendet. Eine ELISA Bestimmung wurde bereits zur Untersuchung der Netrin-1 Level verschiedener Erkrankungen verwendet ((Mulero et al., 2017) u.a.; siehe Tabelle 13). Vergleichend wurde im Rattenserum ebenfalls ein ELISA durchgeführt. Die ELISA Prozedur ist dabei aufgrund vieler Wasch- und Zwischenschritte sehr anfällig für Störungen. Beim Hinzufügen der Stop Solution können durch die Zeitdifferenzen Unterschiede in der Signalqualität zwischen den verschiedenen „Wells“ zu Beginn und Ende der Platte entstehen (Sakamoto et al., 2018). Des Weiteren bedarf ein ELISA oft größerer Probenmengen als andere Verfahren, was insbesondere bei Patientenproben problematisch ist. Zu guter Letzt ist der ELISA anfällig für Unterschiede zwischen verschiedenen KIT Produktionschargen, weshalb in dieser Arbeit nur Kits derselben Charge verwendet wurden.

5.3.1.3.2 BCA Assay

Problematisch war die Proteinbestimmung im Patientenplasma. In Vorversuchen mit unverdünntem Patientenplasma erwiesen sich das in den Proben enthaltene EDTA und der Kaliumgehalt als Problem, da sie die Farbreaktion beeinflussten. Des Weiteren lag der Proteingehalt der Proben oberhalb des Messbereichs. Hierdurch war der Farbumschlag im Assay im Sättigungsbereich, so dass keine Quantifizierung möglich war. Durch Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:100 konnte dieses Problem gelöst werden. Hierdurch lagen die Proteinkonzentrationen im messbaren Bereich und EDTA und Kalium im Toleranzbereich des Assays. Durch die hohe Verdünnung sind jedoch Messungenauigkeiten nicht auszuschließen.

5.3.1.3.3 Western Blot

Zum Nachweis des Netrin-1 Proteins wurde ein Western Blot verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der relativen Quantifizierbarkeit. Hier kann eine hohe Spezifität erreicht werden, da die Masse des Proteins durch seine Position auf der Membran festlegt und so seine Detektion gegenüber der reinen Immunfluoreszenzfärbung von Geweben erleichtert wird. Jedoch kann mit dieser Methode die Lokalisation des Proteins im Gewebe nicht bestimmt werden. Limitiert wird diese Methode auch durch

Vorhandensein und Spezifität der für den Western Blot notwendigen Antikörper (Ghosh et al., 2014). Um die Spezifität des hier verwendeten Antikörpers zu testen, erfolgten im Vorfeld eine Positiv- und eine Negativkontrolle des Western Blots. Hierbei zeigte der Antikörper eine klare Bindung an das verwendete rekombinate Netrin-1 Protein.

5.3.2 Limitationen im Studiendesign

Die geringe Anzahl der analysierten Hautproben ermöglicht keine statistisch signifikanten Aussagen, daher sind weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven geplant. Des Weiteren waren alle untersuchten Parameter bei CRPS Patientinnen und Patienten herabreguliert. Möglich ist hier auch ein generell niedriger mRNA Gehalt der Proben. Um dies auszuschließen, sollte das Experiment mit einer größeren Stichprobe wiederholt werden. Weiterhin kann die unterschiedliche Region der entnommenen Hautproben Unterschiede zwischen Patientinnen und Patienten und den verwendeten Kontrollen bedingen.

Schlussendlich ergibt sich in der Plasmauntersuchung aufgrund der Verfügbarkeit von Kontrollpersonen gleichen Alters und Geschlechts ein leicht jüngeres Kollektiv als das Gesamtkollektiv der ncRNAPain Studie. Dies kann die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränken.

5.4 Klinische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals die Verringerung des Netrin-1-Spiegels im Plasma von CRPS Patientinnen und Patienten evaluiert. Da dieser Unterschied zu gesunden Kontrollen nur gering war und der Netrin-1-Spiegel großen interindividuellen Schwankungen unterlag, ist dieser zumindest nicht unselektiert als eine Art „Biomarker“ einsetzbar. Er könnte aber als Basis für eine Stratifizierung der Patientinnen und Patienten dienen.

Aktuell wurde Netrin-1 bei größeren Säugetieren nur beim Schwein zur Verringerung einer experimentellen Inflammation in der Lunge eingesetzt (Mutz et al., 2010). Hier liegt allerdings ein anderer Pathomechanismus als im vorliegenden Experiment zugrunde.

Bislang ist eine klinische Anwendung von Netrin-1 bei Schmerzpatientinnen und -patienten aufgrund von fehlender klinischer Erfahrung mit dem Protein, sowie der

Diskussion

Kosten für eine Therapie durch den hohen Preis der Substanz leider noch nicht möglich. Im Rattenmodell ist eine tägliche lokale oder auch intraperitoneale Applikation möglich. Klinisch wären eine lokale Gabe bei Mononeuropathien und eine systemische Gabe z.B. subkutan denkbar. Zukünftige Forschung sollte entweder diesen Weg, neue kleine Moleküle oder auch die Antikörper gegen die Unc5b favorisieren.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Neuropathische Schmerzen schränken die Lebensqualität stark ein. Die Therapiemöglichkeiten sind bislang limitiert und eine kausale Therapie ist kaum möglich. Der Zusammenhang von neuropathischem Schmerz mit einer gestörten Blut-Nerven-Schranke (BNS) wurde bereits gezeigt (Hirakawa et al., 2003; Reinhold et al., 2018). Diese BNS wird durch Tight Junction Proteine (TJP) gebildet (Reinhold and Rittner, 2017). Netrin-1 (*Ntn1*) hat je nach Rezeptorbindung verschiedene Effekte auf TJP (Miloudi et al., 2016) und somit auf die Barriereeigenschaften (Podjaski et al., 2015). Während Netrin-1 über Neogenin-1 die Barriere zu stabilisieren scheint, öffnet *Unc5b* bei Bindung von Netrin-1 die Barriere (Miloudi et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde im Tiermodell (Chronic Constriction Injury - CCI) untersucht, ob Netrin-1 einen Einfluss auf die Blut-Nerven-Schranke hat und die Wirkung der Rezeptoren *Unc5b* und Neogenin-1 beleuchtet. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der barrierestabilisierende Netrin-1-Spiegel auch von neuropathischen Schmerzen, im Speziellen durch „Chronic Regional Pain Syndrom“ (CRPS), beeinflusst wird.

Methoden: Hierzu wurden männlichen Wistar-Ratten eine Woche nach CCI täglich lokal *Unc5b* Antikörper injiziert und der Ischiasnerv nach 7 Tagen entnommen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Versuchstieren nach CCI täglich Netrin-1 bzw. physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert, sowie lokal der Neogeninrezeptor durch viermalige lokale *Neogenin-1*-siRNA Injektion geblockt. Die mRNA Expression von *Ntn1*, seine Rezeptoren sowie der Tight Junction Proteine (Claudine - *Cldn*) wurde anschließend mittels q-PCR untersucht. Zur Bestimmung des Netrin-1-Gehalts in Rattennerven wurde ein Western Blot verwendet. Die Netrin-1-Proteinkonzentration im Plasma von CRPS Patientinnen und Patienten und alters- sowie geschlechtsgleichen Kontrollen wurde mittels ELISA bestimmt.

Ergebnisse: Im Rattenmodell zeigte sich die *Ntn1* mRNA vermehrt exprimiert, die Proteinexpression mittels Western Blot jedoch tendenziell vermindert. Die Claudinexpression war nach CCI herabreguliert. Netrin-1-Injektion steigert im CCI Modell die Expression von *Cldn5* und *19*. Der Netrin-1-Rezeptor *UNC5B* wird bei Neuropathie verstärkt und *Neogenin-1* vermindert exprimiert. Die Expression von *Cldn*

Zusammenfassung

12 und *Cldn19* war bei Blockade des Unc5b Rezeptors gesteigert und bei Blockade des Neogenin-1 Rezeptors war die Expression der untersuchten Claudine tendenziell vermindert. Es zeigte sich keine Veränderung der TNF α Expression durch Netrin-1-Injektion. Im Plasma von CRPS Patientinnen und Patienten zeigte sich ein verminderter Netrin-1-Spiegel. Ebenfalls ergaben sich in Pilotstudien in Hautproben von CRPS Patientinnen und Patienten eine niedrigere Netrin-1- und Claudinexpression.

Diskussion: Auch in der Literatur finden sich veränderte Netrin-1-Spiegel bei verschiedenen Erkrankungen mit gestörter Barrierefunktion, dies stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen überein. Netrin-1 mRNA wurde kompensatorisch in Rattennerven vermehrt exprimiert, während auf Proteinebene weniger Netrin-1 nachweisbar war. Die im Rattenmodell gezeigte verstärkte mRNA Expression der *Cldn* Proteine nach einer Netrin-1-Injektion wird über Netrin-1-Rezeptoren (Unc5b, Neogenin-1) beeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente legen nahe, dass Netrin-1 über die Stabilisierung der Blut-Nerven-Schranke einen lindernden Effekt auf neuropathische Schmerzen hat und sich auch die Expression dieses Proteins durch CRPS verändert. Weitere Untersuchungen des Wirkmechanismus sind sinnvoll. Der Einsatz beim Menschen bedarf weiterer Forschung.

7 Summary

Introduction: Neuropathic pain is a common complaint which severely affects quality of life. The treatment remains mostly symptomatic. The pain is caused by a lesion or dysfunction of the somatosensory system. Studies have shown that neuropathic pain is related to dysfunction of the blood nerve barrier and tight junction protein (TJP) loss (Hirakawa et al., 2003; Reinhold et al., 2018). Netrin-1 reseals the blood brain barrier under inflammatory conditions (Podjaski et al., 2015). The function of netrin-1 is dependent on its different receptors. The attractive receptor neogenin-1 protects the nerve barrier, whereas the repulsive receptor Unc5b opens the barrier (Miloudi et al., 2016). Following these observations, we made the hypothesis, that the TJP expression observed in neuropathic pain is regulated by netrin-1 through Unc5b and neogenin-1 receptors. Furthermore, we expected a changed netrin-1-level in plasma of patients with chronic regional pain syndrome (CRPS) which is a type of neuropathic pain.

Methods: Unc5b Antibody (Ab) was injected in Male Wistar rats daily after chronic construction injury (CCI). After one week the sciatic nerve was extracted. In a second group, the animals were treated with daily netrin-1 or saline intraperitoneal injections and local injections of *neogenin*-siRNA for 4 days. qPCR was used to analyse *Ntn1*, *Cldn 19*, *Cldn 5*, *Cldn 12* and receptor (*Unc5b*, *neogenin-1*) expression. To show protein levels of netrin in the sciatic nerve, we used western blot. CRPS patients' plasma netrin-1-level was examined by ELISA.

Results: *Ntn1* mRNA was expressed more in CCI, but in western blot analysis we detected a tendency to lower Netrin-1 protein than in sham animals. We demonstrated that netrin-1 injection upregulates the *Cldn5* and *Cldn19* mRNA in neuropathic pain model CCI. On the other hand, injection of neogenin-1 siRNA, which blocks the receptor, weakens this effect, but not significantly. Blocking the Unc5b receptor elevated the *Cldn 12* and *Cldn19* mRNA expression after CCI. We found lower netrin-1-levels in plasma of CRPS patients by ELISA. A tendency to lower mRNA levels of *NTNI* and *TJP* was also detected in skin biopsies of CRPS patients.

Discussion: This leads to the conclusion that netrin-1 closes the barrier through neogenin-1 and opens it through Unc5b. Netrin-1 level is lower in CRPS. Our results

Zusammenfassung

suggest that netrin-1 might be a protective factor for neuropathic pain. A use in humans needs further investigation.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

Aherne, C.M., Collins, C.B., and Eltzschig, H.K. (2013). Netrin-1 guides inflammatory cell migration to control mucosal immune responses during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 1, e24957.

Alcantara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E., and Sotelo, C. (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127, 1359-1372.

Austin, P.J., Wu, A., and Moalem-Taylor, G. (2012). Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp* 10.3791/3393.

Ay, E., Marakoglu, K., Kizmaz, M., and Unlu, A. (2016). Evaluation of netrin-1 levels and albuminuria in patients with diabetes. *J Clin Lab Anal* 30, 972-977.

Baron, R., Binder, A., and Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9, 807-819.

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

Bhat, S.A., Gurtoo, S., Deolankar, S.C., Fazili, K.M., Advani, J., Shetty, R., Prasad, T.S.K., Andrabi, S., and Subbannayya, Y. (2019). A network map of netrin receptor unc5b-mediated signaling. *J Cell Commun Signal* 13, 121-127.

Birklein, F., Ajit, S.K., Goebel, A., Perez, R., and Sommer, C. (2018). Complex regional pain syndrome - phenotypic characteristics and potential biomarkers. *Nat Rev Neurol* 14, 272-284.

Birklein, F., and Dimova, V. (2017). Complex regional pain syndrome-up-to-date. *Pain Rep* 2, e624.

Birklein, F., Weber, M., and Neundörfer, B. (2000). Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: Evidence for tissue hypoxia? *Neurology* 55, 1213-1215.

Birklein, P.D.F. (2018). S1 leitlinie: Diagnostik und therapie komplexer regionaler schmerzsyndrome (crps) (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie AWMF online, AWMF-Registernummer: 030/116).

Bongo, J.B., and Peng, D.Q. (2014). The neuroimmune guidance cue netrin-1: A new therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiol* 63, 95-98.

Boyer, N.P., and Gupton, S.L. (2018). Revisiting netrin-1: One who guides (axons). *Front Cell Neurosci* 12, 221.

Burgess, R.W., Jucius, T.J., and Ackerman, S.L. (2006). Motor axon guidance of the mammalian trochlear and phrenic nerves: Dependence on the netrin receptor *unc5c* and modifier loci. *J Neurosci* 26, 5756-5766.

Burma, N.E., Leduc-Pessah, H., Fan, C.Y., and Trang, T. (2017). Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *J Neurosci Res* 95, 1242-1256.

Castro Dias, M., Mapunda, J.A., Vladymyrov, M., and Engelhardt, B. (2019). Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers. *Int J Mol Sci* 20.

Cekmez, Y., Garip, S., Ulu, I., Gulsen, S., Haberal, E.T., Olgac, Y., Yogurtcuoglu, E.E., Turkmen, S.B., Aksoy, F.T., and Kiran, G. (2017). Maternal serum netrin-1 levels as a new biomarker of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 30, 1072-1074.

Chen, J.L., Yuan, D.H., Yang, S.J., Gu, C., Zhou, H.S., and Shao, G.F. (2019a). Serum netrin-1 serves as a prognostic biomarker of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clin Chim Acta* 10.1016/j.cca.2019.04.080.

Chen, J.T., Schmidt, L., Schürger, C., Hankir, M.K., Krug, S.M., and Rittner, H.L. (2021). Netrin-1 as a multitarget barrier stabilizer in the peripheral nerve after injury. *Int J Mol Sci* 22.

Chen, J.T.-C., Hu, X., Doppler, K., Breikreuz-Korff, O., Otto, I.U.C., Schwabe, J., Reinhold, A.-K., Günzel, D., Dithmer, S., Hankir, M.K., *et al.* (2019b). Claudin-12 deficiency causes nerve barrier breakdown, mechanical hypersensitivity and painfulness in polyneuropathy. 10.1101/768267 %J bioRxiv, 768267.

Chiba, H., Ichikawa-Tomikawa, N., Imura, T., and Sugimoto, K. (2021). The region-selective regulation of endothelial claudin-5 expression and signaling in brain health and disorders. *J Cell Physiol* 236, 7134-7143.

Cho, S., McCracken, L.M., Heiby, E.M., Moon, D.E., and Lee, J.H. (2013). Pain acceptance-based coping in complex regional pain syndrome type i: Daily relations with pain intensity, activity, and mood. *J Behav Med* 36, 531-538.

Coderre, T.J., Xanthos, D.N., Francis, L., and Bennett, G.J. (2004). Chronic post-ischemia pain (cpip): A novel animal model of complex regional pain syndrome-type i (crps-i; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain* 112, 94-105.

Cuhadar, U., Gentry, C., Vastani, N., Sensi, S., Bevan, S., Goebel, A., and Andersson, D.A. (2019). Autoantibodies produce pain in complex regional pain syndrome by sensitizing nociceptors. *Pain* 160, 2855-2865.

de Mos, M., de Bruijn, A.G., Huygen, F.J., Dieleman, J.P., Stricker, B.H., and Sturkenboom, M.C. (2007). The incidence of complex regional pain syndrome: A population-based study. *Pain* 129, 12-20.

Dey, S., Guthmiller, K.B., and Varacallo, M. (2022). Complex regional pain syndrome. In *Statpearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.)*.

Di Pietro, F., Lee, B., and Henderson, L.A. (2020). Altered resting activity patterns and connectivity in individuals with complex regional pain syndrome. *Hum Brain Mapp* 41, 3781-3793.

Ding, S., Guo, X., Zhu, L., Wang, J., Li, T., Yu, Q., and Zhang, X. (2021). Macrophage-derived netrin-1 contributes to endometriosis-associated pain. *Ann Transl Med* 9, 29.

Drummond, P.D., Skipworth, S., and Finch, P.M. (1996). Alpha 1-adrenoceptors in normal and hyperalgesic human skin. *Clin Sci (Lond)* 91, 73-77.

Finch, P.M., Drummond, E.S., Dawson, L.F., Phillips, J.K., and Drummond, P.D. (2014). Up-regulation of cutaneous $\alpha 1$ -adrenoceptors in complex regional pain syndrome type i. *Pain Med* 15, 1945-1956.

Finke, B. (2008). Tiermodelle zum "complex regional pain syndrome's" (crps): Neurophysiologische und intravitalfluoreszenzmikroskopische studien an der ratte https://doi.org/10.18453/rosdok_id00000448.

Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130, 55-70.

Fortelny, N., Overall, C.M., Pavlidis, P., and Freue, G.V.C. (2017). Can we predict protein from mrna levels? *Nature* 547, E19-e20.

Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., *et al.* (2008). Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin d-dependent ca^{2+} absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 19, 1912-1921.

Gedikli, U., Emektar, E., Corbacioglu, S.K., Dagar, S., Uzunosmanoglu, H., Ozdogan, S., and Cevik, Y. (2019). Determination of netrin-1 levels and its relationship with neurotoxicity in carbon monoxide poisoning. *Hum Exp Toxicol* 38, 561-566.

Ghosh, R., Gilda, J.E., and Gomes, A.V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics* 11, 549-560.

Goebel, A., Birklein, F., Brunner, F., Clark, J.D., Gierthmühlen, J., Harden, N., Huygen, F., Knudsen, L., McCabe, C., Lewis, J., *et al.* (2021). The valencia consensus-based

adaptation of the iasp complex regional pain syndrome diagnostic criteria. *Pain* 162, 2346-2348.

Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: A new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-1882.

Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., and Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mrna expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4, 117.

Guo, D., Zhu, Z., Zhong, C., Peng, H., Wang, A., Xu, T., Peng, Y., Xu, T., Chen, C.S., Li, Q., *et al.* (2019). Increased serum netrin-1 is associated with improved prognosis of ischemic stroke. *Stroke* 50, 845-852.

Guo, T.Z., Offley, S.C., Boyd, E.A., Jacobs, C.R., and Kingery, W.S. (2004). Substance p signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type i. *Pain* 108, 95-107.

Guo, T.Z., Wei, T., Tajerian, M., Clark, J.D., Birklein, F., Goebel, A., Li, W.W., Sahbaie, P., Escolano, F.L., Herrnberger, M., *et al.* (2020). Complex regional pain syndrome patient immunoglobulin m has pronociceptive effects in the skin and spinal cord of tibia fracture mice. *Pain* 161, 797-809.

Hackel D, K.S., Sauer RS, Mousa SA, Böcker A, Pflücke D, Wrede EJ, Kistner K, Hoffmann T, Niedermirtl B, Sommer C, Bloch L, Huber O, Blasig IE, Amasheh S, Reeh PW, Fromm M, Brack A, Rittner HL. (2012). Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(29).

Harden, R.N., Bruehl, S., Stanton-Hicks, M., and Wilson, P.R. (2007). Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. *Pain Med* 8, 326-331.

Hayano, Y., Takasu, K., Koyama, Y., Yamada, M., Ogawa, K., Minami, K., Asaki, T., Kitada, K., Kuwabara, S., and Yamashita, T. (2016). Dorsal horn interneuron-derived netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via unc5b. *J Exp Med* 213, 2949-2966.

Helyes, Z., Tékus, V., Szentes, N., Pohóczky, K., Botz, B., Kiss, T., Kemény, Á., Környei, Z., Tóth, K., Lénárt, N., *et al.* (2019). Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 13067-13076.

Hirakawa, H., Okajima, S., Nagaoka, T., Takamatsu, T., and Oyamada, M. (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, 196-210.

Huygen, F.J., Ramdhani, N., van Toorenenbergen, A., Klein, J., and Zijlstra, F.J. (2004). Mast cells are involved in inflammatory reactions during complex regional pain syndrome type 1. *Immunol Lett* *91*, 147-154.

Jaggi, A.S., Jain, V., and Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* *25*, 1-28.

Jang, A.S., Concel, V.J., Bein, K., Brant, K.A., Liu, S., Pope-Varsalona, H., Dopico, R.A., Jr., Di, Y.P., Knoell, D.L., Barchowsky, A., *et al.* (2011). Endothelial dysfunction and claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* *44*, 483-490.

Jerrhag, D., Englund, M., Karlsson, M.K., and Rosengren, B.E. (2017). Epidemiology and time trends of distal forearm fractures in adults - a study of 11.2 million person-years in sweden. *BMC Musculoskelet Disord* *18*, 240.

Kashiwamura, Y., Sano, Y., Abe, M., Shimizu, F., Haruki, H., Maeda, T., Kawai, M., and Kanda, T. (2011). Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res* *36*, 849-855.

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* *78*, 425-435.

Kim, S.J., Wang, Y.G., Lee, H.W., Kang, H.G., La, S.H., Choi, I.J., Irimura, T., Ro, J.Y., Bresalier, R.S., and Chun, K.H. (2014). Up-regulation of neogenin-1 increases cell proliferation and motility in gastric cancer. *Oncotarget* *5*, 3386-3398.

Kirchmair, L., Ströhle, M., Löscher, W.N., Kreutziger, J., Voelckel, W.G., and Lirk, P. (2016). Neurophysiological effects of needle trauma and intraneural injection in a porcine model: A pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* *60*, 393-399.

Kizmaz, M., Marakoglu, K., Kiyici, A., and Ay, E. (2016). Plasma netrin-1 levels significantly increase in smokers. *Clin Biochem* *49*, 832-834.

Ko, S.Y., Dass, C.R., and Nurgali, K. (2012). Netrin-1 in the developing enteric nervous system and colorectal cancer. *Trends Mol Med* *18*, 544-554.

Kottke, M.A., and Walters, T.J. (2016). Where's the leak in vascular barriers? A review. *Shock* *46*, 20-36.

Krämer, H.H., Eberle, T., Üçeyler, N., Wagner, I., Klonschinsky, T., Müller, L.P., Sommer, C., and Birklein, F. (2011). Tnf- α in crps and 'normal' trauma--significant differences between tissue and serum. *Pain* *152*, 285-290.

Kreß, L., Hofmann, L., Klein, T., Klug, K., Saffer, N., Spitzel, M., Bär, F., Sommer, C., Karl, F., and Üçeyler, N. (2021). Differential impact of keratinocytes and fibroblasts on

nociceptor degeneration and sensitization in small fiber neuropathy. *Pain* 162, 1262-1272.

Lenz, M., Üçeyler, N., Frettlöh, J., Höffken, O., Krumova, E.K., Lissek, S., Reinersmann, A., Sommer, C., Stude, P., Waaga-Gasser, A.M., *et al.* (2013). Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type i (crps i) resolve after 6 months. *Pain* 154, 2142-2149.

Li, B., Shen, K., Zhang, J., Jiang, Y., Yang, T., Sun, X., Ma, X., and Zhu, J. (2020a). Serum netrin-1 as a biomarker for colorectal cancer detection. *Cancer Biomark* 28, 391-396.

Li, J., Wang, G., Weng, Y., Ding, M., and Yu, W. (2020b). Netrin-1 contributes to peripheral nerve injury induced neuropathic pain via regulating phosphatidylinositol 4-kinase iia in the spinal cord dorsal horn in mice. *Neurosci Lett* 735, 135161.

Lim, T.K.Y., Shi, X.Q., Martin, H.C., Huang, H., Luheshi, G., Rivest, S., and Zhang, J. (2014). Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. *Pain* 155, 954-967.

Liu, C., Ke, X., Wang, Y., Feng, X., Li, Q., Zhang, Y., Zhu, J., and Li, Q. (2016). The level of netrin-1 is decreased in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Endocr Disord* 16, 33.

Liu, Y., Liang, Y., Gao, M., Li, Y., Zhao, T., and Zhao, Y. (2021). Animal models of complex regional pain syndrome type i. *J Pain Res* 14, 3711-3721.

Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Breant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.L., *et al.* (2004). The netrin receptor unc5b mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432, 179-186.

Ly, N.P., Komatsuzaki, K., Fraser, I.P., Tseng, A.A., Prodhan, P., Moore, K.J., and Kinane, T.B. (2005). Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14729-14734.

Maihöfner, C., and Bircklein, F. (2007). [complex regional pain syndromes: New aspects on pathophysiology and therapy]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 75, 331-342.

Maihöfner, C., Handwerker, H.O., Neundörfer, B., and Bircklein, F. (2003). Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology* 61, 1707-1715.

Maihöfner, C., Handwerker, H.O., Neundörfer, B., and Bircklein, F. (2004). Cortical reorganization during recovery from complex regional pain syndrome. *Neurology* 63, 693-701.

Maihöfner, C., Handwerker, H.O., Neundörfer, B., and Birklein, F. (2005). Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: A role for tnf-alpha? *Neurology* *65*, 311-313.

Malong, L., Napoli, I., White, I.J., Stierli, S., Bossio, A., and Lloyd, A.C. (2019). Macrophages enforce the blood nerve barrier. *bioRxiv* 10.1101/493494 %J *bioRxiv*, 493494.

Mehlen, P., and Guenebeaud, C. (2010). Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* *22*, 46-54.

Miloudi, K., Binet, F., Wilson, A., Cerani, A., Oubaha, M., Menard, C., Henriques, S., Mawambo, G., Dejda, A., Nguyen, P.T., *et al.* (2016). Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J Clin Invest* *126*, 3006-3022.

Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., *et al.* (2005). Tight junctions in schwann cells of peripheral myelinated axons: A lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* *169*, 527-538.

Moreau, N., Mauborgne, A., Bourgoin, S., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B.B., Villanueva, L., Pohl, M., and Boucher, Y. (2016). Early alterations of hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development. *Pain* *157*, 827-839.

Mulero, P., Cordova, C., Hernandez, M., Martin, R., Gutierrez, B., Munoz, J.C., Redondo, N., Gallardo, I., Tellez, N., and Nieto, M.L. (2017). Netrin-1 and multiple sclerosis: A new biomarker for neuroinflammation? *Eur J Neurol* *24*, 1108-1115.

Munoz, J.C., Martin, R., Alonso, C., Gutierrez, B., and Nieto, M.L. (2017). Relation between serum levels of chemotaxis-related factors and the presence of coronary artery calcification as expression of subclinical atherosclerosis. *Clin Biochem* *50*, 1048-1055.

Mutz, C., Mirakaj, V., Vagts, D.A., Westermann, P., Waibler, K., König, K., Iber, T., Noldge-Schomburg, G., and Rosenberger, P. (2010). The neuronal guidance protein netrin-1 reduces alveolar inflammation in a porcine model of acute lung injury. *Crit Care* *14*, R189.

Naleschinski, D., and Baron, R. (2010). Complex regional pain syndrome type i: Neuropathic or not? *Curr Pain Headache Rep* *14*, 196-202.

ncRNAPain (2022). <http://www.Ncrna-pain.Eu/>, P.M. Kress, ed. (The ncRNAPain Consortium).

- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* *161*, 653-660.
- O'Leary, C.J., Nourse, C.C., Lee, N.K., White, A., Langford, M., Sempert, K., Cole, S.J., and Cooper, H.M. (2017). Neogenin recruitment of the wave regulatory complex to ependymal and radial progenitor adherens junctions prevents hydrocephalus. *Cell Rep* *20*, 370-383.
- Ohta, M., Okajima, S., Hirakawa, H., Tokunaga, D., Fujiwara, H., Oda, R., Kobashi, H., Hirata, M., and Kubo, T. (2005). Expression of tight and gap junctional proteins in the perineurial window model of the rat sciatic nerve. *Int J Neurosci* *115*, 1469-1481.
- Park, K.W., Crouse, D., Lee, M., Karnik, S.K., Sorensen, L.K., Murphy, K.J., Kuo, C.J., and Li, D.Y. (2004). The axonal attractant netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16210-16215.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., *et al.* (2020). The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol* *177*, 3617-3624.
- Plain, A., Pan, W., O'Neill, D., Ure, M., Beggs, M.R., Farhan, M., Dimke, H., Cordat, E., and Alexander, R.T. (2020). Claudin-12 knockout mice demonstrate reduced proximal tubule calcium permeability. *Int J Mol Sci* *21*.
- Podjaski, C., Alvarez, J.I., Bourbonniere, L., Larouche, S., Terouz, S., Bin, J.M., Lecuyer, M.A., Saint-Laurent, O., Larochelle, C., Darlington, P.J., *et al.* (2015). Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation. *Brain* *138*, 1598-1612.
- Quintá, H.R. (2021). Intraspinial administration of netrin-1 promotes locomotor recovery after complete spinal cord transection. *J Neurotrauma* *38*, 2084-2102.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., *et al.* (2020). The revised international association for the study of pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *161*, 1976-1982.
- Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). The netrin protein family. *Genome Biol* *10*, 239.
- Ramesh, G., Berg, A., and Jayakumar, C. (2011). Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers. *Biomarkers* *16*, 172-180.
- Ramkhalawon, B., Hennessy, E.J., Menager, M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., *et al.* (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* *20*, 377-384.

Reinhold, A.K., and Rittner, H.L. (2017). Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Pflugers Arch* 469, 123-134.

Reinhold, A.K., and Rittner, H.L. (2020). Characteristics of the nerve barrier and the blood dorsal root ganglion barrier in health and disease. *Exp Neurol* 327, 113244.

Reinhold, A.K., Salvador, E., Förster, C.Y., Birklein, F., and Rittner, H.L. (2021). Microvascular barrier protection by microrna-183 via foxo1 repression: A pathway disturbed in neuropathy and complex regional pain syndrome. *J Pain* 10.1016/j.jpain.2021.12.007.

Reinhold, A.K., Schwabe, J., Lux, T.J., Salvador, E., and Rittner, H.L. (2018). Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy. *Front Neurosci* 12, 936.

Richner, M., Ferreira, N., Dudele, A., Jensen, T.S., Vaegter, C.B., and Gonçalves, N.P. (2018). Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy. *Front Neurosci* 12, 1038.

Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., and Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med* 72, 32-42.

Sandroni, P., Benrud-Larson, L.M., and McClelland, R.L. (2003). Complex regional pain syndrome type i: Incidence and prevalence in olmsted county, a population-based study. *Pain* 103, 199-207.

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

Scholz, J., Finnerup, N.B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K.D., *et al.* (2019). The iasp classification of chronic pain for icd-11: Chronic neuropathic pain. *Pain* 160, 53-59.

Schubert, A.L., Held, M., Sommer, C., and Uceyler, N. (2019). Reduced gene expression of netrin family members in skin and sural nerve specimens of patients with painful peripheral neuropathies. *J Neurol* 10.1007/s00415-019-09496-6.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342.

Siegel, S.M., Lee, J.W., and Oaklander, A.L. (2007). Needlestick distal nerve injury in rats models symptoms of complex regional pain syndrome. *Anesth Analg* 105, 1820-1829, table of contents.

Stanton, T.R., Wand, B.M., Carr, D.B., Birklein, F., Wasner, G.L., and O'Connell, N.E. (2013). Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD004598.pub3, Cd004598.

Uçeyler, N., Eberle, T., Rolke, R., Birklein, F., and Sommer, C. (2007). Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain* 132, 195-205.

Voortman, M.M., Pekar, T., Bachmayer, D., Archelos, J.J., Stojakovic, T., Scharnagl, H., Ropele, S., Pichler, A., Enzinger, C., Fuchs, S., *et al.* (2017). Serum netrin-1 in relation to gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in early multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 3, 2055217317727294.

Wagner, R., Janjigian, M., and Myers, R.R. (1998). Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in cci neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial tnf-alpha expression. *Pain* 74, 35-42.

Wesseldijk, F., Huygen, F.J., Heijmans-Antonissen, C., Niehof, S.P., and Zijlstra, F.J. (2008). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 are not correlated with the characteristics of complex regional pain syndrome type 1 in 66 patients. *Eur J Pain* 12, 716-721.

Yao, L.L., Hu, J.X., Li, Q., Lee, D., Ren, X., Zhang, J.S., Sun, D., Zhang, H.S., Wang, Y.G., Mei, L., *et al.* (2020). Astrocytic neogenin/netrin-1 pathway promotes blood vessel homeostasis and function in mouse cortex. *J Clin Invest* 130, 6490-6509.

Yildirim, M.E., Kefeli, U., Aydin, D., Sener, N., and Gumus, M. (2016). The value of plasma netrin-1 in non-small cell lung cancer patients as diagnostic and prognostic biomarker. *Tumour Biol* 37, 11903-11907.

Yu, J., Li, C., Ding, Q., Que, J., Liu, K., Wang, H., and Liao, S. (2017). Netrin-1 ameliorates blood-brain barrier impairment secondary to ischemic stroke via the activation of pi3k pathway. *Front Neurosci* 11, 700.

Zelová, H., and Hošek, J. (2013). Tnf- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research* 62, 641-651.

8.2 Materialien

Tabelle 14 Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Echtzeit-Thermozykler	Applied biosystems	Step one plus real-time PCR system 27200 7446
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE	BZ-9000
Kryostat	Leica biosystems	CM3050 S
Mikro-Photometer	fisher scientific	Nanodrop-2000
Mikroplate Reader	Tecan	Sunrise™
Thermomixer comfort	Eppendorf	5382000015
Thermozykler	Applied biosystems	2720 thermal cycler
Tisch-Kühlzentrifuge	Eppendorf	5418R
Tissue-Lyser	Qiagen Retsch	85300

Tabelle 15 Chemikalien

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma Aldrich	226947-1G
Aceton	Sigma Aldrich	W332615
Acrylamid/Bis 30 %	Roth	A3574
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth	9592.3
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B0126
Chaps hydrate	Sigma Aldrich	C3023-1G
Ethanol	Th.Geyer	32205
Glycerol	invitrogen	15514011
Glycine	AppliChem	A1067,1000
GlycoBlue™ Coprecipitant	Invitrogen	AM9515
Guanidine Hydrochloride	Sigma Aldrich	G3272-25G
HEPES	AppliChem	A3724,1000
Isopropanol	Sigma Aldrich	I9516

Anhang

Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting substrate	Roche Diagnostics	12015196001
Luminol 97%	Sigma Aldrich	123072
Milchpulver	AppliChem	A0830,1000
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma	T9281
Paraformaldehyd PFA	Sigma Aldrich	158127
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich	D8537-1L
Pierce TM 660nm Protein Assay Reagent	Thermos Fischer	22660
Proteaseinhibitor	ROCHE	05892970001
Proteinleiter "PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder", 10-250 kDa	Thermo scientific	26619
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen	1023537
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	A2153
RNase away	Sigma Aldrich	83931
RNase-freies Wasser	invitrogen	AM9937
RNase-Inhibitor	Applied biosystems	N8080119
Salzsäure, 1 mol/L	Roth	K025.1
SDS, ultrapur	AppliChem	A1112,1000
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura	4583
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth	AE15
Triton X-100	Sigma Aldrich	X100
TRIzol	Invitrogen	15596026
Tween-20	Sigma Aldrich	P1379
Vectashield hard Mounting Medium	Vector Labs	H-1400

Anhang

Wasser, destilliert	Braun	0082479E
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250

Tabelle 16 KITs

KIT	Hersteller	Katalognummer
Ambion DNA-free™ Kit	ThermoFischer scientific	AM1906
BCA Protein Assay Kit	ThermoFischer scientific	23225
Human Netrin-1 (Ntn1) ELISA Kit	Cusabio	CSB-E11899h
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFischer scientific	4368814
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Applied biosystems	4444557
Power Up SYBR Green Master Mix	Applied biosystems	A25778
miRNeasy micro KIT	Qiagen	217084

Anhang

Tabelle 17 Primersequenzen

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Claudin-1	5'- GGGACAACATCGTGACTGCT -3'	5'- CCACTAATGTCGCCAGACCTG-3'
Claudin-5	5'-AAATTCTGGGTCTGGTGCTG-3'	5'-GCCGGTCAAGGTAACAAAGA-3'
Claudin-12	5'- AACTGGCCAAGTGTCTGGTC-3'	5'- AGACCCCTGAGCTAGCAAT-3'
Claudin-19	5'- TGCTGAAGGACCCATCTG -3'	5'- TGTGCTTGCTGTGAGAACTG -3'
GAPDH	5'- AGTCTACTGGCGTCTTCAC -3'	5'- TCATATTTCTCGTGGTTCAC -3'
Netrin-1	5'- CAGGAAGGACTATGCTGTCCA - 3'	5'- TACGACTTGTGCCCTGCTTG -3'
Neogenin-1	5'- TGTGATGGTGACCAAAGGCA - 3'	5'- GGAGGCTGCCAGTTCACTATT - 3'
UNC5B	5'- CGACCCTAAAAGCCGCCCC -3'	5'- GGGATCTTGTCGGCAGAGTCC - 3'
TNF α	5'- ACCACGCTCTTCTGTCTACTG- 3'	5'- CTTGGTGGTTTGCTACGAC -3'
PMP22	5'- GGGATCCTGTTCCCTGCACAT -3'	5'- TGCCAGAGATCAGTCGTGTGT - 3'

Tabelle 18 Primer Maus Experiment

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
m-UNC5B	5'- TGGATCTTTCAGCTCAAGACCCAG -3'	5'- AAGATGGCCAGCTGGAGCCG - 3'
m-DCC	5'- CTCTTCACAGGATTGGAGAAAGGC -3'	5'- GAGGAGGTGTCCAACATCATGATG - 3'

Anhang

m-Neogenin-1	5'- CCCTGGTCTCTACTCGCTTC -3'	5'- CCTGGCTGGCTGGTATTCTC-3'
--------------	------------------------------	-----------------------------

Tabelle 19 TaqMan Sonden

Sonde	Hersteller	Katalognummer	Assay-Kennung
GAPDH	ThermoFisher scientific	4331182	Hs02786624_g1
Netrin-1	ThermoFisher scientific	4331182	Hs00180355_m1
UNC5B	ThermoFisher scientific	4331182	Hs00900710_m1
Cldn5	ThermoFisher scientific	4331182	Hs01561351_m1
Cldn1	ThermoFisher scientific	4331182	Hs00221623_m1
MMP9	ThermoFisher scientific	4331182	Hs00957562_m1

Tabelle 20 Sekundäre Antikörper

Sek Western Blot	AK	Konjugat	Hersteller	Katalognummer	Host	Verdünnung
Anti IgG	rabbit	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Cell Signaling technology	7074	Goat	1:3000
Anti (H+L) IgG	rat	HRP	invitrogen	61-9520	Rabbit	1:2000
Anti IgG	goat	HRP	Sigma	A4187	Rabbit	1:3000
Anti Rabbit		Alexa fluor 555	invitrogen	A-31572	Donkey	1:1000
Anti Rat		Alexa fluor 488	invitrogen	A-21208	Donkey	1:1000

Anhang

Tabelle 21 Antikörper

Antikörper	Gewicht des Antigens	Hersteller		
Rat anti mouse Netrin-1, Val22-Ala603	70kDa; 55kDa	R&D	MAB1109	full length and fragment

Tabelle 22 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
ECL-Lösung I	250 mM Luminol in DMSO 90 mM p-Cumarsäure in DMSO 10 % Tris	1. Lösung erstellen 2. pH-Wert unter Zugabe von HCl und NaOH auf 8,8 einstellen
ECL-Lösung II	10 % Tris 6,4 ‰ Wasserstoffperoxid	1. Lösung erstellen 2. pH-Wert unter Zugabe von HCl und NaOH auf 8,8 einstellen
Stripping Buffer	0,18% Glycine 1% SDS H ₂ O	1. Lösung erstellen 2. pH-Wert unter Zugabe von HCl und NaOH auf 2 einstellen

Anhang

Tabelle 23 Injektion Tierversuch

Präparat	Hersteller	Katalognummer	
Rat UNC5b AK	R&D	AF1006	
Neogenin si RNA	ambion	4390815 s135621	
Recombinant Human Netrin-1	R&D	6419-N1/CF	

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 24 Verwendete Abkürzungen

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bzw.	Beziehungsweise
BNS	Blut-Nerven-Schranke
BSA	Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
CCI	Chronic Constriction Injury
CL	Kontralateral
Cldn	Claudin
CRPS	Chronic Regional Pain Syndrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich-peroxidase)
IASP	International Association for the Study of Pain
IDV	Integrated density value

Anhang

KO	Knock out
min	Minuten
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PNS	Peripheres Nervensystem
PSL	Partial sciatic nerve ligation
SDS- PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TJ	Tight junction
TJP	Tight Junction Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	Zum Beispiel

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Chronic Constriction Injury.....	6
Abbildung 2 Blut-Nerven-Schranke.....	8
Abbildung 3 Verschiedene Netrin-1 Rezeptoren.....	10
Abbildung 4 Funktion Netrin-1	11
Abbildung 5 Verhalten von Ratten nach CCI und Netrin-1-Injektion bzw. Rezeptorblockierung.....	13
Abbildung 6 Hypothese	15
Abbildung 7 Hypothese	15
Abbildung 8 Versuchsaufbau Tiermodell.....	17
Abbildung 9 Prinzip TaqMan Assay	23
Abbildung 11 Antikörperbindungsstelle	28
Abbildung 13 Verdünnungsreihe.....	30
Abbildung 14 Erhöhte <i>Unc5b</i> oder Netrin-1 abhängige <i>Ntn1</i> Expression im Ischiasnerv der Ratte nach CCI.	32
Abbildung 15 Erniedrigte Netrin-1 Proteinlevel nach CCI im Rattenschiasnerv, Erhöhung des Proteinlevels durch Netrin-1 Injektion.	33
Abbildung 16 Unveränderte Netrin-1 Konzentration im Rattenserum 1, 3 und 6 Wochen nach CCI.....	34
Abbildung 17 Verstärkte Expression des <i>Unc5b</i> , verminderte des <i>Neol</i> nach CCI und Verhinderung des Effekts durch Netrin-1 Injektion.....	35
Abbildung 18 Durch Ausschalten des <i>Unc5b</i> Rezeptors mithilfe eines Antikörpers wirkt Netrin-1 über seinen komplementären Neogenin-1 Rezeptor und damit stabilisierend auf die Blut-Nerven-Schranke	36
Abbildung 19 Gesteigerte Expression von <i>Cldn12</i> und <i>Cldn 19</i> unter Rezeptorblock gegenüber CCI.....	37
Abbildung 20 Durch Ausschalten des Neogenin-1 Rezeptors durch Injektion von <i>Neol</i> siRNA, die die Expression des Rezeptors verhindert, wirkt Netrin-1 über den <i>Unc5b</i> Rezeptor und öffnet die Blut-Nerven-Schranke	38
Abbildung 21 Keine signifikante Veränderung der <i>Cldn</i> Expression durch Blockierung des Neogenin-1 Rezeptors, verstärkte Expression durch Netrin-1 Injektion.	39

Abbildung 22 Gesteigerte <i>Tnfa</i> Expression nach CCI, keine Veränderung durch Netrin-1.....	40
Abbildung 23 Geringere Proteinkonzentration von Netrin-1 in Patientenplasma im Vergleich zu Kontrollplasma.....	42
Abbildung 24 Pilotexperimente: Erniedrigte Expression von NTN1, UNC5b und der Tight Junction Proteine <i>CLDN1</i> und <i>CLDN5</i> in CRPS Patientenhautbiopsien.....	44

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verschiedene Modelle für CRPS Tabelle modifiziert nach Liu et al. 2021 Lizenz CC-BY NC 3.0.....	5
Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der CRPS Patientinnen und Patienten.....	17
Tabelle 3 Temperaturverlauf Transkription	21
Tabelle 4 Temperaturverlauf Genamplifikation	22
Tabelle 5 Temperaturverlauf Genamplifikation	22
Tabelle 6 Gelherstellung.....	25
Tabelle 7 Vorbereitung der Proteinproben	26
Tabelle 8 Zusammensetzung der Puffer	26
Tabelle 9 Transfer Puffer.....	27
Tabelle 10 Konzentrationen.....	30
Tabelle 11 Beschreibung der CRPS Patientinnen und Patienten und Kontrollen	41
Tabelle 12 Beschreibung der CRPS Patienten und Kontrollen Mittelwert und Standardabweichung.....	43
Tabelle 13 Bestimmung des Netrin-1 Spiegels bei verschiedenen Erkrankungen.....	47
Tabelle 14 Geräte.....	71
Tabelle 15 Chemikalien.....	71
Tabelle 16 KITS	73
Tabelle 17 Primersequenzen.....	74
Tabelle 18 Primer Maus Experiment.....	74
Tabelle 19 TaqMan Sonden.....	75
Tabelle 20 Sekundäre Antikörper.....	75
Tabelle 21 Antikörper.....	76
Tabelle 22 Lösungen	76

Tabelle 23 Injektion Tierversuch.....	77
Tabelle 24 Verwendete Abkürzungen.....	77

8.6 CRPS Kriterien nach IASP

CRPS I

1. Anwesenheit einer auslösenden Noxe oder Grund der Ruhigstellung (nicht obligatorisch)
2. Bleibende Schmerzen, Allodynie oder Hyperalgesie inadäquat zum auslösenden Ereignis
3. Nachweis eines Ödems, Hautveränderungen, Veränderungen der Durchblutung oder abnormale Sudomotorik in der Schmerzregion zu irgendeinem Zeitpunkt
4. Ausschluss anderer Ursachen für Schmerz und Dysfunktion

CRPS II

1. Anwesenheit bleibender Schmerzen, Allodynie oder Hyperalgesie nach Nervenläsion, nicht unbedingt limitiert auf das Nervenversorgungsgebiet
2. Nachweis eines Ödems, Hautveränderungen, Veränderungen der Durchblutung oder abnormale Sudomotorik in der Schmerzregion zu irgendeinem Zeitpunkt
3. Ausschluss anderer Ursachen für Schmerz und Dysfunktion

Danksagung

9 Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die tatkräftige Unterstützung von vielen Seiten.

Frau Professor Dr. Rittner möchte ich für ihre stete Unterstützung, ihre Zeit und ihr offenes Ohr bei allen Problemen danken. Durch ihre geduldigen Erklärungen und hilfreichen Fragen brachte sie mir wissenschaftliches Arbeiten nahe.

Dr. rer. nat. Jeremy Chen möchte ich für seine engagierte Betreuung danken. Bei keiner Frage wurde ich alleine gelassen und konnte immer auf seine Ratschläge zählen.

Den weiteren Mitgliedern meines Promotionskomitees, Frau Professor Dr. Claudia Sommer und Herrn Professor Dr. Philip Tovote, danke ich für konstruktives Nachfragen und vor allem für die Zeit, die sie diesem Projekt entgegengebracht haben.

Auch allen Mitarbeitern des Labors, welche mir bei technischen Problemen stets zur Seite standen möchte ich danken. Vielen Dank weiterhin an Carla Norwig und Thomas Lux und alle anderen Studenten der Arbeitsgruppe, mit euch hat die Laborarbeit stets Freude bereitet.

Besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben und stets ein aufmunterndes Wort für mich hatten.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Netrin-1 und seine Rezeptoren beeinflussen die Tight Junction Expression bei neuropathischen Schmerzen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort	Datum
Unterschrift	

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Netrin-1 and its receptors regulate tight junction protein expression in peripheral neuropathy” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place	Date
Signature	