

Aus dem CharitéCentrum 7 für Anästhesiologie, OP-Management
und Intensivmedizin - Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt
operative Intensivmedizin - Campus Benjamin Franklin der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Tight Junction-Proteine als Regulatoren der Permeabilität
des Perineuriums

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Esther Johanna Wrede

aus Herdecke

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. H. L. Rittner
2. Priv.-Doz. Dr. I. E. Blasig
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. Günzel

Datum der Promotion: 05. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis**INHALTSVERZEICHNIS** **3****ABKÜRZUNGEN** **6****1 EINLEITUNG** **8****1.1 PERIPHERE OPIOID-WIRKUNG** **8****1.2 DAS PERINEURIUM ALS VERMITTLER EINER DIFFUSIONSBARRIERE** **10****1.3 REGULATION DER PERINEURALEN PERMEABILITÄT ÜBER TJ-PROTEINE** **13****1.4 WIRKUNG VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN AUF TJ-PROTEINE** **14****1.5 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT** **15****2 METHODEN** **16****2.1 TIERE** **16****2.2 MATERIAL UND GERÄTE** **16**2.2.1 GERÄTE **16**2.2.2 CHEMIKALIEN UND KITS **17**2.2.3 ANTIKÖRPER, ENZYME, INHIBITOREN UND PHARMAKA **19**2.2.4 PRIMER **20****2.3 METHODEN** **21**2.3.1 TIEREXPERIMENTE **21**2.3.2 RNA-ISOLATION UND CDNA- SYNTHESE **23**2.3.3 PRIMER DESIGN **24**2.3.4 PRINZIP DER POLYMERASEKETTENREAKTION **24**2.3.5 PRINZIP DER AGAROSEGELELEKTROPHORESE **25**2.3.6 HERSTELLUNG EINES STANDARDS **26**2.3.7 PRINZIP DER QUANTITATIVEN ECHTZEIT-PCR **27**2.3.8 QRT-PCR-LAUF UND AUSWERTUNG **29**2.3.9 PRINZIP DER SDS-PAGE UND DES WESTERN BLOT **31**2.3.10 MEMBRAN-PROTEIN-EXTRAKTION **32**2.3.11 PROTEINQUANTIFIZIERUNG **32**

Inhaltsverzeichnis	4
2.3.12 SDS-PAGE	33
2.3.13 WESTERN BLOT UND BANDENDETEKTION	34
2.3.14 MESSUNG DER PFOTENDRUCKSCHWELLE (PAW PRESSURE TEST)	35
2.4 PROGRAMME UND STATISTIK	36
<u>3 ERGEBNISSE</u>	<u>37</u>
3.1 DIE PERINEURALE INJEKTION VON HYPERTONER NaCl-LÖSUNG ERMÖGLICHT EINE ERHÖHUNG DER MECHANISCHEN NOZIZEPTIVEN SCHWELLE UND DER mRNA-EXPRESSION VON CLN-1	37
3.1.1 ERHÖHUNG DER MECHANISCHEN NOZIZEPTIVEN SCHWELLE NACH PERINEURALER INJEKTION VON HYPERTONER NaCl-LÖSUNG	37
3.1.2 HOCHREGULATION DER mRNA-EXPRESSION VON CLN-1, NICHT ABER OCCLUDIN UND CLN-5 NACH PERINEURALER INJEKTION VON HYPERTONER NaCl-LÖSUNG	39
3.2 DER MMP-INHIBITOR GM6001 UNTERBINDET DIE EFFEKTE HYPERTONER LÖSUNG	42
3.2.1 INHIBITION DER WIRKUNG VON HYPERTONER NaCl LÖSUNG AUF DIE MECHANISCHE NOZIZEPTIVE SCHWELLE DURCH DEN MMP-INHIBITOR GM6001	42
3.2.2 UNVERÄNDERTE mRNA-EXPRESSION VON CLN-1, OCCLUDIN UND CLN-5 NACH INJEKTION VON GM6001 UND 10 % NaCl	43
3.2.3 VERÄNDERUNGEN DER CLN-1 PROTEIN-EXPRESSION	44
3.3 MMP-9 WIRKT WIE HYPERTONE NaCl-LÖSUNG AUF DIE MECHANISCHE NOZIZEPTIVE SCHWELLE UND ERHÖHT DIE mRNA-EXPRESSION DER PERINEURALEN TJ-PROTEINE	45
3.3.1 ERHÖHUNG DER MECHANISCHEN NOZIZEPTIVEN SCHWELLE NACH PERINEURALER INJEKTION VON MMP-9 UND DAMGO	45
3.3.2 ERHÖHTE mRNA-EXPRESSION VON CLN-1, OCCLUDIN UND CLN-5 NACH INJEKTION VON MMP-9	46
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>48</u>
4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	48
4.2 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	48

	5
4.2.1 PERIPHERE NERVENSTIMULATION	48
4.2.2 MESSUNG DER PFOTENDRUCKSCHWELLE	49
4.2.3 MRNA-QUANTIFIZIERUNG	49
4.2.4 PROTEINUNTERSUCHUNG	50
4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	50
4.3.1 WIRKUNG VON HYPERTONER LÖSUNG NACH PERINEURALER INJEKTION	50
4.3.2 INHIBIERUNG DER TJ-REGULATION DURCH GM6001	54
4.3.3 EFFEKTE VON MMP-9 AUF PERINEURALE TJ	55
4.4 AUSBLICK	59
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>60</u>
<u>6 LITERATUR</u>	<u>63</u>
<u>ANHANG</u>	<u>75</u>
ABBILDUNGEN UND TABELLEN	75
HERSTELLER UND ANBIETER	76
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>78</u>
<u>LEBENS LAUF</u>	<u>79</u>
<u>ERKLÄRUNG</u>	<u>80</u>

Abkürzungen

AFD	Alexa-Fluor-Dextran
Ak	Antikörper
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transkriptase
ARS	Aktivierendes retikuläres System
as	Antisense
BBB	Blut-Hirn-Barriere (blood brain barrier)
BK	Bradykinin
BNB	Blut-Nerven-Barriere (blood nerve barrier)
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Cln-1	Claudin-1
Cln-5	Claudin-5
CP	crossing point
DAMGO	D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly ⁵ -ol-enkephalin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang- Desoxyribonukleinsäure
EBA	Evans Blau Albumin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LC	LightCycler
LED	Leuchtdiode (light emitting diode)
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NC	Nitrocellulose

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institutes of Health
oligo dT	Oligodesoxyribonukleosidtriphosphate
OR	Opioidrezeptor
PAR-2	Protease aktivierter Rezeptor 2
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PPT	Pfetendruckschwelle (paw pressure threshold)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleinacid)
RPL-19	Ribosomales Protein L-19
RT	Reverse Transkriptase
se	sense
Taq	Thermus aquaticus
TIMP	Gewebeinhibitor der Matrixmetalloproteinasen (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TJ	tight junction
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens-Protein

1 Einleitung

1.1 Periphere Opioid-Wirkung

Opioide nehmen eine zentrale Rolle mit weit zurückreichender Tradition in der Behandlung von Schmerzen ein. Handschriftliche Quellen der Sumerer im Gebiet des heutigen Irak beschreiben bereits in der Zeit um 2400 vor Christus eine Kultivierung des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) und die Isolierung des Opiums. Hier wird mit der Bezeichnung des Schlafmohns als „Pflanze der Freude“ bereits Bezug auf eine der zentralen Nebenwirkungen von Opioiden verwiesen – den Rausch (Brownstein 1993). Interessanterweise nehmen die Hinweise auf die Risiken des Opiumgebrauchs beispielsweise durch Erasistratus von Alexandrien aus dem fünften Jahrhundert vor Christus ebenso eine lange Tradition ein (Katz 2007).

Neben den exogenen Opioiden wurden 1975 endogene Opioide zunächst in Form des Enkephalins durch Hans Walter Kosterlitz und John Hughes entdeckt (Hughes et al. 1975), in den Folgejahren zusätzlich Endorphin und Dynorphin. Eine bedeutende Quelle endogener Opioide stellen neben dem zentralen Nervensystem (ZNS) die Immunzellen dar. Sowohl Endorphin als auch Enkephalin und Dynorphin werden von Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten synthetisiert und freigesetzt und können eine Nozizeption beeinflussen (Rittner et al. 2001; Rittner et al. 2007; Zollner et al. 2008; Cabot et al. 1997; Mousa et al. 2001; Labuz et al. 2006).

Exogene und endogene Opioide wirken über drei bisher bekannte (MOR, DOR, KOR) Opioidrezeptoren (OR) (Wang et al. 1993; Meng et al. 1993; Kieffer et al. 1992). Hierbei handelt es sich um sieben transmembrane G_i -Protein gekoppelte Rezeptoren, die nach Bindung eines Liganden über eine Konformitätsänderung und dem Austausch von GDP zu GTP eine Dissoziation der α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten bewirken und somit zum Absinken des cAMP-Gehaltes der Zelle und zur Inhibition von Ca- und/oder weiterer Ionenkanäle (z.B. K) führen. Dies verhindert eine Erregungsbildung bzw. –ausbreitung und eine Neurotransmitterfreisetzung (Stein and Zollner 2009; Hua and Cabot 2010). Bis in die 1980er Jahre hinein war man der Auffassung, dass die analgetische Wirkung von Opi-

oiden über zentrale – in Gehirn und Rückenmark lokalisierte – OR erzielt würde. Seitdem konnten OR aber auch auf peripheren Nervenendigungen lokalisiert und in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass hierdurch analgetische Effekte vermittelt werden können (Bartho et al. 1990; Stein 1993; Stein et al. 1995; Stein et al. 1990; Fields et al. 1980; Mousa et al. 2001; Truong et al. 2003). Periphere OR werden hauptsächlich auf unmyelinisierten C- aber auch auf A δ -Fasern exprimiert (Stein and Zollner 2009; Mousa et al. 2007), nachdem sie von den sensorischen Neuronen in den Hinterwurzelganglien synthetisiert und intraaxonal in die Nervenfortsätze transportiert wurden (Buzas et al. 1997; Young et al. 1980; Mansour et al. 1994; Chen et al. 1997; Wang and Wessendorf 2001).

Systemisch applizierte Opioide wirken als potente Analgetika über eine Aktivierung der OR des ZNS (Freye 2010). Hierbei werden allerdings auch die zentralen Nebenwirkungen der Opioide hervorgerufen; beispielsweise Atemdepression durch Hemmung des Atemzentrums in Pons und Medulla oblongata, Sedierung durch Hemmung des aktivierenden retikulären Systems (ARS) der *Formatio reticularis* (Freye 2010), Übelkeit und Erbrechen über Stimulation des Brechzentrums der Medulla oblongata und des Vestibularapparates (Porreca and Ossipov 2009). Diese Nebenwirkungen sind nicht nur von potentiell lebensbedrohlicher Qualität (beispielsweise Atemlähmung) sondern schränken auch die Anwendung in erheblichem Maße bis zu einer schmerztherapeutischen Mangelversorgung hin ein. Durch eine periphere Applikation von exogenen Opioiden oder eine lokal begrenzte Freisetzung endogener Opioide könnten möglicherweise die analgetischen Effekte der Opioide genutzt und die zentralen Nebenwirkungen umgangen werden. Zahlreiche Studien belegen unter Entzündungsbedingungen und/oder direkter Verletzung peripherer Nerven eine signifikante Schmerzreduktion sowohl durch endogen freigesetzte (Schafer et al. 1994; Machelska et al. 2003; Rittner et al. 2001; Rittner et al. 2006; Brack et al. 2004; Binder et al. 2004) als auch exogen applizierte (Machelska et al. 1999; Stein et al. 1989; Obara et al. 2007; Truong et al. 2003; Pertovaara and Wei 2001) peripher wirkende Opioide.

Exogene Opioide werden im Rahmen der klinischen Forschung zur lokalen peripheren Opioidanalgesie in der Behandlung von Patienten mit chronischen Arthritiden oder nach operativen oder arthroskopischen Eingriffen am Knie genutzt. Hier werden nach intraartikulärer Opioid-Injektion im Vergleich zum Placebo signifikant niedrigere Schmerzwahrnehmungen gemessen (Dalsgaard et al. 1994; Stein 1991; Kalso et al. 2002; Khoury et al. 1992; McSwiney et al. 1993; Joshi et al. 1992). Studien an Patienten mit chronisch inflammatorischer Arthritis belegen eine über mehrere Tage anhaltende analgetische Wirkung nach intraartikulärer Injektion schon bei geringen Dosen von 1-3 mg Morphin (Likar et al. 1997; Stein et al. 1999). Auch in entzündetem Gewebe von Patienten, die sich einer Zahnoperation unterziehen (Dionne et al. 2001; Likar et al. 2001; Likar et al. 1998), sowie nach Augenoperationen (Faktorovich and Basbaum 2010) kann ein antinozizeptiver Effekt durch lokale Applikation von Opioiden nachgewiesen werden

Opioide mit lokaler Wirkungsvermittlung als potenteste Analgetika würden auf Grund der Vermeidung zentraler Nebenwirkungen, hoher systemisch wirksamer Opioidkonzentrationen und potentieller Interaktion mit anderen Pharmaka eine wünschenswerte Behandlungsalternative zu systemisch applizierten Opioiden darstellen. Auch könnten diese im Rahmen einer Lokalanästhesie eingesetzt werden, ohne den Effekt neben den nozizeptiven Fasern auch andere – insbesondere motorische – Fasern zu blockieren. Allerdings führen Versuche hierzu zu keiner deutlichen Analgesie, solange das Gewebe nicht entzündlich verändert ist (Bullingham et al. 1983; Yuge et al. 1985; Schramm and Honda 2010). So lässt sich auch mittels regionaler Opioidapplikation am Nervus (N.) ischiadicus der Ratte kein analgetischer Effekt erzielen (Grant et al. 2001). Hierbei scheint das Perineurium in seiner Funktion der Barrierevermittlung in nicht pathologisch verändertem Gewebe eine zentrale Rolle einzunehmen (Olsson 1990; de la Motte et al. 1975).

1.2 Das Perineurium als Vermittler einer Diffusionsbarriere

Die periphere Nervenfasern – und ihre potentiell vorhandene Myelinschicht – wird vom Endoneurium (Bindegewebe) umgeben, in welches Kapillaren und vereinzelt Makrophagen eingebettet sind. Hierum liegt das Perineurium, wel-

ches einzelne Nervenfasern zu Faszikeln zusammenfasst. Eine äußere Schicht wird vom Epineurium (Bindegewebe) gebildet, in welches die Nervenfaszikel, Blutgefäße und Fettzellen eingebettet sind, wodurch der periphere Nerv dargestellt wird (Lüllmann-Rauch 2003; Rechthand and Rapoport 1987).

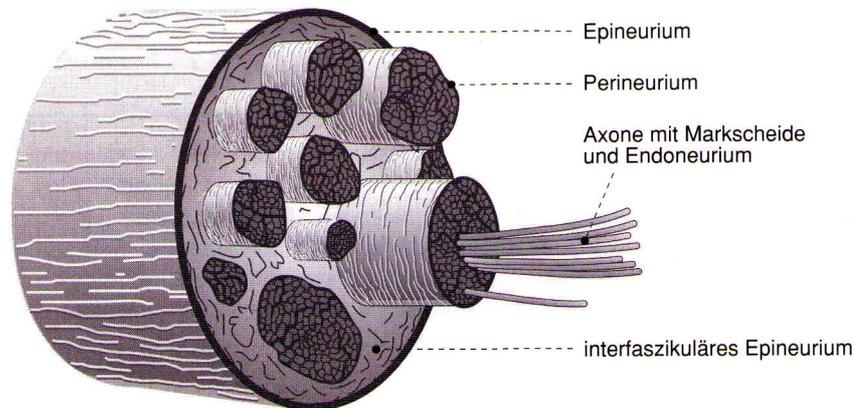


Abb 1: Querschnitt eines peripheren Nerven: Dargestellt wird der Aufbau eines peripheren Nerven aus Nervenfortsätzen und seinen Hüllen (Schirmer 2005).

Das Perineurium besteht aus mehreren Lamellen flacher Zellen nicht gänzlich geklärten Ursprungs (eventuell Fibroblasten oder Gliazellabkömmlinge), die konzentrisch um mehrere Nervenfasern herum liegen und jeweils zu jeder Seite durch Basallaminae bedeckt sind. Die einzelnen Perineuralzellen sind durch gürtelförmig um die Zelle angeordnete Tight Junction (TJ)-Komplexe verbunden, die hierdurch den Interzellularraum abdichten (Rechthand and Rapoport 1987; Reina et al. 2003). Die Funktion des Perineuriums besteht in der Modulation auf den Nerven einwirkender Zugkräfte, der Aufrechterhaltung eines konstanten intrafaszikulären Druckes und der Ausbildung einer Barriere. Das Perineurium regelt zudem die neuronale Homöostase über Transportsysteme (zum Beispiel Glucose-Transporter 1), Transzytose und Regulation der Durchlässigkeit der TJ-Barriere. Zusätzlich verhindert die TJ-Barriere die Exposition der Nervenfasern gegenüber Komponenten des Immunsystems und potentiellen Noxen (Pina-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008).

In den 1990er Jahren wurden als TJ bildende Transmembranproteine das Occludin und die Claudine (Cln) identifiziert (Furuse et al. 1998; Furuse et al. 1993), 2005 das Tricellulin (Ikenouchi et al. 2005). Des Weiteren sind seit den 1980er Jahren die intrazellulären Zonula occludens-Proteine (ZO) bekannt, die

eine Befestigung von Occludin und Cln an die intrazellulären Aktinfilamente vermitteln (Gonzalez-Mariscal et al. 2003; Lüllmann-Rauch 2003). Insgesamt sind heutzutage mehr als 40 Proteine bekannt, die an der Ausbildung von TJ beteiligt sind (Bazzoni and Dejana 2004). Da aber für die interzelluläre Barrierefunktion des Perineuriums insbesondere Vertreter der Cln-Familie und Occludin von Bedeutung zu sein scheinen (Gonzalez-Mariscal et al. 2003), soll in dieser Arbeit der Fokus hierauf gerichtet sein.

Sowohl Occludin (65 kDa) als auch Cln (20-27 kDa) bilden vier transmembranäre Regionen und zwei extrazelluläre Schleifen aus, wobei der genaue Mechanismus, der hier die Bindung benachbarter TJ vermittelt, nicht bekannt ist (Gonzalez-Mariscal et al. 2003). Sowohl die Carboxyl- als auch die Amino-terminale Domäne beider Proteine sind intrazellulär lokalisiert und vermitteln die Bindung intrazellulärer Proteine. Die Cln-Familie umfasst 24 bekannte Mitglieder und die Undurchlässigkeit der TJ-Barriere wird unter anderem wesentlich durch den im jeweiligen Gewebe vorherrschenden Cln-Typ beeinflusst (Gonzalez-Mariscal et al. 2003; Bazzoni and Dejana 2004).

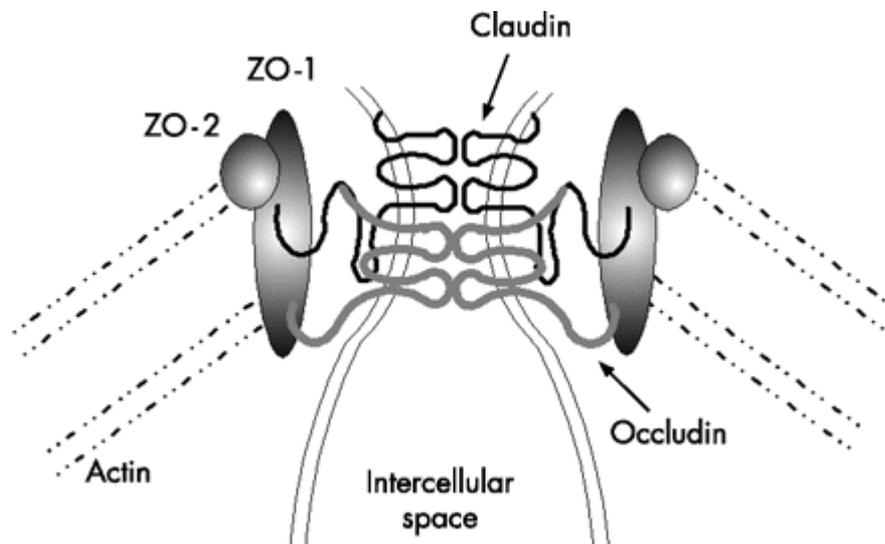


Abb 2: Struktur der TJ-Proteine Cln-1 und Occludin: Dargestellt sind die TJ-Proteine Cln-1 und Occludin unter Ausbildung ihrer je vier transmembranären Regionen und zwei extrazellulären Schleifen bei intrazellulärer Lokalisation ihrer Carboxyl- und Amino-terminalen Domäne mit Bindung an intrazelluläre Strukturen (Arrieta et al. 2006).

In perineuralen TJ sind Cln-1 und -3, ZO-1 und Occludin nachgewiesen worden, wohingegen in gefäßendothelialen TJ hauptsächlich Cln-5 und Occludin vorzufinden sind (Pummi et al. 2004; Ohtsuki et al. 2008). Da für die Schrankenfunktion des Perineuriums perineurale TJ verantwortlich sind, soll in dieser Arbeit der Focus auf Cln-1 und Occludin gelegt werden. Außerdem soll Cln-5 als Vertreter endothelialer TJ untersucht werden. Der Einfluss des intrazellulär lokalisierten ZO-1 oder möglicher Schwanzzell-TJ (Cln-1, -2, -3, -5, ZO-1 und Occludin) soll hier unberücksichtigt bleiben (Alanne et al. 2009).

1.3 Regulation der perineuralen Permeabilität über TJ-Proteine

Um eine periphere analgetische Wirkung von Opioiden in der nicht entzündeten Pfote zu erreichen, wurden hypertone Lösungen intraplantar in Rattenpfoten appliziert, wodurch sich die Permeabilität des Perineuriums zu erhöhen scheint (Rittner et al. 2009; Antonijevic et al. 1995). In vorliegender Arbeit soll gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auch im Rahmen der perineuralen Applikation von hypertoner NaCl-Lösung und hydrophilen Opioiden am N. ischiadicus möglich ist. Zwei Studien, die die Durchlässigkeit des Perineuriums des N. ischiadicus von Ratten bzw. Mäusen untersuchen, zeigen nach Druck-induzierter Läsion des Nerven eine Diffusion von Molekülen (Evans Blau Albumin (EBA) beziehungsweise Meerrettichperoxidase (HRP)) in das endoneurale Kompartiment (Hirakawa et al. 2003; Kristensson and Olsson 1976). Hirakawa et al. zeigen des Weiteren immunhistochemisch eine Expression der perineuralen TJ-Proteine Cln-1, -5 und Occludin in intaktem Gewebe des N. ischiadicus, die nach Nervenligatur temporär nicht nachweisbar sind und erst 1,5 (Cln-1) bzw. 2-3 (Occludin) Tage nach Ligatur wieder exprimiert werden. Es lässt sich also zweierlei vermuten; zum Einen, dass die periphere Opioidanalgesie über eine erhöhte Permeabilität des Perineuriums vermittelt wird und zum Anderen, dass diese Permeabilität über TJ-Proteine reguliert wird, wobei hier mehrere Mechanismen eine Rolle spielen könnten; Internalisierung, Abbau, verminderte Expression oder Veränderung der Struktur/Funktion der Proteine.

In dieser Arbeit soll die Regulation der TJ-Proteine Cln-1 und Occludin als Vermittler der perineuralen Barrierefunktion nach perineuraler Applikation von hypertoner NaCl-Lösung untersucht werden, um eine Einsicht in die Funktion und

eine mögliche temporäre Öffnung des Perineuriums zu erhalten. Zudem soll ein möglicher Einfluss auf das endothelial exprimierte Cln-5 untersucht werden. Diese Erkenntnisse wären nicht nur für die Erzielung einer peripheren Opioidanalgesie sondern auch für den Einsatz weiterer Pharmaka, die direkt am Nerven angreifen sollen, von Nutzen.

1.4 Wirkung von Matrixmetalloproteinasen auf TJ-Proteine

Die Expression bzw. Funktion von TJ-Proteinen kann durch Exposition gegenüber Matrixmetalloproteinasen (MMP) beeinflusst werden. Dies zeigen zahlreiche Studien an unterschiedlichen TJ-haltigen Geweben wie cerebrale und renale vaskuläre Endothelien, Respirations- und Corneaepithelien (Louboutin et al. 2010; Yang et al. 2007; Chen et al. 2009; Ichiyasu et al. 2004; Li et al. 2004; Pflugfelder et al. 2005; Vermeer et al. 2009; Caron et al. 2005; Behzadian et al. 2001).

Die Familie der MMP (M10, Subfamilie M10A) gehört nach der Nomenklatur der Peptidasen-Datenbank MEROPS zum Clan der Metallopeptidasen (MA) (Rawlings et al. 2006). Im Menschen sind seit ihrer Erstbeschreibung 1962 (Gross and Lapiere 1962) 23 verschiedene Zink abhängige MMP bekannt, die nach ihrer Struktur und Substratpräferenz in Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-typische MMP und Andere unterteilt werden können (Nagase et al. 2006). Durch ihre Funktion der Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine nehmen MMP eine wichtige Position in der Regulation von Gewebsarchitektur, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen, Migration von Zellen innerhalb des extrazellulären Gewebes und der Aktivierung und Deaktivierung von Signalmolekülen ein (Page-McCaw et al. 2007). Eine Regulation der Aktivität von MMP wird im Wesentlichen durch die endogenen Inhibitoren α_2 -Makroglobulin und die spezifischen Gewebeinhibitoren der MMP (Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinasen, TIMP) erzielt (Nagase et al. 2006).

In Studien zur Degradation von TJ-Proteinen und Erhöhung der parazellulären Permeabilität kann eine Beteiligung von MMP in verschiedenen Geweben beobachtet werden (Vermeer et al. 2009; Chen et al. 2009). Allerdings sind bislang keine Untersuchungen zu perineuralen TJ und deren Permeabilität nach MMP-Exposition durchgeführt worden. Es gibt jedoch einige Studien, die nach Druckläsion des N. ischiadicus von Ratten signifikant erhöhte MMP-9 Level und

als Quellen hierfür Schwann-Zellen, Makrophagen und vaskuläre Endothelzellen zeigen (Demestre et al. 2004; Chattopadhyay et al. 2007; Shubayev et al. 2006).

Bei einer Untersuchung von Corneaepithelzellen unter hypertonem Stress kann ein signifikanter Anstieg der Konzentration von MMP-1, -3, -9 und -13 in hypertoner NaCl-Lösung beobachtet werden (Li et al. 2004). Dementsprechend soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eventuelle Effekte der hypertonen Kochsalzlösung durch einen Breitspektrum-Inhibitor der MMP-1, -2, -3, -8 und -9 unterbunden werden können. In einer weiteren Versuchsreihe soll mittels perineuraler Applikation von MMP-9 zum Einen die Opioid-vermittelte Analgesie und zum Anderen die Regulation der TJ-Proteine Cln-1, Occludin und Cln-5 analysiert werden.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Da eine peripher-lokale analgetische Wirkung von Opioiden durch die Barrierefunktion des Perineuriums limitiert zu sein scheint, sollen in dieser Arbeit folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1) Die perineurale Injektion von hypertoner Lösung erhöht die Permeabilität des Perineuriums über die Regulation perineuraler TJ-Proteine.
- 2) Matrixmetalloproteinasen erhöhen die Permeabilität des Perineuriums über die Regulation perineuraler TJ-Proteine.

Hierzu sollen folgende Versuche am N. ischiadicus von Ratten durchgeführt werden:

- 1) Messung der Pfortendruckschwelle von Ratten nach perineuraler Applikation von hypertoner Lösung, MMP-Inhibitor oder MMP-9 und dem Opioidpeptid DAMGO.
- 2) Analyse des Expressionsmusters der mRNA der TJ-Proteine Cln-1, Occludin und Cln-5 nach perineuraler Applikation von hypertoner Lösung, MMP-Inhibitor oder MMP-9.
- 3) Untersuchung der Expression der TJ-Proteine nach perineuraler Applikation von hypertoner Lösung, deren mRNA hierunter Veränderungen unterliegen.

2 Methoden

2.1 Tiere

Die Versuche werden mit männlichen Wistar-Ratten eines Gewichts von 180-220 g durchgeführt. Die Tiere entstammen der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Kraemerstr. 6-10, 12207 Berlin. Sie werden bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 0,5$ °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-60 % in einem jeweils 12 h Tag-Nacht-Rhythmus (8/20 Uhr) gehalten und haben freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Trockenfutter. Die Ratten werden im Rahmen allgemeiner Kontrollen in regelmäßigen Abständen tierärztlich untersucht. Die Tierversuche sind genehmigt durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin (Aktenzeichen REG 0095/08, 09.06.2008). Die Versuchsprotokolle entsprechen den Leitlinien der International Association for the Study of Pain (Zimmermann 1983). Alle Eingriffe werden in Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether)-Kurznaarkose durchgeführt.

2.2 Material und Geräte

2.2.1 Geräte

Algesiometer	Ugo Basile
AquaDest Anlage	Millipore
Blot-Apparatur	Bio-Rad
Blotfilter	Whatman
Blotmembran (Nitrocellulose Protran BA83)	Whatman
Chemilumineszenz-Film	GE Healthcare
Dounce-Homogenisator	IKA
Elektrophorese-Apparaturen (Power Pac 300 & 1000)	Bio-Rad
Entwickler & Fixierer	Adeforoll
Gefrierschränke (-20 & -80 °C)	AEG
	GFL

Glasgefäße	Schott
Glaskapillaren	Roche
Heizblock	Grant Boekel
Kamera (Polaroid Gel Cam)	Sigma-Aldrich
Kanülen	Becton Dickinson
Magnetrührer	IKA
Narkosegerät (Tiberius)	Dräger
pH-Meter	Mettler Toledo
Nervenstimulator & Stimulationskanüle (Stimuplex)	Braun
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen (Biosphere Filter Tips)	Sarstedt
Präparierbesteck	Aesculap
Reaktionsgefäße (1,5 ml, RNase frei)	Biozym
Röhrchen (Falcon, 15 & 50ml)	Becton Dickinson
Röntgenentwicklungsmaschine (RG II)	Fuji
Rührfischchen	C. Roth
Rüttler (IKA Vibrax VXR)	Janke & Kunkel
Spektrophotometer	Shimadzu
Spritzen	Becton Dickinson
	Hamilton
Stößel	Biozym
Thermocycler (LightCycler 1.5 Instrument)	Roche
UV-Licht (Macro Vue UV=25)	Hoefer
Vakuumkonzentrator	Eppendorf
Vortex	Neolab
Waage	Sartorius
Zentrifugen	Heraeus
	Beckman

2.2.2 Chemikalien und Kits

Im Folgenden werden vom Hersteller direkt bezogene Stoffe angegeben, selbst angefertigte Puffer und Lösungen werden in den entsprechenden Abschnitten des Kapitels beschrieben. Ein ausführliches Herstellerverzeichnis ist im Anhang aufgeführt.

Acrylamid	C. Roth
Agarose	Roche
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNA Molekulargewichtsmarker IX (72-1350 bp)	Roche
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol, 99%	C. Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche
LumiLight (Peroxidase-Substratlösung)	Roche
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol (β -MSH)	C. Roth
Methanol	C. Roth
Milchpulver	C. Roth
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	C. Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Orange G Ladepuffer	C. Roth
PCR Puffer, 10X	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	GIBCO Invitrogen Corp.
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20)	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail (Complete Tablette)	Roche

Protein Standard (Precision Plus, Dual Color)	Bio-Rad
Reverse Transkriptase Puffer	Roche
Tetramethyldiamin (TEMED)	C. Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Wasser	Braun
	Roche

2.2.3 Antikörper, Enzyme, Inhibitoren und Pharmaka

Primärantikörper: anti-Claudin-1 IgG	Invitrogen
Sekundärantikörper: Peroxidase anti-rabbit IgG	Vector Laboratories
Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transkriptase	Roche
Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)	Calbiochem
Thermus aquaticus (Taq) Polymerase	Roche
Matrixmetalloproteinase-Inhibitor GM6001	Chemicon
RNase-Inhibitor	Roche
D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly ⁵ -ol-enkephalin (DAMGO)	Sigma-Aldrich
Isofluran	Abbott

2.2.4 Primer

		RPL-19	Claudin-1	Occludin	Claudin-5
	NIH-Zugangsnr.	X82202	NM_031699	NM_031329	NM_031701
PCR – Primer und Produkt	Name Primer sense	RPL-19b se rat	Claudin-1a se rat	Occludin 3 se rat	Claudin-5b se rat
	Länge Primer sense	21 mer	20 mer	21 mer	20 mer
	Sequenz Primer sense (5'-3')	AATCGCC AATGCCA ACTCTCG	GGGACAA CATCGTG ACTGCT	AACGGCA AAGTGAA TGGCAAG	GCAGACT CCGAGGC AAGTTA
	Position Primer sense	1521-1541	289-308	1130-1150	903-922
	Schmelzpunkt Primer sense	62,5 °C	57,5 °C	61,2 °C	57,0 °C
	Name Primer antisense	RPL-19b as rat	Claudin-1 as rat	Occludin3 as rat	Claudin-5b as rat
	Länge Primer antisense	21 mer	21 mer	21 mer	20 mer
	Sequenz Primer antisense (5'-3')	TGCTCCA TGAGAAT CCGCTTG	CCACTAA TGTCGCC AGACCTG	TCTGTCC TCTTCGC CTTCCCT	CAGCTGC CCTTTCA GGTTAG
	Position Primer antisense	3274-3254	585-565	1332-1312	1190-1171
	Schmelzpunkt Primer antisense	60,7 °C	59,2 °C	61,0 °C	57,1 °C
	Produktlänge	330 bp	297 bp	182 bp	287 bp

Tab. 1: Primer von TIB MOLBIOL: Angegeben sind die National Institutes of Health (NIH)-Zugangsnummern sowie Name, Länge, Sequenz, Schmelzpunkt und die Produktlänge der verwendeten Primer.

2.3 Methoden

2.3.1 Tierexperimente

Die Ratten werden an ein Narkosegerät angeschlossen und mit einer 4 % Isoflurannarkose unter Gabe von 100 % O₂ anästhesiert. Währenddessen wird der rechte N. ischiadicus der Ratten mittels Nervenstimulation aufgesucht. Der Nerv wird mit einer Impulsamplitude von 0,90 mA Konstantstrom (Impulsfrequenz 2 Hz, Impulsbreite 0,1 ms) aufgesucht, was durch die mit der Reizfrequenz korrelierenden Flexionsbewegung der Pfote deutlich wird. Dann wird unter Beibehaltung der Reiz assoziierten Flexion die Stromstärke bis auf 0,2 mA gesenkt und der Nerv hierdurch genau lokalisiert, um dann jeweils 300 µl Lösung zu injizieren. Nach dem Experiment entsprechender Zeit werden die Ratten mittels inhalativer Isofluran-Überdosis getötet. Für die Untersuchung der mRNA- und Protein-Expression der TJ-Proteine wird im Anschluss jeweils 1 cm des Nervens im Verlauf des Oberschenkels distal der Zusammenfügung der Nervenfaszikel zum N. ischiadicus entnommen. Der linke N. ischiadicus dient als Kontrolle.

Versuche mit hypertoner Lösung		
Methode	Behandlung	Messzeitpunkt
PPT	300 µl 0,9 oder 10% NaCl und 30 µg DAMGO oder 10 % NaCl	5 min
	300 µl 10 % NaCl und 30 µg DAMGO 10 min vor Messung	0, 1, 2, 4, 6, 8 h
qRT-PCR	300 µl 10 % NaCl	0,5, 1, 2 h
Western Blot	300 µl 10 % NaCl	0,5, 1h
Versuche mit MMP-Inhibitor GM6001		
Methode	Behandlung	Messzeitpunkt
PPT	0, 0,02 oder 0,2 mg GM6001 (gelöst in 5 µl DMSO und 295 µl 0,9 % NaCl) und 300 µl 10 % NaCl und 30 µg DAMGO nach 10 min	10 min
qRT-PCR	0,2 mg GM6001 (gelöst in 5 µl DMSO und 295 µl 0,9 % NaCl) und 300 µl 10 % NaCl nach 10 min	0,5 h
Western Blot	0,2 mg GM6001 (gelöst in 5 µl DMSO und 295 µl 0,9 % NaCl) und 300 µl 10 % NaCl nach 10 min	0,5, 1 h
Versuche mit MMP-9		
Methode	Behandlung	Messzeitpunkt
PPT	300 µl 0, 0,4, 2 oder 10 pmol MMP-9 (gelöst in 0,9 % NaCl) und 30 µg DAMGO	10 min
qRT-PCR	300 µl 2 pmol MMP-9 (gelöst in 0,9 % NaCl)	0,5 h

Tab. 2: Protokolle der Tierexperimente: Angegeben sind die Methodik mit der der N. ischiadicus im Anschluss an die Behandlung untersucht werden soll, die Art der Behandlung der Ratten und die Messzeitpunkte.

2.3.2 RNA-Isolation und cDNA- Synthese

Untersucht werden soll die mRNA der perineuralen TJ-Proteine. Aufgrund der Instabilität der mRNA gegenüber ubiquitär vorhandener RNasen und zur Verwendung im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird diese mit einer Reversen Transkriptase (RT) in eine copy Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben:

Die Nerven werden direkt nach Entnahme in ein jeweils 1 ml Trizol enthaltendes Reaktionsgefäß überführt, zerkleinert und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) und Inkubation wird 30 min bei 4 °C mit 15.000 x g zentrifugiert. Hierbei wird die Mixtur in eine wässrige, ausschließlich RNA-haltige, und eine organische Phase, die DNA, Proteine und Zelldebris enthält, getrennt. Die wässrige Phase wird in 500 µl Isopropanol überführt. Die RNA wird über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Anschließend werden die Proben bei 4 °C mit 15.000 x g über 30 min zentrifugiert. Das RNA-Sediment wird zweimal mit 75 %iger Ethanolösung gewaschen. Danach werden die Proben bei Raumtemperatur in der Vakuumzentrifuge getrocknet, so dass ausschließlich RNA im Reaktionsgefäß verbleibt.

Zur cDNA-Synthese werden 10,4 µl RNase freies Wasser und 1 µl (0,2 µg / ml) Oligodesoxyribonukleosidtriphosphate (oligo dT) zugegeben, die bei 65 °C an den poly-Adenosin-Schwanz der mRNA binden und so kurze Doppelstrang (ds)-DNA bilden, an die sich die RT zur Bildung eines komplementären Basenstranges anlagern kann. Die Proben werden also für 3 min auf 65 °C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Ein Reaktionsgemisch zur cDNA-Synthese (RT-Puffer, DTT, Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Gemisch (gleiche Anteile von Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytosintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat), Avian Myeloblastosis Virus (AMV)-RT und RNase-Inhibitor) wird zugefügt und die Proben für 2 h bei 42 °C inkubiert. Hierbei lagert sich die RT an die oligo dT und kann von hier aus die mRNA kopieren. Anschließend kann die cDNA über Monate bei -20 °C gelagert werden.

Protokoll der cDNA-Synthese:

4 µl 5x RT-Puffer

2 µl 0,1 M DTT

2 µl 10 mM dNTP

0,5 µl AMV-RT

0,1 µl RNase Inhibitor → zu 11,4 µl H₂O-, mRNA-, oligo dT-Mix

2.3.3 Primer Design

Die Primer dieser Arbeit werden über das Primer Design Programm der University of Massachusetts Medical School, USA, durch Eingabe der Zielsequenzen ermittelt. Zur Sequenzrecherche und Primer-Kontrolle wird das Programm „BLAST search“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwendet. Des Weiteren wird die Spezifität der Primer mittels Schmelzkurvenanalyse bei der qRT-PCR kontrolliert.

Zur Primer-Optimierung werden folgende Kriterien beachtet:

- Schmelztemperatur ähnlich bei sense und antisense Primern (etwa 65 °C)
- Länge des PCR-Produktes (etwa 200-300 bp)
- C/G-Gehalt (etwa 50 %)
- Länge der Primer (etwa 20 bp)
- Sequenz der Primer (möglichst wenig selbst- oder paarweise komplementäre Sequenzen, Vermeidung von Poly-A, -T, -G, oder -C Sequenzabschnitten)
- Position der Bindung der Primer (möglichst nicht am Beginn oder Ende des Gens)

2.3.4 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich kleinste Mengen an DNA oder – wie in dieser Arbeit untersucht – in cDNA umgeschriebene mRNA (siehe 2.3.2) durch exponentielle Vervielfältigung nachweisen. Hierzu verwendet man komplementär an den als Einzelstrang vorliegenden gesuchten Gen-

abschnitt bindende oligo dT als Primer, ein sich an die Primer anlagerndes hitzestabiles Enzym – die *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase – und dNTP zur Synthese des komplementären cDNA-Stranges.

Das Prinzip der Vervielfältigung besteht in repetitiven Zyklen, bestehend aus je drei Temperatur-abhängigen Schritten. Im ersten Schritt wird die cDNA in einem Thermocycler auf etwa 95°C erhitzt, wodurch sich die cDNA-Doppelstränge durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen auftrennen und in Form von Einzelsträngen vorliegen (Denaturierung). Im zweiten Schritt wird die Temperatur Primer-abhängig für etwa 30 sec auf einen Bereich von etwa 55-65 °C gesenkt, um eine Anlagerung der Primer an die cDNA-Einzelstränge zu ermöglichen (Anlagerung). Die Temperatur ist von Faktoren wie Länge und Guanin/Cytosin-Gehalt der Primer abhängig und muss spezifisch ermittelt werden. Im dritten Schritt wird die Temperatur wieder auf etwa 72 °C erhöht, um eine durch die DNA-Polymerase katalysierte Synthese des komplementären Stranges zu erzielen, so dass am Ende ein neuer cDNA-Doppelstrang vorliegt (Extension). Durch Wiederholung dieser drei Schritte steigt die Menge des Gesamtproduktes exponentiell bis sich nach etwa 35 Zyklen ein Plateau einstellt.

2.3.5 Prinzip der Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich PCR-Produkte auftrennen und semiquantitativ nachweisen. Die negativ geladenen DNA- beziehungsweise cDNA-Moleküle werden auf ein Agarosegel aufgetragen und wandern nach Anlegung einer Spannung in Richtung der Anode. Hierbei können sich die kleineren Moleküle schneller durch die Poren der Agarosegelmatrix fortbewegen als größere, so dass die Moleküle ihrer Anzahl an Basenpaaren nach aufgetrennt werden. Dem Agarosegel wird Ethidiumbromid zugefügt, welches in der DNA interkaliert und durch Anregung mit UV-Licht (302 nm) fluoresziert (560 nm). Durch einen Marker im Agarosegel mit DNA-Fragmenten bekannter Anzahl von Basenpaaren lassen sich die PCR-Produkte semiquantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wird die Agarosegelelektrophorese zur Quantifizierung eines Standards genutzt (siehe 2.3.6).

2.3.6 Herstellung eines Standards

Ein Standard bezeichnet ein PCR-Produkt, dessen Produktkonzentration bekannt ist, worüber die Konzentration des PCR-Produktes in einer unbekannt Probe bestimmt werden kann.

Hierzu wird eine Gewebeprobe aufgearbeitet (siehe 2.3.2) und unter Verwendung der bestimmten Primer mittels PCR amplifiziert (siehe 2.3.4). Anschließend wird der Standard in Verdünnungen zusammen mit einem, in gleicher Weise verdünnten, Molekulargewichtsmarker (IX; 72-1353 bp; 0,25 µg/µl) in einem 3 % Agarosegel in 1x TAE-Laufpuffer elektrophoretisch bei 80 V über 2 h aufgetrennt und über die einander entsprechenden Banden die Konzentration des Standards berechnet.

Verdünnungsreihe Standard bzw. Molekulargewichtsmarker:

12 µl PCR-Produkt bzw. Marker und 12 µl H₂O → je 8, 6, 4, 2, 1, 0,5 µl

3 % Agarosegel: 3 g Agarose

100 ml 1x TAE

7 µl Ethidiumbromid

10x TAE: 500 ml H₂O

48,4 g Tris-Base

20 ml 0,5 M EDTA

11,42 ml Essigsäure

H₂O ad 1 l

Berechnung der cDNA-Kopienzahl des Standards:

(Marker-Konzentration) x (% DNA der korrespondierenden Markerbande) x (Verdünnungsfaktoren Standard vs. Marker) x 1000 = Konzentration des Standard [ng/µl]

Konzentration Standard [ng/µl] x 10⁻⁹ g / (Gewicht 1bp (660 Da) x bp PCR-Produkt) x 6,023 x 10²³ = Kopien/µl

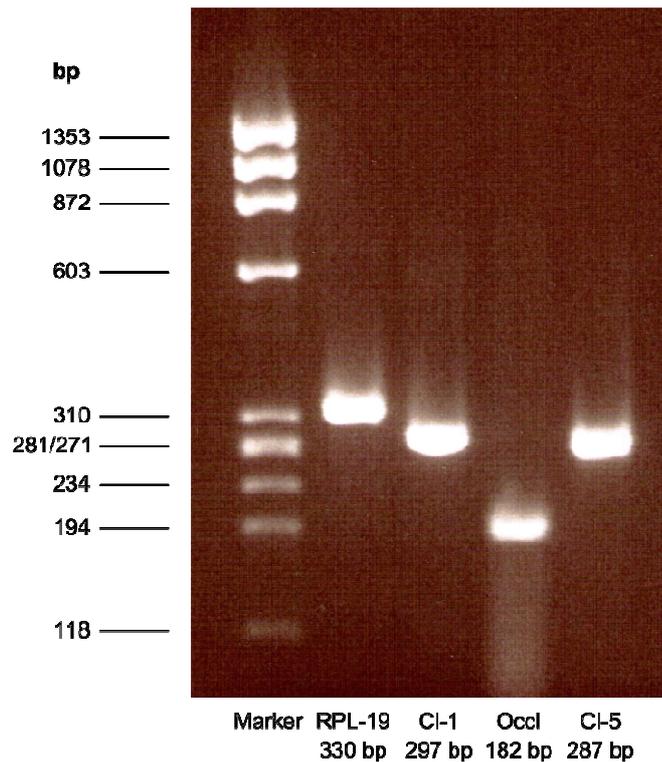


Abb 3: Vergleich der PCR-Produkte der Standard-Pools: Mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennte PCR-Produkte im Vergleich ihrer Größe zu den Banden spezifischer Größe des Molekulargewichtsmarkers (IX; 72-1353 bp; 0,25 µg/µl).

2.3.7 Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR

Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) beruht auf der Methode der DNA- beziehungsweise cDNA-Vervielfältigung mittels konventioneller PCR (siehe 2.3.4). Bei der qRT-PCR in einem LightCycler-Gerät ist jedoch eine Quantifizierung der DNA oder cDNA durch Messung der Fluoreszenz eines den Proben beigefügten Farbstoffes (SYBR Green), der proportional zur Produktmenge in der DNA interkaliert, am Ende jedes Zyklus in Echtzeit (Real Time) möglich.

Die Temperierung der Proben im LightCycler findet durch Übertragung der Lufttemperatur auf einen Rotor platzierter Glaskapillaren statt, was eine Verkürzung der Zyklen ermöglicht.

Unterhalb des Rotors befinden sich eine LED Lichtquelle (470 nm), die den SYBR Green-Farbstoff anregt, und ein Dreikanal-Photometer (530, 640 und 705 nm), welches dessen Fluoreszenz (520nm) misst. SYBR Green, an dsDNA ge-

bunden, fluoresziert hierbei ungefähr 1000x stärker als die ungebundene Form, wodurch die doppelsträngigen PCR-Produkte am Ende eines Zyklus erfasst werden können. Die Bindung und damit Fluoreszenz erfolgt jedoch unspezifisch an unterschiedliche PCR-Produkte, so dass am Ende der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird, indem die Temperatur der Proben schrittweise von 55 °C (DNA liegt als Doppelstrang vor) auf 95 °C (DNA liegt als Einzelstrang vor) erhöht und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Die Schmelzkurve entsteht durch die jähe Abnahme der Fluoreszenz bei Schmelzen der DNA oder cDNA am spezifischen Schmelzpunkt, der abhängig von Faktoren wie Größe und Zusammensetzung (CG-Gehalt) des DNA-Fragmentes ist. Somit hat jedes PCR-Produkt eine eigene Schmelzkurve, wodurch Verunreinigungen detektiert werden können.

Ferner wird eine Schmelzkurvenanalyse in Pilotexperimenten durchgeführt, um den genauesten Zeitpunkt für die Fluoreszenz-Messung am Ende eines jeden PCR-Zyklus zu ermitteln. Bei der Temperatur unmittelbar vor Fluoreszenzabfall am Schmelzpunkt kann die gesamte Fluoreszenz des PCR-Produktes gemessen werden, ohne dass die Intensität durch andere unspezifische PCR-Produkte – wie Primer-Dimere – verfälscht wird.

Als Grundlage für die Quantifizierung dient die Ermittlung des Fluoreszenzschwennwertes (Crossing Point, CP), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Er liegt am Beginn der exponentiellen Phase der PCR, in der die Fluoreszenz proportional des PCR-Produktes ist. Die Quantifizierung erfolgt über den Vergleich der Fluoreszenz der Proben mit der eines mitlaufenden Standards (siehe 2.3.6 und 2.3.8).

Zur relativen quantitativen Aussage über die Expression des Zielgens wird der cDNA-Gehalt der jeweiligen Probe ins Verhältnis zur cDNA eines „house keeping“ Gens derselben Probe gesetzt. „House keeping“ Gene spielen bei Basalfunktionen der Zelle eine Rolle. Es wird davon ausgegangen, dass diese stets in konstanter Weise exprimiert und durch Manipulation weder stimuliert noch supprimiert werden. Als „house keeping“ Gen in der vorliegenden Arbeit dient das ribosomale Protein L-19 (RPL-19) der S60 Untereinheit.

2.3.8 qRT-PCR-Lauf und Auswertung

Für den Lauf einer qRT-PCR werden ein Kit, welches eine Taq-Polymerase, Puffer, $MgCl_2$, SYBR Green I-Farbstoff und dNTP enthält (LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I), sowie die Primer und cDNA-Probe benutzt. Bestmögliche Konditionen in Form von Temperatur und Zeit der einzelnen PCR-Schritte und -Zyklen werden in Abhängigkeit der Primer in Pilotexperimenten ermittelt und sind in Tab. 3 aufgeführt. Da die Taq-Polymerase zur Unterbindung vorzeitiger Reaktionen in modifizierter Form vorliegt, ist zu Beginn der PCR eine Inkubationszeit von 10 min bei 95 °C nötig, um das Enzym zu aktivieren. Jedem Lauf folgt eine Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.3.7). Dem Lauf werden mindestens drei Verdünnungsstufen eines Standards in Duplikaten beigelegt. Trägt man den dekadischen Logarithmus der cDNA-Kopienmenge des Standards gegen die Zykluszahl am CP auf, so erhält man eine Standard-Gerade negativer Steigung, an die zur Optimierung der Genauigkeit der Messungen folgende Bedingungen gestellt werden:

- Der Regressionskoeffizient (r) soll im Bereich von -0,99 bis -1,00 liegen, um einen direkten Zusammenhang von Zyklus-Zahl (CP) und der cDNA-Kopienmenge in Abhängigkeit der Verdünnungsstufe darzustellen.
- Die Steigung (Slope) sollte im Bereich von etwa -3,3 liegen, um hierüber die Effizienz der PCR berechnen zu können, die idealerweise bei 2 (pro Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der cDNA-Kopien) liegt.

$$\text{Effizienz } E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$$

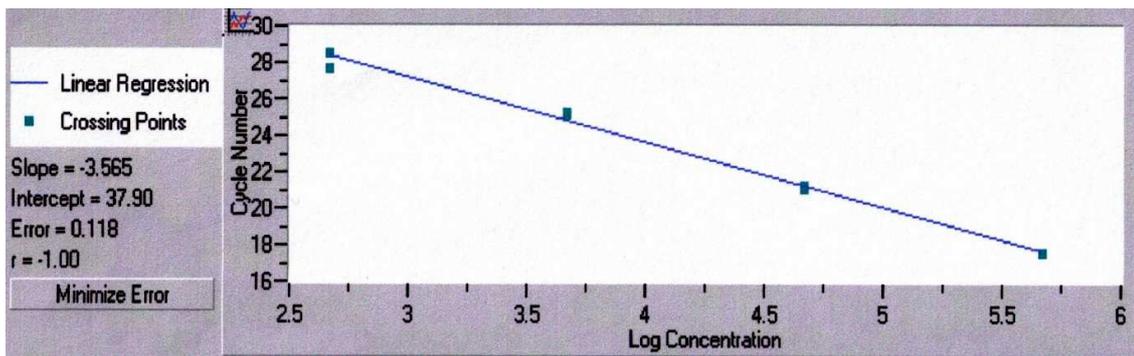


Abb 4: lineare Regressionsgerade der Standardkurve: Ordinate: Zykluszahl (CP) Abszisse: dekadischer Logarithmus der initialen cDNA-Kopienzahl. Angegeben ist die lineare Regressionsgerade für den Standard von Cln-1 mit Fehler und Regressionskoeffizienten. Die Geradengleichung lautet: $y = mx + b = -3,565 \times \log(\text{Kopien cDNA}) + 37,90$ und die Effizienz beträgt $E = 10^{(-1/3,565)} = 1,91$.

Über die Standardkurve kann nun direkt eine Quantifizierung der cDNA-Kopien der Proben erfolgen:

Kopienzahl n cDNA = CP der Probe – (y-Achsenabschnitt (Intercept)/Steigung)

Die einzelnen Proben laufen als Duplikate, aus denen der Mittelwert bestimmt wird. Zur Auswertung wird die Zahl der cDNA-Kopien der jeweiligen TJ-Proteine in Bezug gesetzt zur Zahl der Kopien der cDNA des „house keeping“ Gens RPL-19, so dass die Messwerte der Proben vergleichbar werden.

Protokoll für die qRT-PCR:

1 µl cDNA

1 µl 10 µM Primer sense

1 µl 10 µM Primer antisense

4 µl LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I

13 µl H₂O (PCR grade)

qRT-PCR Konditionen		RPL-19	Claudin-1	Occludin	Claudin-5
	Zyklen	29	35	35	35
Anlagerungs- temperatur	69 °C	65 °C	68 °C	62 °C	
Anlagerungszeit	3 sec	3 sec	3 sec	3 sec	
Extensions- temperatur	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	
Extensionszeit	14 sec	11 sec	10 sec	13 sec	
Fluoreszenz- temperatur	88 °C	86 °C	85 °C	86 °C	

Tab. 3: Laufbedingungen der qRT-PCR: Angegeben sind die Anzahl der Zyklen eines Laufes sowie die Temperaturen und Zeiten für Primeranlagerung, Extension des zu amplifizierenden cDNA-Abschnittes und Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der jeweiligen Primer.

2.3.9 Prinzip der SDS-PAGE und des Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Hierfür werden diese zunächst ihrer Größe nach mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli 1970). SDS dient der Denaturierung der Proteine (Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur) und einer gleichmäßigen Verteilung negativer Ladung um die Proteine, so dass ihr Wanderungsverhalten durch die Acrylamidgelmatrix des Gels nur von ihrer Größe bestimmt wird. Ein Marker, bestehend aus Proteinen bekannter Größe, ermöglicht hierbei eine Abschätzung der Größe der Proteine der Proben. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend mittels einer senkrecht zum Gel angelegten Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blot). Nach Blocken der freien Bindungsstellen auf der Membran, wird diese nacheinander mit einem für das Zielprotein spezifischen Antikörper (Ak) und einem daran bindenden sekundären Ak behandelt. Dieser ist mit HRP konjugiert, welche eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert und so die Banden des Zielproteins sichtbar macht.

2.3.10 Membran-Protein-Extraktion

Der Gewebeprobe (siehe 2.3.1) wird 500 µl eines Lysepuffer-Protease-Inhibitor-Gemisches zugefügt und diese anschließend viermal in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Dann wird das Gewebe mit einem Douncer homogenisiert bis keine Gewebestücke mehr sichtbar sind. Die Zellsuspension wird zur weiteren Zerkleinerung je 10 x durch Kanülen abnehmender Größe (18, 20, 22 und 26 G) gezogen. Die Suspension wird 5 min bei 4 °C mit 200 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und weitere 30 min mit 43.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die gelöste Zellfraktion befindet, wird abgenommen. Das Pellet mit der membranständigen Proteinfraction wird in 100 µl eiskaltem Lysepuffer erneut gelöst und anschließend bei -80 °C asserviert oder direkt zur Proteinquantifizierung weiter verwendet.

Membran-Lysepuffer: 2 ml Tris HCl, pH 7,4
500 µl 1 M MgCl₂
200 µl 0,5M EDTA
120 µl 0,5 EGTA
H₂O ad 100 ml → pro 10ml Membran-
Lysepuffer 1 Tablette
Protease Inhibitor Cocktail
(Complete, Roche)

2.3.11 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgt photometrisch über den Vergleich der Proteinkonzentration der Probe mit der von Standardlösungen (bovine Serumalbumin (BSA)-Lösungen in bekannter steigender Konzentration). Dies wird mit Hilfe des Bradford-Testes durch den Einsatz von Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) durchgeführt (Bradford 1976), welches unter Extinktionsverschiebung Komplexe mit Proteinen bildet. Das Maß der Reaktion ist abhängig von der Proteinkonzentration, so dass über den Vergleich der Probenextinktion mit der Standardkurve eine Aussage über die Proteinkonzentration der Probe gemacht werden kann. Die Quantifizierung dient dazu,

eine jeweils gleiche Menge des Gesamtproteins der einzelnen Proben auf das Gel aufzutragen, um eine vergleichbare Aussage über die Menge des Zielproteins machen zu können.

2.3.12 SDS-PAGE

Es wird ein Gel hergestellt, bestehend aus einem 12,5 %igem Trenngel (Trenngelpuffer 1 M Tris, pH 8,8), welches nach Polymerisation mit einem Sammelgel (Sammelgelpuffer 0,5 M Tris, pH 6,8) überschichtet wird.

Die Proben werden mit H₂O auf das gleiche Volumen gebracht, 1:5 mit 5x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C vorgeheizt (denaturiert). Die Elektrophoresekammer wird mit dem Gel und 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben werden mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Ein Standard mit Proteinen bekannter Größe wird mit analysiert. Die Elektrophorese wird etwa für 0,5 h bei 50 V laufen gelassen bis die Lauffront im Trenngel angelangt ist, anschließend auf Eis bei 150 V für etwa 1 h bis die Lauffront nahezu das Ende der Kammer erreicht hat.

Elektrophorese-Gel:

	<u>Trenngel 12,5%</u>	<u>Sammelgel</u>
H ₂ O [ml]	4,4	3,75
Trenngelpuffer [ml]	2,5	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	1,6
37,5 % Acrylamid [ml]	3,2	0,675
10% APS [μ l]	50	30
TEMED [μ l]	5	3

5x Probenpuffer (Lämmli): 62,5 mM Tris pH 6,8

2 % SDS

10 % Glycerol

1 % MSH

2 mM EGTA

1 mM PMSF

1 % Bromphenolblau

1x Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

2.3.13 Western Blot und Bandendetektion

Die aufgetrennten Proteine des Gels werden über eine senkrecht angelegte Spannung auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran übertragen und durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Hierzu wird ein Gel-Membran-Sandwich hergestellt, nachdem die Bestandteile vorher in 1x Transferpuffer für 5 min equilibriert worden sind.

Das Sandwich wird mit einem Kühlakku und einem Rührfischchen in die Elektrodenkammer gesetzt. Die Kammer wird mit 1x Transferpuffer befüllt. Der Transfer findet unter einer Spannung von 100 V bei konstanter Stromstärke von 0,2-0,4 A über 1 h statt.

Gel-Membran-Sandwich:

Kathode → Schwamm | Filter | Gel | NC-Membran | Filter | Schwamm → Anode

1x Transferpuffer: 100 ml 10x Puffer West
100 ml Methanol
700 ml H₂O

10x Puffer West: 144 g Glycin
30,4 g Tris
H₂O ad 1 l (pH 8,1-8,4, nicht einstellen)

Die auf die NC-Membran übertragenen Banden werden immundetektiert. Hierzu wird die Membran in PBT gespült, anschließend in 5 % Magermilchpulverlösung für 2 h bei Raumtemperatur geblockt, erneut in PBT gespült und anschließend über Nacht bei 4 °C in 5 % BSA-Lösung inkubiert. Zu r Bindung des Primärantikörpers (hier anti-Cln-1 IgG) wird dieser im Verhältnis 1:2000 mit 5 % BSA-Lösung gemischt und die Membran in dieser Lösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran je 10 min 2 x in PBT und 1 x in

2.4 Programme und Statistik

Für die Verarbeitung der Daten der LightCycler-Messungen wird die LightCycler Software 3.5.3 (Roche) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgt über die Programme SigmaStat 3.5 (SPSS Inc.) und Excel 2003 (Microsoft). Bei den Daten der qRT-PCR wird jeweils das prozentuale Verhältnis der zu vergleichenden Werte untersucht. Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Werte einer Gruppe vor und nach Behandlung werden bei Normalverteilung mittels t-Test für gepaarte Stichproben (paired t-Test), bei nicht normaler Verteilung mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Bei mehreren Gruppen mit zwei Faktoren und wiederholter Messung einer der Faktoren wird eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (Two Way Repeated Measures ANOVA) durchgeführt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ werden als signifikant angesehen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt über das Programm SigmaPlot 10.0 (SPSS Inc.)

3 Ergebnisse

3.1 Die perineurale Injektion von hypertoner NaCl-Lösung ermöglicht eine Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle und der mRNA-Expression von Cln-1

3.1.1 Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle nach perineuraler Injektion von hypertoner NaCl-Lösung

Nur nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl-Lösung und DAMGO steigt 5 min nach Injektion die mechanische Pfotendruckschwelle im Vergleich zur basalen Pfotendruckschwelle signifikant an (Abb. 5, $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA). Im Vergleich der Gruppen nach Behandlung mit 10 beziehungsweise 0,9 % NaCl und DAMGO und 10% NaCl allein zeigt sich zwischen 0,9 % NaCl und DAMGO und 10 % NaCl allein kein Unterschied, jedoch ein signifikanter zu 10 % NaCl und DAMGO. Die Basalwerte unterscheiden sich nicht signifikant.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl zum Zeitpunkt 0 und des Opioidpeptides DAMGO nach 0, 1 und 2 h eine signifikante Zunahme der mechanischen Pfotendruckschwelle im Vergleich zur Pfotendruckschwelle vor Behandlung (Abb. 6, $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA). Ab 4 h nach Injektion ist die Pfotendruckschwelle nicht mehr signifikant gegenüber den Basalwerten erhöht. Analog zeigen sich innerhalb der Werte der behandelten Gruppen Unterschiede der Pfotendruckschwelle in Abhängigkeit der Zeit; die Pfotendruckschwellen 0, 1 und 2 h nach Behandlung sind gegenüber denen nach 4, 6 und 8 h signifikant erhöht. Auch hier sind die Basalwerte nicht signifikant unterschiedlich.

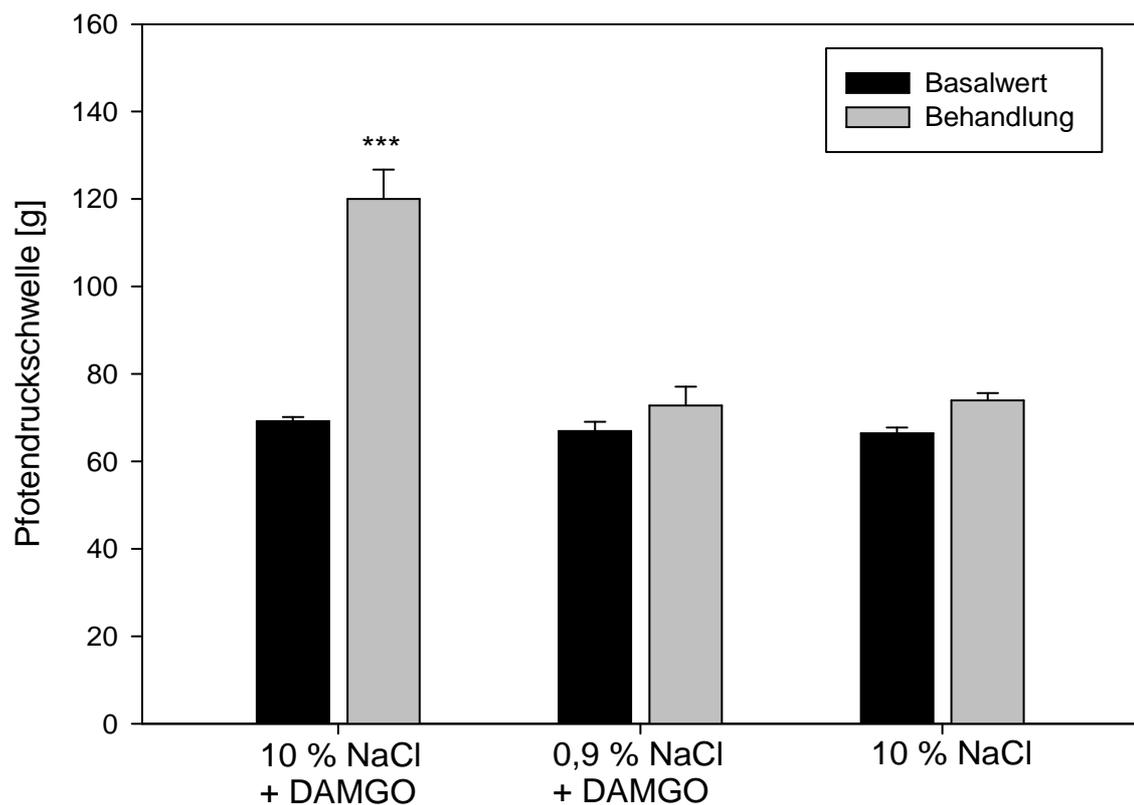


Abb. 5: Erhöhung der mechanischen Pfotendruckschwelle nur nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl und DAMGO im Vergleich zu 0,9% NaCl und DAMGO oder 10 % NaCl allein: Messung der Pfotendruckschwelle [g] 5 min nach Injektion von 0,9 oder 10 % NaCl und 30 μ g DAMGO oder 10 % NaCl an den N. ischiadicus (■) im Vergleich zum Basalwert vor Behandlung (■), n = 6/Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz *** bei $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA).

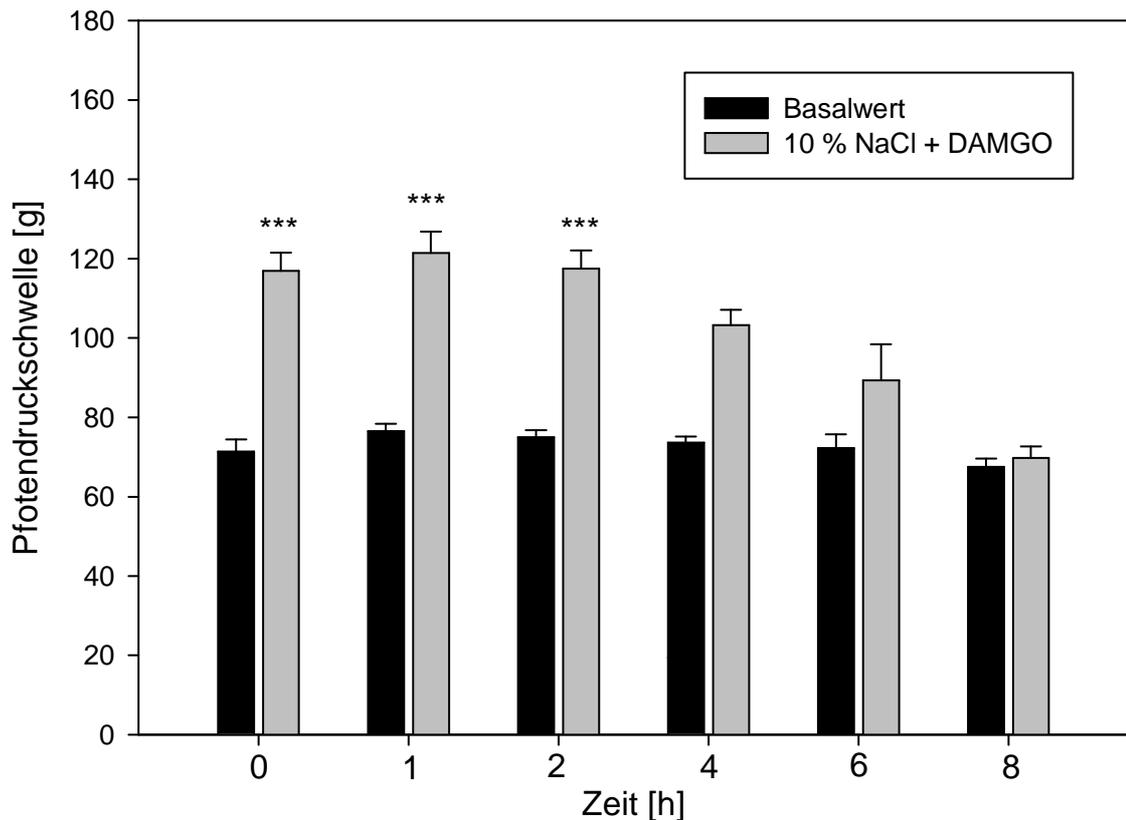


Abb. 6: Zeitverlauf der Wirkung von 10 % NaCl perineural appliziert auf die mechanischen Pfortendruckschwellen: Messung der Pfortendruckschwelle [g] in Abhängigkeit der Zeit [h] nach einmaliger Injektion von 10 % NaCl zum Zeitpunkt 0 und anschließender Injektion von 30 µg DAMGO vor dem entsprechenden Messzeitpunkt an den N. ischiadicus (■) im Vergleich zum Basalwert vor Behandlung (■), n = 6/Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz *** bei $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA).

3.1.2 Hochregulation der mRNA-Expression von Cln-1, nicht aber Occludin und Cln-5 nach perineuraler Injektion von hypertoner NaCl-Lösung

Nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl-Lösung kommt es 30 min nach Injektion zu einem 2,98fachen prozentualen Anstieg der cDNA des TJ-Proteins Cln-1 im Vergleich zur Kontrolle in Form des unbehandelten kontralateralen N. ischiadicus (Abb. 7, $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA). 60 und 120 min nach Injektion von 10 % NaCl ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

Innerhalb der Behandlungsgruppe ist die Kopienzahl der cDNA von Cln-1 30 min nach Behandlung gegenüber der nach 60 und 120 min signifikant erhöht. Die unbehandelten Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant.

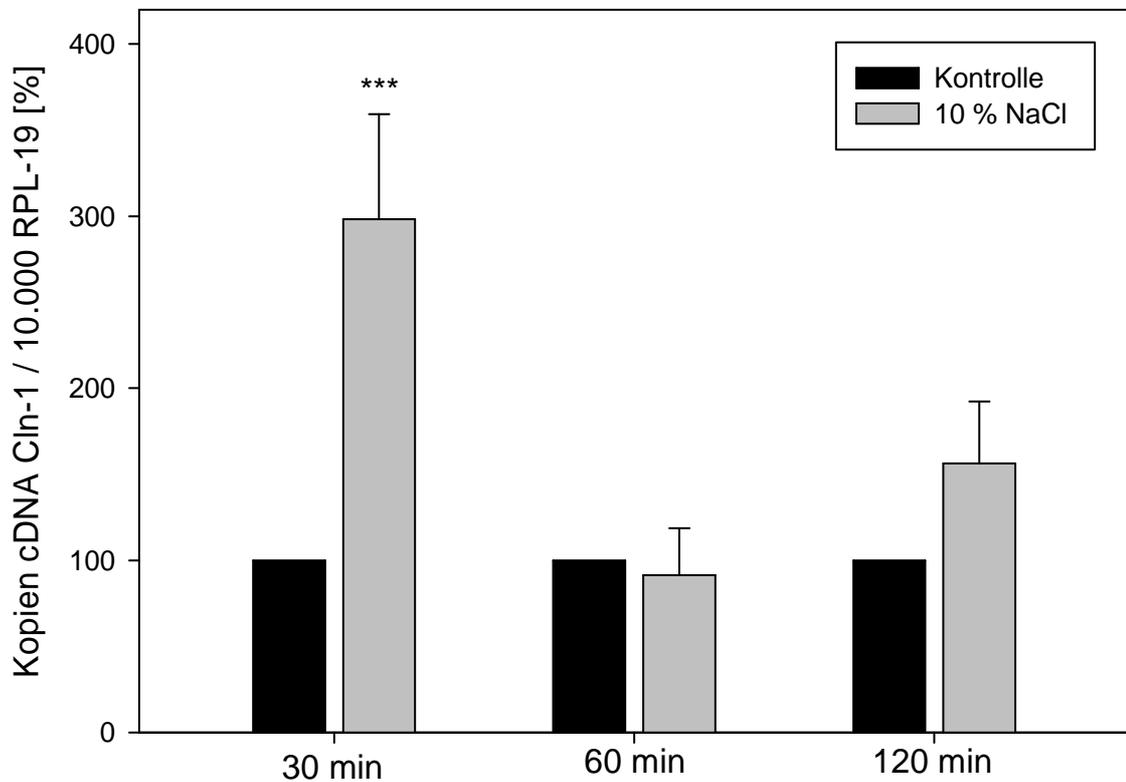


Abb. 7: Perineurale Injektion von 10 % NaCl reguliert die mRNA-Expression von Cln-1 hoch: Quantifizierung der cDNA von Cln-1 im Verhältnis zu 10.000 Kopien cDNA RPL-19 derselben Probe nach Injektion von 10 % NaCl (■) im Vergleich zur Kontrolle (■) in Abhängigkeit des Messzeitpunktes nach Behandlung, n = 13 (30 min), 9 (60 min), 12 (120 min). Die Daten werden normalisiert und die behandelten Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes im Verhältnis zur Kontrolle angegeben (Signifikanz *** bei $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA).

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von Occludin und Cln-5 wird nach Injektion von 10 % NaCl-Lösung an das Perineurium des rechten N. ischiadicus zu keinem der Messzeitpunkte von 30, 60 und 120 min ein signifikanter Unterschied in der Menge der cDNA zwischen dem behandelten und dem unbehandelten kontralateralen N. ischiadicus deutlich (Abb. 8 und 9).

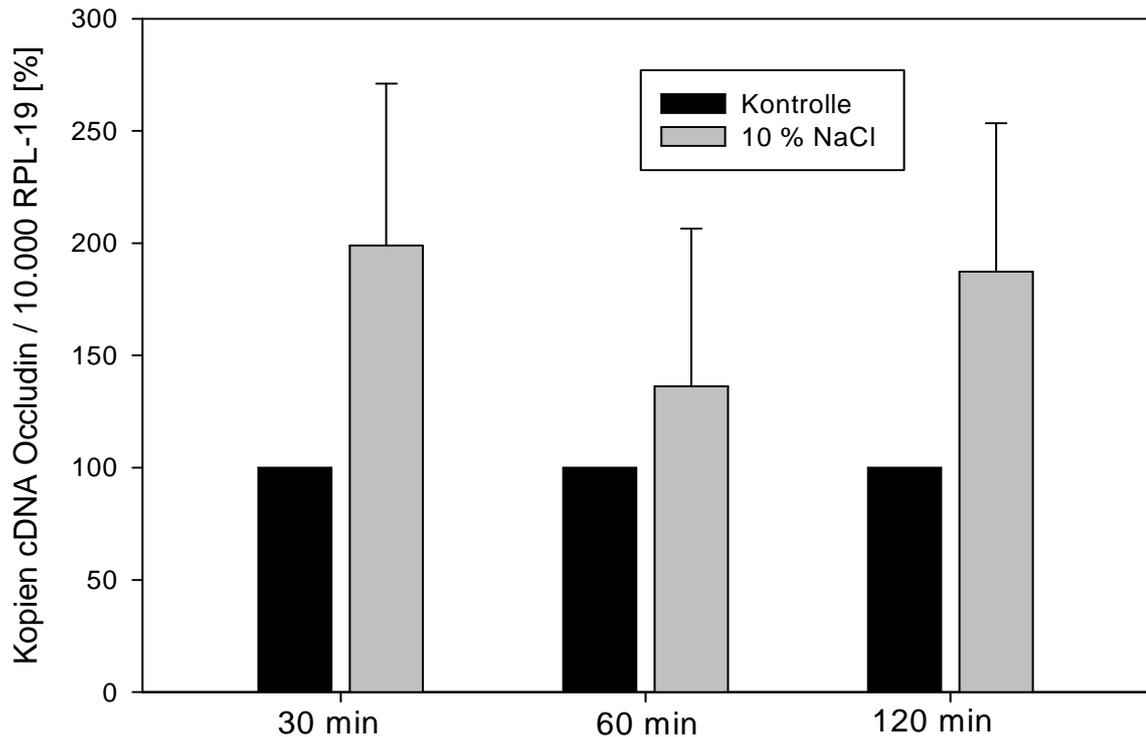


Abb. 8: Unveränderte mRNA-Expression von Occludin nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl: Quantifizierung der cDNA von Occludin im Verhältnis zu 10.000 Kopien cDNA RPL-19 derselben Probe nach Injektion von 10 % NaCl (■) im Vergleich zur Kontrolle (■) in Abhängigkeit des Messzeitpunktes nach Behandlung, n = 6 (30 min), 5 (60 min), 7 (120 min). Die Daten werden normalisiert und die behandelten Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes im Verhältnis zur Kontrolle angegeben (Two Way Repeated Measures ANOVA).

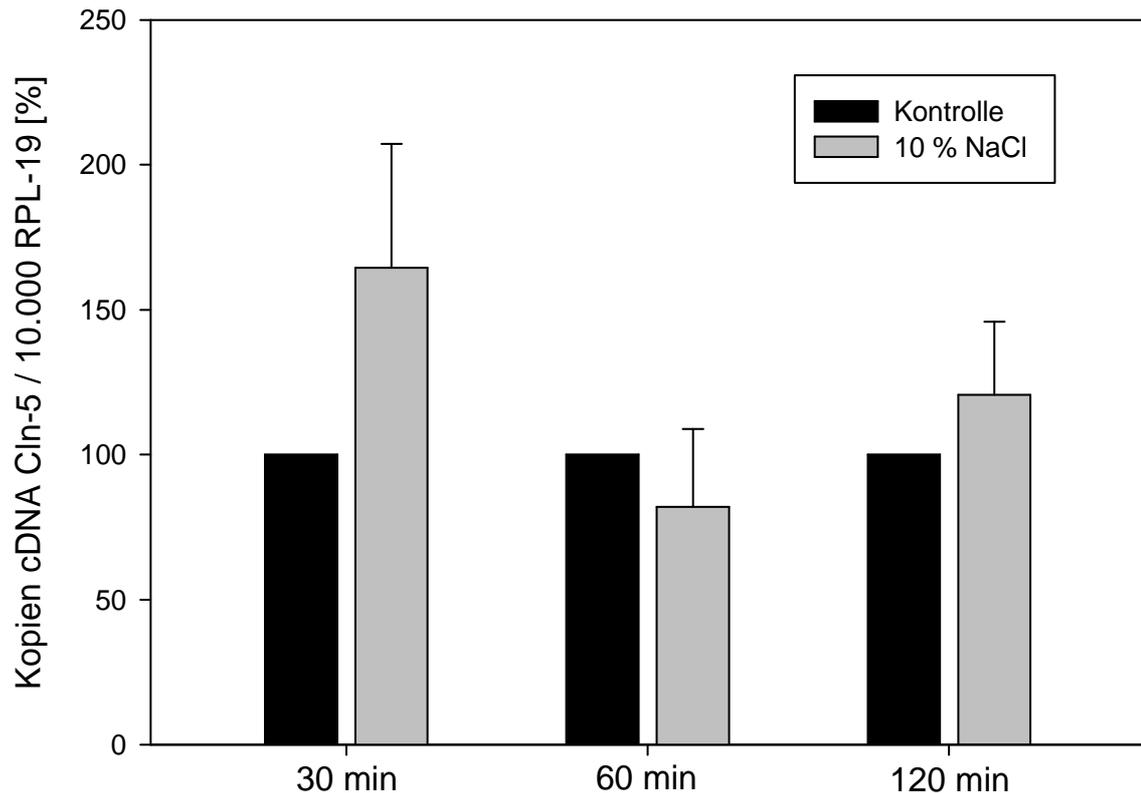


Abb. 9: Unveränderte mRNA-Expression von Cln-5 nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl: Quantifizierung der cDNA von Cln-5 im Verhältnis zu 10.000 Kopien cDNA RPL-19 derselben Probe nach Injektion von 10 % NaCl (■) im Vergleich zur Kontrolle (■) in Abhängigkeit des Messzeitpunktes nach Behandlung, n = 9 (30 min), 11 (60 min), 12 (120 min). Die Daten werden normalisiert und die behandelten Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes im Verhältnis zur Kontrolle angegeben (Two Way Repeated Measures ANOVA).

3.2 Der MMP-Inhibitor GM6001 unterbindet die Effekte hypertoner Lösung

3.2.1 Inhibition der Wirkung von hypertoner NaCl Lösung auf die mechanische nozizeptive Schwelle durch den MMP-Inhibitor GM6001

Im Vergleich der basalen Pfortendruckschwelle mit der nach perineuraler Applikation von 0, 0,02 oder 0,2 mg GM6001, einem Breitspektrum-Inhibitor der MMP, und 10 % NaCl mit DAMGO, zeigt sich nach 10 min dosisabhängig eine Reduktion der Wirkung hypertoner Lösung (Abb. 10, $p < 0,05$ (0,001), Two Way Repeated Measures ANOVA). Die mechanische nozizeptive Schwelle nach

10 % NaCl und DAMGO ohne Vorbehandlung mit GM6001 liegt signifikant höher als die nach 0,02 und 0,002 mg GM6001. Im Vergleich der Basalwerte zeigt sich kein Einfluss von GM6001 auf die Pfortendruckschwelle.

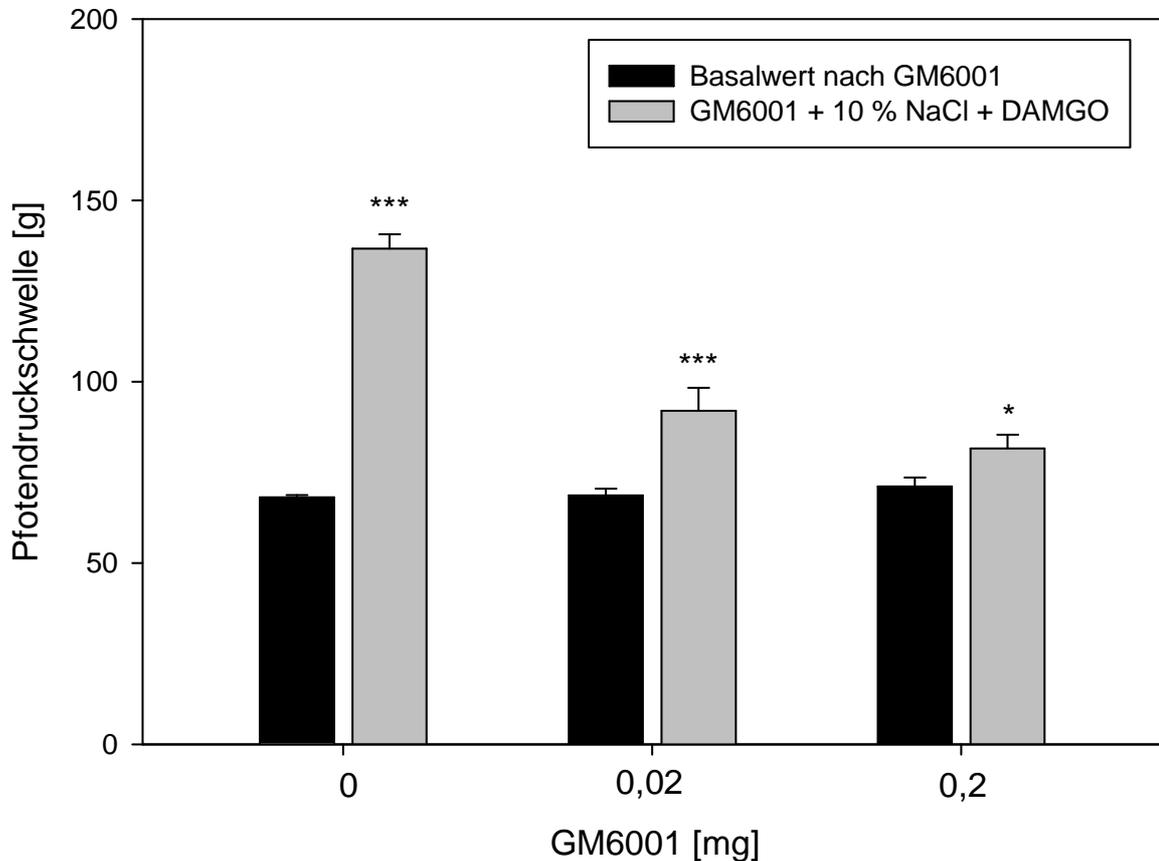


Abb. 10: GM6001 verringert dosisabhängig die Wirkung von 10 % NaCl bei Injektion vor 10 % NaCl und DAMGO: Messung der Pfortendruckschwelle [g] nach Injektion von 10 % NaCl und 30 µg DAMGO an den rechten N. ischiadicus 10 min nach Injektion unterschiedlicher Konzentration GM6001 [mg] (■) im Vergleich zum Basalwert nach Injektion von GM6001 (■), n = 6 / Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz * bei $p < 0,05$, *** bei $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA).

3.2.2 Unveränderte mRNA-Expression von Cln-1, Occludin und Cln-5 nach Injektion von GM6001 und 10 % NaCl

Bei der Untersuchung, ob GM6001 den Effekt hypertoner Lösung auf die Regulation von Cln-1, Occludin und Cln-5 beeinflusst, zeigt sich 30 min nach peri-

neuraler Injektion für die cDNA der TJ-Proteine weder ein Effekt der hypertonen Lösung auf Cln-1 (Abb. 11A), noch auf Occludin (Abb. 11B) und Cln-5 (Abb. 11C) im Vergleich zum kontralateralen N. ischiadicus.

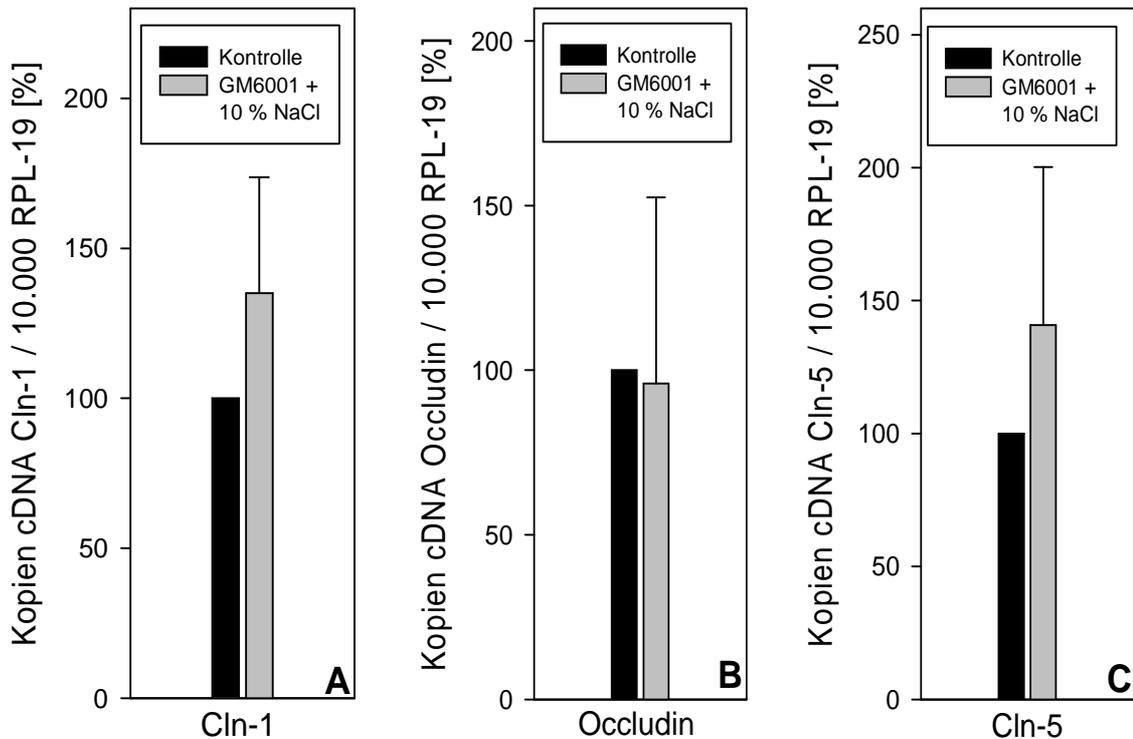


Abb. 11: GM6001 verhindert den Anstieg der Cln-1 mRNA-Expression nach perineuraler Gabe von 10% NaCl: Quantifizierung der cDNA der TJ-Proteine im Verhältnis zu 10.000 Kopien cDNA RPL-19 derselben Probe 30 min nach Injektion von 10 % NaCl 10 min nach Injektion von GM6001 (■) im Vergleich zur Kontrolle (■), die Daten werden normalisiert und die behandelten Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes im Verhältnis zur Kontrolle angegeben; **Abb. 11A:** cDNA Quantifizierung von Cln-1, n = 7 (paired t-Test), **Abb. 11B:** cDNA Quantifizierung von Occludin, n = 7 (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test), **Abb. 11C:** cDNA Quantifizierung von Cln-5, n = 9 (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

3.2.3 Veränderungen der Cln-1 Protein-Expression

30 und 60 min nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl an den rechten N. ischiadicus zeigt sich eine verminderte Expression von Cln-1 im Vergleich zur

Kontrolle ohne Behandlung (Abb. 12). Die vorherige Injektion von 0,2 mg GM6001 blockiert diesen Abfall der Cln-1 Expression nach 30 und 60 min.

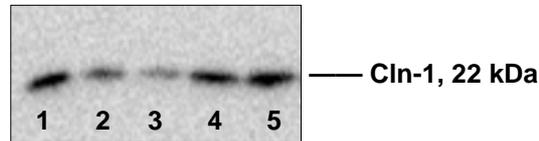


Abb. 12: Cln-1 Protein nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl und nach GM6001 und 10 % NaCl: Western Blot für Cln-1 nach Nervengewebsentnahme 30 (2) und 60 (3) min nach 10 % NaCl-Injektion und 30 (4) und 60 min nach Injektion von 0,2 mg GM6001 und 10 % NaCl und der Kontrolle ohne Behandlung (1).

3.3 MMP-9 wirkt wie hypertone NaCl-Lösung auf die mechanische nozizeptive Schwelle und erhöht die mRNA-Expression der perineuralen TJ-Proteine

3.3.1 Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle nach perineuraler Injektion von MMP-9 und DAMGO

Nach perineuraler Injektion von MMP-9 unterschiedlicher Konzentration zusammen mit DAMGO zeigt sich ab 0,4 pmol MMP-9-Lösung ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg der Pfortendruckschwelle nach 10 min (Abb. 13, $p < 0,05$ (0,001), Two Way Repeated Measures ANOVA). Die Injektion bewirkt einen maximalen Effekt bei 2 pmol MMP-9-Lösung, welcher sich bei höherer Dosierung nicht weiter erhöht; die Pfortendruckschwelle nach 2 pmol MMP-9 unterscheidet sich nicht von der nach 10 pmol, wohingegen diese Werte eine signifikante Erhöhung gegenüber den Werten nach 0 und 0,4 pmol MMP-9 aufweisen.

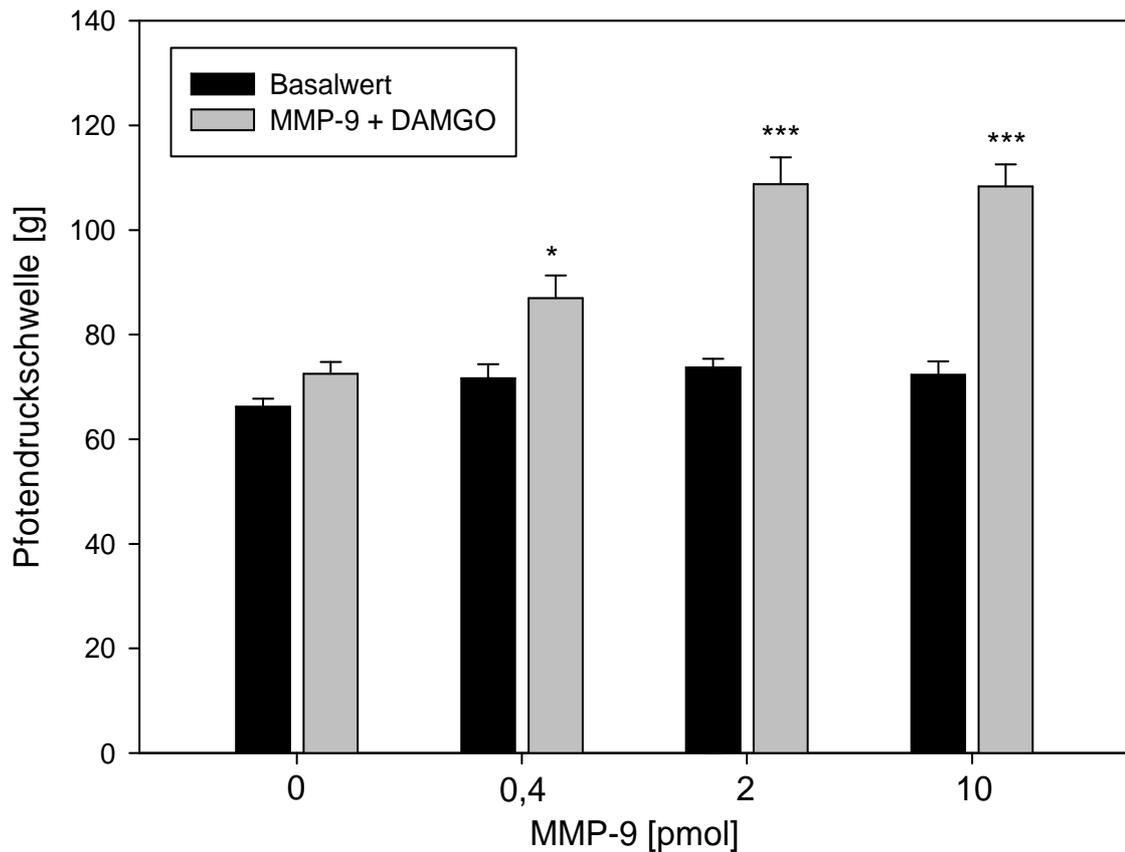


Abb. 13: Erhöhte mechanische Pfortendruckschwelle nach perineuraler Injektion von MMP-9 und 30 µg DAMGO: Messung der Pfortendruckschwelle [g] nach Injektion von MMP-9 unterschiedlicher Konzentrationen und 30 µg DAMGO an den N. ischiadicus (■) im Vergleich zum Basalwert (■), n = 4 (0 pmol), 6 (0,4 pmol), 8 (2 pmol), 5 (10 pmol). Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz * bei $p < 0,05$, *** bei $p < 0,001$, Two Way Repeated Measures ANOVA).

3.3.2 Erhöhte mRNA-Expression von Cln-1, Occludin und Cln-5 nach Injektion von MMP-9

30 min nach perineuraler Injektion von 2 pmol MMP-9-Lösung zeigt sich für Cln-1 (Abb. 14A, ** $p < 0,01$), Occludin (Abb. 14B, * $p < 0,05$) und Cln-5 (Abb. 14C, * $p < 0,05$) ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle in Form des unbehandelten kontralateralen N. ischiadicus (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

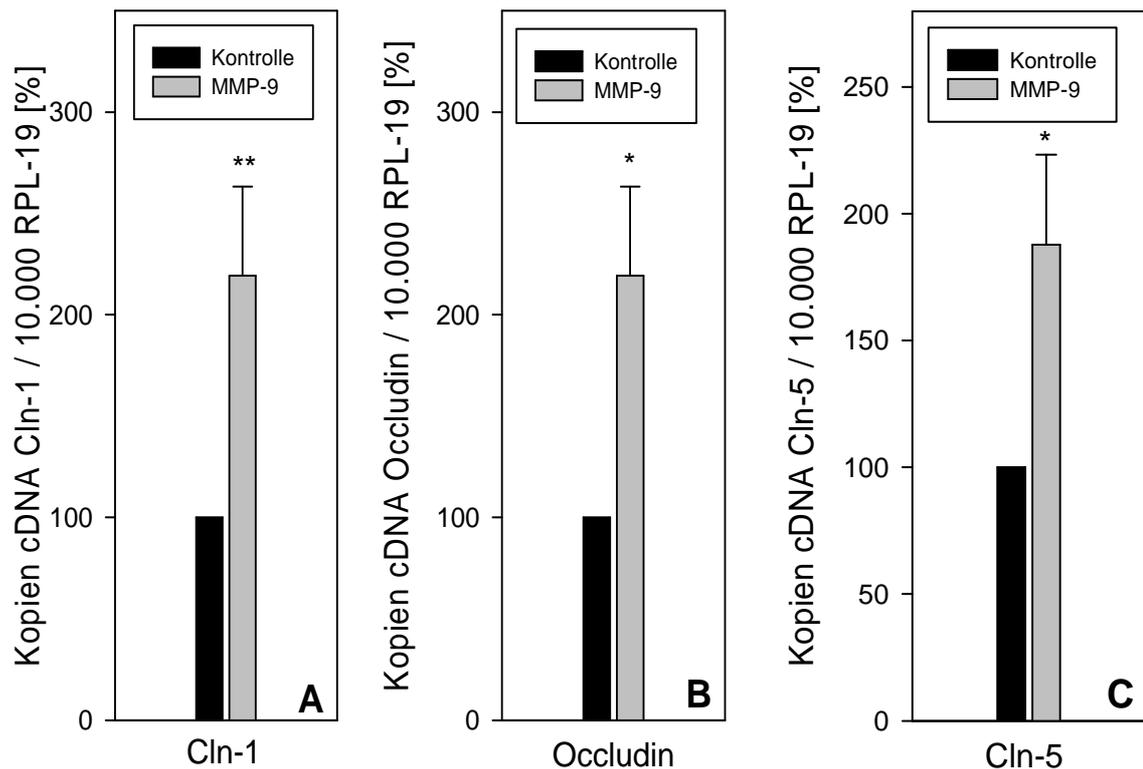


Abb. 14: Hochregulation der mRNA-Expression von Cln-1, Occludin und Cln-5 nach perineuraler Injektion von MMP-9: Quantifizierung der cDNA der TJ-Proteine im Verhältnis zu 10.000 Kopien cDNA RPL-19 derselben Probe 30 min nach Injektion von 2 pmol MMP-9 (■) im Vergleich zur Kontrolle (■), die Daten werden normalisiert und die behandelten Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes im Verhältnis zur Kontrolle angegeben; **Abb. 14A:** cDNA Quantifizierung von Cln-1, $n = 14$ (Signifikanz ** bei $p < 0,01$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test), **Abb. 14B:** cDNA Quantifizierung von Occludin, $n = 15$ (Signifikanz * bei $p < 0,05$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test), **Abb. 14C:** cDNA Quantifizierung von Cln-5, $n = 16$ (Signifikanz * bei $p < 0,05$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wird der Einfluss hypertoner Lösung und Matrixmetalloproteinasen auf die Barrierefunktion der TJ im Perineurium peripherer Nerven untersucht:

- 1) Nach perineuraler Applikation hypertoner Lösung steigt bei zusätzlicher Gabe von DAMGO die mechanische nozizeptive Schwelle im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt hält bis zu 2 h nach Injektion an. Gleichzeitig erhöht sich die mRNA-Expression von Cln-1, nicht aber Cln-5 und Occludin 30 min nach perineuraler Injektion hypertoner Lösung. Das Protein Cln-1 ist 30 und 60 min nach perineuraler Applikation hypertoner Lösung vermindert nachweisbar.
- 2) Der Matrixmetalloproteinase-Inhibitor GM6001 blockiert die Wirkung von hypertoner Lösung sowohl in den Schmerzverhaltenstests als auch in der mRNA- und Proteinexpression von Cln-1.
- 3) Die perineurale Injektion von MMP-9 kann die gleiche Wirkung auf die mechanische Schmerzschwelle auslösen. Die mRNA-Expression für Cln-1, Occludin und Cln-5 steigt 30 min nach perineuraler Injektion von MMP-9.

4.2 Diskussion von Material und Methoden

4.2.1 Periphere Nervenstimulation

Die Methodik der peripheren Nervenstimulation ist in Durchführung und Material der klinischen Anwendung bei Patienten entnommen. Zudem wird die Technik der peripheren Stimulation des N. ischiadicus von Ratten in früheren Studien beschrieben (Puehler et al. 2004; McCarthy et al. 2002; Grant et al. 2001). In der Klinik wird inzwischen häufig eine Ultraschall-gestützte Technik angewendet, die sich hier wegen der kleinen anatomischen Verhältnisse aber nicht rentiert. Das injizierte Volumen von je 300 µl wird von McCarthy et al. beschrieben und wurde von uns in Pilotexperimenten auf Wirkung und Lokalisation überprüft (McCarthy et al. 2002). Wenn das Injektionsvolumen unter anderen Be-

dingungen kritisch sein sollte, müsste in weiteren Versuchen untersucht werden, ob auch kleinere Volumina ausreichend sind, um den Nerven sicher zu erreichen.

4.2.2 Messung der Pfortendruckschwelle

Die Bestimmung der Pfortendruckschwelle der Versuchstiere erfolgt nach Randall Selitto und ist seit den fünfziger Jahren etabliert (Randall and Selitto 1957). Während die Sensitivität der Methode im oberen (analgetischen) Bereich sehr gut ist, ist die Diskriminierung im unteren (hyperalgetischen) Bereich schlechter. In dieser Arbeit wird aber in dem Bereich gemessen, der eine gute Diskrimination erlaubt. Die Experimente werden teilweise verblindet durchgeführt, um einen Bias durch den Untersucher zu reduzieren.

Zunehmend diskutiert werden die Messverfahren für Schmerzmessungen bei Tieren wegen der mangelnden Korrelation zwischen einer reflexartigen Reaktion auf einen nozizeptiven Reiz hin und dem tatsächlichen Erleben von Schmerz, welches mit emotionalen und das Verhalten beeinflussenden Komponenten einhergeht (Vierck et al. 2008). Dementsprechend werden derzeit neue Modelle zur experimentellen Messung von Schmerzen, wie die Beurteilung der Gesichtsausdrücke von Versuchstieren als Ausdruck des Erleben eines spontanen Schmerzes auf einen nozizeptiven Reiz hin, untersucht (Dolgin 2010).

4.2.3 mRNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der cDNA mittels qRT-PCR bietet im Vergleich zur Quantifizierung mittels konventioneller PCR die Möglichkeit, schon während der PCR eine Quantifizierung durchführen zu können. Die Quantifizierung mit Hilfe des Farbstoffes SYBR Green weist eine hohe Sensitivität auf, die Spezifität ist aufgrund der Interkalierung von SYBR Green in sämtliche PCR-Produkte jedoch im Vergleich – beispielsweise zu Sondentechniken – geringer, weshalb hier stets die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird (Holzapfel and Wickert 2007). Die Quantifizierung erfolgt über einen beigefügten Standard und ist dementsprechend abhängig von dessen Effizienz, die optimalerweise bei 2, real jedoch meist leicht darunter bei etwa 1,9 liegt. Auch muss bedacht werden, dass die Normierung der Werte über den Vergleich zu „house keeping“ Genen eine rela-

tive Quantifizierung darstellt und nicht gänzlich exakt ist, da man annehmen muss, dass auch relativ konstant exprimierte „house keeping“ Gene unter bestimmten Bedingungen verändert exprimiert werden können (Holzapfel and Wickert 2007).

Insgesamt zeigen die Werte für die cDNA-Kopien eine hohe Streuung und teilweise nicht messbare Werte, so dass die Proben von Occludin (n = 6) und Cln-5 (n = 9) gegenüber Cln-1 (n = 13) nur in reduzierter Anzahl analysiert werden können. Dies liegt daran, dass allgemein niedrigere Level der Kopienzahlen der cDNA schon bei den unbehandelten Gruppen von Occludin beziehungsweise Cln-5 im Verhältnis zu Cln-1 ($\approx 1:30-50$; Occludin-Mittelwert 498 Kopien cDNA / 10.000 RPL-19 / Probe, Cln-5-Mittelwert 811 Kopien cDNA / 10.000 RPL-19 / Probe gegenüber Cln-1-Mittelwert 26.963 Kopien cDNA / 10.000 RPL-19 / Probe) vorliegen.

4.2.4 Proteinuntersuchung

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die membrangebundene TJ-Fraktion untersucht, jedoch keine mögliche intrazelluläre Fraktion oder eine funktionelle Begutachtung des Proteins angestellt, so dass zunächst einmal keine Aussage gemacht werden kann, ob Cln-1 abgebaut oder möglicherweise internalisiert oder auch funktionell beeinflusst wird.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Wirkung von hypertoner Lösung nach perineuraler Injektion

Die perineurale Applikation von 10 % NaCl-Lösung bewirkt eine Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle nach perineuraler Opioidgabe unmittelbar nach Injektion für mindestens 2 h (Abb. 6). Die perineurale Applikation von Opioiden allein (Grant et al. 2001) oder mit 0,9 % NaCl sowie die alleinige Gabe von 10 % NaCl perineural vermag dies nicht zu bewirken (Abb. 5). Diese Erkenntnisse decken sich mit vorherigen Untersuchungen der Pfotendruckschwelle von Ratten nach intraplantarer Injektion von 0,25 und 0,5 M Mannitol und DAMGO (Antonijevic et al. 1995) bzw. 10% NaCl und Opioidpeptiden (Rittner et

al. 2009). Die Pfortendruckschwelle erhöht sich hier ebenfalls nur, wenn das Opioid unter der Bedingung hypertonen Stresses verabreicht wird, dann aber auch zeitlich analog innerhalb von 3 min. Dieser Effekt scheint – zumindest anteilig – auf eine erhöhte Permeabilität des Perineuriums zurückzuführen zu sein; beide Studien zeigen eine erhöhte Färbung von Endoneurium und Nerv nach intraplantarer Injektion von HRP nach Injektion mit Mannitol oder hypertoner 20 % NaCl-Lösung im Vergleich zu ungefärbtem Endoneurium nach alleiniger Injektion von HRP. Ob und zu welchem Zeitpunkt die perineurale Barriere in der Pfote wieder vollständig intakt ist, ist aber noch nicht belegt. Der Verlust der Analgesie der Ratten ab 4 h nach Injektion könnte durch einen Wiederverschluss des Perineuriums verursacht sein. Hierzu wären weitere Untersuchungen an TJ-Proteinen im zeitlichen Verlauf nach Injektion hypertoner Lösung, beispielsweise mittels Western Blot, sowie Permeabilitätsuntersuchungen mit einem Farbstoff sinnvoll. Eine andere frühere Studie zeigt die erhöhte Permeabilität des Perineuriums eines N. ischiadicus vom Frosch mittels eines Radiotracers ($[^{14}\text{C}]$ Sucrose) nach Behandlung mit hypertoner NaCl-Lösung, wobei hier die Durchlässigkeit für EBA ausbleibt (Weerasuriya et al. 1979). Es bleibt also zu untersuchen, ob trotz einer potentiellen Öffnung des Perineuriums eine selektive Permeabilität bestehen bleibt.

Außerdem sind weitere mögliche Effekte durch 10 % NaCl am peripheren Nerven – wie eine Beeinflussung der Expression von OR auf der Zelloberfläche oder eine Beeinflussung der Aktivität beziehungsweise Signaltransduktion der OR – zu bedenken. Einige Studien an Zellkulturen von Neuronen des Ganglion trigeminale zeigen, dass für eine Aktivierung von OR ein „Priming“, beispielsweise durch Bradykinin (BK), Protease aktivierten Rezeptor 2 (PAR-2) und eventuell auch DOR Agonisten selbst, nötig ist (Berg et al. 2007a; Patwardhan et al. 2005; Rowan et al. 2009; Berg et al. 2007b; Schramm and Honda 2010). Diese Mechanismen, wenn und wo sie eine Rolle spielen, sind allerdings noch nicht ganz geklärt und müssten im Zusammenhang mit hypertoner Lösung erst noch genau untersucht werden. Des Weiteren zeigen einige Studien, dass variierende niedrige (0 - 118 mM) extrazelluläre Na-Konzentrationen die Bindungskapazität und –affinität von DAMGO an die MOR auf Neuronen beziehungsweise Neuroblastomzellen des ZNS und die durch DAMGO vermittelte Inhibition der mittels Forskolin induzierten cAMP-Produktion beeinflussen können

(Yabaluri and Medzihradsky 1997; Krumins et al. 1993). So wäre eine Untersuchung dieser Parameter in Abhängigkeit hypertoner Na-Konzentrationen sinnvoll, um die Frage eventueller Effekte zu klären.

Außerdem ist zu bedenken, dass die Expression von OR auf peripheren Nerven, wie dem N. ischiadicus, und auch deren Funktion im Rahmen einer Nervenläsion beobachtet werden kann (Hassan et al. 1993; Labuz et al. 2009), einheitliche Aussagen bezüglich der Funktion von OR auf unveränderten Nerven aber noch ausstehen. Eine in vivo-Studie zeigt nach perineuraler Applikation von Fentanyl oder Morphin ausbleibende antinozizeptive Effekte, wobei hier die Funktion des Perineuriums unbeachtet bleibt (Grant et al. 2001).

Die Permeabilität des Perineuriums wird durch perineurale TJ reguliert, die durch hypertone Lösung beeinflussbar zu sein scheinen. Ähnliches wird nach temporärer mechanischer Verletzung des N. ischiadicus von Ratten beobachtet (Hirakawa et al. 2003). Die Permeabilität des Perineuriums für EBA erhöht sich, und die perineuralen TJ-Proteine Cln-1 und Occludin sind nach einem Tag vorübergehend nicht nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wird eine andere Kinetik gezeigt: 30 min nach perineuraler Applikation von 10 % NaCl steigt die mRNA für Cln-1 etwa um das 3fache im Vergleich zum unbehandelten Nerven an (Abb. 7). Dies könnte einen Hinweis auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese nach potentiell vorherigen Abbau – ausgelöst durch hypertonen Stress – liefern. Das zeitliche Fenster für den Prozess der Transkription scheint hierbei innerhalb 30 min nach Behandlung und im Bereich von < 1 h zu liegen, da bereits ab 1 h nach Injektion die mRNA-Level wieder etwa auf Ebene der Kontrolle liegen. Die binnen Minuten einsetzende Opioidanalgesie nach perineuraler Applikation von 10 % NaCl und der Wirkverlust nach 4 h könnten diesem zeitlichen Fenster entsprechen, ebenso der deutlich schwächere Cln-1 Proteinnachweis 0,5 und 1 h nach Behandlung mit 10 % NaCl. Es gilt hierbei zu bedenken, dass dieses Ergebnis nur eine Momentaufnahme widerspiegelt und der Proteinnachweis von Cln-1 über einen längeren Zeitraum fortgeführt werden müsste, um zu überprüfen, ob beziehungsweise in welchem Zeitrahmen eine erneute Expression des Proteins eintritt. Hirakawa et al. zeigen den erneuten Nachweis für Cln-1 ab Tag 1,5 nach Behandlung, so dass sich diese Ergebnisse entsprechen könnten. Interessanterweise wird in der vorliegenden Arbeit

weder für Occludin noch für Cln-5 innerhalb der untersuchten 2 h nach Behandlung ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression nachgewiesen (Abb. 8 und 9). Hierfür bestehen mehrere Erklärungsmodelle, die zukünftiger Untersuchung bedürfen:

Erstens könnte es möglich sein, dass die Permeabilität der perineuralen TJ-Barriere nur durch Cln-1, nicht aber durch Occludin oder Cln-5 reguliert wird. Zweitens könnten zwar die Proteine mit abgebaut werden, ohne aber in dem gleichen Zeitfenster resynthetisiert zu werden. Diesen Hypothesen stehen zwei Studien gegenüber. Hirakawa et al. zeigen einen Wiedernachweis von Occludin nach Nervenverletzung (Hirakawa et al. 2003). Eine zweite Arbeitsgruppe zeigt an einer anderen Barriere, der Bluthirnschranke (BBB), elektronenmikroskopisch eine Öffnung der interendothelialen Verbindungen einhergehend mit einem Verlust der endothelialen TJ-Proteine Occludin und Cln-5 5 min nach Injektion von hyperosmolarer 1,8 M L(+)Arabinose in die A. carotis communis (Dobrogowska and Vorbrodt 2004). Sie zeigen 30 min nach Behandlung eine partielle Reexpression von Occludin und Cln-5.

Drittens könnten die Proteine nicht abgebaut, sondern nur temporär nach intrazellulär verlagert worden sein, so dass eine Resynthese nicht nötig wäre. Eine Studie an mukosalen epithelialen TJ-Barrieren von Rattendärmen zeigt immunfluoreszenzmikroskopisch und mittels Proteinanalyse eine erhöhte Durchlässigkeit der TJ-Barriere, jedoch keinen Abbau von Cln-1, sondern eine veränderte Lokalisation von der lateralen Epitheloberfläche ins Zellinnere nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Kontrolle (Li et al. 2009). Ein Vergleich zu dieser Studie ist unter Vorbehalt anzustellen, da es sich hier zum Einen um pathologisch verändertes Gewebe und zum Anderen um ein anderes Organsystem handelt. Grundsätzlich sollte aber die Möglichkeit der Internalisierung von Cln-1 anstelle eines Abbaus in zukünftigen Proteinanalysen berücksichtigt werden. Dies gilt auch für die TJ-Proteine Occludin und Cln-5, für die ähnliche Ergebnisse von Li et al. beschrieben werden. Diese Frage könnte mit Hilfe einer Proteinanalyse, bei der membrangebundene und intrazelluläre Proteinfractionen gesondert untersucht würden, geklärt werden.

Viertens könnte ein Anstieg der mRNA außerhalb des hier beobachteten Zeitraums von bis zu 2 h nach Behandlung eintreten. Diese Überlegung würde den Beobachtungen von Hirakawa et al. entsprechen, die einen erneuten Nachweis

von Occludin frühestens am Tag 2 nach Nervenverletzung feststellen, im Gegensatz zu Cln-1 am Tag 1,5 (Hirakawa et al. 2003).

Welcher Mechanismus – ausgelöst durch hypertone Lösung – der veränderten TJ-Expression bzw. -Regulation zu Grunde liegt, ist noch nicht geklärt. Eine Studie zeigt anhand humanen Corneaepithelien, welche hyperosmolarem Stress in Form von hyperosmolarer NaCl-Lösung ausgesetzt sind, einen Anstieg der Konzentration der MMP 1, 3, 9 und 13 nach 24 h (Li et al. 2004). Zudem werden hier 5 und 60 min nach hyperosmolarem Stress die aktivierten phosphorylierten c-Jun N-terminalen Kinasen (p-JNK) 1 und 2 mittels Western Blot nachgewiesen, so dass vermutet wird, hyperosmolare Lösung könne den JNK-Signalpfad aktivieren, wodurch vermehrt MMP freigesetzt würden.

4.3.2 Inhibierung der TJ-Regulation durch GM6001

Die Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle durch 10 % NaCl verringert sich dosisabhängig nach Behandlung mit einem Breitspektrum-MMP-Inhibitor und die veränderte Regulation und Expression von Cln-1 bleibt aus (Abb. 10 - 12). Eine Permeabilitätssteigerung des Perineuriums über eine Beeinflussung der TJ-Barriere scheint somit inhibiert zu werden.

Diese Beobachtungen könnten auf eine Beteiligung von MMP am Abbau der perineuralen TJ-Barriere zurückzuführen sein. Vorangegangene Studien zeigen unter der Bedingung erhöhter MMP-Aktivität eine Inhibition der Degradation der TJ-Proteine Cln-5 und Occludin in TJ-Verbänden von Gehirnkapillaren durch GM6001 (Lischper et al. 2010; Verma et al. 2010; Chen et al. 2009). Eine dieser Studien zeigt dies explizit im Zusammenhang mit MMP-9 (Chen et al. 2009). Auch Versuche an Nabelvenen-Endothel zeigen die Inhibition einer Occludin-Proteolyse durch den Einsatz eines MMP-Inhibitors (Wachtel et al. 1999). Des Weiteren belegt eine Versuchsreihe an MMP-9 produzierenden alveolären dendritischen Zellen eine GM6001 vermittelte Inhibition der sonst nach MMP-9-Freisetzung stattfindenden Migration durch das – über TJ verbundene – Respirationsepithel (Ichiyasu et al. 2004).

Die Regulation perineuraler TJ-Proteine über MMP bzw. deren Inhibitoren hingegen ist bis dato noch nicht erforscht. Auch muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, ob beziehungsweise welche der potentiell beteiligten MMP,

die von GM6001 inhibiert werden (MMP-1, 2, 3, 8 und 9), an diesem Prozess beteiligt ist/sind. Bei Untersuchungen an cerebralen Blut-Hirn-Schranke bildenden Gefäßendothel-TJ von Mäusen und Ratten wird im Zusammenhang einer Permeabilitätserhöhung durch Ischämie/Reperfusionsschäden ein Anstieg von MMP-2 und -9 und deren mRNA festgestellt (Yang et al. 2007; Asahi et al. 2000). Da eine Studie an humanem Corneaepithel, welches hypertoner NaCl-Lösung ausgesetzt ist, ebenfalls eine – neben MMP-1, -3 und -13 – erhöhte MMP-9-Expression (Li et al. 2004) zeigt, wird in dieser Arbeit der Einfluss von MMP auf perineurale TJ über den exemplarischen Einsatz von MMP-9 untersucht.

4.3.3 Effekte von MMP-9 auf perineurale TJ

MMP-9 ermöglicht dosisabhängig bei anschließender perineuraler Applikation von DAMGO eine Anhebung der mechanischen nozizeptiven Schwelle (Abb. 13). So kann die Hypothese aufgestellt werden, dass MMP-9 analog der hypertonen Lösung eine Permeabilitätserhöhung des Perineuriums bewirkt und so die Bindung von DAMGO an die peripheren OR ermöglicht. Es gibt bislang keine Studien, die den Einfluss von MMP auf die Permeabilität des Perineuriums prüfen. Unterstützt werden diese Ergebnisse also nur durch Studien an anderen TJ ausbildenden Geweben, die eine Permeabilitätserhöhung der TJ-Barriere im Zusammenhang mit einer gesteigerten MMP-9-Expression beschreiben (Louboutin et al. 2010; Siu et al. 2003; Reijerkerk et al. 2006). Eine in vitro-Studie an cerebralen Endothelzellkulturen von Mäusen zeigt eine erhöhte Permeabilität der TJ für mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes Dextran nach der Behandlung mit MMP-9 (Chen et al. 2009). Eine weitere Studie an Zellkulturen von humanem Respirationsepithel belegt eine erhöhte transepitheliale Leitfähigkeit und Permeabilität für Makromoleküle wie Sphingomyelin und Viren (rekombinantes Adenovirus) nach Behandlung mit MMP-9 (Vermeer et al. 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Pflugfelder et al. bei der Untersuchung der Durchlässigkeit von Corneaepithel von Mäusen. Es wird eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle verschiedener Größe (Carboxyfluorescein, Alexa-Fluor-Dextran (AFD) und HRP) bei Mäusen mit erhöhter MMP-9-Aktivität festgestellt (Pflugfelder et al. 2005).

Auch wenn die perineuralen Applikationen hypertoner Lösung und MMP-9 sich entsprechende Ergebnisse bezüglich der Pfortendruckschwelle bei zusätzlicher DAMGO-Applikation liefern, kann hier nicht der Rückschluss, hypertone Lösung bewirke eine Aktivierung von MMP-9, gezogen werden. Bisher zeigt eine Studie an cornealen Epithelien, dass eine erhöhte Konzentration von MMP-9 durch Behandlung mit hypertoner NaCl-Lösung erzielt werden kann (Li et al. 2004). Es könnten aber auch andere oder zusätzliche – durch hypertone Lösung beeinflusste – Mechanismen, wie die Öffnung von Ionenkanälen oder andere Modulationen der TJ-Proteine beteiligt sein, die die Durchlässigkeit des Perineuriums regulieren. Weitere Hinweise hierzu könnten zymographische Aktivitätsmessungen, Messungen der mRNA-Expression oder der Einsatz von knock-out Mäusen für MMP-9 nach Behandlung mit hypertoner Lösung liefern.

In dieser Arbeit wird kein zeitlicher Verlauf der Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle nach Opioidgabe nach MMP-9-Applikation dargestellt. Dies wäre von Bedeutung, um die Dauer einer möglichen perineuralen Öffnung zu ermitteln und um festzustellen, ob und in welchem zeitlichen Rahmen die Permeabilitätserhöhung reversibel ist. Behzadian et al. stellen bei der Behandlung von bovinem Retinaepithel mit MMP-9 eine erhöhte Permeabilität für HRP bis mindestens 12-16 h nach Behandlung fest (Behzadian et al. 2001). Dies wäre ein deutlich längerer Zeitraum, als die von uns gemessene weniger als 4 h andauernde erhöhte perineurale Permeabilität nach Applikation von hypertoner Lösung.

Im Rahmen dieser Arbeit wird hinsichtlich der Regulation von Cln-1, Occludin und Cln-5 ein Anstieg der mRNA-Expression aller drei Proteine nach MMP-9 nachgewiesen (Abb. 14). Es wird der Zeitpunkt von 30 min untersucht, da sich hier ebenso ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Cln-1 nach 10 % NaCl zeigt. Dementsprechend kann aber keine Aussage über mögliche Verläufe der Regulation der TJ-Proteine durch MMP-9 gemacht werden. Yang et al. zeigen bei der Untersuchung der mRNA-Expression von Occludin und Cln-5 3,5 h nach Induktion erhöhter MMP-9-Level erniedrigte Werte gegenüber den Ausgangswerten (Yang et al. 2007).

Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass die vermutete Permeabilitätserhöhung des Perineuriums durch MMP-9 über eine Beeinflussung der Re-

gulation der TJ-Proteine bewirkt werden kann. Ob es aber tatsächlich zu einem Proteinabbau und anschließender Biosynthese und einer intakten – gleich einer unbehandelten – TJ-Barriere kommt, kann hiermit aber noch nicht bewiesen werden.

Dass MMP-9 einen degradierenden Einfluss auf die Expression bzw. Funktion der endothelialen TJ-Proteine Occludin und Cln-5 innehält, wird in mehreren Studien beschrieben (Pflugfelder et al. 2005; Vermeer et al. 2009; Chen et al. 2009; Caron et al. 2005; Behzadian et al. 2001; Yang et al. 2007). Hier muss man zwischen den Studien unterscheiden, die lediglich eine Abnahme des TJ Proteins zeigen, und denen, die tatsächlich Abbauprodukte nachweisen. Zu den Ersteren gehören die Folgenden: Caron et al. und Behzadian et al. beschreiben mittels Western Blot lediglich eine Abnahme von Occludin im Zusammenhang mit erhöhten MMP-9 Levels (Behzadian et al. 2001; Caron et al. 2005). Pflugfelder et al. zeigen immunhistochemisch eine Abnahme der Occludin-Färbung als eine Diskontinuität des Occludin-Färbemusters der Zellmembranen (Pflugfelder et al. 2005). Eine neue Studie an humanem Respirationsepithel kann bei der immunhistochemischen Untersuchung von Cln-1 und Occludin neben einer Diskontinuität des Membranfärbemusters eine Zunahme der intrazellulären Immunfluoreszenz (Vermeer et al. 2009) nachweisen.

Abbauprodukte von TJ-Proteinen können die Studien von Pflugfelder et al. und Yang et al. zeigen. Pflugfelder et al. zeigen eine Abnahme von 65 kDa und Zunahme von 50 kDa Occludin mittels Western Blot (Pflugfelder et al. 2005). Die Studie von Yang et al. deckt sich mit der Erkenntnis der Verschiebung des Occludin-Types. Hier wird auch eine Verschiebung von 22 kDa zu 17 kDa Cln-5 gezeigt. Offen bleibt die Frage, ob 50 kDa Occludin ein Abbauprodukt von MMP-9 darstellt, oder ob durch den Einfluss von MMP-9 vermehrt nichtfunktionsfähiges 50 kDa Occludin gebildet werden könnte (Yang et al. 2007). Abbauprodukte von Cln-1 werden bisher in keiner Studie gezeigt. Dies kann entweder durch technische Grenzen (wie Bindungsstellen des Antikörpers) oder einen anderen Mechanismus bedingt sein.

Ferner sollte erwähnt werden, dass eine Studie einen ausbleibenden Effekt von MMP-9 auf die Expression von Occludin bei einer Untersuchung von cerebralen Endothelzellen nach Ischämie zeigt (Asahi et al. 2001).

Interessanterweise decken sich die Ergebnisse der Untersuchung der mRNA-Expression von Cln-1, Occludin und Cln-5 nach perineuraler Behandlung mit 10 % NaCl nicht mit denen nach MMP-9-Behandlung. Nach hypertoner Lösung steigt lediglich die Cln-1 mRNA-Expression, während nach MMP-9 die mRNA-Expression sowohl von Cln-1 als auch von Occludin und Cln-5 steigt (Abb. 7 und 14). Es muss also angenommen werden, dass der potentielle Abbau/Wiederaufbau der TJ-Proteine nach hypertoner Lösung durch andere oder zusätzliche Mechanismen gekennzeichnet ist. Insbesondere ist der Einfluss der Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases = TIMP) zu untersuchen. Einige Studien zeigen eine Coaktivierung von MMP und ihren Inhibitoren, so dass der Einfluss der MMP limitiert wird (Siu et al. 2003; Caron et al. 2005). Des Weiteren könnte am Perineurium untersucht werden, in wie weit hier durch hypertone Lösung der JNK-Signalweg aktiviert wird, der zu einer MMP-Aktivierung führen könnte, wie es an Corneaepithelien gezeigt wird (Li et al. 2004).

Es verbleibt zu klären, woher die durch hypertone Lösung potentiell aktivierte MMP-9 stammt. MMP-9 kann in dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Ichiyasu et al. 2004). Weitere Studien an entzündeten oder verletzten peripheren Nerven lokalisieren MMP-2 und -9 in Schwann-Zellen, Makrophagen und Gefäßendothelzellen (Chattopadhyay et al. 2007; Demestre et al. 2004; Shubayev et al. 2006; Oliveira et al. 2010). Interessant ist hierbei der Einfluss von Zytokinen auf die Expression von MMP-9. Es ist bekannt, dass MMP-9 in entzündetem Gewebe heraufreguliert und auch am Abbau von TJ-Proteinen beteiligt ist (Goetzl et al. 1996; McColl et al. 2008; Oliveira et al. 2010; Teles et al. 2007; Leppert et al. 1999). Analog hierzu ist beschrieben worden, dass die Permeabilität des Perineuriums in entzündetem Gewebe erhöht ist (Antonijevic et al. 1995; Guy and Rao 1984; Bockman et al. 1988; de la Motte et al. 1975; Rechthand and Rapoport 1987; Olsson 1990). Eine Arbeitsgruppe berichtet im Rahmen von inflammatorischen demyelinisierenden Neuropathien von einer vaskulären Permeabilitätserhöhung und dem Zusammenbruch der Blut-Nerven-Barriere (BNB) induziert durch Zytokine wie TNF- α oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (Creange et al. 1998), so dass sich die Frage nach einem potentiellen Einfluss von Zytokinen im Rahmen der Behandlung

mit hypertoner Lösung oder MMP-9 stellt. Einige Studien zeigen am peripheren Nerven eine erhöhte Expression von MMP-9 nach Applikation von Zytokinen wie TNF- α (Oliveira et al. 2010; Shubayev et al. 2006) oder IL-1 β (Chattopadhyay et al. 2007) bzw. eine nur mäßig erhöhte Expression in knock-out Mäusen für den TNF- α Rezeptor 1 bzw. 1 und 2 (Shubayev et al. 2006). Es stellt sich hier die Frage, ob hypertoner Stress eine immunologische Reaktion verursachen könnte.

4.4 Ausblick

Ein Verständnis der Regulation und Funktion der Permeabilität des Perineuriums und seiner TJ-Proteine am peripheren Nerven ist für eine potentielle zukünftige peripher-regionale Applikation von Opioiden oder anderer hydrophiler nozizeptionsspezifischer Pharmaka in der Klinik von Bedeutung, um diese als regional wirkende Analgetika einsetzen zu können (Rittner et al. 2009). Zusätzlich ist dieses Verständnis von Bedeutung für eine mögliche Applikation weiterer Substanzen – wie beispielsweise genetisch veränderter Viren – zur Therapie von Erkrankungen des peripheren Nervensystems. So zeigt eine Studie eine Permeabilität von humanem Respirationsepithel für rekombinantes Adenovirus nach vorheriger MMP-9-Behandlung (Vermeer et al. 2009). Hierfür bedarf es allerdings weiterer Forschung an der Wirkungsvermittlung hypertoner Lösung am peripheren Nerven zur Klärung der Fragen nach den beteiligten Signalwegen, Botenstoffen (wie die Rolle der Zytokine) und Enzymen (wie die Rolle der MMP). Des Weiteren müssen zeitliche Zusammenhänge zwischen Wirkung, Reversibilität und späterer Funktion der TJ-Proteine beziehungsweise des Perineuriums nach Behandlung untersucht werden. Und es bedarf der Entdeckung/Entwicklung geeigneter Substanzen zur Erzielung einer temporären perineuralen Permeabilitätserhöhung in der Klinik. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die perineurale Barriere eine physiologische Funktion innehält. Insofern müssen alle Interventionen sorgfältig hinsichtlich ihrer Reversibilität der Öffnung und möglicher toxischer Wirkungen weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Opioide zählen zu den potentesten Analgetika. Neben der lange bekannten Wirkungsvermittlung über im ZNS lokalisierte Rezeptoren, kann grundsätzlich eine peripher-regionale Analgesie durch exo- oder endogene Opioide über Rezeptoren auf Nervenendigungen peripherer sensorischer Nerven erzielt werden, wodurch zentrale Nebenwirkungen von Opioiden, wie Atemdepression, Sedierung oder Nausea umgangen werden können. Bisher beschränkt sich die periphere Applikation bei Patienten aber auf wenige, gut definierte Kompartimente (wie Kniegelenke oder Zahntaschen) unter der Bedingung pathologischer Veränderungen wie Entzündung oder Läsion. Als eine wesentliche Ursache für eine fehlende Wirkung einer Applikation im Verlauf des Nerven im Sinne einer Regionalanästhesie kann die von Perineurium gebildete Diffusionsbarriere vermutet werden, deren Permeabilität von TJ-Proteinen reguliert wird. Die Durchlässigkeit des Perineuriums kann ohne Vorliegen einer Entzündung beziehungsweise Läsion durch die Erzeugung hypertonen Stresses artifiziell beeinflusst werden. Deshalb soll der Frage nach einer Opioid-vermittelten Analgesie nach perineuraler Applikation hypertoner NaCl-Lösung nachgegangen und eine potentielle Beteiligung der perineuralen TJ-Proteine auf Ebene der molekularen Regulation und Expression untersucht werden.

In einigen Studien kann der Abbau von TJ-Proteinen durch Matrixmetalloproteinasen gezeigt werden, insbesondere im Rahmen inflammatorischer Prozesse, aber auch nach hypertonem Stress. So soll außerdem untersucht werden, ob der Einfluss hypertoner Lösung auf die Barrierefunktion des Perineuriums beziehungsweise die Regulation der TJ-Proteine durch einen Matrixmetalloproteinase-Inhibitor unterbunden, und ob durch die perineurale Applikation von MMP-9 ebenfalls eine Erhöhung der mechanischen nozizeptiven Schwelle nach Opioidgabe vermittelt und die Regulation der TJ-Proteine beeinflusst werden kann.

Nach perineuraler Applikation von 10 % NaCl-Lösung steigt bei zusätzlicher Gabe von DAMGO umgehend die mechanische Druckschmerzgrenze der Versuchstiere im Test nach Randall Sellito über 2 h signifikant im Vergleich zur

Kontrolle. Bei der mRNA-Quantifizierung mittels LC-PCR zeigt sich ein gegenüber der Kontrolle dreifach erhöhter Wert der mRNA-Level für Cln-1 30 min nach perineuraler Injektion von 10 % NaCl-Lösung. Dieser Effekt ist ab 60 min nach Injektion nicht mehr nachweisbar. Auf die mRNA-Expression von Cln-5 und Occludin lässt sich kein Effekt nachweisen. 30 und 60 min nach perineuraler Applikation von 10 % NaCl-Lösung zeigt sich eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verminderte Expression von Cln-1. Bei perineuraler Injektion des MMP-Inhibitors GM6001 vor der Applikation hypertoner Lösung und DAMGO vermindert sich GM6001-dosisabhängig ab 0,2 mg ein Anstieg der Druckschmerzgrenze der Versuchstiere und der Cln-1 mRNA Anstieg bleibt aus. Die perineurale Injektion von MMP-9 zeigt bei den Versuchstieren dosisabhängig ab 0,4 pmol unter zusätzlicher Gabe von DAMGO eine signifikante Erhöhung der Druckschmerzgrenze. Die mRNA-Expression für Cln-1, Occludin und Cln-5 steigt 30 min nach perineuraler Injektion von MMP-9 signifikant an.

Mittels hypertoner Lösung scheint sich über eine vorübergehende Permeabilitätserhöhung des Perineuriums eine periphere, regionale Opioid-vermittelte Analgesie in nicht pathologisch verändertem Gewebe erzielen zu lassen. Dieser Effekt könnte durch eine Beeinflussung des perineuralen TJ-Proteins Cln-1 vermittelt werden. Da ähnliche Effekte auf die Nozizeption und die mRNA-Expression von Cln-1 über MMP-9 erzielt werden können, gilt es zukünftig zu klären, ob die Effekte hypertoner Lösung über die Aktivitätserhöhung einer MMP verursacht sein könnten. Da die Ergebnisse der mRNA-Untersuchung für Occludin und Cln-5 nach hypertoner Lösung oder MMP-9 widersprüchliche Ergebnisse liefern, muss ebenso von einem Einfluss anderer oder zusätzlicher Faktoren auf das Perineurium, ausgelöst durch 10 % NaCl, ausgegangen werden. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass hypertone Lösung auch einen Effekt auf den Nerven selbst – wie die Signalvermittlung der aktivierten OR – ausübt.

Eine nozizeptionsspezifische Analgesie, beispielsweise durch regional applizierte Opiode, ist ein vielversprechendes zukünftiges Konzept. Dafür ist jedoch am peripheren Nerven ein genaueres Verständnis der Regulation und Funktion der Permeabilität des Perineuriums und seiner TJ-Proteine, auch im Zusammen-

hang mit hypertoner Lösung oder hierdurch potentiell aktivierter MMP, nötig. Erkenntnisse in diese Richtung wären aber auch für die mögliche Applikation weiterer Substanzen zur Therapie beispielsweise neurologischer Erkrankungen von Bedeutung. Hierzu müssten Stoffe aufgefunden werden, die klinisch für eine temporäre lokale perineurale Permeabilitätserhöhung ohne (neuro)toxische Nebenwirkungen eingesetzt werden können.

6 Literatur

- Alanne, M. H., K. Pummi, A. M. Heape, R. Grenman, J. Peltonen, and S. Peltonen. 2009. Tight junction proteins in human Schwann cell autotypic junctions. *J Histochem Cytochem* 57 (6):523-529.
- Antonijevic, I., S. A. Mousa, M. Schafer, and C. Stein. 1995. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci* 15 (1 Pt 1):165-172.
- Arrieta, M. C., L. Bistriz, and J. B. Meddings. 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55 (10):1512-1520.
- Asahi, M., K. Asahi, J. C. Jung, G. J. del Zoppo, M. E. Fini, and E. H. Lo. 2000. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (12):1681-1689.
- Asahi, M., X. Wang, T. Mori, T. Sumii, J. C. Jung, M. A. Moskowitz, M. E. Fini, and E. H. Lo. 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 21 (19):7724-7732.
- Bartho, L., C. Stein, and A. Herz. 1990. Involvement of capsaicin-sensitive neurons in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342 (6):666-670.
- Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84 (3):869-901.
- Behzadian, M. A., X. L. Wang, L. J. Windsor, N. Ghaly, and R. B. Caldwell. 2001. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (3):853-859.
- Berg, K. A., A. M. Patwardhan, T. A. Sanchez, Y. M. Silva, K. M. Hargreaves, and W. P. Clarke. 2007a. Rapid modulation of micro-opioid receptor signaling in primary sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 321 (3):839-847.

- Berg, K. A., G. Zardeneta, K. M. Hargreaves, W. P. Clarke, and S. B. Milam. 2007b. Integrins regulate opioid receptor signaling in trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 144 (3):889-897.
- Binder, W., S. A. Mousa, N. Sitte, M. Kaiser, C. Stein, and M. Schafer. 2004. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 20 (1):92-100.
- Bockman, D. E., M. Buchler, P. Malfertheiner, and H. G. Beger. 1988. Analysis of nerves in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 94 (6):1459-1469.
- Brack, A., H. L. Rittner, H. Machelska, K. Leder, S. A. Mousa, M. Schafer, and C. Stein. 2004. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain* 112 (3):229-238.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brownstein, M. J. 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (12):5391-5393.
- Bullingham, R., G. O'Sullivan, H. McQuay, P. Poppleton, M. Rolfe, P. Evans, and A. Moore. 1983. Perineural injection of morphine fails to relieve postoperative pain in humans. *Anesth Analg* 62 (2):164-167.
- Buzas, B., J. Rosenberger, and B. M. Cox. 1997. Regulation of delta-opioid receptor mRNA levels by receptor-mediated and direct activation of the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. *J Neurochem* 68 (2):610-615.
- Cabot, P. J., L. Carter, C. Gaiddon, Q. Zhang, M. Schafer, J. P. Loeffler, and C. Stein. 1997. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 100 (1):142-148.
- Caron, A., R. R. Desrosiers, and R. Beliveau. 2005. Ischemia injury alters endothelial cell properties of kidney cortex: stimulation of MMP-9. *Exp Cell Res* 310 (1):105-116.
- Chattopadhyay, S., R. R. Myers, J. Janes, and V. Shubayev. 2007. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun* 21 (5):561-568.

- Chen, F., N. Ohashi, W. Li, C. Eckman, and J. H. Nguyen. 2009. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 50 (6):1914-1923.
- Chen, J. J., J. Dymshitz, and M. R. Vasko. 1997. Regulation of opioid receptors in rat sensory neurons in culture. *Mol Pharmacol* 51 (4):666-673.
- Creange, A., J. P. Lefaucheur, F. J. Authier, and R. K. Gherardi. 1998. [Cytokines and peripheral neuropathies]. *Rev Neurol (Paris)* 154 (3):208-216.
- Dalsgaard, J., S. Felsby, P. Juelsgaard, and J. Froekjaer. 1994. Low-dose intra-articular morphine analgesia in day case knee arthroscopy: a randomized double-blinded prospective study. *Pain* 56 (2):151-154.
- de la Motte, D. J., S. M. Hall, and G. Allt. 1975. A study of the perineurium in peripheral nerve pathology. *Acta Neuropathol* 33 (3):257-270.
- Demestre, M., G. M. Wells, K. M. Miller, K. J. Smith, R. A. Hughes, A. J. Gearing, and N. A. Gregson. 2004. Characterisation of matrix metalloproteinases and the effects of a broad-spectrum inhibitor (BB-1101) in peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 124 (4):767-779.
- Dionne, R. A., A. M. Lepinski, S. M. Gordon, L. Jaber, J. S. Brahim, and K. M. Hargreaves. 2001. Analgesic effects of peripherally administered opioids in clinical models of acute and chronic inflammation. *Clin Pharmacol Ther* 70 (1):66-73.
- Dobrogowska, D. H., and A. W. Vorbrodt. 2004. Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier. *J Mol Histol* 35 (5):529-539.
- Dolgin, E. 2010. Animalgesic effects. *Nat Med* 16 (11):1237-1240.
- Faktorovich, E. G., and A. I. Basbaum. 2010. Effect of Topical 0.5% Morphine on Postoperative Pain After Photorefractive Keratectomy. *J Refract Surg*:1-8.
- Fields, H. L., P. C. Emson, B. K. Leigh, R. F. Gilbert, and L. L. Iversen. 1980. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* 284 (5754):351-353.
- Freye, E. *Opioide in der Medizin*. 8. Aufl. Heidelberg: Springer, 2010.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141 (7):1539-1550.

- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 (6 Pt 2):1777-1788.
- Goetzl, E. J., M. J. Banda, and D. Leppert. 1996. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156 (1):1-4.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B. E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81 (1):1-44.
- Grant, G. J., K. Vermeulen, M. I. Zakowski, and L. Langerman. 2001. Perineural antinociceptive effect of opioids in a rat model. *Acta Anaesthesiol Scand* 45 (7):906-910.
- Gross, J., and C. M. Lapiere. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1014-1022.
- Guy, J., and N. A. Rao. 1984. Acute and chronic experimental optic neuritis. Alteration in the blood-optic nerve barrier. *Arch Ophthalmol* 102 (3):450-454.
- Hassan, A. H., A. Ableitner, C. Stein, and A. Herz. 1993. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 55 (1):185-195.
- Hirakawa, H., S. Okajima, T. Nagaoka, T. Takamatsu, and M. Oyamada. 2003. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res* 284 (2):196-210.
- Holzappel, B., and L. Wickert. 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 37 (2):120-126.
- Hua, S., and P. J. Cabot. 2010. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* 31 (9):427-433.
- Hughes, J., T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, and H. R. Morris. 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258 (5536):577-580.
- Ichiyasu, H., J. M. McCormack, K. M. McCarthy, D. Dombkowski, F. I. Preffer, and E. E. Schneeberger. 2004. Matrix metalloproteinase-9-deficient den-

- dritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 (6):761-770.
- Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, and S. Tsukita. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171 (6):939-945.
- Joshi, G. P., S. M. McCarroll, C. M. Cooney, W. P. Blunnie, T. M. O'Brien, and A. J. Lawrence. 1992. Intra-articular morphine for pain relief after knee arthroscopy. *J Bone Joint Surg Br* 74 (5):749-751.
- Kalso, E., L. Smith, H. J. McQuay, and R. Andrew Moore. 2002. No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour--lessons learned from IA morphine. *Pain* 98 (3):269-275.
- Katz, N. 2007. Opioids: after thousands of years, still getting to know you. *Clin J Pain* 23 (4):303-306.
- Khoury, G. F., A. C. Chen, D. E. Garland, and C. Stein. 1992. Intraarticular morphine, bupivacaine, and morphine/bupivacaine for pain control after knee videoarthroscopy. *Anesthesiology* 77 (2):263-266.
- Kieffer, B. L., K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, and C. G. Hirth. 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (24):12048-12052.
- Kristensson, K., and Y. Olsson. 1976. Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 3. Entry into injured axons and subsequent localization in perikaryon. *Brain Res* 115 (2):201-213.
- Krumins, S. A., D. C. Kim, O. J. Igwe, and A. A. Larson. 1993. DAMGO binding to mouse brain membranes: influence of salts, guanine nucleotides, substance P, and substance P fragments. *Peptides* 14 (2):309-314.
- Labuz, D., S. Berger, S. A. Mousa, C. Zollner, H. L. Rittner, M. A. Shaqura, T. Segovia-Silvestre, B. Przewlocka, C. Stein, and H. Machelska. 2006. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci* 26 (16):4350-4358.
- Labuz, D., Y. Schmidt, A. Schreiter, H. L. Rittner, S. A. Mousa, and H. Machelska. 2009. Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* 119 (2):278-286.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Leppert, D., P. Hughes, S. Huber, B. Erne, C. Grygar, G. Said, K. M. Miller, A. J. Steck, A. Probst, and P. Fuhr. 1999. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 53 (1):62-70.
- Li, D. Q., Z. Chen, X. J. Song, L. Luo, and S. C. Pflugfelder. 2004. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (12):4302-4311.
- Li, Q., Q. Zhang, C. Wang, X. Liu, L. Qu, L. Gu, N. Li, and J. Li. 2009. Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med* 13 (9B):4061-4076.
- Likar, R., W. Koppert, H. Blatnig, F. Chiari, R. Sittl, C. Stein, and M. Schafer. 2001. Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. *J Pain Symptom Manage* 21 (4):330-337.
- Likar, R., M. Schafer, F. Paulak, R. Sittl, W. Pipam, H. Schalk, D. Geissler, and G. Bernatzky. 1997. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesth Analg* 84 (6):1313-1317.
- Likar, R., R. Sittl, K. Gragger, W. Pipam, H. Blatnig, C. Breschan, H. V. Schalk, C. Stein, and M. Schafer. 1998. Peripheral morphine analgesia in dental surgery. *Pain* 76 (1-2):145-150.
- Lischper, M., S. Beuck, G. Thanabalasundaram, C. Pieper, and H. J. Galla. 2010. Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions. *Brain Res* 1326:114-127.
- Louboutin, J. P., L. Agrawal, B. A. Reyes, E. J. Van Bockstaele, and D. S. Strayer. 2010. HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress. *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (8):801-816.
- Lüllmann-Rauch, R. Histologie. Stuttgart: Thieme, 2003.
- Machelska, H., M. Pfluger, W. Weber, M. Piranvisseh-Volk, J. D. Daubert, R. Dehaven, and C. Stein. 1999. Peripheral effects of the kappa-opioid

- agonist EMD 61753 on pain and inflammation in rats and humans. *J Pharmacol Exp Ther* 290 (1):354-361.
- Machelska, H., J. K. Schopohl, S. A. Mousa, D. Labuz, M. Schafer, and C. Stein. 2003. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 141 (1-2):30-39.
- Mansour, A., C. A. Fox, S. Burke, F. Meng, R. C. Thompson, H. Akil, and S. J. Watson. 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350 (3):412-438.
- McCarthy, R. J., J. M. Kerns, H. A. Nath, M. Shulman, and A. D. Ivankovich. 2002. The antinociceptive and histologic effect of sciatic nerve blocks with 5% butamben suspension in rats. *Anesth Analg* 94 (3):711-716; table of contents.
- McColl, B. W., N. J. Rothwell, and S. M. Allan. 2008. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci* 28 (38):9451-9462.
- McSwiney, M. M., G. P. Joshi, P. Kenny, and S. M. McCarroll. 1993. Analgesia following arthroscopic knee surgery. A controlled study of intra-articular morphine, bupivacaine or both combined. *Anaesth Intensive Care* 21 (2):201-203.
- Meng, F., G. X. Xie, R. C. Thompson, A. Mansour, A. Goldstein, S. J. Watson, and H. Akil. 1993. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (21):9954-9958.
- Mousa, S. A., R. H. Straub, M. Schafer, and C. Stein. 2007. Beta-endorphin, Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66 (7):871-879.
- Mousa, S. A., Q. Zhang, N. Sitte, R. Ji, and C. Stein. 2001. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 115 (1-2):71-78.
- Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69 (3):562-573.
- Obara, I., W. Makuch, M. Spetea, J. Schutz, H. Schmidhammer, R. Przewlocki, and B. Przewlocka. 2007. Local peripheral antinociceptive effects of 14-

- O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 558 (1-3):60-67.
- Ohtsuki, S., H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, and T. Terasaki. 2008. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* 104 (1):147-154.
- Oliveira, A. L., S. L. Antunes, R. M. Teles, A. C. Costa da Silva, T. P. Silva, R. Brandao Teles, M. Ferreira Medeiros, C. Britto, M. R. Jardim, E. Pereira Sampaio, and E. Nunes Sarno. 2010. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprous neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (1):27-39.
- Olsson, Y. 1990. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* 5 (3):265-311.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3):221-233.
- Patwardhan, A. M., K. A. Berg, A. N. Akopain, N. A. Jeske, N. Gamper, W. P. Clarke, and K. M. Hargreaves. 2005. Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the delta-opioid receptor in trigeminal nociceptors. *J Neurosci* 25 (39):8825-8832.
- Pertovaara, A., and H. Wei. 2001. Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *Eur J Pharmacol* 429 (1-3):139-145.
- Pflugfelder, S. C., W. Farley, L. Luo, L. Z. Chen, C. S. de Paiva, L. C. Olmos, D. Q. Li, and M. E. Fini. 2005. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am J Pathol* 166 (1):61-71.
- Pina-Oviedo, S., and C. Ortiz-Hidalgo. 2008. The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv Anat Pathol* 15 (3):147-164.
- Porreca, F., and M. H. Ossipov. 2009. Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: mechanisms, implications, and management options. *Pain Med* 10 (4):654-662.

- Puehler, W., C. Zollner, A. Brack, M. A. Shaqura, H. Krause, M. Schafer, and C. Stein. 2004. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience* 129 (2):473-479.
- Pummi, K. P., A. M. Heape, R. A. Grenman, J. T. Peltonen, and S. A. Peltonen. 2004. Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* 52 (8):1037-1046.
- Randall, L. O., and J. J. Selitto. 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111 (4):409-419.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, and A. J. Barrett. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34 (Database issue):D270-272.
- Rechthand, E., and S. I. Rapoport. 1987. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier. *Prog Neurobiol* 28 (4):303-343.
- Reijerkerk, A., G. Kooij, S. M. van der Pol, S. Khazen, C. D. Dijkstra, and H. E. de Vries. 2006. Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *FASEB J* 20 (14):2550-2552.
- Reina, M. A., A. Lopez, M. C. Villanueva, J. A. De Andres, and F. Maches. 2003. [The blood-nerve barrier in peripheral nerves]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 50 (2):80-86.
- Rittner, H. L., A. Brack, H. Machelska, S. A. Mousa, M. Bauer, M. Schafer, and C. Stein. 2001. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 95 (2):500-508.
- Rittner, H. L., D. Hackel, R. S. Yamdeu, S. A. Mousa, C. Stein, M. Schafer, and A. Brack. 2009. Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun* 23 (4):548-557.
- Rittner, H. L., D. Labuz, J. F. Richter, A. Brack, M. Schafer, C. Stein, and S. A. Mousa. 2007. CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. *Brain Behav Immun* 21 (8):1021-1032.

- Rittner, H. L., D. Labuz, M. Schaefer, S. A. Mousa, S. Schulz, M. Schafer, C. Stein, and A. Brack. 2006. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J* 20 (14):2627-2629.
- Rowan, M. P., N. B. Ruparel, A. M. Patwardhan, K. A. Berg, W. P. Clarke, and K. M. Hargreaves. 2009. Peripheral delta opioid receptors require priming for functional competence in vivo. *Eur J Pharmacol* 602 (2-3):283-287.
- Schafer, M., L. Carter, and C. Stein. 1994. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (10):4219-4223.
- Schirmer, M. Neurochirurgie. 10. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer, 2005.
- Schramm, C. L., and C. N. Honda. 2010. Co-administration of delta- and mu-opioid receptor agonists promotes peripheral opioid receptor function. *Pain* 151 (3):763-770.
- Shubayev, V. I., M. Angert, J. Dolkas, W. M. Campana, K. Palenscar, and R. R. Myers. 2006. TNFalpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci* 31 (3):407-415.
- Siu, M. K., W. M. Lee, and C. Y. Cheng. 2003. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-alpha, gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 144 (1):371-387.
- Stein, A., A. Yassouridis, C. Szopko, K. Helmke, and C. Stein. 1999. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain* 83 (3):525-532.
- Stein, C. 1991. Peripheral analgesic actions of opioids. *J Pain Symptom Manage* 6 (3):119-124.
- Stein, C. 1993. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg* 76 (1):182-191.
- Stein, C., A. H. Hassan, R. Przewlocki, C. Gramsch, K. Peter, and A. Herz. 1990. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (15):5935-5939.

- Stein, C., M. J. Millan, T. S. Shippenberg, K. Peter, and A. Herz. 1989. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248 (3):1269-1275.
- Stein, C., M. Schafer, and A. H. Hassan. 1995. Peripheral opioid receptors. *Ann Med* 27 (2):219-221.
- Stein, C., and C. Zollner. 2009. Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* (194):495-518.
- Teles, R. M., S. L. Antunes, M. R. Jardim, A. L. Oliveira, J. A. Nery, A. M. Sales, E. P. Sampaio, V. Shubayev, and E. N. Sarno. 2007. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. *J Peripher Nerv Syst* 12 (3):195-204.
- Truong, W., C. Cheng, Q. G. Xu, X. Q. Li, and D. W. Zochodne. 2003. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 53 (3):366-375.
- Verma, S., M. Kumar, U. Gurjav, S. Lum, and V. R. Nerurkar. 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397 (1):130-138.
- Vermeer, P. D., J. Denker, M. Estin, T. O. Moninger, S. Keshavjee, P. Karp, J. N. Kline, and J. Zabner. 2009. MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296 (5):L751-762.
- Vierck, C. J., P. T. Hansson, and R. P. Yeziarski. 2008. Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain* 135 (1-2):7-10.
- Wachtel, M., K. Frei, E. Ehler, A. Fontana, K. Winterhalter, and S. M. Gloor. 1999. Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* 112 (Pt 23):4347-4356.
- Wang, H., and M. W. Wessendorf. 2001. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol* 429 (4):590-600.

- Wang, J. B., Y. Imai, C. M. Eppler, P. Gregor, C. E. Spivak, and G. R. Uhl. 1993. mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (21):10230-10234.
- Weerasuriya, A., S. I. Rapoport, and R. E. Taylor. 1979. Modification of permeability of frog perineurium to [14C]-sucrose by stretch and hypertonicity. *Brain Res* 173 (3):503-512.
- Yabaluri, N., and F. Medzihradsky. 1997. Regulation of mu-opioid receptor in neural cells by extracellular sodium. *J Neurochem* 68 (3):1053-1061.
- Yang, Y., E. Y. Estrada, J. F. Thompson, W. Liu, and G. A. Rosenberg. 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27 (4):697-709.
- Young, W. S., 3rd, J. K. Wamsley, M. A. Zarbin, and M. J. Kuhar. 1980. Opioid receptors undergo axonal flow. *Science* 210 (4465):76-78.
- Yuge, O., M. Matsumoto, L. M. Kitahata, J. G. Collins, and M. Senami. 1985. Direct opioid application to peripheral nerves does not alter compound action potentials. *Anesth Analg* 64 (7):667-671.
- Zimmermann, M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2):109-110.
- Zollner, C., S. A. Mousa, O. Fischer, H. L. Rittner, M. Shaqura, A. Brack, M. Shakibaei, W. Binder, F. Urban, C. Stein, and M. Schafer. 2008. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 118 (3):1065-1073.

Anhang

Abbildungen und Tabellen

ABB 1: QUERSCHNITT EINES PERIPHEREN NERVEN	11
ABB 2: STRUKTUR DER TJ-PROTEINE CLN-1 UND OCCLUDIN	12
ABB 3: VERGLEICH DER PCR-PRODUKTE DER STANDARD-POOLS	27
ABB 4: LINEARE REGRESSIONSGERADE DER STANDARDKURVE	30
ABB 5: ERHÖHUNG DER MECHANISCHEN PFOTENDRUCKSCHWELLE NUR NACH PERINEURALER INJEKTION VON 10 % NACL UND DAMGO IM VERGLEICH ZU 0,9% NACL MIT DAMGO ODER 10 % NACL ALLEIN	38
ABB 6: ZEITVERLAUF DER WIRKUNG VON 10 % NACL PERINEURAL APPLIZIERT AUF DIE MECHANISCHEN PFOTENDRUCKSCHWELLEN	39
ABB 7: PERINEURALE INJEKTION VON 10 % NACL REGULIERT DIE MRNA-EXPRESSION VON CLN-1 HOCH	40
ABB 8: UNVERÄNDERTE MRNA-EXPRESSION VON OCCLUDIN NACH PERINEURALER INJEKTION VON 10 % NACL	41
ABB 9: UNVERÄNDERTE MRNA-EXPRESSION VON CLN-5 NACH PERINEURALER INJEKTION VON 10 % NACL	42
ABB 10: GM6001 VERRINGERT DOSISABHÄNGIG DIE WIRKUNG VON 10 % NACL BEI KOINJEKTION MIT 10 % NACL UND DAMGO	43
ABB 11: GM6001 VERHINDERT DEN ANSTIEG DER CLN-1 MRNA- EXPRESSION NACH PERINEURALER GABE VON 10% NACL	44
ABB 12: CLN-1 PROTEIN NACH PERINEURALER INJEKTION VON 10 % NACL UND NACH GM6001 UND 10 % NACL	45
ABB 13: ERHÖHTE MECHANISCHE PFOTENDRUCKSCHWELLE NACH PERINEURALER INJEKTION VON MMP-9 UND 30 µG DAMGO	46
ABB 14: HERAUFREGULATION DER MRNA-EXPRESSION VON CLN-1, OCCLUDIN UND CLN-5 NACH PERINEURALER INJEKTION VON MMP-9	47

TAB. 1: PRIMER VON TIB MOLBIOL	20
TAB. 2: PROTOKOLLE DER TIEREXPERIMENTE	22
TAB. 3: LAUFBEDINGUNGEN DER QRT-PCR	31

Hersteller und Anbieter

Name	Ort	Land
Abbott	Wiesbaden	Deutschland
Adeforoll	Dietzenbach	Deutschland
AEG	Nürnberg	Deutschland
Aesculap	Tuttlingen	Deutschland
Beckman	Krefeld	Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
Bio-Rad	München	Deutschland
Biozym	Oldendorf	Deutschland
Braun	Melsungen	Deutschland
Calbiochem	San Diego, CA	USA
Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Chemicon	Temecula, CA	USA
Dräger	Lübeck	Deutschland
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Fuji	Düsseldorf	Deutschland
GE Healthcare	Buckinghamshire	Großbritannien
GFL	Burgwedel	Deutschland
GIBCO Invitrogen Corporation	Karlsruhe	Deutschland
Grant Boekel	Camebridgeshire	Großbritannien
Hamilton	Bonaduz	Schweiz
Heraeus	Buckinghamshire	Großbritannien
Hofer	Holliston, MA	USA
IKA	Staufen	Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Janke & Kunkel	Staufen	Deutschland
Mettler Toledo	Giessen	Deutschland
Microsoft Corporation	Redmond, CA	USA

Millipore	Schwalbach	Deutschland
Neolab	Heidelberg	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Schott	Mainz	Deutschland
Shimadzu	Duisburg	Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
SPSS Incorporation	Chicago, IL	USA
TIB MOLBIOL	Berlin	Deutschland
Ugo Basile	Comerio	Italien
Vector Laboratories	Burlingame, CA	USA
Whatman	Dassel	Deutschland

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Heike L. Rittner für die Überlassung des Themas und die fachliche und freundliche Unterstützung, ihren Rat und ihre motivierenden Worte.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christoph Stein für die anregenden Gespräche und die Überlassung des Arbeitsplatzes danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Melanie Busch-Dienstfertig und Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel für die Weitergabe ihrer Erfahrung in Fragen der Methodik, ihre spontane Hilfsbereitschaft und aufmunternden Worte.

Den technischen Assistentinnen Frau Barbara Trampenau und Frau Katharina Kuschfeldt danke ich für den organisatorischen Beistand und die technische Unterstützung bei der Durchführung des Western Blots.

Meiner Mutter und meinem Vater, Frau Gudrun Wrede-Behschnitt und Herrn Karl-Georg Wrede, danke ich von ganzem Herzen für die immerwährende bedingungslose Unterstützung in jeder ihnen möglichen Form, ihren liebevollen Rückhalt und ihr Vertrauen in mich.

Ich danke meinem Partner Herrn Gabriel Hege für seine Unterstützung und Ermutigung und die praktische Hilfe bei computertechnischen Problemen.

Frau Eika Herlyn danke ich für ihre jahrelangen Aufmunterungen und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Esther Johanna Wrede, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Tight Junction-Proteine als Regulatoren der Permeabilität des Perineuriums “ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“