

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Über quantitative und qualitative Veränderungen von
extrazellulären Vesikeln bei neuropathischen Schmerzen
im *Chronic-Constriction-Injury*-Modell der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patricia Fabienne Schmitz

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Timo Brandenburger

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Annemarie Hübers

meinen Eltern gewidmet

Zusammenfassung

Schmerz (Nozizeption) ist eine für den Menschen überlebenswichtige Sinneswahrnehmung. Bei neuropathischen Schmerzen liegt dagegen ein pathologisches Schmerzempfinden vor. Neuropathische Schmerzen entstehen über eine direkte Schädigung von Strukturen des nozizeptiven Systems selbst und präsentieren sich klinisch mit einer komplexen und heterogenen Symptomatik. Die aktuell etablierten Therapiemöglichkeiten sind häufig unzureichend, was einen hohen Leidensdruck für die betroffenen Patienten bedingt. Ein besseres Verständnis über die vielschichtigen und bis dato noch nicht vollständig erfassten Entstehungsmechanismen stellen eine Weiterentwicklung in Diagnostik und Therapie in Aussicht. Neue Erkenntnisse können an dieser Stelle über die Erforschung von extrazellulären Vesikeln gewonnen werden. Extrazelluläre Vesikel (EV) konnten als ein weiterer Mechanismus der Zell-Zell-Kommunikation im menschlichen Organismus identifiziert werden und wirken an vielen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen mit. Es konnte gezeigt werden, dass sich die u.a. Proteinzusammensetzung (das Proteom) eines EVs im physiologischen und pathologischen Zustand der sezernierenden Zellen verändern kann. In dieser Arbeit werden in Ratten nach Induktion von neuropathischen Schmerzen nach dem *Chronic-Constriction-Injury* Modell (nach *Bennet et al.*) Veränderungen in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der extrazellulären Vesikel in Serumproben untersucht. Extrazelluläre Vesikel werden in einem mehrschrittigen Verfahren mittels Polyethylenglykol präzipitiert und durch eine Ultrazentrifugation weiter angereichert. Ein großer Teil dieser Arbeit wird die durchgeführte Methodenetablierung zur Vesikelisolation einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration und die Vesikelgröße in den beiden Versuchsgruppen unterschiedlich ist. Bei der hier verwendeten Methode zur Isolation kann, orientierend an den aktuell gültigen Leitlinien zur Erforschung von EVs, davon ausgegangen werden, dass EVs angereichert werden konnten. Die sich anschließende massenspektrometrische Proteomik-Analyse bestätigt dies nicht und kann zudem keine differentiell regulierten Proteine identifizieren. Dies öffnet Raum für Diskussionen. Unerlässlich für die weitere Erforschung und perspektivisch späteren Einsatz in der klinischen Diagnostik ist die Etablierung einer verlässlichen, reproduzierbaren, einfach durchführbaren und kosteneffizienten Methode.

Summary

Neuropathic pain is a pathological condition in pain sensation and arises from direct injury to components of the nociceptive system. Neuropathic pain is clinically characterized by complex and heterogeneous symptoms. Despite available multimodal treatments therapeutic efficacy remains limited. This highlights the need for a better understanding as for novel diagnostic and therapeutic approaches. Extracellular vesicles (EVs) are newly discovered key mediators of intercellular communication and have gained wide attention for their roles in both physiological and pathological processes. Notably, their proteomic profiles may reflect the state of the cells from which they originate. This study investigates changes in EV proteome composition in a rat model of neuropathic pain. Neuropathic pain is induced via *Chronic-Constriction-Injury* (CCI). EVs were isolated from serum using a multi-step protocol involving polyethyleneglycol (PEG) precipitation and ultracentrifugation. Method development and optimization for EV isolation were a central component of the study. The results indicate differences in EV concentration and size distribution between experimental groups (*Chronic-Constriction-Injury* and *Sham*). Based on current consensus guidelines for EV research, the applied isolation method is widely distributed and considered to yield a successful enrichment of EVs. However, subsequent mass spectrometry-based proteomic analysis did not correlate these findings. In addition no differentially regulated proteins could be identified. Further investigation is needed. These findings highlight both the massive potential and the current limitations of EV-based biomarkers in neuropathic pain research. Establishing a reliable, reproducible, and scalable isolation protocol remains a critical step toward clinical applicability.

Abkürzungsverzeichnis

AK	<i>Apoptotische Körperchen</i>	MISEV	<i>Minimal informational standards for study of extracellular vesicles</i>
ALIX	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>	mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
AMPA	<i>α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>	MSE	<i>Mean Square Error</i>
APOA1	<i>Apolipoprotein A1</i>	MV	<i>Mikrovesikel</i>
APOA4	<i>Apolipoprotein A4</i>	MVB	<i>Multivesicular Body</i>
APOB	<i>Apolipoprotein B</i>	n	<i>Anzahl Messwerte</i>
APOC1	<i>Apolipoprotein C1</i>	NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
APOC2	<i>Apolipoprotein C2</i>	NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
APOC3	<i>Apolipoprotein C3</i>	NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
APOC4	<i>Apolipoprotein C4</i>	NVEP	<i>Nicht vesikuläre extrazelluläre Partikel</i>
APOE	<i>Apolipoprotein E</i>	OP	<i>Operation</i>
CCI	<i>Chronic-Constriction-Injury</i>	PAA	<i>Polyacrylamid</i>
CD63	<i>cluster of differentiation 63</i>	PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
CD9	<i>cluster of differentiation 9</i>	PEG	<i>Polyethylenglykol</i>
Conc.	<i>Partikelkonzentration</i>	PRS	<i>Pfotenrückzugsschwellenwert</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>	PVDF	<i>Polyvinylidendifluorid</i>
ddH ₂ O	<i>doppelt destilliertes Wasser</i>	Q1	<i>erstes Quartil</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>	Q3	<i>drittes Quartil</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>	RIPA	<i>Radio-Immunpräzipitations-Assay-Puffer</i>
EV	<i>Extrazelluläre Vesikel</i>	RSV	<i>Respiratorisches Synzytial-Virus</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>	SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
GABA	<i>Gamma-Aminobuttersäure</i>	sd	<i>Standardabweichung, Standardabweichung</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>	SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
HSV	<i>Herpes-simplex-Virus</i>	SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
IASP	<i>International Association for the study of Pain</i>	sEV	<i>small EV</i>
ICAM-1	<i>Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1</i>	SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimidesensitive-factor attachment receptor</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>	SNI	<i>spared nerve injury</i>
ILV	<i>Intraluminale Vesikel</i>	TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>	TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>	UZ	<i>Ultrazentrifugation</i>
IEV	<i>large EV</i>	VarK	<i>Variationskoeffizient</i>
Max	<i>Maximum</i>	VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
mEV	<i>Medium-sized EV</i>	vWF	<i>von Willebrandt Faktor</i>
Min	<i>Minimum</i>	X10	<i>10. Perzentil</i>
		X50	<i>50. Perzentil</i>
		X90	<i>90. Perzentil</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Nozizeption.....	1
1.2 Neuropathische Schmerzen	4
1.3 Extrazelluläre Vesikel (EV).....	6
1.4 Erforschung von EVs im Kontext neuropathischer Schmerzen	12
1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	12
2 Materialien und Methoden	14
2.1 Materialien.....	14
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Tierversuche: <i>Chronic-Constriction-Injury</i> und Pfotenrückzugsschwellenwert	18
2.2.2 <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA)	20
2.2.3 Präzipitation mit Polyethylenglykol.....	20
2.2.4 Ultrazentrifugation (UZ)	21
2.2.5 <i>Size Exclusion Chromatography</i> (SEC).....	22
2.2.6 Proteinbestimmung und Western Blot (SDS-PAGE) Analyse.....	22
2.2.7 Massenspektrometrie	24
3 Ergebnisse	26
3.1 <i>Neuropathie im Tiermodell: Chronic Constriction-Injury</i> (CCI).....	26
3.2 Partikelanalyse mittels <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	30
3.3 Präzipitation mit Polyethylenglykol.....	37
3.4 Ultrazentrifugation.....	40
3.5 <i>Size Exclusion Chromatography</i> (SEC)	42
3.6 Massenspektrometrie.....	44

4	Diskussion	48
4.1	<i>Neuropathie im Tiermodell: Chronic-Constriction-Injury (CCI)</i>	<i>48</i>
4.2	<i>Quantitative Partikelanalyse mittels Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....</i>	<i>50</i>
4.3	<i>Präzipitation mit Polyethylenglykol.....</i>	<i>51</i>
4.4	<i>Ultrazentrifugation (UZ).....</i>	<i>54</i>
4.5	<i>Size Exclusion Chromatography (SEC)</i>	<i>54</i>
4.6	<i>Massenspektrometrie.....</i>	<i>55</i>
4.7	<i>Schlussfolgerungen</i>	<i>57</i>
	Literatur- und Quellenverzeichnis	58
	Abbildungsverzeichnis	65
	Tabellenverzeichnis	67
	Anhang	70
	Danksagung	76

1 Einleitung

Der Schmerz (Nozizeption) ist eine für den Menschen überlebenswichtige Sinneswahrnehmung. Die IASP (*International Association for the Study of Pain*) definiert Schmerz als eine "unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit tatsächlichen oder möglichen Gewebeschädigungen auftritt oder geschildert wird" [1, 2]. Neuropathische Schmerzen sind dagegen eine pathologische Schmerzform. Durch Schädigungen von Strukturen des nozizeptiven Systems können Veränderungen auf biochemischer, physiologischer, morphologischer und auch genetischer Ebene induziert werden und unangenehme Symptomatiken induzieren.

Die Prävalenz von chronischen neuropathischen Schmerzen liegt in Europa bei 25 – 30% [3]. Trotz stetigem Fortschritt in Medizin und Forschung kann dieses Krankheitsbild oft nur unzureichend zufriedenstellend therapiert werden. Dazu kommt ein oftmals hoher Leidensdruck für die betroffenen Patienten.

Für ein besseres Krankheitsverständnis ist es unerlässlich die zugrunde liegenden Mechanismen der Entstehung und Chronifizierung besser zu verstehen. Für die experimentelle Erforschung von neuropathischen Schmerzen wird auf Tiermodelle zurückgegriffen. Bis dato konnten Veränderungen auf molekularer und plastischer Ebene im nozizeptiven System identifiziert werden, die mit der Entstehung von neuropathischen Schmerzen assoziiert werden [4].

1.1 Nozizeption

Der Schmerz (Nozizeption) ist eine für den Menschen überlebenswichtige Sinneswahrnehmung. Das nozizeptive System ein komplexes und vielschichtiges somatosensorisches System des menschlichen Organismus. Die Wahrnehmung von Schmerzen durch adäquate, d.h. für den menschlichen Organismus potenziell schädigende Stimuli warnt und schützt den Organismus vor einer drohenden oder stattgehabten Verletzung [4, 5]. Diese Reize werden von Schmerzrezeptoren, den Nozizeptoren, detektiert und über afferente Schmerzfasern in das Gehirn weitergeleitet [4, 5]. Das Empfinden von Schmerz und dessen emotionale Bewertung entsteht sekundär durch die Verarbeitung im

Großhirnkortex [4]. Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen eines sensiblen Neurons und befinden sich in fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers. Die höchste Dichte an Nozizeptoren gibt es in der Haut [6]. Nozizeptoren sind in der Lage mechanische, thermische und chemische Reize zu detektieren. Zum nozizeptiven System zählen die aufsteigenden nozizeptiven Fasern und die absteigenden anti-nozizeptiven Fasern, deren Zusammenwirken das nozizeptive System als Ganzes ausmacht [5]. Nozizeptoren können anhand ihrer Leitungseigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden. Die nicht myelinisierten und langsam leitenden Typ-C Fasern und die myelinisierten und schnell leitenden A δ -Fasern. Analog dazu können zwei verschiedene Schmerzerlebnisse unterschieden werden: Ein früher „heller“ Schmerz, welcher gut lokalisierbar ist (über schnell leitende A δ -Fasern weitergeleitet, wichtig für die Auslösung von Schutzreflexen) und ein darauffolgender später „dumpfer“ Schmerz (schlecht lokalisierbar, über langsam leitende Typ-C-Fasern weitergeleitet).

Die aufsteigende nozizeptive Bahn gliedert sich in drei Neurone (s. Abb. 1). Das erste Neuron ist der Nozizeptor mit seinen freien peripheren Nervenendigungen in Haut und Organen und seinem Zellkörper im Spinalganglion. Von dort verlaufen die Fasern über die Hinterwurzel in das Hinterhorn des Rückenmarks. Dort erfolgt eine Umschaltung auf das zweite Neuron. Die Fasern des zweiten Neurons kreuzen auf Segmentebene und verlaufen ab dort in den Vorderseitenstrangbahnen (*Tractus spinothalamicus*) zum Thalamus in die medialen und lateralen Thalamuskern (*Nucleus ventralis posterolateralis* und die *Nuclei intralaminares* und *centromedianus*). Die Nozizeption des Gesichts weicht hiervon ab und erfolgt über den Nervus trigeminus. Fasern aus dem lateralen Thalamus haben ihr Ziel im primären und sekundären somatosensorischen Kortex (*Gyrus postcentralis*). Hier erfolgt die bewusste Wahrnehmung des Schmerzes. Fasern aus den medialen Thalamuskernen ziehen in das limbische System (*Gyrus cinguli*), hier erfolgt die subjektive Bewertung des Empfundenen. An den genannten Verschaltungsstellen kommt es entweder zu einer direkten Verschaltung oder die Verschaltung erfolgt über modulierende, meist hemmende Interneurone. Der erregende Transmitter der direkten Verschaltung ist Glutamat, welcher AMPA- und NMDA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktiviert. Die hemmenden Transmitter der Interneurone sind GABA und endogene Opioide (Endorphine), welche Opioid-Rezeptoren an der prä- und postsynaptischen Membran aktivieren. [5, 6]

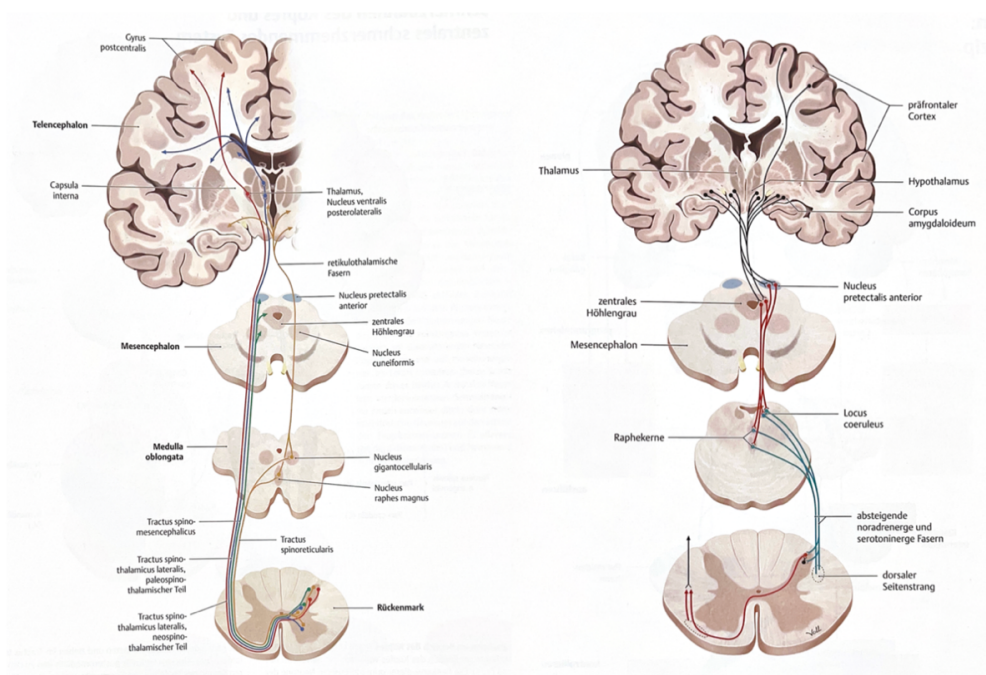


Abb. 1: Die Anatomie des nozizeptiven Systems [6].

Dargestellt auf der linken Seite die aufsteigende nozizeptive Bahn und auf der rechten Seite die absteigende anti-nozizeptive Bahn (übernommen mit Genehmigung des Thieme-Verlages aus Schüncke, M., et al., *Prometheus: LernAtlas der Anatomie (4., überarbeitete und erweiterte Auflage) 2015*)

Die absteigende, anti-nozizeptive Bahn dient der Schmerzhemmung (sog. deszendierende Hemmung). Diese Bahn gliedert sich ebenfalls in drei Neurone (s. Abb. 1). Das erste Neuron liegt im Mittelhirn (periaquäduktales Grau). Dieses wird von Afferenzen aus verschiedenen Regionen des Gehirns angesteuert, wie dem limbischen System, dem präfrontalen Cortex oder dem Hypothalamus. Die Fasern des ersten Neurons ziehen in den Hirnstamm, wo sie im *Nucleus raphe magnus* (Transmitter: Serotonin) und im *Nucleus caeruleus* (Transmitter: Noradrenalin) umschalten. Von hier aus verlaufen die Fasern in das Rückenmark und verschalten dort auf direkt oder indirekt schmerzhemmende Fasern. Direkte schmerzhemmende Fasern ziehen direkt zu den nozizeptiven Synapsen und reduzieren dort deren Aktivität (Transmitter: Serotonin). Indirekt schmerzhemmende Fasern ziehen zu hemmenden Interneuronen, die im Hinterhorn des Rückenmarks liegen (an der Umschaltungsstelle auf das zweite Neuron der nozizeptiven Bahn) und aktivieren diese (Transmitter Noradrenalin). Die Aktivierung der hemmenden Interneurone (Transmitter: GABA, endogene Opiode) führt an dieser Stelle zu einer Unterbrechung der Schmerzweiterleitung. Dieses System der Schmerzmodulation ist ständig aktiv und kann unter Stress zusätzlich intensiviert werden (Stressanalgesie). [5, 6]

1.2 Neuropathische Schmerzen

Neuropathische Schmerzen sind eine pathologische Schmerzform und entstehen als direkte Folge einer Schädigung der Strukturen des nozizeptiven Systems [1, 2]. Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen liegt in Europa bei 25 – 30% [3], weltweit wird sie in verschiedenen Studien zwischen 3% - 17% angegeben [3, 7, 8]. Neuropathische Schmerzen haben ein breit gestreutes klinisches Erscheinungsbild und können interindividuell sehr variabel sein. Typische Symptomatiken sind eine Hyperalgesie (gesteigertes Schmerzempfinden) oder Allodynie (gesteigerte Schmerzempfindlichkeit) sowie spontan einschießenden Schmerzen. Weitere Symptomatiken die beobachtet werden können sind Hypästhesien, eine Hypalgesie (Minus-Symptome) oder Dysästhesien, Kribbelparästhesien und Kälte-/oder Hitzeallodynie (Plus-Symptome) [9]. Es gibt vielfältige Ursachen für neuropathische Schmerzen. Diese können traumatisch, metabolisch, medikamentös-toxisch, infektiös oder autoimmun bedingt sein. Klinisch-ätiologisch lassen sich neuropathische Schmerzen in zentrale und periphere neuropathische Schmerzen unterteilen, die peripheren neuropathischen Schmerzen zudem in eine lokale und generalisierte Form (s. Tabelle 1).

Lokale periphere Neuropathien	Posttraumatische Mononeuropathie Diabetische Mononeuropathie Ischämische Neuropathie Engpasssyndrom Post-Zoster Neuralgie Trigeminusneuralgie
Generalisierte periphere Neuropathien	Diabetische Polyneuropathie Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie Alkohol-toxische Polyneuropathie Dominant-erbliche sensorische Neuropathie
Zentrale Neuropathien	Hirnfarkt Multiple Sklerose Parkinson-Syndrom Querschnittsläsion

Tabelle 1: Klinisch-ätiologische Einteilung von neuropathischen Schmerzen (modifiziert nach Baron) [10]

Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Veränderungen sind bis dato noch nicht vollständig aufgeschlüsselt. Eine strukturelle Läsion im nozizeptiven System kann fehlgeleitete plastische Veränderungen im peripheren und zentralen Nervensystem induzieren [4]. Diese Veränderungen führen zu einer Imbalance der exzitatorischen und inhibitorischen Bahnen und letztendlich zu einer heterogenen klinischen Symptomatik. Vordergründig scheinen periphere und zentrale Sensibilisierungsprozesse verantwortlich zu sein [11]. Eine Sensibilisierung ist auf Veränderungen von intra- und extrazellulären Signalkaskaden sowie Veränderungen in der Expression und Verteilung von Rezeptoren und Ionenkanälen in den nozizeptiven Strukturen zurückzuführen [4, 12]. Auch die durch eine Nervenläsion induzierte Entzündung spielt eine tragende Rolle bei der Entwicklung von chronischen neuropathischen Schmerzen [12, 13]. Eine Sensibilisierung ist primär ein physiologischer Prozess und hat zum Ziel die Funktionen des Nervensystems an die aktuellen Gegebenheiten anzupassen. Die Freisetzung von Schmerzmediatoren wie Prostaglandinen, Histamin, Bradykinin, Kalium oder Protonen aus entzündetem Gewebe führt zu einer Senkung der Reizschwelle der ortständigen Nozizeptoren [4]. Klinisch kommt es zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit am Ort der Verletzung (periphere Sensibilisierung). Als Folge einer Überaktivität in der Peripherie kommt es zu einer zentralen Sensibilisierung in Strukturen des zentralen Nervensystems durch Veränderungen der Ionenkanal- und Rezeptordichte an den Synapsen im Rückenmark und im Gehirn. Zudem kann es auch zu einer Umstrukturierung von Neuronen im Hinterhorn und Rückenmark kommen [10]. Eine ektope Aktivität wie bei spontan einschießenden Schmerzen sind Folge von fehlgeleiteten Anpassungsprozessen im Nervensystem [4, 14] und können sowohl in den geschädigten Neuronen als auch in benachbarten, intakten Neuronen generiert werden [15]. Langfristig ist durch solche fehlgeleiteten Anpassungsvorgänge eine Chronifizierung der Symptomatik möglich [10].

Die Diagnosestellung stützt sich primär auf Anamnese und klinischer Untersuchung und ergänzende funktionelle klinisch-apparative Diagnostik [16].

Die Therapie von neuropathischen Schmerzen ist aufgrund der komplexen und heterogenen klinischen Präsentation herausfordernd. Im Sinne eines interdisziplinären und multimodalen Therapiekonzeptes kann neben einer medikamentösen auch eine Psycho-, Ergo- oder Physiotherapie erwogen werden. Hierfür besteht allerdings noch keine ausreichende Evidenz [9]. Gemäß der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie [16] steht die pharmakologische Therapie im Vordergrund. Die erste Wahl sind Antikonvulsiva (Pregabalin,

Gabapentin) sowie tri- und tetrazyklische Antidepressiva. Opioide sind ebenfalls wirksam, hier sind jedoch das Nebenwirkungsprofil und das Abhängigkeitspotential therapielimitierend. Mit den etablierten medikamentösen Therapieoptionen kann oftmals keine Schmerzfreiheit erreicht werden [9]. Als realistisches Therapieziel gilt eine effektive Schmerzreduktion von >30% [9], die Verbesserung von Lebensqualität und Funktionalität sowie der Erhalt der Arbeitsfähigkeit und der sozialen Teilhabe [16]. Eine kausale Mechanismus-basierte Therapie ist bis dato nicht existent.

1.3 Extrazelluläre Vesikel (EV)

Extrazelluläre Vesikel (EV) ist ein Überbegriff für eine heterogene Gruppe von Vesikeln. EVs stellen einen Mechanismus der interzellulären Kommunikation im menschlichen Organismus dar [17]. Sie transportieren Biomoleküle wie Proteine, Lipide, mRNA- oder DNA- über den Extrazellulärraum zu einer Zielzelle [18]. EVs sind in der Lage phänotypische und molekulare Veränderungen in ihrer Zielzelle zu induzieren, indem sie ihren Inhalt an diese abgeben [19]. EVs konnten bis dato in fast allen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel oder Liquor nachgewiesen werden [20-24]. Eine Zelle ist in der Lage verschiedene EV-Subtypen zu sezernieren [25]. EVs sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben und können sich selbst nicht replizieren [26-28].

Die ersten Beobachtungen zu diesen Vesikeln machten *Chargaff et al.* 1946, als sie die Wirkung von Thromboplastin in der Blutgerinnung untersuchten [29]. 1967 gelangen *Woolf et al.* die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen und sie bezeichneten diese Vesikel als „platelet dust“ [30]. Von hier an folgten in geringen Zeitabständen neue Erkenntnisse [31]. 1971 konnten *Crawford et al.* zeigen, dass diese Vesikel aus Lipiden aufgebaut und mit Molekülen beladen sind [32]. 1974 war eine Studie von *Nunez et al.* die erste, die eine Entstehung dieser Vesikel über eine Fusion eines *multivesicular body* (MVB)s mit der Zellmembran beschrieb [31, 33]. 1987 definierten *Johnstone et al.* und *Harding et al.* den Begriff Exosomen für ebendiese Vesikel, die über eine Fusion eines *MVBs* mit der Plasmamembran entstehen [21, 34, 35]. Mit zunehmenden technischen Möglichkeiten seit den 90er Jahren kam es zu einem exponentiellen Anstieg von Publikationen und Wissen auf diesem Forschungsfeld. Ein großer Durchbruch wurde 2007 erzielt, als in einer funktionellen Studie gezeigt werden konnte, dass die in EVs enthaltenen RNA-Moleküle in der Lage sind, die

Proteinsynthese in der Zielzelle zu beeinflussen [24, 36]. 2011 gründete sich mit der *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) eine Forschungsgemeinschaft, welche experimentelle Standards festlegt und den Forschenden eine Plattform zum Austausch bietet [17, 26, 31]. Von Beginn an existierte keine einheitliche Nomenklatur. Es wurden viele verschiedene Begriffe synonym verwendet um diese Vesikel zu beschreiben. 2011 wurde der Überbegriff „Extrazelluläre Vesikel“ (EV) eingeführt und eine Unterteilung der EVs in die drei Subtypen Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen (s. Abb. 2) [17, 37].

Diese drei Subtypen wurden anhand ihrer Größe und ihres Entstehungsmechanismus unterschieden [37].

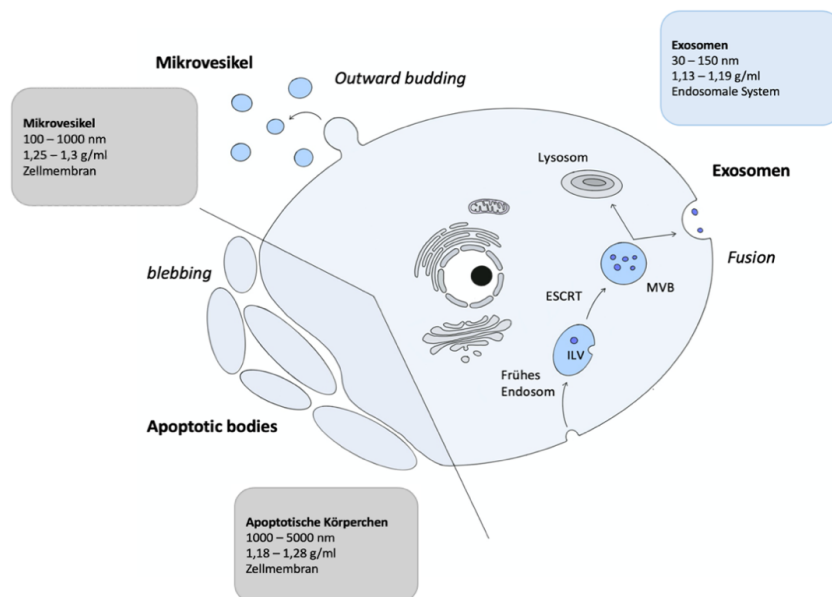


Abb. 2: Übersicht über die Biogenese der drei Subtypen von extrazellulären Vesikeln (Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen) modifiziert nach Gurung et al. [38].

ILV = Intraluminale Vesikel, MVB = *Multivesicular Body*, ESCRT = *Endosomal Sorting Complex required for Transport*. (Abbildung erstellt mit der Applikation Procreate von Savage Interactive, Version 5.3.1)

Exosomen sind die kleinsten Vesikel mit einer Größe zwischen 30 - 150 nm. Sie werden im endosomalen System über eine Invagination der endosomalen Membran gebildet (als intraluminale Vesikel, ILV). Dort werden sie mit Molekülen beladen und in einem *multivesicular body* (MVB) zur Zellmembran transportiert. Bei der Fusion mit der Zellmembran werden die Exosomen in den Extrazellulärraum frei gegeben. Mikrovesikel (MV; 100 - 1000 nm) entstehen

direkt über die Abschnürung an der Zellmembran. Apoptotische Körperchen (AK; 1000 - 5000 nm) sind die größten Vesikel und entstehen im Rahmen des programmierten Zelltods einer Zelle. [38]

Mittlerweile ist bekannt, dass diese drei Vesikelsubtypen überlappende physikobiochemische (betreffend Größe, Dichte und Markerprofil) Eigenschaften besitzen und eine exakte Diskriminierung zwischen den einzelnen Vesikelsubtypen nicht ganz einfach ist. Aktuell wird von der *ISEV* eine deskriptive Bezeichnung empfohlen, sollte der Ursprung der EVs nicht sicher sein. So kann bspw. nach der Vesikelgröße in *small EVs* (sEVs, < 200nm), *medium EVs* (mEVs, 200 – 800 nm) oder *large EVs* (lEVs, > 1000 nm) unterteilt werden [26, 39]. Die Begriffe Exosomen und sEVs sind nicht synonym zu verwenden [26]. Der Extrazellularraum eines Organismus enthält eine Mischpopulation bestehend aus verschiedenen EV-Subtypen [40].

Die Komposition des Vesikelinhaltes ist hochspezifisch und hängt von weiteren Faktoren, wie dem Zelltyp, dem Zustand der sezernierenden Zelle (physiologisch oder pathologisch) sowie dem Subtyp des Vesikels ab [40, 41]. Verschiedene Mechanismen sind aktiv am sog. *Sorting* von Biomolekülen in die *ILVs*, den späteren Exosomen, hinein beteiligt [42]. Dazu gehört der *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) mit seinen akzessorischen Proteine [24]. Neben dieser Proteinmaschinerie sind noch weitere Mechanismen beschrieben [43]. Bisherige Studien haben signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Vesikelinhaltes von EVs unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen identifizieren können [27]. Die Aufnahme von EVs in die Zielzelle erfolgt über sowohl unspezifische als auch spezifische, Rezeptor-abhängige Mechanismen [44]. Beschrieben sind bis dato eine Liganden-Rezeptor-Interaktion an der Zellmembran, die direkte Fusion des Vesikels mit der Zellmembran [45, 46] oder die Aufnahme des Vesikels in die Zelle über Endozytose [44, 47]. Die Halbwertszeit von EVs in der Blutzirkulation wird verschieden beziffert und variiert zwischen 2 min bis 5,5 h, wohingegen sich EVs noch deutlich länger in soliden Organen nachweisen lassen [48, 49].

Für die Erforschung von EVs sind valide und reproduzierbare Isolations- und Charakterisierungsmethoden notwendig. In der Literatur ist ein breites Spektrum an verwendeten Methoden mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen beschrieben [26, 28, 50].

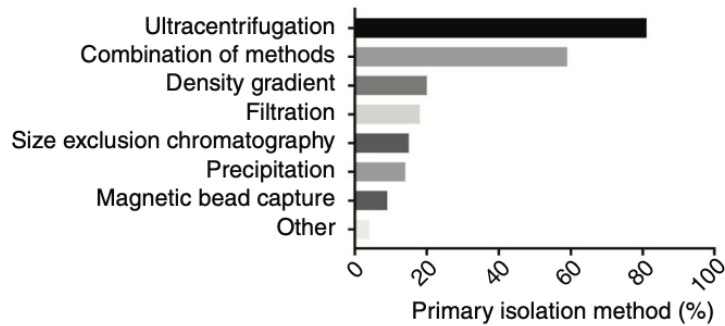


Abb. 3: Auflistung der prozentual am häufigsten verwendeten primären Isolationsmethode zur Isolation von extrazellulären Vesikeln (EVs) unabhängig vom verwendeten Probenmaterial [50]. Online-Umfrage unter Forschenden der *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)*

Die Ultrazentrifugation (UZ) ist die am häufigsten verwendete primäre Isolationsmethode [50]. Weit verbreitet ist die Verwendung eines mehrstufigen Verfahrens bzw. die Kombination verschiedener Methoden [50], v.a. bei der Verwendung eines komplexen Probenmaterials wie Blutplasma oder -serum. Die weiteren häufig verwendeten Methoden zur Isolation von EVs sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Verwendung einer Präzipitationsmethode ist mit einer Häufigkeit von 14 % angegeben [50]. Für eine weitere Aufreinigung nach einer primären Isolationsmethode wird am häufigsten die Ultrazentrifugation verwendet [50].

Das hier verwendete Probenmaterial ist Blutserum. Die Anreicherung von EVs aus Serum- oder Plasmaproben birgt einige methodische Herausforderungen. In Tabelle 2 sind die Konzentrationen der hier relevanten Blutbestandteile dargestellt. Blutplasma oder -serum sind trotzdem häufig verwendete Probenmaterialien in der Erforschung von EVs [51, 52].

Zellen/Partikel	Partikelkonzentration/ml (Blut)
Erythrozyten	$4 - 6 \times 10^9$
Leukozyten	$4 - 11 \times 10^6$
Thrombozyten	$150 - 450 \times 10^6$
EVs	1×10^{10}
VLDL	$0,7 - 8,6 \times 10^{13}$
LDL	$0,6 - 1,2 \times 10^{15}$
HDL	$1,4 - 2,3 \times 10^{16}$

Tabelle 2: Blutkonzentration (pro Milliliter Blut (ml)) der hier relevanten Bestandteile [52, 53]

Blut besteht aus zellulären Bestandteilen, wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, daneben kommen Gerinnungsfaktoren und weitere Proteine wie Albumin oder Lipoproteine vor [52]. Es bestehen zudem stark divergierende Mengenverhältnisse der einzelnen Bestandteile. Plasma sowie Serum enthalten ca. 60 – 80 mg/ml an Proteinen [52]. Zum größten Teil sind es Proteine wie Albumin, Fibrinogen (Serum), Immunglobuline und Komplementfaktoren sowie viele weitere weniger abundante Proteine. In Relation dazu nehmen EVs einen sehr geringen Teil ein. Geschätzt wird die EV-Fraktion auf ca. 50 nl/ml Plasma [52], d.h. umgerechnet ca. 0,00005% des Plasmavolumens. Folglich liegen die EV-assoziierten Proteine, die eigentlichen Zielproteine innerhalb der EVs in einer verhältnismäßig extrem niedrigen Konzentration vor [52]. Es wird geschätzt, dass EVs im Plasma von gesunden Menschen in einer Konzentration zwischen 10^7 bis 10^9 EVs/ml Plasma vorliegen. Im Vergleich dazu liegen Lipoproteine gesamthaft mit einer Konzentration von ca. 10^{16} Lipoproteine/ml Plasma vor [54]. Die Separation von EVs und Lipoproteinen (v.a. *HDL*) ist eine bekannte Herausforderung bei der Isolation von EVs aus Serum oder Plasma. Die Ursache für die Schwierigkeit in der Auftrennung von EVs und Lipoproteinen liegt in deren überlappenden physikochemischen Eigenschaften (Größe und Dichte) bei zugleich vorliegenden stark divergierenden Mengenverhältnissen im Serum [52, 54, 55]. Lipoproteine sind ein wesentlicher Bestandteil des Fettsäurestoffwechsels und setzen sich aus Lipiden und Proteinen zusammen. Sie dienen Fettsäuren als Transportmittel im Blutkreislauf. Die verschiedenen Lipoproteine unterscheiden sich in ihrer Dichte und ihrer Funktion (s. Tabelle 3). Nach ihrer Dichte werden Chylomikronen, das *high-density lipoprotein (HDL)*, *low-density lipoprotein (LDL)*, *intermediate-density lipoprotein (IDL)* und das *very low-density lipoprotein (VLDL)* unterschieden. Die zugehörigen Apolipoproteine sind teils spezifisch für eine Lipoprotein-Untergruppe, so ist das Apolipoprotein APOA1 mit *HDL* assoziiert [52, 54]. Die Lipoproteinlevel im Blut unterliegen starken interindividuellen und tageszeitlichen Schwankungen und werden zudem beeinflusst durch Faktoren wie die Diät, Genetik und Rasse [53]. Die ungewollte Ko-Isolation betrifft in diesem Kontext v.a. das *HDL*. *HDL* hat überlappende Dichteigenschaften mit EVs [54, 55].

Partikel	Größe (nm)	Dichte (g/ml)
Chylomikronen	75 - 1200	< 0,95
High density lipoprotein (HDL)	7 – 13	1,063 – 1,21
Intermediate density lipoproteins (IDL)	23 – 27	1,006 – 1,019
Low density lipoprotein (LDL)	18 – 23	1,019 – 1,063
Very low density lipoprotein (VLDL)	30 – 80	0,95 – 1,006
Exosomen	20 – 200	1,08-1,21
Mikrovesikel (MV)	100 - 1000	
Apoptotic bodies (AK)	1000 – 5000	

Tabelle 3: Physikochemische Eigenschaften (Größe und Dichte) von Extrazellulären Vesikeln (EVs) und Lipoproteinen [53, 56]. Die Größe ist angegeben in Nanometer (nm), die Dichte ist angegeben in Gramm pro Milliliter (g/ml).

Die gängigen Isolationsverfahren trennen nach physikalischen oder biochemischen Eigenschaften wie Größe oder Dichte auf. Es ist sinnvoll zwei Isolationsverfahren mit unterschiedlichen Auftrennungseigenschaften zu kombinieren. Dadurch kann nachweislich die Kontamination durch Lipoproteine und andere Proteine reduziert werden, jedoch ist dabei auch ein signifikanter Mengenverlust an angereicherten EVs möglich [53].

Zur Etablierung allgemeingültiger Standards bei der Erforschung der extrazellulären Vesikel hat die *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)* ein fünf-stufiges Charakterisierungsverfahren definiert [17, 26]. Die aktuelle Version ist eine Weiterentwicklung der Version von 2018 [26]. Proteine der Kategorien eins und zwei dienen jeweils dem Nachweis von EV-Bestandteilen. Kategorie eins beinhaltet ein Transmembranprotein, welches mit einer Plasma- oder endosomalen Membran assoziiert ist, dazu zählen u.a. die Tetraspannine wie bspw. CD63. Kategorie zwei beinhaltet den Nachweis eines cytosolischen Proteins wie bspw. Proteine des *ESCRT*-Komplexes mit seinen akzessorischen Proteinen (z.B. das *TSG101*). In Kategorie drei soll das Isolat auf das Vorhandensein von Kontaminanten hin untersucht werden. Typische Kontaminanten bei Serumproben sind Albumin und Lipoproteine. Die Kategorien vier und fünf sind optional und zielen auf den Nachweis von Proteinen bestimmter Zellkompartimente (Kategorie vier) oder weiterer Kontaminanten (Kategorie fünf) ab [26].

Extrazelluläre Vesikel konnten bis dato in fast allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden [57]. Diese sind betreffend ihrer Zusammensetzung, potenzieller Kontaminanten und dem Spektrum an vorhandenen extrazellulären Vesikeln sehr heterogen, was die Vergleichbarkeit der teilweise sehr unterschiedlichen Studien erschwert. So ist ein Isolationsprotokoll nicht auf jedes Probenmaterial gleichermaßen anwendbar oder muss daraufhin angepasst werden [58]. Bei der Auswahl der Methode sollte das Anforderungsprofil der nachfolgenden Analysen sowie das verwendete Probenmaterial berücksichtigt werden. Die Wahl der Methode kann die nachfolgenden Ergebnisse beeinflussen [59].

1.4 Erforschung von EVs im Kontext neuropathischer Schmerzen

Im Allgemeinen sind EVs in der Lage über ihren Inhalt phänotypische und molekulare Veränderungen in ihrer Zielzelle zu induzieren [19]. Sie sind an physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt [41] und sind auch im Kontext neuropathischer Schmerzen relevant [60]. Bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen ist die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Neuronen, Gliazellen und Entzündungszellen und damit die Interaktion auf molekularer Ebene bestimmend [61, 62]. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer peripheren Nervenläsion die von Neuronen, Gliazellen und Immunzellen sezernierten EVs die durch die Läsion initiierten biologischen Prozesse modulieren können [63-65]. EVs fördern die Aktivierung von Gliazellen und Schwannzellen, regulieren die neuroinflammatorische Reaktion und Angiogenese und sind an der axonalen Regeneration nach einer Nervenläsion beteiligt [62, 66]. EVs werden zunehmend als Therapiestrategie von neuropathischen Schmerzen erforscht, indem sie als *Carrier* für spezifische Biomoleküle (Proteine, mRNA) dienen könnten. In Versuchen mit Stammzellen konnten gezeigt werden, dass die Aufnahme von Stammzell-EVs in Schwannzellen die Proliferation von Schwannzellen und die Regeneration des Nervens fördert [62, 67].

1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Die Behandlung von neuropathischen Schmerzen ist herausfordernd und häufig unzureichend. In den letzten Jahren gab es nur wenige neue Erkenntnisse in der Aufschlüsselung des zugrundeliegenden Pathomechanismus. Ein neuer und

vielversprechender Forschungsansatz in vielen Bereichen der medizinischen Grundlagenforschung ist die Analyse von EVs und ihres Inhaltes im Kontext einer bestimmten Pathologie. Es ist bekannt, dass der Inhalt der EVs einen Einfluss auf Signalkaskaden sowie die Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren der Zielzelle hat [40]. Für die Erforschung von EVs im Kontext von neuropathischen Schmerzen gibt es bis dato nur wenige Studien.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst eine Isolationsmethode für die Anreicherung von EVs aus Serumproben der Ratte zu etablieren. Hierzu wird ein mehrstufiges Isolationsverfahren angestrebt. Untersucht werden sollen quantitative und qualitative Veränderungen von extrazellulären Vesikeln im Kontext von neuropathischen Schmerzen. Dazu werden in Versuchstieren nach dem *Chronic-Constriction-Injury (CCI)* Modell ein peripherer neuropathischer Schmerz induziert. Aus Serumproben dieser Versuchstiere werden extrazelluläre Vesikel (EVs) angereichert und ihre Größe, Konzentration und ihr Inhalt (Proteom) analysiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Differentiell regulierte Proteine können möglicherweise einen Rückschluss auf die Pathophysiologie von neuropathischen Schmerzen zulassen, in der Diagnostik verwendet werden sowie ein mögliches Therapietarget darstellen.

2 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien aufgelistet, die Beschreibung der Methoden folgt im zweiten Teil des Kapitels.

2.1 Materialien

Tabellarische Aufzählung der hier verwendeten Materialien.

Antikörper

Anti-CD63	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, Vereinigte Staaten)
Anti-APOA1	MyBiosource (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) Polyclonal Antibody to Apolipoprotein A1 (<i>rabbit</i>)
Anti-TSG101	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Anti-Albumin	
Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) Page Ruler™ Plus

Geräte

Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Life Sciences (Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten) Optima XPN-80, XPN13MO7
Zentrifuge	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland) Eppendorf 5417R
Particle Tracking Analyzer	Particlemetrix GmbH (Inning am Ammersee, Deutschland) ZetaView ^R Evolution-System

Magnet-Rührplatte	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) Magnetrührer Variomag, Mono
Magnet-Heizrührplatte	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland) Heizplatte/Magnetrührer MR 2002
Plattformschüttler	IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland) Plattformschüttler MTS4
Vortex-Mixer	Scientific Industries (Bohemia, New York, Vereinigte Staaten) Vortex Genie Touch Mixer
Microplate Reader	Biotek Instruments (Winooski, Vermont, Vereinigte Staaten) Synergy 2 Microplate Reader (Software Gen5™ Version 1.11)
Mikrotestplatten	Sarstedt, (Nümbrecht, Deutschland) Mikrotestplatte 96-Wel-
Electrophoresis Power Supply	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) Electrophoresis Power Supply 1001
Western Blot Detektionskammer	Decon Science Tec. GmbH (Hohengandern, Deutschland) DeVision DBOX
Western Blot Detektion Kammersystem	Photometrics (Peabody, Massachusetts, Vereinigte Staaten) Cool Snap HQ ² Kamera
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland) LA230S
Aesthesiometer	Ugo Basile S.r.l., (Gemonio (VA), Italien) Dynamic Plantar Aesthesiometer

Software

GelPro Analyzer	Media Cybernetics (Rockville, Maryland, Vereinigte Staaten)
Endnote 21	Clarivate Analytics (Philadelphia, Pennsylvania, Vereinigte Staaten) Version 21.5 for Macintosh
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, Vereinigte Staaten). Version 16.98
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, Vereinigte Staaten). Version 16.98
Microsoft Word	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, Vereinigte Staaten). Version 16.98
ImageJ	ImageJ, Open Source Software
GIMP	GNU General Public License
Procreate (iPadOS)	Savage Interactive (Hobart, Tasmanien, Australien) Version 5.3.1

Verbrauchsmaterialien

Pipette	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland) Eppendorf Research Pipettensatz (100 – 5000 µl)
Pipettierspitzen	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Reagiergefäße und Röhren	Sarstedt, (Nümbrecht, Deutschland) SafeSeal Reagiergefäße und Röhren
Western Blot Membranen	Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten) Immobilon® -P PVDF Membran

Substanzen und Puffer

Polyethylenglykol (8.000Da)	Sigma Aldrich (St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)
Sephadex™ G-100	GE Healthcare (Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten)
Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) Pierce™ BCA Protein Assay Kit
Enhanced Chemoluminescence Substrate (ECL)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) Clarity™ Western ECL Substrate
Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	VWR Chemicals Int. (Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
1,5 M TRIS pH 8,8	
1,25 M TRIS pH 6,8	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Schuchardt oHG, (Hohenbrunn, Deutschland)
Ammoniumperoxidsulfat (10%)	
Loading Buffer	7ml Aqua dest., 500mM Tris-HCL (pH 6,8), 2ml Glycerol, 1g SDS, 30mg 0,5%iges, Bromphenolblau, 1:10 in Mercaptoethanol
Running Buffer	3 g Sigma 7-9, 14,4g Glycin, 1g SDS, 1l Aqua dest.
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten)
RIPA Puffer pH8	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS

Transfer Puffer	12 mM Sigma 7-9, 96 mM Glycin und Aqua destilliert
TBS-T Puffer	6 g Sigma 7-9, 22,2 g NaCl, 2 ml Tween, Aqua destilliert, pH 8

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche: *Chronic-Constriction-Injury* und Pfotenrückzugsschwellenwert

Tierversuche erfolgen nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW, Dezernat 81 Tierschutz/Tierversuche). Das Aktenzeichen lautet: 84-02.04.2015.A033. Projektnummer G33/15.

Verwendet werden 18 männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 220g. Die Aufteilung ($n = 18$) erfolgt randomisiert in die *Chronic-Constriction-Injury* (CCI)- oder Kontrollgruppe (*Sham*)-Gruppe. Die Versuchsdauer beträgt 28 Tage (s. Abb. 4). Es finden drei Testungen zur mechanischen Hypersensitivität, dem Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS) an den Tagen Null, 14 und 28 statt. Die Operationen an den Versuchstieren finden an Tagen Null und 14 statt.

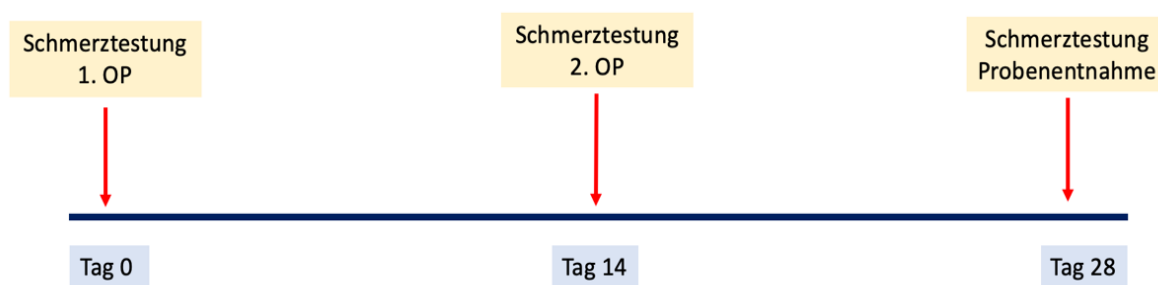


Abb. 4: Versuchsablauf der Tierversuche. Der Versuchszeitraum beträgt 28 Tage. OP = Operation

Die Allgemeinnarkose wird gewichtsadaptiert mit Pentobarbital (60 mg/kg KG) durchgeführt. Unter aseptischen Bedingungen erfolgt die stumpfe Präparation durch die Gewebeschichten und die Darstellung des *Nervus ischiadicus*. Den Versuchstieren der CCI-Gruppe werden

proximal der Trifurkation des *Nervus ischiadicus* in den *Nervus peroneus communis*, *Nervus tibialis* und den *Nervus suralis* (nach Bennett et al. [68]) vier Ligaturen im Abstand von jeweils 1 mm, lose und mit einem doppelten Knoten, um den *Nervus ischiadicus* platziert (s. Abb. 5). Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (*Sham*) wird der *Nervus ischiadicus* lediglich dargestellt, hier erfolgt keine Manipulation am Nerven. Muskulatur, Weichgewebe und Haut werden schichtweise verschlossen. An Tag 14 werden den CCI-Versuchstieren die Ligaturen in einer wie oben beschriebenen Operation entfernt. Bei den *Sham*-Versuchstiere wird wie an Tag null der *Nervus ischiadicus* dargestellt ohne diesen zu manipulieren. An Tag 28 erfolgt die Beendigung des Versuchs für beide Gruppen sowie die Probengewinnung.

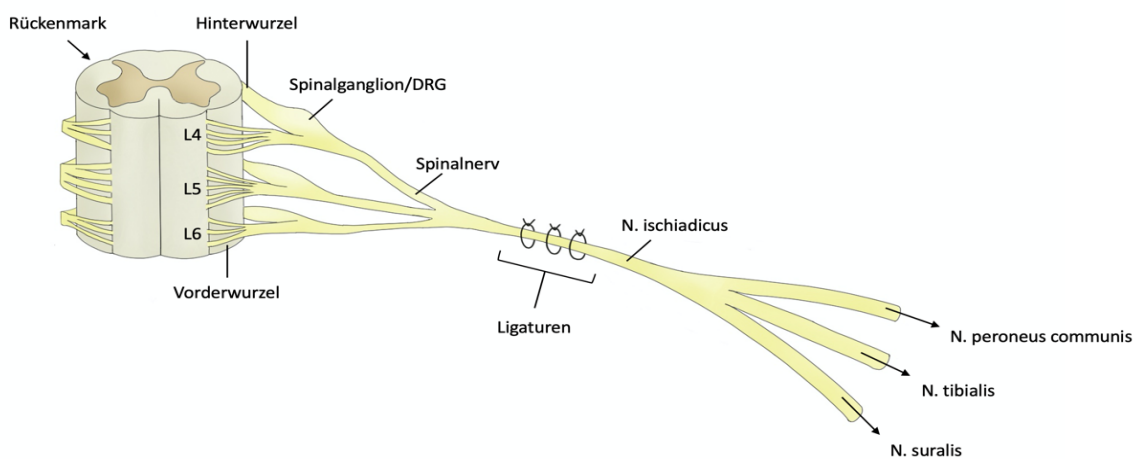


Abb. 5: Chronic-Constriction-Injury (CCI) Modell nach Bennett et al. [68]. N. = Nervus. Abbildung modifiziert nach Austin et al. [69] (erstellt mit der Applikation Procreate von Savage Interactive, Version 5.3.1)

Die mechanische Sensitivität im Innervationsgebiet des *Nervus ischiadicus* wird über den Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS) quantifiziert. Der Pfotenrückzugsschwellenwert, gemessen in Gramm (g), ist eine mechanische Reizschwelle. Gemessen wird in ruhiger Umgebung und nach 30 min Eingewöhnungszeit. Pro Tier werden drei bis fünf Messungen durchgeführt. Die Messung wird mit dem *Dynamic Plantar Aesthesiometer* durchgeführt. Für die Messung übt ein Filament eine sich steigernde mechanische Stimulation auf die plantare Hinterpfote (sensibles Innervationsgebiet des *Nervus ischiadicus*) aus. Die maximal aufgebrauchte Kraft (in gramm, g) und die dazugehörige Latenzzeit (in Sekunden, s) werden gemessen, bis das Versuchstier die Pfote zurückzieht. Die Messung des PRS mit dem *Dynamic Plantar Aesthesiometer* ist eine etablierte und häufig verwendete Methode und erbringt

gemäß vorhandener Literatur zuverlässige Messergebnisse [69]. Eine Herabsetzung des PRS stellt eine Verhaltensänderung dar, die sich am ehesten durch die Induktion einer peripheren Mononeuropathie erklären lässt.

2.2.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Die *Nanoparticle Tracking Analysis* (hier verwendet Particlemetrix, ZetaView^R) ist ein optisch-basiertes Verfahren für die Charakterisierung (Einzelpartikelmessung) von Nanopartikeln. Sie ist ein etabliertes und häufig angewandtes Verfahren für die Charakterisierung von EVs [50]. Mittels *NTA* können die Partikelgröße, die Partikelgrößenverteilung und die Partikelkonzentration bestimmt werden. Die *NTA* detektiert in einem Größenbereich zwischen 30 – 1000 nm bei einer Partikelkonzentration von 10^7 – 10^9 Partikel/ml.

Für die *NTA*-Messungen werden die Serumproben der *CCI*- und *Sham*-Gruppe verwendet. Die *NTA*-Messung findet vor dem mehrstufigen Isolationsprozess statt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch PEG-Rückstände zu vermeiden. Die Proben werden vor der Messung mit *Phosphat buffered saline (PBS)* auf eine Konzentration im Bereich $2,0$ – $2,8 \times 10^7$ verdünnt. Die Messung erfolgt in einem Dispersionsmedium (Wasser). Die Probe wird in einer geschlossenen Kammer von einem Laserstrahl belichtet. Die Nanopartikel streuen dieses Licht in Abhängigkeit von ihrer Bewegungsaktivität (*Brownsche* Molekularbewegung) durch das Medium. Größere Partikel bewegen sich dabei langsamer als kleinere. Diese Lichtstreuung wird von einem Mikroskop und einer hochsensitiven Kamera erfasst. Die Software (ZetaView Software 8.04.02) kann mit diesen Bildern die Diffusionskonstante der sich bewegenden Nanopartikel bestimmen. Mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung kann der hydrodynamische Durchmesser der Partikel bestimmt und die Messwerte zu Partikelgröße, -konzentration und Größenverteilung errechnet werden [70].

2.2.3 Präzipitation mit Polyethylenglykol

Für die Etablierung der Methode werden Vorversuche mit gepooltem Rattenserum durchgeführt. Die primäre Isolationsmethode ist eine Präzipitation mit Polyethylenglykol (PEG, 8000 Da). Die Präzipitation ist ein Ausfällungsverfahren. Das hier verwendete Präzipitat ist Polyethylenglykol mit einer Partikelgröße von 8.000 kDa. Polyethylenglykol ist stark hydrophil. Durch die Bindung von Wasser reduziert PEG die Löslichkeit der gelösten Moleküle

und fördert die Bildung von Aggregaten [71], welche folglich ebenso leichter ausfallen können. Durch eine anschließende Zentrifugation werden die ausgefällten Partikel pelletiert und vom Überstand getrennt.

Für die PEG-Lösung werden 20 g PEG (8.000 Da) und 98 ml ddH₂O auf einer Rührplatte bei ca. 90°C vermischt. Anschließend wird das Gemisch unter einer Sterilbank durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die Isolation ist ein mehrschrittiger Prozess und erfolgt an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Präanalytisch erfolgt eine Aufreinigung der Serumproben durch zweimalige Zentrifugation (3000 g, 12°C für 30 min) um größere Kontaminanten und Zelldebris zu entfernen. Die PEG-Lösung wird mit Complete (40 µl/ml PEG Stock) versetzt. Die Probe wird mit PEG versetzt, sodass das Präzipitat 1/5 des Endvolumens ausmacht. Die Probe wird gut durchgemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag werden die Proben pelletiert (1.500 g für 30 min bei 22°C) und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wird zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Das Pellet wird dem Ausgangsvolumen entsprechend in PBS gelöst und ein weiteres Mal mit PEG versetzt (s.o.). Nach guter Durchmischung wird es erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben werden am dritten Tag erneut zentrifugiert (1.500 g für 30 min bei 22°C) und das Pellet in 200 µl PBS gewaschen. Je nach Verwendungszweck werden die Pellets in dem dafür entsprechenden Medium resuspendiert.

2.2.4 Ultrazentrifugation (UZ)

Häufig werden mehrere Verfahren zur Isolation von EVs schrittweise kombiniert [26]. So soll eine spezifischere Anreicherung der Vesikel erreicht, das Vorhandensein von störenden Kontaminanten reduziert und damit insgesamt die Qualität der Anreicherung erhöht werden [50, 58]. Die Ultrazentrifugation ist ein mechanisches Trennverfahren. Die Auftrennung der in Lösung liegenden Teilchen erfolgt durch das Einwirken starker Zentrifugalkräfte auf die Lösung. Die Zentrifugalkraft wird durch einen Rotor innerhalb einer Vakuumkammer erzeugt. Für die Auftrennung ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen entscheidend. Dieser Faktor ist abhängig von der Größe, der Dichte und der Form der gelösten Teilchen. Unter der Sedimentationsgeschwindigkeit versteht man die Geschwindigkeit, mit der sich ein Partikel innerhalb eines flüssigen Mediums absetzen kann. Durch die Rotation in der Zentrifuge wirkt die Zentrifugalkraft auf die Lösung. Die sich in der Lösung befindlichen Partikel werden abhängig von ihrer Dichte unterschiedlich stark nach außen gedrückt. Die Partikel

sedimentieren unterschiedlich schnell, schwere und dichte Partikel sedimentieren schneller als leichte oder weniger dichte Partikel.

Für die Ultrazentrifugation werden die Pellets nach der PEG-Präzipitation in 10 ml PBS gelöst und bei 110.000 g für 2 h bei 4°C zentrifugiert (*Beckman Coulter Life Sciences, Optima XPN-80, SW40 Rotor, Krefeld, Germany*). Anschließend wird das Pellet in 100 µl Medium, je nach Verwendungszweck (PBS, Radio-Immunpräzipitations-Assay-Puffer (RIPA), Natriumchlorid (NaCl)) resuspendiert.

2.2.5 Size Exclusion Chromatography (SEC)

Mittels *Size Exclusion Chromatography* sollen APOA1-positive Lipoproteine (*HDL*) von den EVS aufgetrennt werden [72]. Als Trennmedium wird Sephadex™ G-100 (Fraktionierungsbereich 4 – 150 kDa) verwendet. Sephadex™ G-100 ist ein poröses Gel aus quervernetzten Dextranen. Eine Säule wird mit Sephadex™ G-100 Gel gefüllt und mit bis zu 15 ml PBS gespült. Das Isolat (aus 1000 µl Poolserum hergestellt, in 150 µl PBS gelöst) läuft durch die Säule und wird in kontinuierlichen Fraktionen (30 x á 500 µl) eluiert und aufgefangen. Die Probe wird auf das poröse Trennmaterial gegeben. Große Partikel passen nicht durch die Poren, laufen daher im Randbereich durch und eluieren in den frühen Fraktionen. Kleinere Partikel können die Poren passieren und eluieren folglich in den späteren Fraktionen. Daraus resultieren unterschiedliche Elutionszeiten der aufgetrennten Bestandteile. Das Eluat kann kontinuierlich in Fraktionen aufgefangen werden. Kleinere Proteine, wie das *HDL* (7 – 13 nm) sollten in den späteren Fraktionen eluieren, größere Partikel wie die EVs (20 – 200 nm) passieren im Randbereich, da diese zu groß für die Poren des Trennmediums sind und eluieren in den frühen Fraktionen.

2.2.6 Proteinbestimmung und Western Blot (SDS-PAGE) Analyse

Die Proteinbestimmung erfolgt mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Die Detektion erfolgt im Synergy 2 Microplate Reader (*Biotek Instruments, Software Gen5™ Version 1.11*). Die Proben werden entsprechend dem Proteingehalt mit RIPA Puffer verdünnt (RIPA-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,5 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS), im Verhältnis von 1:1 mit Loading Buffer versetzt (Loading Buffer: 7 ml Aqua dest., 500

mM Tris-HCL (pH 6,8), 2 ml Glycerol, 1 g SDS, 30mg 0,5 %-iges, Bromphenolblau, 1:10 in Mercaptoethanol) und bei 95° C für 5 Minuten inkubiert.

Die Western Blot Analyse ist ein etabliertes Verfahren für den Nachweis von Proteinen aus einem Stoffgemisch. Die Proteine werden anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mithilfe von Antikörpern detektiert und sichtbar gemacht. Für die Gelelektrophorese wird ein Polyacrylamid-Gel mit den zu analysierenden Proben beladen. Auf dieses Polyacrylamid-Gel wirkt ein elektrisches Feld, in diesem wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit. Die Laufstrecke eines Proteins ist umgekehrt proportional zur Masse. Durch die vorherige Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) besitzen die Proteine eine negative Ladung und wandern in dem elektrischen Feld gegen den Plus-Pol. Die aufgetrennten Proteine werden aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Die noch freien verbliebenen Stellen der Membran werden mit einer Milchpulverlösung blockiert sodass keine weiteren unerwünschten Proteine dort haften können. Für den eigentlichen Proteinnachweis wird die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Zielprotein. Anschließend wird die Membran gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist zusätzlich mit einem Enzym gekoppelt, welches eine Farbreaktion katalysiert. Durch die Zugabe einer Chemolumineszenz können die Banden über die Farbreaktion sichtbar gemacht und detektiert werden.

Für die Western Blots werden Polyacrylamid-Gele (Sammel- und Trenngele) verwendet. Herstellung von Polyacrylamid (PAA)-Gelen: Trenngel (PAA (30 %), Aqua destilliert, 1,5 M Sigma 7-9 pH 8,8, Natriumdodecylsulfat 10 %, Tetramethylethylendiamin, Ammoniumpersulfat 10 %). Sammelgel (PAA (30 %), Aqua destilliert, 1,25 M Sigma 7-9 pH 6,8, Natriumdodecylsulfat 10 %, Tetramethylethylendiamin, Ammoniumpersulfat 10 %). Die Gelelektrophorese findet in der Elektrophoresekammer (Electrophoresis Power Supply 1001, Amersham Pharmacia Biotech) für 90 min bei 100 V und 400 mA statt. Die Elektrophoresekammer ist mit Running Buffer gefüllt (3 g Sigma 7-9, 14,4g Glycin, 1 g SDS, 1 l Aqua destilliert). Der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran erfolgt in einem Tank-Blot-System, welches mit Transfer Buffer (12mM Sigma 7-9, 96mM Glycin und Aqua destilliert) befüllt ist. Der Transfer benötigt 60 min bei 280 mA. Die Membran inkubiert anschließend für 2 h in einer 5 %-igen Milchpulverlösung. Der Primär-Antikörper wird nach Herstellerangaben in 1 %-iger Milchpulverlösung verdünnt, auf die Membran gegeben und diese inkubiert über Nacht. Am

nächsten Tag erfolgt zunächst ein dreimaliges Waschen der Membran für 10 min in *Tris-buffered saline with Tween* (TBS-T: 6 g Sigma 7-9, 22,2 g NaCl, 2 ml Tween, Aqua destilliert, pH 8). Anschließend wird der Sekundärantikörper für 2 h hinzugegeben. Der Sekundärantikörper wird gemäß Herstellerangaben in 1 %-iger Milchpulverlösung verdünnt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wird die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen. Für die Detektion wird die Membran mit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) vorbereitet. Die Detektion erfolgt in einer Geldokumentationskammer (DeVision DBOX, Decon DC Science Tec.) mit dem Kamerasystem (Cool Snap HQ² Kamera, Photometrics) und der Software GelPro Analyzer (Media Cybernetics). Die Bildbearbeitung erfolgte mithilfe der Software Microsoft Powerpoint, ImageJ und GIMP.

2.2.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren der Proteinanalytik. Mittels Massenspektrometrie können Moleküle über ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) charakterisiert werden. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Zur Probenvorbereitung wird zunächst ein proteolytischer Verdau durchgeführt. Durch die Zugabe einer Protease werden die großen komplexen Proteine in viele kleine Peptide zerlegt. Häufig verwendet wird Trypsin, eine Protease, die nach Lysin und Arginin spaltet (Trypsinverdau). Die entstandenen Peptide werden konzentriert und in der Massenspektrometrie analysiert. Für die Analyse müssen die Peptide in eine Gasphase überführt (Desorption) und ionisiert werden. Bei der Ionisation werden Peptiden-Ionen (elektrisch geladene Teilchen) generiert. Mit Hilfe eines starken elektrischen oder magnetischen Feldes werden diese Peptid-Ionen extrahiert und in den Analysator überführt. Hier befinden sie sich in einer stabilen Kreislaufbahn (Ionenfalle). Dort bewegen sie sich in einer bestimmten Frequenz, diese ist von ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis abhängig. Durch eine Änderung an dem angelegten elektrischen oder magnetischen Feld kann die Kreislaufbahn von Ionen mit einem bestimmtem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis destabilisiert werden. Diese Ionen verlassen die Ionenfalle und können am Detektor erfasst werden. Anhand des Nachweises charakteristischer Peptide kann auf das Vorliegen von Proteinen geschlossen werden.

Die Massenspektrometrie erfolgt mit Isolaten aus Serumproben der *CCI-* und *Sham-*Gruppe. Die Serumproben sind mit einer PEG-Präzipitation und Ultrazentrifugation vorbehandelt.

Die Massenspektrometrie und statistische Auswertung erfolgt in einem auswärtigen Labor (*Proteome Research*, AG Prof. Stühler) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dargestellt.

3.1 Neuropathie im Tiermodell: *Chronic Constriction-Injury (CCI)*

Die Messung des Pfotenrückzugsschwellenwertes (PRS) der Versuchstiere erfolgt zu drei Zeitpunkten: 1. Messung (A) = Tag 0, 2. Messung (B) = Tag 14 postoperativ und 3. Messung (C) = Tag 28 postoperativ. In Tabelle 4 sind vergleichend die Mittelwerte des detektierten Pfotenrückzugsschwellenwertes über die Versuchsgruppen *CCI* und *Sham* dargestellt.

<i>Mean</i>	Gesamt	<i>CCI</i>	<i>Sham</i>
Messung A (Tag 0)	35,404	35,885	34,922
Messung B (Tag 14)	27,9	21,812	34,857
Messung C (Tag 28)	30,266	25,925	34,607

Tabelle 4: Arithmetisches Mittel (*Mean*) des Pfotenrückzugsschwellenwertes (PRS, in g) dargestellt an den drei Messzeitpunkten A (Tag 0), B (Tag 14) und C (Tag 28) für die gesamte Stichprobe (Gesamt) und die Versuchsgruppen *Chronic Constriction Injury (CCI)* und *Sham*.

Die Hypothesentestung erfolgt mittels Varianzanalyse. Die Beantwortung der Frage, zwischen welchen Gruppen die Effekte signifikant ist erfolgt final im Rahmen einer Post-hoc-Testung mit Bonferroni-Korrektur (s. Tabelle 5, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Im durchgeführten Test wird der Einfluss der Variable Messung mit $F(2; 23) = 14:257; p < 0:01$ signifikant (MSE = 14:482), d.h. die Mittelwerte der verschiedenen Messzeitpunkte unterscheiden sich signifikant voneinander. Der Einfluss der Variable Gruppe ist mit $F(1; 12) = 14:762; p < 0:01$ signifikant (MSE = 31:869), d.h. die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich signifikant. Die Interaktion zwischen den Variablen Messung und Gruppe ist mit $F(2; 23) = 12:095; p < 0:01$ signifikant (MSE = 14:482), d.h. die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Messungen unterscheiden sich signifikant in Abhängigkeit von der Gruppe.

	Messung 1 (A)	Messung 2 (B)
Messung 2 (B)	0,011	----
Messung 3 (C)	0,045	0,728

Tabelle 5: Ergebnisse des Post-hoc Tests. Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (Korrekturmethode: Bonferroni)

Diese Ergebnisse sind in den folgenden Grafiken (Abb. 6 – 8) dargestellt.

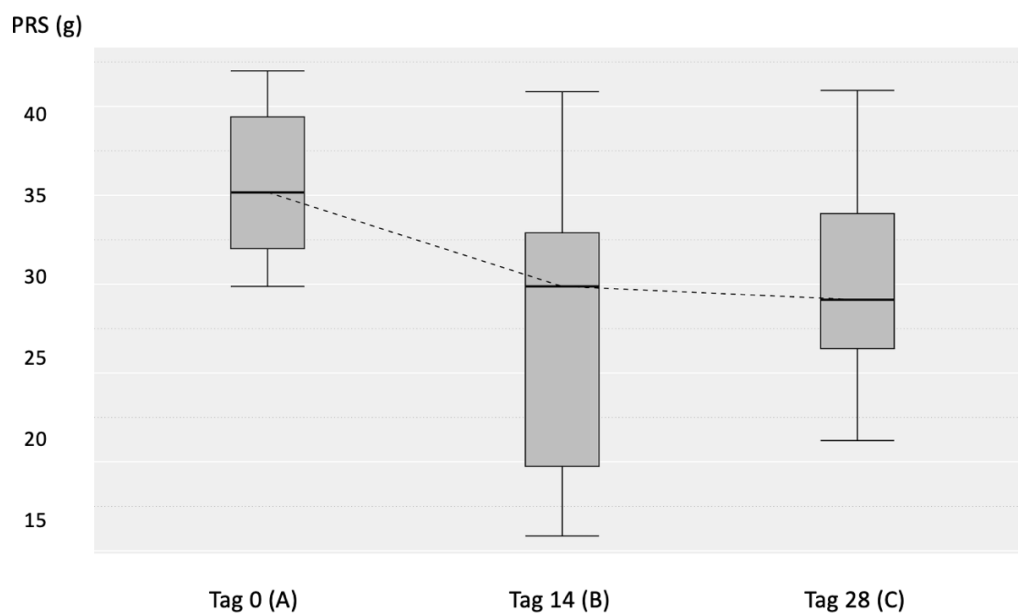


Abb. 6: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der gesamten Stichprobe. Dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C)

Wie in Abbildung 6 dargestellt verändert sich der PRS der gesamten Stichprobe über den Versuchszeitraum. In den Messungen nach 14 (B) bzw. 28 (C) Tagen ist der PRS im Vergleich zu Tag 0 (A, prä-operativ) herabgesetzt. Der PRS der Messungen an Tag 14 (B) und Tag 28 (C) unterscheidet sich dagegen kaum voneinander.

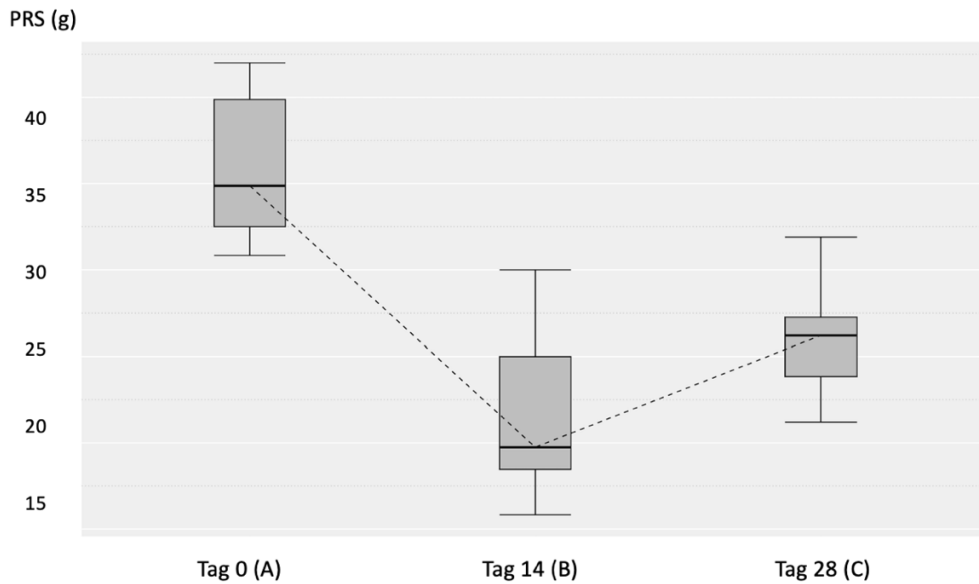


Abb. 7: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe (CCI) dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C)

Wie in Abbildung 7 dargestellt ist der PRS der CCI-Gruppe an Tag 14 (B) herabgesetzt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch die operative Manipulation am *Nervus ischiadicus* eine Symptomatik, die zu einer messbaren Verhaltensänderung führt, induziert werden konnte. Im Vergleich dazu zeigt die *Sham*-Gruppe (s. Abb. 8) ebenfalls eine herabgesetzte Schwelle, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß.

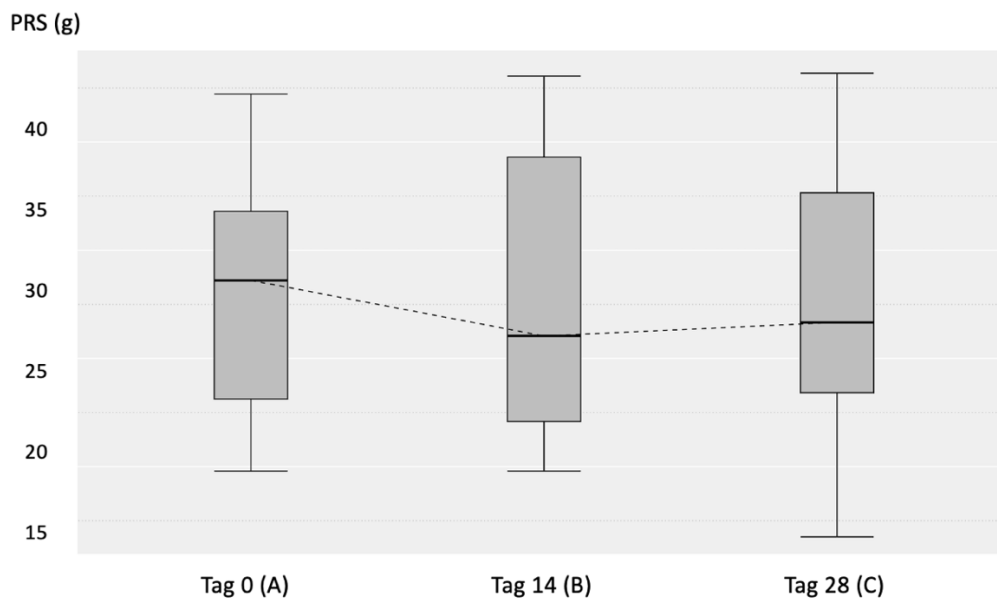


Abb. 8: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der *Sham*-Gruppe dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C)

Zur Vollständigkeit folgt die deskriptive Statistik der Messwerte.

Variable	Min	Max	Mean	sd
A	29,875	42	35,404	3,97
B	15,833	40,833	27,9	8,288
C	21,2	40,9	30,266	5,963

Tabelle 6: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, $n = 16$. Pfofenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
A	32	35,167	39,417	0,112	16
B	19,75	29,875	32,896	0,297	15
C	26,375	29,125	33,975	0,197	14

Tabelle 7: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Pfofenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

Variable	Min	Max	Mean	sd
A	30,833	42	35,885	4,357
B	15,833	30	21,812	5,383
C	21,2	31,9	25,925	3,474

Tabelle 8: Statistische Momente *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe, $n = 8$. Pfofenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
A	32,5	34,875	39,875	0,121	8
B	18,458	19,75	25	0,247	8
C	23,837	26,2	27,25	0,134	7

Tabelle 9: Statistische Momente der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe. Pfofenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

Variable	Min	Max	Mean	sd
A	29,875	40,333	34,922	3,776
B	29,875	40,833	34,857	4,54
C	28,05	40,9	34,607	4,581

Tabelle 10: Statistische Momente der Sham-Gruppe, n = 8. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
A	31,875	35,167	37,083	0,108	8
B	31,25	33,625	38,583	0,13	7
C	32,05	34	37,6	0,132	7

Tabelle 11: Statistische Momente der Sham-Gruppe. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28

3.2 Partikelanalyse mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Mittels NTA wird die Partikelkonzentration, die Partikelgröße und die Größenverteilung der vorhandenen Partikel in den Serumproben der CCI- und Sham-Versuchstieren gemessen. Die NTA wird zur Partikelcharakterisierung genutzt. Dabei werden die *Brownsche* Molekularbewegung, die zufällige Eigenbewegung der Partikel in Lösung und die gemessene Lichtstreuung der Partikel genutzt. Eine Software kann mithilfe der Diffusionskonstante und der Stokes-Einstein-Beziehung die Partikelgröße errechnen. Für die Analyse der Partikelgrößenverteilung wird die Partikelgröße der 10. Perzentile (X10), der 50. Perzentile (X50 = Medianwert), der 90. Perzentile (X90) und der Durchschnitt (*Mean*) bestimmt und zwischen den beiden Gruppen verglichen. Bei einer Partikelgröße auf der 10. Perzentile sind 10% der gemessenen Partikel kleiner als dieser Wert und 90% der gemessenen Partikel größer als dieser Wert, bei der 90. Perzentile (X90) verhält es sich genau andersherum.

Folgende Hypothesen werden formuliert und getestet:

1. Es gibt einen Unterschied zwischen der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe und *Sham*-Gruppe bezüglich der Partikelkonzentration (in 10^{10} Partikel/ml)
2. Es gibt einen Unterschied zwischen der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe und *Sham*-Gruppe bezüglich der Partikelgröße (nm) und der Partikelgrößenverteilung (nm). Die Partikelgrößenverteilung wird untersucht in den Verteilungspositionen X10, X50, X90 und Mean

Der Unterschied in der Partikelkonzentration (in 10^{10} Partikel/ml) ist zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant (s. Abb. 9), $t(0.95,9) = 1,652$, $p = 0,13$ (Signifikanzniveau $p = 0,05$). Die Varianzhomogenität (Levene-Test) liegt mit $F(1,10) = 4,467$, $p = 0,061$ vor. Eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) kann über beide Gruppen mit $W = 0,946$, $p = 0,708$ und $W = 0,936$, $p = 0,626$ angenommen werden.

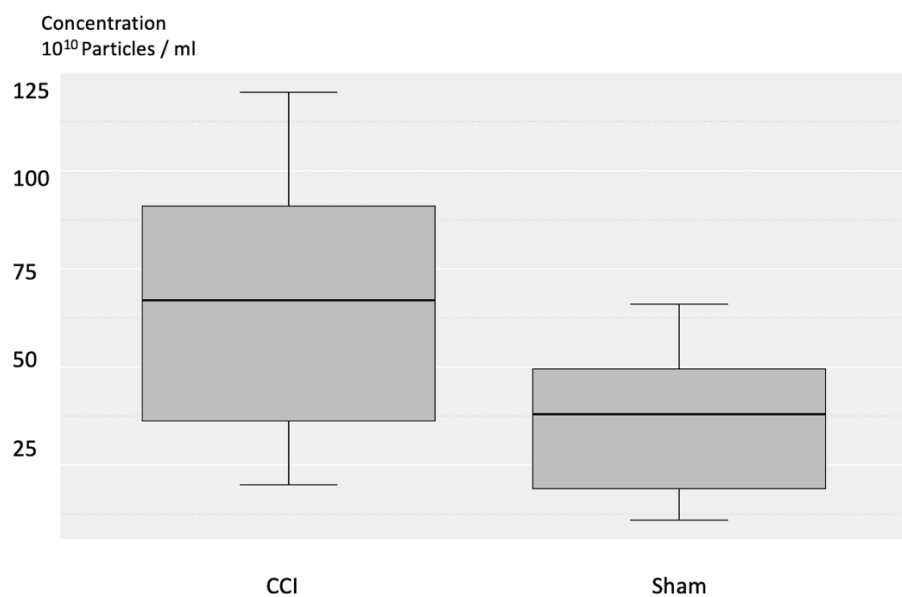


Abb. 9: Vergleich der Partikelkonzentration (in 10^{10} Partikel/ml) zwischen der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe (CCI) und der *Sham*-Gruppe gemessen mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Zur Vollständigkeit folgt die deskriptive Statistik der Messwerte der Partikelkonzentrationen (in 10^{10} Partikel/ml).

Variable	Min	Max	Mean	sd
----------	-----	-----	------	----

Conc. (10¹⁰P./ml)	11	120	51,5	33,835
-------------------------------------	----	-----	------	--------

Tabelle 12: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, n = 12. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
Conc.(10¹⁰P./ml)	26	48,5	70,75	0,657	12

Tabelle 13: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte

Variable	Min	Max	Mean	sd
Conc. (10¹⁰P./ml)	20	120	66,5	38,899

Tabelle 14: Statistische Momente Chronic-Constriction-Injury-Gruppe, n = 6. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
Conc.(10¹⁰P./ml)	36,25	67	91	0,585	6

Tabelle 15: Statistische Momente der Chronic-Constriction-Injury-Gruppe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte

Variable	Min	Max	Mean	sd
Conc. (10¹⁰P./ml)	11	66	36,5	21,575

Tabelle 16: Statistische Momente der Sham-Gruppe, n = 6. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung

Variable	Q1	Median	Q3	VarK	n
Conc.(10 ¹⁰ P./ml)	19	38	49,5	0,591	6

Tabelle 17: Statistische Momente der Sham-Gruppe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10¹⁰ Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte

Die Partikelgrößenverteilung ist in den gemessenen Verteilungspositionen (X10, X50, X90 und Mean) jeweils nicht signifikant bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (s. Abb. 10).

- a) **X10:** Die Varianzhomogenität (Levene-Test) liegt mit $F(1,10) = 0,021$, $p = 0,888$ vor. Eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) kann über beide Gruppen mit $W = 0,879$, $p = 0,266$ und $W = 0,972$, $p = 0,905$ angenommen werden. Im durchgeführten t-Test ist der Unterschied zwischen der CCI- und Sham-Gruppe nicht signifikant bei $t(0,95, 9) = -0,88$, $p = 0,399$.
- b) **X50:** Die Varianzhomogenität (Levene-Test) liegt mit $F(1,10) = 0,145$, $p = 0,711$ vor. Eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) kann über beide Gruppen mit $W = 0,968$, $p = 0,877$ und $W = 0,891$, $p = 0,323$ angenommen werden. Im durchgeführten t-Test ist der Unterschied zwischen der CCI- und Sham-Gruppe nicht signifikant bei $t(0,95,9) = -0,831$, $p = 0,425$.
- c) **X90:** Die Varianzhomogenität (Levene-Test) liegt mit $F(1,10) = 0,748$, $p = 0,407$ vor. Eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) kann über beide Gruppen mit $W = 0,85$, $p = 0,158$ und $W = 0,929$, $p = 0,575$ angenommen werden. Im durchgeführten t-Test ist der Unterschied zwischen der CCI- und Sham-Gruppe nicht signifikant bei $t(0,95,9) = -0,092$, $p = 0,929$.
- d) **Mean:** Die Varianzhomogenität (Levene-Test) liegt mit $F(1,10) = 0,078$, $p = 0,786$ vor. Eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) kann über beide Gruppen mit $W = 0,847$, $p = 0,149$ und $W = 0,808$, $p = 0,069$ angenommen werden. Im durchgeführten t-Test ist der Unterschied zwischen der CCI- und Sham-Gruppe nicht signifikant bei $t(0,95,9) = -0,466$, $p = 0,651$.

Die Konzentration der gemessenen Partikel im Vergleich zwischen der *CCI*- und *Sham*-Gruppe ergibt keinen signifikanten Unterschied (*bei $\alpha = 0,05$*). Die arithmetischen Mittel für die beiden Gruppen (s. Tabellen 14 und 16) lassen jedoch eine Tendenz erkennen (*CCI*: $66,5 \times 10^{10}$ Particles/ml, *Sham*: $36,5 \times 10^{10}$ Particles/ml). Rein deskriptiv betrachtet, liegt die Konzentration in der Gruppe der *CCI*-Versuchstiere über der der *Sham*-Gruppe. Diese Differenz lässt sich statistisch nicht bestätigen, könnte jedoch mit einer größeren Probengröße verifiziert werden. Auch über die verschiedenen Verteilungspositionen (*X10*, *X50*, *X90*, *Mean*) zeigt die Größe der gemessenen Partikel im Vergleich zwischen der *CCI*- und *Sham*-Gruppe keine signifikanten Unterschied ($\alpha = 0,05$). Die Verteilung der Partikelgröße ist somit ebenfalls nicht signifikant (s. Abb. 10). Die Medianwerte der beiden Gruppen (s. Tabellen 20 und 22) zeigen, dass Partikel mit einer medianen Größe von 187 nm messbar waren (*CCI*: 183 nm und *Sham*: 191 nm). Dieser Größenwert liegt, unter der Annahme es handelt sich um EVs, an der oberen Grenze von Exosomen (definiert bei 20 – 200 nm) und dem unteren Spektrum von Mikrovesikeln (definiert als 100 – 1000 nm). Das Spektrum der hier nachgewiesenen Partikel bewegt sich zwischen 109 nm (*X10*) bis 574 nm (*X90*). In dieses Größenspektrum passen neben MVs auch weitere nicht vesikuläre extrazelluläre Partikel (NVEPs) wie Aggregate aus EVs oder Aggregate aus EVs und Lipoproteinen. Das Serumprotein Albumin (ca. 10 nm) und Komplementfaktoren (3 – 10 nm) fallen unter die untere Detektionsgrenze des *NTA*. Ein Erythrozyt mit einer Größe von 7000 – 8000 nm befinden sich weit oberhalb der Nachweisgrenze. Lipoproteine mit einem Größenspektrum von 7 – 1200 nm dürften eher in aggregierter Form als einzeln nachgewiesen werden (eine potentielle Ausnahme stellen hier Chylomikronen dar).

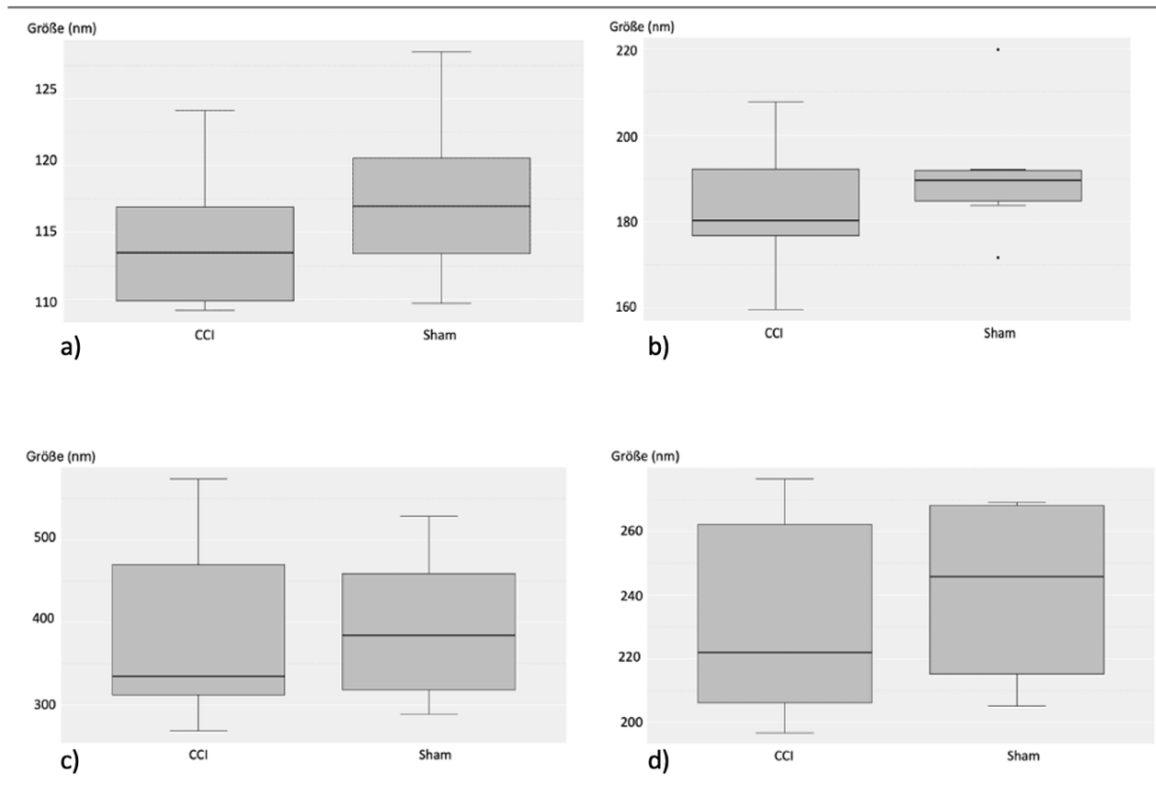


Abb. 10: Vergleich der jeweiligen Partikelgröße (in nm) in den Verteilungspositionen X10 (a), X50 (b), X90 (c) und Mean (d) zwischen den beiden Versuchsgruppen *Chronic-Constriction-Injury (CCI)* und *Sham*. Gemessen mittels *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*.

Zur Vollständigkeit folgt die deskriptive Statistik der Messwerte der Partikelgrößenverteilung (in nm) in den Verteilungspositionen X10, X50, X90 und Mean (s. Tabelle 18 – 23).

Größe (nm)	Min	Max	Mean	sd
X10	109,2	128,5	116,092	6,199
X50	159,7	219,8	187,192	16,054
X90	268,9	573,7	391,608	105,427
Mean	196,7	276,5	236,675	31,603

Tabelle 18: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, $n = 12$. Partikelgrößenverteilung in nm. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

Größe (nm)	Q1	Median	Q3	VarK	n
X10	110,45	116,1	118,85	0,053	12
X50	178,65	185,8	193,05	0,086	12
X90	310,2	341,15	480,225	0,269	12
Mean	210,05	225,4	268,975	0,134	12

Tabelle 19: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Partikelgrößenverteilung in nm.
 Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte.
 X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

Größe (nm)	Min	Max	Mean	sd
X10	109,2	124,1	114,5	5,809
X50	159,7	207,7	183,283	16,651
X90	268,9	573,7	388,683	123,613
Mean	196,7	276,5	232,267	35,128

Tabelle 20: Statistische Momente Chronic-Constriction-Injury-Gruppe, n = 6. Partikelgrößenverteilung in nm.
 Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung.
 X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

Größe (nm)	Q1	Median	Q3	VarK	n
X10	109,875	113,5	116,9	0,051	6
X50	176,75	180,3	192,175	0,091	6
X90	312,35	334,95	469,825	0,318	6
Mean	206,1	221,95	262,25	0,151	6

Tabelle 21: Statistische Momente der Chronic-Constriction-Injury-Gruppe. Partikelgrößenverteilung in nm.
 Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte.
 X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

Größe (nm)	Min	Max	Mean	sd
X10	109,7	128,5	117,683	6,688
X50	171,7	219,8	191,1	15,908
X90	289,2	528,7	394,533	95,665
Mean	205,1	269,2	241,083	30,276

Tabelle 22: Statistische Momente der Sham-Gruppe, n = 6. Partikelgrößenverteilung in nm.
 Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung.
 X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

Größe (nm)	Q1	Median	Q3	VarK	n
X10	113,425	116,95	120,55	0,057	6
X50	184,8	189,6	191,925	0,083	6
X90	318,45	384,3	459,225	0,242	6
Mean	215,175	245,8	268,175	0,126	6

Tabelle 23: Statistische Momente der Sham-Gruppe. Partikelgrößenverteilung in nm.
 Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte.
 X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel.

3.3 Präzipitation mit Polyethylenglykol

Die von der *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)* veröffentlichten *minimal Information for the study of extracellular vesicles (MISEV)* von 2023 dienen als Leitfaden [26]. Es erfolgt eine Protein-basierte Charakterisierung des Isolats mittels Western Blot Verfahren. In den folgenden Western Blots (s. Abb. 11 - 14) werden nach der durchgeführten PEG-Präzipitation das Isolat und der abpipettierte Überstand (jeweils drei Proben aus gepooltem Rattenserum) auf das Vorhandensein der Proteine *tumor susceptibility gene 101 (TSG101)*, CD63, ApolipoproteinA1 (APOA1) und Albumin analysiert. In Abbildung 11 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins *TSG101* dargestellt. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 54 kDa zu erwarten. Orientierend an der Proteinleiter (links, in kDa) und der Positivkontrolle können drei jeweils deutlich abgrenzbare Banden auf Höhe des erwarteten Molekulargewicht (54 kDa) dargestellt werden. Die Banden zeigen sich in den Proben mit den isolierten EVs, dagegen zeigen sich in den Überständen keine Banden auf dieser Höhe. Dies deutet auf das Vorhandensein des Proteins *tumor susceptibility gene 101 (TSG101)* in den Isolaten hin.

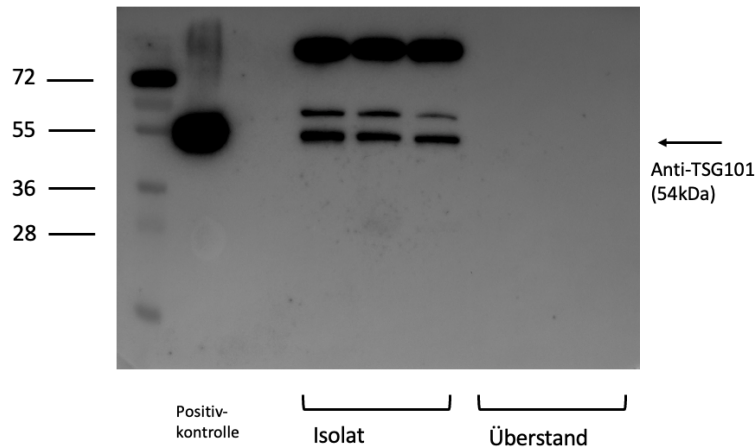


Abb. 11: Nachweis des Proteins *tumor susceptibility gene 101* (TSG101) nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit 6 min. Positivkontrolle: 6 µg Protein

In Abbildung 12 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins CD63 dargestellt. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 27 kDa zu erwarten. Orientierend an der Proteinleiter (links, in kDa) können auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts (27 kDa) drei gut abgrenzbare Banden dargestellt werden. Die Banden zeigen sich in den Proben mit den isolierten EVs, wohingegen sie auch in den Überständen schwach nachweisbar sind. Das Vorhandensein des Proteins CD63 in den Isolaten kann angenommen werden.

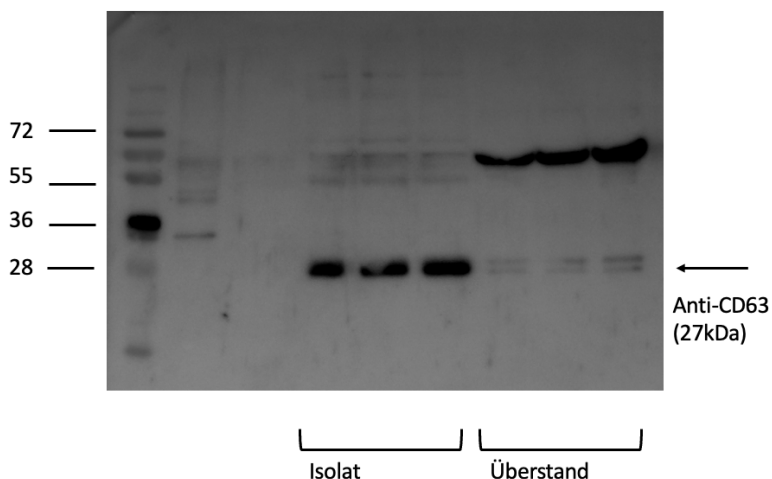


Abb. 12: Nachweis des Proteins CD63 nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit: 20 s. Positivkontrolle: 0,55 µg / µl

Der Western Blot zur Detektion von Albumin ist in Abbildung 13 dargestellt. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande bei 69 kDa zu erwarten. Vergleichend mit der Proteinleiter (links, in kDa) und der Positivkontrolle zeigen sich auf der Höhe von 69 kDa drei starke Banden in den Überständen. Dagegen zeigen die Proben aus den Isolaten keine Reaktion. Das Vorhandensein von Albumin in den Isolaten ist nicht zu beweisen, dagegen kann angenommen werden, dass Albumin im Überstand nachweisbar ist.

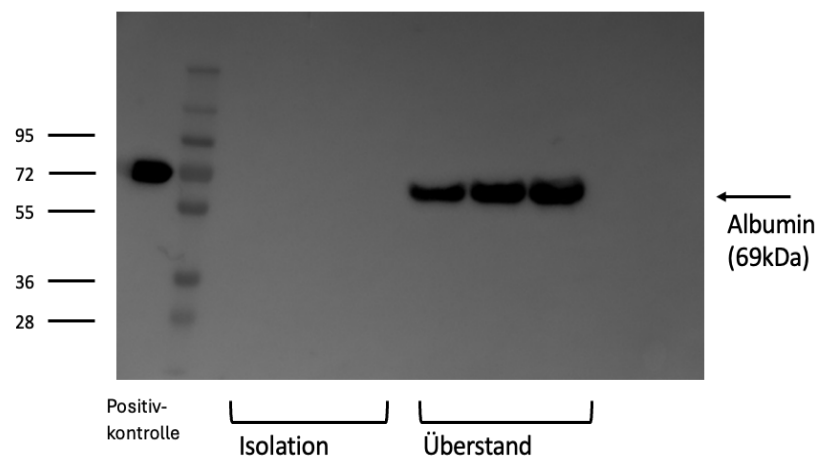


Abb. 13: Nachweis des Proteins Albumin nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand

In Abbildung 14 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins APOA1 dargestellt. APOA1 ist ein mit *HDL* assoziiertes Apolipoprotein. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 27 kDa zu erwarten. Orientierend an Proteinleiter (links, in kDa) und der Positivkontrolle zeigen sich sowohl in den drei Proben aus dem Isolat als auch in den drei Proben aus den Überständen starke jeweils gut abgrenzbare Banden auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts (27 kDa). Damit ist das Vorhandensein von APOA1 in Isolat und Überstand anzunehmen.

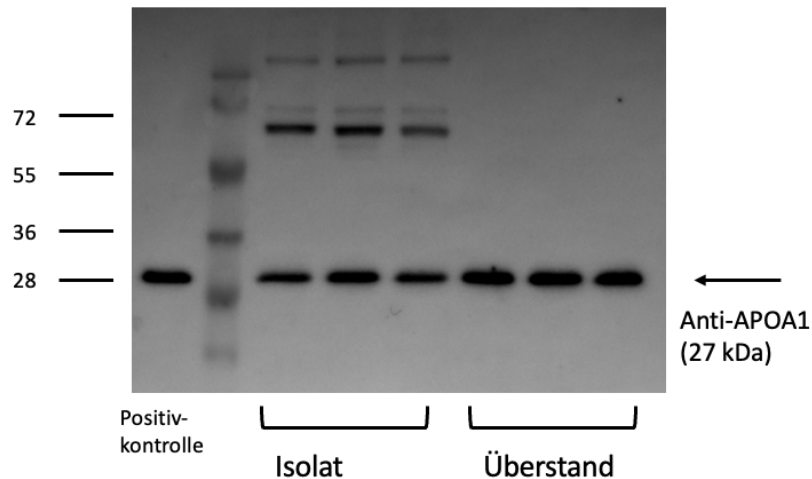


Abb. 14: Nachweis des Proteins ApolipoproteinA1 (APOA1) nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit 10 s. Positivkontrolle 20 µg Protein

3.4 Ultrazentrifugation

Um das Isolat nach der PEG-Präzipitation weiter aufzureinigen und die Konzentration von EVs in der Probe zu erhöhen, erfolgt eine Ultrazentrifugation. In den zwei folgenden Western Blots werden jeweils zwei Proben auf das Vorhandensein der Proteine *TSG101* und CD63 analysiert. Die Proben beschriftet mit „vor UZ“ sind Isolate nach der PEG Präzipitation, die Proben beschriftet mit „nach UZ“ sind nach der PEG Präzipitation mit einer zusätzlichen Ultrazentrifugation behandelt worden. In Abbildung 15 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins *TSG101* dargestellt. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 54 kDa zu erwarten. Orientierend an der Proteinleiter (links, in kDa) können auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts (54 kDa) eine gut abgrenzbare Bande in den Proben „vor UZ“ detektiert werden, wohingegen in den Proben „nach UZ“ nur schwache Banden zur Darstellung kommen. Ein Vorhandensein des Proteins *TSG101* ist vor der UZ anzunehmen, nach der UZ zeigt sich ein schwächeres Signal, was auf ein vermindertes Vorhandensein des Zielproteins hinweisen kann.

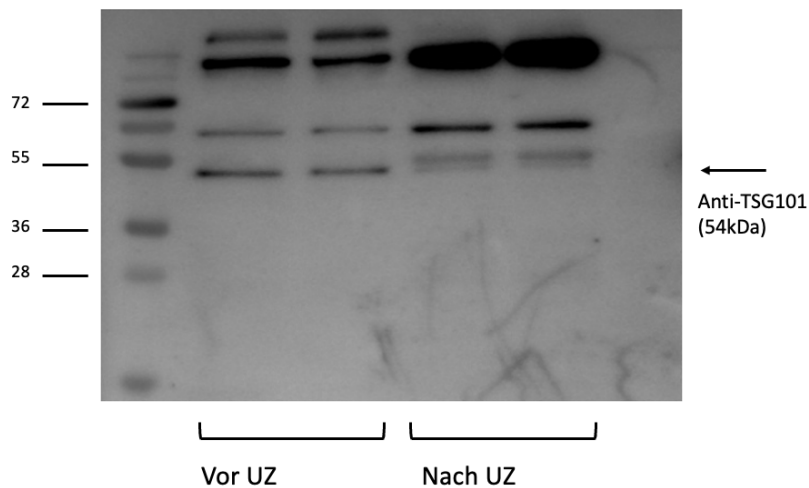


Abb. 15: Nachweis des Proteins *tumor susceptibility gene (TSG101)* in Isolaten aus gepooltem Rattenserum: Die Proben „vor UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol. Die Proben „nach UZ“ sind Isolate nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und Ultrazentrifugation. Belichtungszeit: 5 min. Positivkontrolle: 15 µg Proteinmenge

In Abbildung 16 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins CD63 dargestellt. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 27 kDa zu erwarten. Orientierend an der Proteinleiter (links, in kDa) und der Negativkontrolle (rechts) können auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts (27 kDa) vier Banden detektiert werden. Die entsprechenden Banden zeigen sich in den Proben ohne Behandlung mit Ultrazentrifugation („vor UZ“) schwächer als in den Probe nach PEG-Präzipitation und Ultrazentrifugation („nach UZ“). Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass das Protein CD63 sowohl nach der Behandlung mit einer PEG-Präzipitation („vor UZ“) als auch nach der mehrstufigen Behandlung mittels PEG-Präzipitation und Ultrazentrifugation („nach UZ“) im Isolat vorhanden ist.

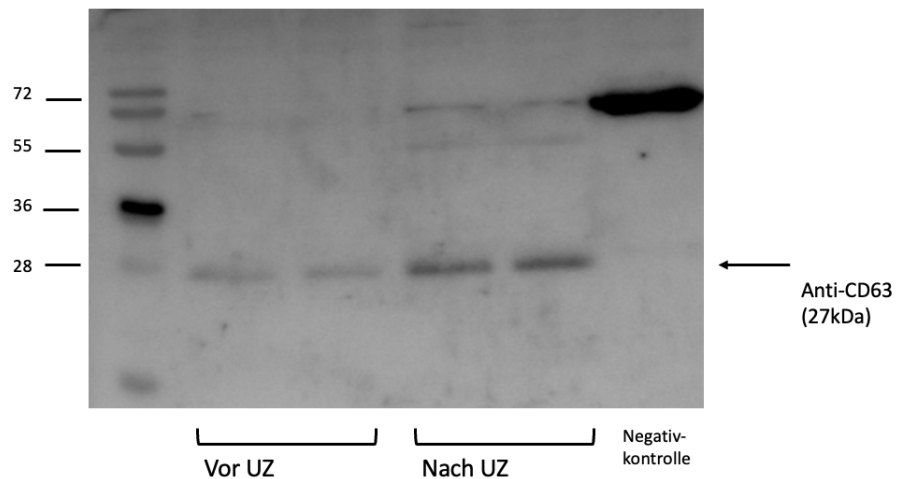


Abb. 16: Nachweis des Proteins CD63 in Isolaten aus gepooltem Rattenserum: Die Proben „vor UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol. Die Proben „nach UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol und Ultrazentrifugation. Belichtungszeit: 1 min. Negativkontrolle: Poolserum

3.5 *Size Exclusion Chromatography* (SEC)

Die *Size Exclusion Chromatography* (SEC) separiert Moleküle nach ihrer Größe in einem porösen Trennmedium (hier verwendet Sephadex™ G-100). Große Partikel können die Poren nicht passieren, laufen folglich im Randbereich der Säule durch und eluieren früh. Kleinere Partikel können die Poren passieren und eluieren später. Über die unterschiedlichen Elutionszeiten werden die Partikel in den Fraktionen aufgetrennt aufgefangen. Kleinere Partikel, wie das *HDL* (7 – 13 nm) sollten in den späteren Fraktionen eluieren, größere Partikel wie die EVs (20 – 200 nm) passieren im Randbereich, da sie zu groß für die Poren des Trennmediums sind und eluieren in den frühen Fraktionen. Sephadex™ G-100 hat einen Fraktionierungsbereich zwischen 4 – 150 kDa. Bei der Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Blutplasma- oder Serum ist die Co-Isolation von Lipoproteinen ein bekanntes Phänomen [17]. Mittels *Size exclusion chromatography* (SEC) soll eine Größenauftrennung von extrazellulären Vesikeln und Lipoproteinen (*HDL*) erreicht werden. In Abbildung 17 ist der Western Blot zur Detektion des Proteins APOA1 nach der Behandlung von gepoolten Serumproben (Ratte) mittels PEG-Präzipitation und anschließender SEC. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 27 kDa zu erwarten. Orientierend an der Proteinleiter (rechts, in kDa) und Positivkontrolle (rechts) zeigen sich in allen eluierten

Fraktionen (von links an beginnend mit den früh eluierten Fraktionen) eine jeweils starke und gut abgrenzbare Bande auf Höhe von 27 kDa. Es ist stark davon auszugehen, dass in allen eluierten Fraktionen das Protein APOA1 nachweisbar ist und somit keine nachweisbare Auftrennung erreicht werden konnte. Für den Nachweis einer funktionierenden Auftrennung hätte APOA1 lediglich in den frühen Fraktionen (links) jedoch nicht mehr in den späten Fraktionen (rechts) nachweisbar sein sollen.

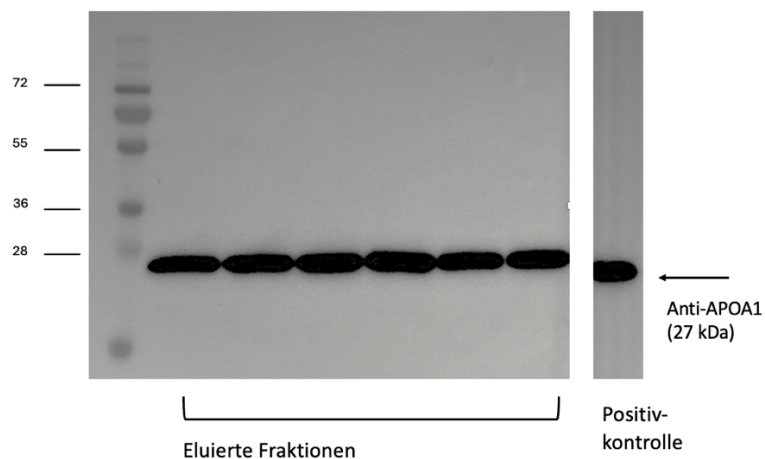


Abb. 17: Nachweis des Proteins ApolipoproteinA1 (APOA1) in einem Isolat aus gepooltem Rattenserum nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und *Size Exclusion Chromatography* mit Sephadex™ G-100. Belichtungszeit: 10 min. Positivkontrolle: 20 µg Proteinmenge

Zusätzlich wurden die in der SEC eluierten Fraktionen auf das Vorhandensein des Proteins *TSG101* analysiert. Für den hier verwendeten Antikörper ist eine Bande auf Höhe von 54 kDa zu erwarten. Wie in Abbildung 18 dargestellt zeigen sich hier auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts jeweils gleichmäßig schwache Banden über alle eluierten Fraktionen. Es kann angenommen werden, dass *TSG101* im Isolat über die eluierten Fraktionen nachweisbar ist.

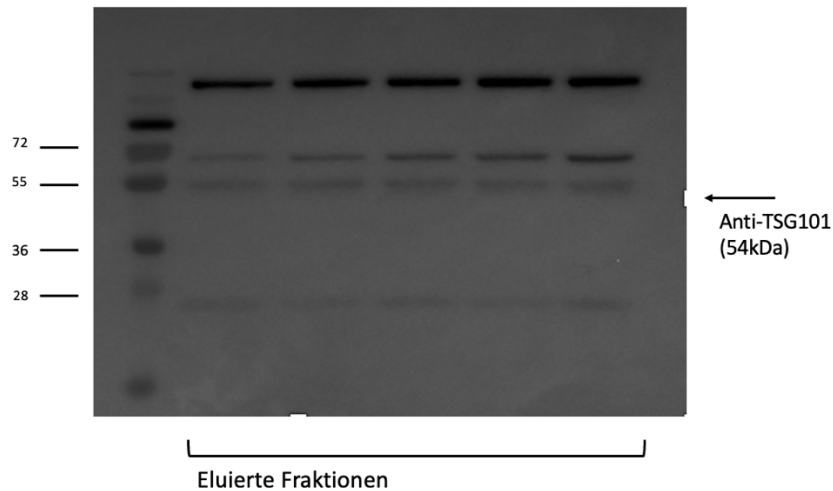


Abb. 18: Nachweis des Proteins *tumor susceptibility gene 101* (TSG101) in einem Isolat aus gepooltem Rattenserum nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und Size Exclusion Chromatography mit Sephadex™ G-100. Belichtungszeit: 10 min. Positivkontrolle: 20 µg Proteinmenge

3.6 Massenspektrometrie

In der massenspektrometrischen Untersuchung lassen sich insgesamt keine differentiell exprimierten Proteinen zwischen der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe und *Sham*-Gruppe nachweisen. Tabelle 24 zeigt die 18 meist abundanten Proteine. Die vollständigen Daten sind im Anhang eingefügt (s. Tabelle 25).

Protein Name	Protein ID	Peptide	Mean CCI	Mean Sham	t-Test CCI/Sham
Apolipoprotein B-100	Q7TMA5	267	1704700000	1869500000	-0,632
Komplementfaktor C3	MORBF1	142	4126420000	3342020000	1,198
Anastellin	A0A096P6L8	118	1773470000	2041150000	0,771
Fibronectin	F1LST1	117	156308000	190867000	-0,205
Myosin-6	G3V6P7	114	94636400	77772800	0,596
Filamin A	COJPT7	111	165086000	156880000	0,184
Talin 1	G3V852	105	112933000	96903500	0,455
Komplementfaktor C4	P08649	93	2344430000	1787420000	1,650

Komplementfaktor C4a	A0A0G2JW12	91	18676500	17726600	-1,880
Komplementfaktor C5	P08650	86	351383000	350938000	0,062
Komplementfaktor C4b	Q6MG90	86	185692000	186228000	-0,007
Komplementfaktor H	G3V9R2	78	1869720000	1598530000	1,061
Thrombospondin 1	A0A0G2JV24	75	7387170000	7046720000	0,036
Multimerin 1	D4A3E0	44	178690000	179060000	-0,110
Alpha-2-Makroglobulin	P06238	43	73879700	67785700	0,271
Von Willebrandt Faktor	F1M957	43	29120200	23507200	0,824
Komplementfaktor C6	Q811M5	43	94031500	100517000	-0,314
Albumin	P02770	41	172092000	134328000	1,170

Tabelle 24: Ausschnitt aus der massenspektrometrischen Analyse mit den 18 meist abundanten Proteinen sortiert in absteigender Reihenfolge nach der absoluten Menge der detektierten Peptide (CCI = *Chronic-Constriction-Injury*). Statistische Auswertung (t-Test/SAM-Analyse Statistik (SAM = *Significance Analysis of Microarrays*) zwischen den beiden Versuchsgruppen (*Chronic-Constriction-Injury* und *Sham*) mit *False Discovery Rate* (FDR) 5 %, Standard Error (So) 0,1.

Das meist abundante Protein ist das Apolipoprotein B (APOB). Desweiteren konnten mehrere Komplementfaktoren (Komplementfaktor C3, C4 und seine Spaltprodukte C4a und C4b, C5, C6 und H) nachgewiesen werden. Komplementfaktoren sind Proteine des unspezifischen Immunsystems und dienen der Abwehr von Krankheitserregern. Die Proteine von Willebrandt Faktor (vWF) und Multimerin-1 sind an der Hämostase beteiligt. Fibronectin ist ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix und fungiert als Adhäsionsmolekül, Anastellin ist ein Fragment des Fibronectins. Thrombospondin ist ebenfalls ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix und hemmt u.a. als Tumorsuppressoren die Angiogenese. Filamin A ist an der Stabilisierung und Vernetzung des intrazellulären Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Das Protein Talin 1 spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion. Myosin-6 ist ein Motorprotein und katalysiert den intrazellulären Transport von Vesikeln entlang von Aktinfilamenten. Alpha-2-Makroglobulin ist ein Akute-Phase-Protein und wird im Rahmen von Gewebeschädigungen oder akuten Entzündungen vermehrt freigesetzt. Albumin ist das höchst abundante Protein im Blut und an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Gefäßsystem beteiligt.

Die vorgängig mittels Western Blot Analyse nachgewiesenen Proteine CD63 und *TSG101* finden sich in der massenspektrometrischen Analyse nicht wieder. Dagegen kann das Protein

Albumin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen zudem das Vorhandensein mehrerer Apolipoproteine, darunter die Apolipoproteine APOA1, APOA4, APOC1, APOC2, APOC3 und APOC4 sowie APOE (s. vollständige Auswertung Tabelle 25).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung können auch für die Evaluation der Isolationsmethode zur Isolation von EVs herangezogen werden. Die in den Vorversuchen mittels Western Blot Verfahren nachgewiesenen Markerproteine CD63 und *TSG101* lassen sich in der massenspektrometrischen Analyse der Versuchstiere nicht nachweisen. Dafür gelingt der Nachweis des mit EVs assoziierten Proteins CD9. Ebenfalls gegenläufig zu den Vorversuchen sind mit den Serumproteinen APOA1 und Albumin zwei der häufigen Kontaminanten nachweisbar.

Zur weiteren Charakterisierung des Isolats eignet sich ein Abgleich mit den etablierten Datenbanken. Ergebnisse bisheriger Proteomanalysen von EVs können in öffentlich zugänglichen Online-Datenbanken wie „Vesiclepedia“ oder „ExoCarta“ eingepflegt und gesammelt werden. So sind zurzeit > 9700 (Stand: 01.2025) verschiedene Proteine dort gelistet [26, 28, 73-77]. Dies veranschaulicht die Komplexität und hohe funktionelle Diversität dieser Vesikel [41]. Zur Validierung der Ergebnisse der hier durchgeführten Massenspektrometrie sind nachfolgend (s. Abb. 19) die 20 meist abundanten Proteine der Datenbanken *Vesiclepedia* und *ExoCarta* vergleichend aufgeführt. Im Überblick kann festgestellt werden, dass beide Datenbanken grob das gleiche Proteinprofil abbilden. Im Vergleich mit der hier durchgeführten Proteomanalyse können acht von 20 Proteinen der *Vesiclepedia*-Datenbank und zehn von 20 der Proteine der *ExoCarta*-Datenbank (jeweils mit einem grünen Feld markiert) nachgewiesen werden. Das in der Etablierung verwendete Protein CD63 ist in beiden Datenbanken das am häufigsten in EVs nachgewiesene Protein, *TSG101* liegt jeweils unter den fünf am häufigsten nachgewiesenen Proteinen (s. Abb. 19).

Vesiclepedia (Stand 08.01.2025, 16.00 Uhr)	ExoCarta (Stand: 08.01.2025, 16.00 Uhr)
CD63	CD63
CD9	CD9
PDCD6IP (programmed cell death 6 interacting protein)	TSG 101
TSG101 (tumor susceptibility gene 101)	PDCD6IP
CD81	GAPDH
GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase)	CD81
FLOT1 (Flotillin 1)	FLOT1
ACTB (Actin beta)	SDCBP
ANXA2 (Annexin 2)	ACTB
SDCBP (Syndecan binding protein 2)	HSP90AA1
HSP90AA1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1)	ANXA2
HSPA8 (heat shock protein family A member 8)	ITGB1 (Integrin beta)
ANXA5 (Annexin 5)	HSP90AB1
ENO1 (Enolase 1)	ENO1
PKM (Pyruvatkinase, muscle)	HSPA8
HSP90AB1 (heat shock protein 90 alpha family class B member 1)	PKM
YWHAZ (tyrosin-3-monooxygenase/tryptophan-5-monooxygenase activation protein zeta)	LDHA (Lactate dehydrogenase alpha chain)
PGK1 (phosphoglycerate kinase 1)	YWHAZ
FLOT2 (Flotillin 2)	FASN (fatty acid synthase)
YWHAE (tyrosin-3-monooxygenase/tryptophan-5-monooxygenase activation protein epsilon)	PGK1

Abb. 19: Abgleich der massenspektrometrischen Analyse mit den Proteindatenbanken *Vesiclepedia* und *ExoCarta* bezüglich des Vorhandenseins von häufig in EVs nachgewiesenen Proteinen.

(Quelle: http://microvesicles.org/extracellular_vesicle_markers; Quelle: http://exocarta.org/exosome_markers_new; Zugriff auf die Datenbanken jeweils am 08.01.25 um 16Uhr)

4 Diskussion

Nach Darstellung der Ergebnisse werden folgende Schlussfolgerung zur Diskussion definiert:

1. Das *Chronic-Constriction-Injury*-Modell induziert eine messbare Symptomatik in den Versuchstieren
2. Im Kontext einer induzierten Neuropathie verändern sich die Partikelgröße und die Partikelkonzentration im Serum
3. Ein mehrstufiges Isolationsverfahren bestehend aus einer Präzipitation mit Polyethylenglykol und einer Ultrazentrifugation kann, orientierend an den *MISEV23 Guidelines*, EVs anreichern
4. Die *Size Exclusion Chromatography* kann Lipoproteine und EVs nicht voneinander auftrennen
5. Es können keine differentiell exprimierten Proteine zwischen der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe und der *Sham*-Gruppe identifiziert werden

4.1 Neuropathie im Tiermodell: *Chronic-Constriction-Injury (CCI)*

Der Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS; gemessen in g) ist kein definierter, absolut festgelegter Wert. Er beschreibt die minimale mechanische Intensität (in g) die aufgebracht werden muss, um eine Rückzugsreaktion der Hinterpfote auszulösen. Vergleichend mit einer Kontrollgruppe kann so eine Verhaltensänderung gemessen werden, die in diesem Falle durch die induzierte Schmerzsymptomatik erklärt werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied des PRS in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit und des Messzeitpunktes besteht (s. Kapitel 3.1). Es liegt somit eine messbare mechanische Hyperalgesie in der *CCI*-Gruppe vor. Somit kann bestätigt werden, dass das *CCI*-Modell eine messbare Symptomatik in den Versuchstieren induzieren kann. Die klinische Präsentation von neuropathischen Schmerzen ist jedoch komplex und vereint viele verschiedene Symptomatiken. Dieser Komplexität kann das *CCI*-Modell nicht vollumfänglich gerecht werden, da hier gezielt eine Symptomatik, die mechanische Hyperalgesie, induziert wird und beurteilt werden kann.

Für die Erforschung von neuropathischen Schmerzen existieren verschiedene etablierte Tiermodelle, die sich jeweils nach der Art (bspw. traumatisch, metabolisch) und dem Ort

(zentral, peripher) der induzierten Schädigung unterscheiden [78]. Das hier verwendete CCI-Modell geht auf *Bennett et al.* [68] zurück und induziert eine unilaterale periphere Mononeuropathie (des *Nervus ischiadicus*) [69, 78, 79]. In der Literatur wird dieses Modell als verlässlich und gut reproduzierbar beschrieben [79]. Voraussetzung für valide Messergebnisse ist das exakte Platzieren des *Von-Frey*-Filamentes im sensiblen Innervationsgebiet des *Nervus ischiadicus*. Mit dem Ziel eine partielle Nervenschädigung zu induzieren werden vier lose Ligaturen um den *Nervus ischiadicus* platziert [68]. Diese Ligaturen sollen gerade so eng anliegen, dass sie den Umfang des Nervens reduzieren, jedoch ohne die epineurale Blutzirkulation komplett zu unterbinden [80], die Lockerheit der gesetzten Ligaturen kann die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen [81]. Dies ist entscheidend um einerseits die gewünschte Symptomatik zu induzieren und andererseits die Innervation der Extremität für die nachfolgenden Tests zur Detektion der mechanischen Hyperalgesie zu erhalten [82]. Anhand der messbaren Verhaltensänderungen der Versuchstiere kann sekundär auf die induzierte Symptomatik zurückgeschlossen werden [79]. Typischerweise entwickeln die Versuchstiere innerhalb der ersten Woche Verhaltensänderungen, die ihren Höhepunkt in der zweiten Woche erreichen und für mindestens sieben Wochen persistieren [78]. Der ideale Messzeitpunkt für die Neuropathie ist nach 14 Tagen, hier sind die Symptomatiken gut ausgeprägt und die begleitende Entzündungsreaktion des Gewebes durch die stattgehabte Präparation der Haut- und Weichteile in ausreichendem Maße abgeklungen [80, 83]. In verschiedenen Studien variiert die Anzahl der gesetzten Ligaturen, die Verwendung von einer, zwei, drei oder vier Ligaturen induziert eine vergleichbare und jeweils ausreichende neuropathische Symptomatik [80]. Als physiologische Reaktion auf die traumatische Manipulation durch das Legen der Ligaturen am *Nervus ischiadicus* bildet sich ein intraneurales Ödem, welches die Nervenfasern komprimiert. Einige der Axone gehen zugrunde und es entsteht eine lokale Entzündungsreaktion [80, 82, 84]. Eine Entzündungsreaktion führt zu einem lokalen Sensibilisierungsprozess. Die Entzündungsreaktion ist die primäre natürliche Antwort des Organismus auf einen Zellschaden und zielt u.a. darauf ab die geschädigten Strukturen abzubauen und den Reparaturprozess zu initiieren [85]. Durch das Trauma kommt es ab dem dritten Tag zu einer ortho- und retrograden Degeneration der betroffenen Axone [86], von denen die orthograde Degeneration (sog. Wallersche Degeneration) prominenter ausgeprägt ist [80, 87]. Die degenerierten zellulären Strukturen schrumpfen und kollabieren, die Myelinscheide löst sich

ab und es kommt zu einer segmentalen Demyelinisierung. Schwannzellen und ortsständige Makrophagen produzieren Entzündungsmediatoren, Makrophagen werden mobilisiert und phagozytieren den entstandenen Zelldebris und Myelin. Es folgt die Regeneration des Axons [80]. Methodisch zu beachten ist, dass das Zurückziehen der Pfote ein spinaler Reflex ist und nicht zwangsläufig mit dem subjektiven Schmerzempfinden gleichzusetzen ist [88]. Veränderungen in der Reizschwelle sind daher eher mit einer Sensibilisierung der peripheren und spinalen nozizeptiven Strukturen zu erklären. Ein vermehrtes Stressempfinden durch das Erleben der Symptomatik kann sich auch auf das Verhalten der Versuchstiere auswirken.

4.2 Quantitative Partikelanalyse mittels *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*

Insgesamt betrachtet ist in der *CCI*-Gruppe eine höhere Partikelkonzentration zu sehen, während die Partikelgröße in der *Sham*-Gruppe niedriger ausfällt. Über die verschiedenen Verteilungspositionen hinweg ist die Tendenz zu beobachten, dass die gemessene Partikelgröße in der *CCI*-Gruppe unter der Partikelgröße der *Sham*-Gruppe liegt. Verschiedene Faktoren können Größe und Konzentration von EVs im Serum beeinflussen [89]. Es ist bekannt, dass im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses im Organismus eine erhöhte EV-Konzentration und ein verändertes EV-Spektrum im Blutkreislauf vorliegen kann [89]. Zudem ist beschrieben, dass die Menge an EVs in der Blutzirkulation mit der Höhe des C-reaktiven Proteins (CRP, einem Entzündungsparameter korreliert [90]. Durch die Manipulation im Gewebe und das Setzen der Ligaturen um den *Nervus ischiadicus* wird eine anhaltende Entzündungsreaktion induziert und Entzündungsmediatoren freigesetzt. Darüber hinaus ist es möglich, dass bereits frühe Regenerationsprozesse stattfinden. CRP ist zudem in der akuten Phase einer Entzündung erhöht und sein Gehalt sinkt nach 6 – 10 h wieder ab. Da zwischen der zweiten Operation der Versuchstiere (Tag 14, B) und der Probengewinnung 14 Tage liegen, ist jedoch davon auszugehen, dass die akute Entzündungsreaktion bereits abgeklungen sein sollte. Demnach sollte eine akute Entzündungsreaktion als direkte Folge der Nervenläsion nicht als Ursache für Veränderungen der Vesikelkonzentration und -größe in Frage kommen. Der Entnahmezeitpunkt des Probenmaterials und die damit einhergehende Entzündungsreaktion in den Versuchstieren ist demnach eine beeinflussbare Variable. Die Messung wurde vor dem Isolationsprozess durchgeführt, somit muss bedacht werden, dass die hier nachgewiesenen und gemessenen Partikel möglicherweise zum größeren Teil den

nicht vesikulären extrazellulären Partikeln (NVEPs) zuzuordnen sind bzw. die EVs, die sich zu einem geringen Teil darunter befinden, „maskiert“ werden können [52]. Es muss angenommen werden, dass die nachgewiesenen Partikel eine Mischung aus EVs und NVEPs darstellen. Der NTA wird hier vor der Präzipitation durchgeführt. Das Präzipitat PEG kann einen elektronenmikroskopisch sichtbaren Film auf der Oberfläche der EVs bilden und somit weitergehenden Analysen beeinflussen [71]. Die NTA misst alle in Lösung liegenden Partikel und kann nicht zwischen EVs und anderen größengleichen Nanopartikeln unterscheiden [26, 28, 52]. Daher stellt insbesondere Probenmaterial mit einem hohen Proteingehalt im Hintergrund eine methodische Herausforderung dar [91]. Partikel ähnlicher Größe (wie EVs, Lipoproteine, Proteinaggregate) und co-isolierte Partikel führen zu Messungenauigkeiten. Die untere technische Nachweisgrenze liegt bei ca. 30 nm, damit überschneidet sich die untere Nachweisgrenze mit dem Größenspektrum von kleinen EVs und diese werden nicht detektiert, sodass das Vorhandensein dieser sEVs möglicherweise unterschätzt wird [53].

Bezüglich Größe und Konzentration von EVs liegen kaum vergleichbare Studien vor. Es ist beschrieben, dass nach Induktion von neuropathischen Schmerzen sowohl die Konzentration als auch die Größe von EVs im Vergleich mit einer Kontrollgruppe signifikant größer sind (CCI, Plasma) [92]. Diese Ergebnisse sind jedoch nur bedingt vergleichbar, da die EVs hier nach einer Isolation mittels Ultrazentrifugation charakterisiert wurden.

4.3 Präzipitation mit Polyethylenglykol

Nach der durchgeführten mehrschrittigen Präzipitation mit Polyethylenglykol wurde das Isolat mittels Western Blot Verfahren charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgt nach den 2023 definierten *Minimal Information for the Study of extracellular Vesicles (MISEV)* definierten Standards der *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)*. Die Ergebnisse zeigen, dass orientierend an den oben genannten experimentellen Standards die Präzipitationsmethode mit Polyethylenglykol EVs anreichern kann. Mit CD63 und TSG101 können zwei mit EVs assoziierte Proteine mittels Western Blot im Isolat nachgewiesen werden. Aktuell existiert kein generischer EV-Marker und auch keine verlässlichen Markerproteine, welche die einzelnen EV-Subtypen voneinander unterscheiden können [26]. Es konnten einige mit EVs assoziierte Proteine identifiziert werden. Als Konsequenz ihres Bildungsmechanismus enthalten EVs zytosolische Proteine, wie Proteine des Zytoskeletts

(bspw. Aktin, Vimentin, Annexine, Chaperone), Proteine die mit dem endosomalen System assoziiert sind sowie Proteine des *ESCRT*-Komplexes (u.a. *TSG101*, ALIX), welcher an der Bildung von EVs beteiligt ist [46]. Die Biogenese von Exosomen beginnt im endosomalen System einer Zelle mit der Abschnürung von intraluminalen Vesikel (*ILVs*) in das Innere eines Endosoms. Dieses reift zu einem *multivesicular body (MVB)*, welches mit Hilfe des Zytoskeletts zur Zellmembran transportiert wird und mit dieser fusioniert [24]. Dabei werden die Vesikel als Exosomen in den Extrazellularraum abgegeben [24]. Dieser Prozess wird durch den *endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-Komplex)* katalysiert, einer Proteinmaschinerie bestehend aus vier in Serie geschalteten Proteinkomplexen und weiteren akzessorischen Proteinen [24, 43, 93-95]. Die Komplexe 0 – II katalysieren die Einsortierung des Vesikelinhalts, der Komplex III die Fusion und Abschnürung an der Zellmembran [24, 96]. *TSG101* ist ein akzessorisches Protein und Bestandteil des Komplex 0, es katalysiert dessen Interaktion mit dem Komplex I [24]. Zudem sind EVs angereichert an Tetraspaninen wie CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 und CD82 [97, 98]. Tetraspanine sind Transmembranproteine und sind an der endosomalen- und der Plasmamembran in Mikrodomänen angereichert [24, 99]. Da bestimmte Tetraspanine wiederholt in Exosomenisolaten nachgewiesen wurden, definierte man diese als spezifische Markerproteine für EVs [17, 38, 98]. Dies konnte in den folgenden Jahren widerlegt werden. Tetraspanine wie CD9, CD63 und CD82, daneben auch ALIX und weitere *ESCRT*-Proteine, die zu den häufig verwendeten „Exosomenmarkern“ zählten, konnten vielmehr in einem breiten Spektrum von EVs nachgewiesen werden [40, 100]. Tetraspanine kommen an der Zellmembran vor und können deshalb auch in Vesikeln anderer Subpopulationen, welche sich über die Zellmembran abschnüren, vorkommen [98].

Die Präzipitation mit Polyethylenglykol ist ein akzeptiertes [50], günstiges [101], einfach umzusetzendes und zugleich schonendes Verfahren, um EVs aus Probenmaterial wie Serum zu isolieren [28]. Im Vergleich mit den aktuell angewandten Isolationsmethoden für EVs zeigt sich, dass diese Methode die prozentual höchste Ausbeute für EVs bietet [28, 53]. Diese vergleichbar hohe Ausbeute ist jedoch auch dadurch bedingt, dass die Präzipitation ein eher unspezifisches Verfahren ist. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Menge an co-isolierten Proteinen (Kontaminanten) aus dem Serum wie bspw. von Lipoproteinen hoch ist [28, 53, 59, 101]. Diese Kontamination kann das Ergebnis von nachstehenden Analysen wie bspw. einer Proteomikanalyse beeinflussen [59]. Durch das Präzipitat (PEG) wird zudem auch eine gewisse Verunreinigung und Aggregatbildung von EVs in Kauf genommen. *Weng et al.* konnten mittels

Elektronenmikroskopie darstellen, dass die Zugabe von PEG für die Isolation zu einer Aggregatbildung (zwischen EVs und weiteren Proteinen) führt und das Präzipitat einen sicht- und messbaren Film auf der Vesikeloberfläche hinterlässt [71]. Durch diese Aggregatbildung können sich (aggregierte) Proteine der weiteren Separation entziehen. Diese Verunreinigung kann auch die Ergebnisse nachstehender Analysen beeinflussen [101], weshalb weitere Aufreinigungsschritte sinnvoll werden [59]. Für eine Proteomikanalyse ist es letztendlich erforderlich, eine möglichst hohe und spezifische Anreicherung mit der größtmöglichen Depletion von störenden Kontaminanten zu erreichen.

Es kann diskutiert werden, ob die nachgewiesenen Lipoproteine eine andere Ursache haben können. *Toth et al.* konnten zeigen, dass sich eine Proteincorona an der Vesikeloberfläche bildet, sobald diese sezerniert werden (*mEVs*, 100 – 400 nm, Plasma) [102]. In diesem Kontext konnten neun Proteine identifiziert werden, welche an der Bildung dieser Proteincorona beteiligt sind: Apolipoprotein A1 (APOA1), Apolipoprotein B (APOB), Apolipoprotein C3 (APOC3), Apolipoprotein E (APOE), Komplementfaktor 3 und 4B (C3, C4B), Fibrinogen- α -Kette, Immunglobulin-Schwerkette γ 2 und γ 4 [102]. Lipoproteine sind demnach ein wesentlicher Bestandteil dieser Proteincorona. Somit ist zu hinterfragen, inwieweit die nachgewiesenen Lipoproteine im Isolat eine echte Kontamination darstellen, Teil der Vesikelcorona sind oder zum Proteom der EVs gehören. Diese Differenzierung scheint zum jetzigen Zeitpunkt unmöglich. Somit stehen jedoch mehrere Erklärungen im Raum, weshalb Lipoproteine als Kontaminanten in den Isolaten von vielen verschiedenen Studien beschrieben wurden [102, 103]. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass Proteine des Fettstoffwechsels und Akute-Phase-Proteine in der Regenerationsphase nach einer traumatischen Verletzung eines peripheren Nervens heraufreguliert sein können [104]. Es wird vermutet, dass diese Proteincorona die Mobilität der Vesikel [105] sowie auch deren Größe [106] und Dichte [102] beeinflussen kann. Vieles spricht dafür, dass diese Erkenntnisse bezüglich der Vesikelcorona für alle EV-Subtypen, wie auch sEVs gelten [102]. Bei der Zugabe von *LDL*-Partikeln zu isolierten EVs konnte gezeigt werden, dass sich spontan eine *LDL*-Korona um diese EVs bildet [55]. Ungeklärt ist weiterhin, inwieweit die Zusammensetzung der Proteincorona spezifisch ist oder sich zufällig auf der Vesikeloberfläche bildet und welche Rolle diese Proteine auf der Vesikeloberfläche für die Interaktion mit der Umgebung und die Aufnahme in eine Zielzelle spielen. Dieses Phänomen der Bildung einer Oberflächencorona aus Proteinen ist bereits in anderen Kontexten bekannt,

bspw. die Bildung einer Proteinkorona in biologischen Flüssigkeiten um Viruspartikel wie bei dem Herpes-Simplex-Virus (HSV) oder dem Respiratorischen-Synzytial-Virus (RSV) [107].

4.4 Ultrazentrifugation (UZ)

Die Ultrazentrifugation ist die am häufigsten verwendete Methode zur Isolation von extrazellulären Vesikeln [50]. Sie ist eine gut verfügbare und kosteneffiziente Methode und für große Probenvolumina geeignet. Bei der Verwendung von Probenmaterial mit einer komplexen Zusammensetzung ist es etabliert mehrere Isolationsverfahren schrittweise zu kombinieren [50]. Gemäß Literatur können sEVs bei Zentrifugalkräften von 100.000 – 200.000g separiert werden [108]. Da die Ultrazentrifugation ebenfalls eine unspezifische Methode ist, können auch hier NVEPs mit angereichert werden [28], bezüglich der *EV-recovery* sind in der Literatur stark schwankende Werte zwischen 2 % und 80 % (im Vergleich dazu die PEG Präzipitation mit 90 %) angegeben [28]. Gemäß Literatur ist auch bei der Ultrazentrifugation alleine keine exakte Auftrennung der Partikel zu erreichen [28]. Bei hohen g-Kräften können die Vesikel Aggregate von unterschiedlicher Morphologie bilden [26, 28, 109] und bei g-Kräften ab 120.000 g rupturieren [58].

4.5 *Size Exclusion Chromatography (SEC)*

Die *Size Exclusion Chromatography (SEC)* hat zum Ziel, das Polymer aus dem Isolat auszuwaschen [59] sowie Lipoproteine (APOA1-positives *HDL*) und EVs aufzutrennen. Die *SEC* ist ein schonendes [101] Verfahren zur Größenauftrennung. *Deregibus et al.* zeigten in einem vergleichbaren Versuchsaufbau, dass durch eine *SEC* eine Reduktion von APOA1 erreicht werden kann [72]. Die in Vorversuchen durchgeführte *SEC* zeigt hier keine Auftrennung von Lipoproteinen und EVs. Zu erwarten gewesen wäre ein Nachweis von *HDL* (über APOA1) in den früh eluierten Fraktionen, bei gleichzeitigem Nachweis von *TSG101* als Vesikelmarker in den spät eluierten Fraktionen. Wie in den gezeigten Western Blots zu entnehmen, sind über alle eluierten Fraktionen das mit *HDL* assoziierte Lipoprotein APOA1 und auch der Vesikelmarker *TSG101* in gleichbleibender Intensität nachweisbar. Die durchgeführte *SEC* konnte keine nachweisbare Auftrennung von EVs und APOA1-positiven *HDL* realisieren. Neben den überlappenden Dichteigenschaften von EVs und *HDL* müssen zudem die im

Serum vorliegenden Mengenverhältnisse berücksichtigt werden. Die Konzentration von *HDL* übersteigt die von EVs im Serum um ein Vielfaches. Trotz positivem Nachweis von APOA1 ist dennoch eine Reduktion der *HDL*-Partikel durch die *SEC* denkbar. Bei einer Reduktion der *HDL*-Partikel um 99 % werden die EVs verhältnismäßig konzentriert, vorausgesetzt man hat keinen größeren Verlust. Die noch verbliebenen 1 % der *HDL*-Partikel übersteigen weiterhin die Menge der EVs deutlich (>10.000-fach) [52, 110, 111]. Lipoproteine können zudem mit angereicherten EVs Aggregate von unterschiedlicher Größe formen [55]. Dies begünstigt zusätzlich eine erschwerte Auftrennbarkeit der beiden Partikel und könnte auch erklären, weshalb APOA1 in allen eluierten Fraktionen nachweisbar ist. EVs und Lipoproteine sind allgemein schwer voneinander zu trennen, denn auch bei gegenläufiger Herangehensweise, der Isolation von Lipoproteine aus Serumproben, sind hier mit EVs assoziierte Proteine nachweisbar [54, 112].

4.6 Massenspektrometrie

In den hier durchgeführten Massenspektrometrie können keine differentiell exprimierten Proteine zwischen den beiden Versuchsgruppen identifiziert werden. Möglicherweise ist dies dadurch erklärbar, dass bei den hier angewandten Isolationsmethoden ein zu großer Restanteil an co-isolierten Partikeln in den Isolaten vorliegt und diese Partikel das Vorliegen von differentiell exprimierten Proteinen aus EVs maskieren. Weitere mögliche Ursachen können zudem in der Nachweismethode (Massenspektrometrie) selber liegen. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis von Proteinen kann durch den präanalytischen Trypsinverdau erklärt werden. Besitzt ein Protein wenige geeignete Spaltstellen (in dem Fall für Lysin und Arginin) oder ist stark posttranslational modifiziert ist in diesen Fällen die Peptidbildung limitiert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass schlecht ionisierbare Peptide vorliegen. In diesen Fällen können sich die betreffenden Peptide der massenspektrometrischen Analyse entziehen und werden nicht nachgewiesen.

Es gibt bis dato nur wenige Studien, die differentiell exprimierte Proteinen im Kontext einer im Tiermodell induzierten peripheren Mononeuropathie identifizieren konnten. Explizit sind Studien zu differentiell exprimierten Proteinen aus isolierten extrazellulären Vesikeln in diesem Kontext rar. Die wenigen bisher auf diesem Gebiet durchgeführten Studien sind zudem sehr heterogen und weisen Unterschiede im angewandten Schmerzmodell, dem verwendeten

Probenmaterial, der Isolationsmethode(n) und dem verwendeten Detektionsverfahren der Proteine auf. Die bisher beschriebenen Proteinmodulationen sind inkonsistent. Eine vergleichbare Studie von *Jean-Toussaint et al. (2020)* konnte zwei Proteine identifizieren, die in Serumexosomen nach der Induktion einer peripheren Neuropathie heraufreguliert waren (*Spared nerve injury, SNI*): Der Komplementfaktor C5a und das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 [113]. Beide Proteine haben eine proinflammatorische Funktion und sind an der Leukozytenmigration beteiligt. Eine Inhibition von C5a konnte analgetische Effekte bei neuropathischen Schmerzen im Tierversuch zeigen [113, 114]. Konkordant dazu führt eine Blockade von ICAM-1 zu einer gestörten Migration von Immunzellen und folglich zu einer reduzierten Intensität der Entzündungsreaktion [113, 115]. Proteine, welche zu den Akute-Phase-Proteinen zählen und Proteine des Fettstoffwechsels sind in der Regenerationsphase nach einer traumatischen Verletzung eines peripheren Nerven heraufreguliert [104]. Galectin-3 wird nach einem Nervenstrauma von Schwannzellen heraufreguliert [116, 117] und konnte auch in Exosomen in diesem Kontext nachgewiesen werden [118]. Galectin-3 ist an der Regulierung der Myelinphagozytose [116, 119] und der Rekrutierung von Makrophagen beteiligt [87, 120].

Für die Bewertung, ob EVs im Isolat angereichert wurden können die *MISEV2023 Guidelines* sowie die Datenbanken *ExoCarta* und *Vesiclepedia* als Entscheidungsgrundlage herangezogen werden. Der Nachweis kann in den vorliegenden Ergebnisse nicht über die in den Vorversuchen verwendeten Proteine CD63 und *TSG101* erbracht werden. Dafür konnte das Tetraspanin CD9 als Transmembranprotein nachgewiesen werden. Demnach sind die Ergebnisse bezüglich des Nachweises von Vesikelmarkern inkonsistent. Neben den bereits etablierten Proteinen konnten in aktuelleren Studien weitere mit sEVs assoziierte Proteine identifiziert werden. Dazu zählen Syntenin-1 [121, 122] sowie weitere Proteine des *ESCRT*-Komplexes, Tetraspanine (CD3, -4, -5, -6, -14 mehr als CD9, CD63, CD81), Syndecan-4, ALIX, *Rab*- und *SNARE* Proteine (*soluble N-ethylmaleimidesensitive-factor attachment receptor*) [121]. Neben dem *ESCRT*-abhängigen Weg können EVs auch über andere *ESCRT*-unabhängige Wege entstehen [123]. *Stuffers et al. (2009)* zeigten, dass bei einer Blockade der *ESCRT*-Untereinheiten EVs gebildet und sezerniert wurden [25, 124]. Es ist davon auszugehen, dass mehrere Bildungswege neben- und miteinander existieren, darunter über die Interaktion der Proteine ALIX, Syntenin und Syndecan [38, 43], die somit auch für den Vesikelnachweis herangezogen werden könnten. Sie katalysieren die Bildung von *ILVs* am Endosom und sind

zudem an der Beladung der Vesikel mit Proteinen beteiligt [38, 43, 125]. ALIX (*programmed cell death 6 interacting protein*) ist wie *TSG101* ein akzessorisches Protein der ESCRT-Maschinerie, und an der Bildung von *ILVs* beteiligt [38, 43, 96]. Syntenin-1, Syndecan oder ALIX sind in der massenspektrometrischen Proteomanalyse nicht nachweisbar. Bezüglich der beschriebenen Vesikelcorona [102] konnte die massenspektrometrische Analyse den Nachweis von sechs dieser Proteine (APOA1, APOB100, APOC3, APOE, Komplementfaktor C3 und Fibrinogen) erbringen. Proteine des Fettstoffwechsels können in der Regenerationsphase nach einer traumatischen Verletzung eines peripheren Nervens heraufreguliert sein [104]. Die massenspektrometrische Analyse kann auch hier keine Aussage über den Ursprung dieser Proteine liefern.

4.7 Schlussfolgerungen

Die in den letzten Jahrzehnten rapide wachsende Anzahl an Studien und Ergebnissen zeigt das immense Potential, welches in der Erforschung von EVs in der medizinischen Grundlagenforschung und damit auch in Diagnostik und Therapie von Krankheiten steckt. Es ist bekannt, dass EVs eine grundlegende Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation darstellen und auch an der Modulation von Signalkaskaden, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen beitragen, beteiligt sind. Es ist anzunehmen, dass die Erforschung von differentiell regulierten Proteinen in EVs im Kontext von neuropathischen Schmerzen einen Erkenntnisgewinn liefern kann. Wie in den Ergebnissen dieser Arbeit dargestellt kann die angewandte Methode zur Isolation von EVs bei der Verwendung von Serumproben einen limitierenden Faktor darstellen. Somit ist die Etablierung einer validen Isolationsmethode von EVs unabdingbar und stellt aktuell einen limitierenden Faktor dar.

Für den Gebrauch dieser Vesikel im klinischen Alltag, etwa als Biomarker für neuropathischen Schmerz oder als *carrier* für eine zielgerichtete Therapie, müssen hohe Anforderungen betreffend Anwendungssicherheit, Verlässlichkeit, Reproduzierbarkeit und Kosten erfüllt werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Jensen, T.S., et al., *A new definition of neuropathic pain*. Pain, 2011. **152**(10): p. 2204-2205.
2. Finnerup, N.B., et al., *Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice*. Pain, 2016. **157**(8): p. 1599-1606.
3. Leadley, R.M., et al., *Chronic diseases in the European Union: the prevalence and health cost implications of chronic pain*. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2012. **26**(4): p. 310-25.
4. Costigan, M., J. Scholz, and C.J. Woolf, *Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage*. Annu Rev Neurosci, 2009. **32**: p. 1-32.
5. Baumgärtner, U., *[Nociceptive system : Nociceptors, fiber types, spinal pathways, and projection areas]*. Schmerz, 2010. **24**(2): p. 105-13.
6. Schüncke, M., et al., *Prometheus: LernAtlas der Anatomie (4., überarbeitete und erweiterte Auflage)* 2015.
7. van Hecke, O., et al., *Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies*. Pain, 2014. **155**(4): p. 654-62.
8. Cohen, S.P. and J. Mao, *Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications*. Bmj, 2014. **348**: p. f7656.
9. Schlereth, T., *s2k-Leitlinie, Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen (2019)*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie
10. Baron, R., A. Binder, and G. Wasner, *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment*. Lancet Neurol, 2010. **9**(8): p. 807-19.
11. Costigan, M., et al., *Heat shock protein 27: developmental regulation and expression after peripheral nerve injury*. J Neurosci, 1998. **18**(15): p. 5891-900.
12. Finnerup, N.B., R. Kuner, and T.S. Jensen, *Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment*. Physiol Rev, 2021. **101**(1): p. 259-301.
13. Sosanya, N.M., et al., *Identifying Plasma Derived Extracellular Vesicle (EV) Contained Biomarkers in the Development of Chronic Neuropathic Pain*. J Pain, 2020. **21**(1-2): p. 82-96.
14. Scholz, J. and C.J. Woolf, *The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1361-8.
15. Wu, G., et al., *Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents*. J Neurosci, 2002. **22**(17): p. 7746-53.
16. al., S.T.e., *Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie*. 2019, Deutsche Gesellschaft für Neurologie
17. Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.

18. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(3): p. 301-12.
19. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
20. Zeringer, E., et al., *Strategies for isolation of exosomes*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(4): p. 319-23.
21. Hessvik, N.P. and A. Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(2): p. 193-208.
22. Li, P., et al., *Progress in Exosome Isolation Techniques*. Theranostics, 2017. **7**(3): p. 789-804.
23. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert Rev Proteomics, 2009. **6**(3): p. 267-83.
24. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
25. Juan, T. and M. Furthauer, *Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **74**: p. 66-77.
26. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. J Extracell Vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
27. Bandu, R., J.W. Oh, and K.P. Kim, *Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology*. Exp Mol Med, 2019. **51**(3): p. 30.
28. Coumans, F.A.W., et al., *Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles*. Circ Res, 2017. **120**(10): p. 1632-1648.
29. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. J Biol Chem, 1946. **166**(1): p. 189-97.
30. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
31. Couch, Y., et al., *A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(14): p. e12144.
32. Crawford, N., *The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma*. Br J Haematol, 1971. **21**(1): p. 53-69.
33. Nunez, E.A., J. Wallis, and M.D. Gershon, *Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. 3. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation*. Am J Anat, 1974. **141**(2): p. 179-201.
34. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 329-39.
35. Pan, B.T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. **33**(3): p. 967-78.
36. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.

37. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
38. Gurung, S., et al., *The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling*. Cell Commun Signal, 2021. **19**(1): p. 47.
39. Saint-Pol, J. and M. Culot, *Minimum information for studies of extracellular vesicles (MISEV) as toolbox for rigorous, reproducible and homogeneous studies on extracellular vesicles*. Toxicol In Vitro, 2025. **106**: p. 106049.
40. Cufaro, M.C., et al., *Extracellular Vesicles and Their Potential Use in Monitoring Cancer Progression and Therapy: The Contribution of Proteomics*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 1639854.
41. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*. Cell Biosci, 2019. **9**: p. 19.
42. Haraszti, R.A., et al., *High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 32570.
43. Baietti, M.F., et al., *Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 677-85.
44. Costa Verdera, H., et al., *Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis*. J Control Release, 2017. **266**: p. 100-108.
45. Prada, I. and J. Meldolesi, *Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
46. Meldolesi, J., *Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication*. Curr Biol, 2018. **28**(8): p. R435-r444.
47. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
48. McKelvey, K.J., et al., *Exosomes: Mechanisms of Uptake*. J Circ Biomark, 2015. **4**: p. 7.
49. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
50. Gardiner, C., et al., *Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 32945.
51. Royo, F., et al., *Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee*. Cells, 2020. **9**(9).
52. Nieuwland, R. and P.R. Siljander, *A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum*. J Extracell Vesicles, 2024. **13**(1): p. e12400.
53. Brennan, K., et al., *A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 1039.
54. Simonsen, J.B., *What Are We Looking At? Extracellular Vesicles, Lipoproteins, or Both?* Circ Res, 2017. **121**(8): p. 920-922.
55. Sódar, B.W., et al., *Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24316.

56. György, B., et al., *Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters.* Blood, 2011. **117**(4): p. e39-48.
57. Doyle, L.M. and M.Z. Wang, *Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis.* Cells, 2019. **8**(7).
58. Ramirez, M.I., et al., *Technical challenges of working with extracellular vesicles.* Nanoscale, 2018. **10**(3): p. 881-906.
59. Taylor, D.D. and S. Shah, *Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes.* Methods, 2015. **87**: p. 3-10.
60. Yu, X., et al., *The release of exosomes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens brain regions of chronic constriction injury (CCI) model mice could elevate the pain sensation.* Neurosci Lett, 2020. **723**: p. 134774.
61. Vicario, N., et al., *Intercellular communication and ion channels in neuropathic pain chronicization.* Inflamm Res, 2020. **69**(9): p. 841-850.
62. Zhang, K., et al., *Concise review: Current understanding of extracellular vesicles to treat neuropathic pain.* Front Aging Neurosci, 2023. **15**: p. 1131536.
63. Lopez-Verrilli, M.A. and F.A. Court, *Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system.* Front Physiol, 2012. **3**: p. 205.
64. Lopez-Verrilli, M.A., F. Picou, and F.A. Court, *Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system.* Glia, 2013. **61**(11): p. 1795-806.
65. López-Leal, R., et al., *Schwann cell reprogramming into repair cells increases miRNA-21 expression in exosomes promoting axonal growth.* J Cell Sci, 2020. **133**(12).
66. Yu, T., et al., *Exosomes as a Promising Therapeutic Strategy for Peripheral Nerve Injury.* Curr Neuropharmacol, 2021. **19**(12): p. 2141-2151.
67. Bucan, V., et al., *Effect of Exosomes from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neurite Outgrowth and Sciatic Nerve Regeneration After Crush Injury.* Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 1812-1824.
68. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.* Pain, 1988. **33**(1): p. 87-107.
69. Austin, P.J., A. Wu, and G. Moalem-Taylor, *Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats.* J Vis Exp, 2012(61).
70. Filipe, V., A. Hawe, and W. Jiskoot, *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates.* Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 796-810.
71. Weng, Y., et al., *Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling.* Analyst, 2016. **141**(15): p. 4640-6.
72. Deregibus, M.C., et al., *Charge-based precipitation of extracellular vesicles.* Int J Mol Med, 2016. **38**(5): p. 1359-1366.
73. Kalra, H., et al., *Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation.* PLoS Biol, 2012. **10**(12): p. e1001450.

74. Simpson, R.J., H. Kalra, and S. Mathivanan, *ExoCarta as a resource for exosomal research*. J Extracell Vesicles, 2012. **1**.
75. Mathivanan, S., et al., *ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D1241-4.
76. Pathan, M., et al., *Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D516-d519.
77. Kim, D.K., et al., *EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research*. Bioinformatics, 2015. **31**(6): p. 933-9.
78. Jaggi, A.S., V. Jain, and N. Singh, *Animal models of neuropathic pain*. Fundam Clin Pharmacol, 2011. **25**(1): p. 1-28.
79. Colleoni, M. and P. Sacerdote, *Murine models of human neuropathic pain*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(10): p. 924-33.
80. Gopalsamy, B., et al., *Experimental Characterization of the Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain Model in Mice*. Neurochem Res, 2019.
81. Wang, C., et al., *Effects of varying degrees of ligation in a neuropathic pain model induced by chronic constriction injury*. Life Sci, 2021. **276**: p. 119441.
82. Campbell, J.N. and R.A. Meyer, *Mechanisms of neuropathic pain*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 77-92.
83. Starowicz, K., et al., *Peripheral antinociceptive effects of MC4 receptor antagonists in a rat model of neuropathic pain - a biochemical and behavioral study*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(6): p. 1086-95.
84. Maves, T.J., et al., *Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man*. Pain, 1993. **54**(1): p. 57-69.
85. Moalem, G. and D.J. Tracey, *Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain*. Brain Res Rev, 2006. **51**(2): p. 240-64.
86. Coleman, M.P. and M.R. Freeman, *Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat*. Annu Rev Neurosci, 2010. **33**: p. 245-67.
87. Gaudet, A.D., P.G. Popovich, and M.S. Ramer, *Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 110.
88. Rice, A.S.C., et al., *Sensory profiling in animal models of neuropathic pain: a call for back-translation*. Pain, 2018. **159**(5): p. 819-824.
89. Benedikter, B.J., et al., *Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(13): p. 2321-2337.
90. Eguchi, A., et al., *Identification of actin network proteins, talin-1 and filamin-A, in circulating extracellular vesicles as blood biomarkers for human myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome*. Brain Behav Immun, 2020. **84**: p. 106-114.
91. Kowkabany, G. and Y. Bao, *Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles*. Molecules, 2024. **29**(19): p. 4672.
92. Tang, Y., et al., *Schwann cell-derived extracellular vesicles promote memory impairment associated with chronic neuropathic pain*. J Neuroinflammation, 2024. **21**(1): p. 99.

93. Schmidt, O. and D. Teis, *The ESCRT machinery*. *Curr Biol*, 2012. **22**(4): p. R116-20.
94. Colombo, M., et al., *Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 24): p. 5553-65.
95. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway*. *Dev Cell*, 2011. **21**(1): p. 77-91.
96. Larios, J., et al., *ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes*. *J Cell Biol*, 2020. **219**(3).
97. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. *Bioscience*, 2015. **65**(8): p. 783-797.
98. Andreu, Z. and M. Yanez-Mo, *Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 442.
99. Perez-Hernandez, D., et al., *The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(17): p. 11649-61.
100. Kowal, J., et al., *Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(8): p. E968-77.
101. Tiwari, S., et al., *Preparation and characterization of extracellular vesicles*. *Am J Reprod Immunol*, 2021. **85**(2): p. e13367.
102. Tóth, E., et al., *Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma*. *J Extracell Vesicles*, 2021. **10**(11): p. e12140.
103. Palviainen, M., et al., *Extracellular vesicles from human plasma and serum are carriers of extravesicular cargo-Implications for biomarker discovery*. *PLoS One*, 2020. **15**(8): p. e0236439.
104. Jiménez, C.R., et al., *Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(2): p. 120-32.
105. Skliar, M., et al., *Membrane proteins significantly restrict exosome mobility*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **501**(4): p. 1055-1059.
106. Varga, Z., et al., *Size Measurement of Extracellular Vesicles and Synthetic Liposomes: The Impact of the Hydration Shell and the Protein Corona*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020. **192**: p. 111053.
107. Ezzat, K., et al., *The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2331.
108. Momen-Heravi, F., et al., *Current methods for the isolation of extracellular vesicles*. *Biol Chem*, 2013. **394**(10): p. 1253-62.
109. Linares, R., et al., *High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 2015. **4**: p. 29509.
110. Johnsen, K.B., et al., *What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019. **1871**(1): p. 109-116.
111. Boing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. *J Extracell Vesicles*, 2014. **3**.

112. Dashty, M., et al., *Proteome of human plasma very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism*. *Thromb Haemost*, 2014. **111**(3): p. 518-30.
113. Jean-Toussaint, R., et al., *Proteome characterization of small extracellular vesicles from spared nerve injury model of neuropathic pain*. *J Proteomics*, 2020. **211**: p. 103540.
114. Quadros, A.U. and T.M. Cunha, *C5a and pain development: An old molecule, a new target*. *Pharmacol Res*, 2016. **112**: p. 58-67.
115. Machelska, H., et al., *Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1*. *J Neurosci*, 2002. **22**(13): p. 5588-96.
116. Rotshenker, S., *Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury*. *J Neuroinflammation*, 2011. **8**: p. 109.
117. Ching, R.C. and P.J. Kingham, *The role of exosomes in peripheral nerve regeneration*. *Neural Regen Res*, 2015. **10**(5): p. 743-7.
118. Choi, D.S., et al., *Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes*. *Mass Spectrom Rev*, 2015. **34**(4): p. 474-90.
119. Bosse, F., *Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration*. *Cell Tissue Res*, 2012. **349**(1): p. 5-14.
120. Gaudet, A.D., et al., *A role for galectin-1 in the immune response to peripheral nerve injury*. *Exp Neurol*, 2009. **220**(2): p. 320-7.
121. Lischig, A., et al., *Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles*. *Mol Cell Proteomics*, 2022. **21**(9): p. 100273.
122. Kugeratski, F.G., et al., *Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker*. *Nat Cell Biol*, 2021. **23**(6): p. 631-641.
123. Wei, D., et al., *RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway*. *Cell Res*, 2021. **31**(2): p. 157-177.
124. Stuffers, S., et al., *Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs*. *Traffic*, 2009. **10**(7): p. 925-37.
125. Ghossoub, R., et al., *Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3477.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Anatomie des nozizeptiven Systems [6]. Dargestellt auf der linken Seite die aufsteigende nozizeptive Bahn und auf der rechten Seite die absteigende anti-nozizeptive Bahn (übernommen mit Genehmigung des Thieme-Verlages aus Schüncke, M., et al., *Prometheus: LernAtlas der Anatomie (4., überarbeitete und erweiterte Auflage)* 2015)..... 3

Abb. 2: Übersicht über die Biogenese der drei Subtypen von extrazellulären Vesikeln (Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen) modifiziert nach *Gurung et al.* [38]. ILV = Intraluminal Vesikel, MVB = *Multivesicular Body*, ESCRT = *Endosomal Sorting Complex required for Transport*. (Abbildung erstellt mit der Applikation Procreate von Savage Interactive, Version 5.3.1)..... 7

Abb. 3: Auflistung der prozentual am häufigsten verwendeten primären Isolationsmethode zur Isolation von extrazellulären Vesikeln (EVs) unabhängig vom verwendeten Probenmaterial [50]. Online-Umfrage unter Forschenden der *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)*..... 9

Abb. 4: Versuchsablauf der Tierversuche. Der Versuchszeitraum beträgt 28 Tage. OP = Operation..... 18

Abb. 5: *Chronic-Constriction-Injury (CCI)* Modell nach *Bennett et al.* [68]. N. = Nervus. Abbildung modifiziert nach *Austin et al.* [69] (erstellt mit der Applikation Procreate von Savage Interactive, Version 5.3.1)..... 19

Abb. 6: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der gesamten Stichprobe. Dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C) 27

Abb. 7: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der *Chronic-Constriction-Injury-Gruppe (CCI)* dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C) 28

Abb. 8: Pfotenrückzugsschwellenwert (PRS, in g) der *Sham-Gruppe* dargestellt an den drei Messzeitpunkten Tag 0 (A), Tag 14 (B) und Tag 28 (C) 28

Abb. 9: Vergleich der Partikelkonzentration (in 10^{10} Partikel/ml) zwischen der *Chronic-Constriction-Injury-Gruppe (CCI)* und der *Sham-Gruppe* gemessen mittels *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)* 31

Abb. 10: Vergleich der jeweiligen Partikelgröße (in nm) in den Verteilungspositionen X10 (a), X50 (b), X90 (c) und Mean (d) zwischen den beiden Versuchsgruppen *Chronic-Constriction-Injury (CCI)* und *Sham*. Gemessen mittels *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*..... 35

Abb. 11: Nachweis des Proteins *tumor susceptibility gene 101 (TSG101)* nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit 6 min. Positivkontrolle: 6 µg Protein 38

Anhang

Abb. 12: Nachweis des Proteins CD63 nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit: 20 s. Positivkontrolle: 0,55 µg / µl	38
Abb. 13: Nachweis des Proteins Albumin nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand	39
Abb. 14: Nachweis des Proteins ApolipoproteinA1 (APOA1) nach Präzipitation mit Polyethylenglykol in Isolat und Überstand. Belichtungszeit 10 s. Positivkontrolle 20 µg Protein	40
Abb. 15: Nachweis des Proteins <i>tumor susceptibility gene (TSG101)</i> in Isolaten aus gepooltem Rattenserum: Die Proben „vor UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol. Die Proben „nach UZ“ sind Isolate nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und Ultrazentrifugation. Belichtungszeit: 5 min. Positivkontrolle: 15 µg Proteinmenge	41
Abb. 16: Nachweis des Proteins CD63 in Isolaten aus gepooltem Rattenserum: Die Proben „vor UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol. Die Proben „nach UZ“ sind Isolate nach der Präzipitation mit Polyethylenglykol und Ultrazentrifugation. Belichtungszeit: 1 min. Negativkontrolle: Poolserum	42
Abb. 17: Nachweis des Proteins ApolipoproteinA1 (APOA1) in einem Isolat aus gepooltem Rattenserum nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und <i>Size Exclusion Chromatography</i> mit Sephadex™ G-100. Belichtungszeit: 10 min. Positivkontrolle: 20 µg Proteinmenge	43
Abb. 18: Nachweis des Proteins <i>tumor susceptibility gene 101 (TSG101)</i> in einem Isolat aus gepooltem Rattenserum nach Präzipitation mit Polyethylenglykol und <i>Size Exclusion Chromatography</i> mit Sephadex™ G-100. Belichtungszeit: 10 min. Positivkontrolle: 20 µg Proteinmenge	44
Abb. 19: Abgleich der massenspektrometrischen Analyse mit den Proteindatenbanken <i>Vesiclepedia</i> und <i>ExoCarta</i> bezüglich des Vorhandenseins von häufig in EVs nachgewiesenen Proteinen.	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisch-ätiologische Einteilung von neuropathischen Schmerzen (modifiziert nach Baron) [10]	4
Tabelle 2: Blutkonzentration (pro Milliliter Blut (ml)) der hier relevanten Bestandteile [52, 53]	10
Tabelle 3: Physikochemische Eigenschaften (Größe und Dichte) von Extrazellulären Vesikeln (EVs) und Lipoproteinen [53, 56]. Die Größe ist angegeben in Nanometer (nm), die Dichte ist angegeben in Gramm pro Milliliter (g/ml).....	11
Tabelle 4: Arithmetisches Mittel (<i>Mean</i>) des Pfotenrückzugsschwellenwerts (PRS, in g) dargestellt an den drei Messzeitpunkten A (Tag 0), B (Tag 14) und C (Tag 28) für die gesamte Stichprobe (Gesamt) und die Versuchsgruppen <i>Chronic Constriction Injury (CCI)</i> und <i>Sham</i> . 26	
Tabelle 5: Ergebnisse des Post-hoc Tests. Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (Korrekturmethode: Bonferroni).....	27
Tabelle 6: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, $n = 16$. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28.....	29
Tabelle 7: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, $n =$ Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28	29
Tabelle 8: Statistische Momente <i>Chronic-Constriction-Injury</i> -Gruppe, $n = 8$. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28.....	29
Tabelle 9: Statistische Momente der <i>Chronic-Constriction-Injury</i> -Gruppe. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, $n =$ Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28.....	29
Tabelle 10: Statistische Momente der <i>Sham</i> -Gruppe, $n = 8$. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28	30

Anhang

- Tabelle 11: Statistische Momente der *Sham*-Gruppe. Pfotenrückzugsschwellenwert in g. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. A = Messung an Tag 0, B = Messung an Tag 14, C = Messung an Tag 28 30
- Tabelle 12: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, $n = 12$. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung 32
- Tabelle 13: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte 32
- Tabelle 14: Statistische Momente *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe, $n = 6$. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung 32
- Tabelle 15: Statistische Momente der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte 32
- Tabelle 16: Statistische Momente der *Sham*-Gruppe, $n = 6$. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung 32
- Tabelle 17: Statistische Momente der *Sham*-Gruppe. Messung der Partikelkonzentration (Conc.) in 10^{10} Partikel pro Milliliter (ml). Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte 33
- Tabelle 18: Statistische Momente der gesamten Stichprobe, $n = 12$. Partikelgrößenverteilung in nm. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel..... 35
- Tabelle 19: Statistische Momente der gesamten Stichprobe. Partikelgrößenverteilung in nm. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel..... 36
- Tabelle 20: Statistische Momente *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe, $n = 6$. Partikelgrößenverteilung in nm. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel..... 36
- Tabelle 21: Statistische Momente der *Chronic-Constriction-Injury*-Gruppe. Partikelgrößenverteilung in nm. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil,

Anhang

VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel..... 36

Tabelle 22: Statistische Momente der *Sham*-Gruppe, n = 6. Partikelgrößenverteilung in nm. Min = Minimum, Max = Maximum, Mean = arithmetisches Mittel, sd = Standardabweichung. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel. 37

Tabelle 23: Statistische Momente der *Sham*-Gruppe. Partikelgrößenverteilung in nm. Q1 = erstes Quartil, median = Median, Q3 = drittes Quartil, VarK = Variationskoeffizient, n = Anzahl Messwerte. X10 = 10. Perzentil, X50 = 50. Perzentil, X90 = 90. Perzentil, Mean = arithmetisches Mittel..... 37

Tabelle 24: Ausschnitt aus der massenspektrometrischen Analyse mit den 18 meist abundanten Proteinen sortiert in absteigender Reihenfolge nach der absoluten Menge der detektierten Peptide (*CCI* = *Chronic-Constriction-Injury*). Statistische Auswertung (t-Test/*SAM*-Analyse Statistik (*SAM* = *Significance Analysis of Microarrays*) zwischen den beiden Versuchsgruppen (*Chronic-Constriction-Injury* und *Sham*) mit *False Discovery Rate* (FDR) 5 %, Standard Error (So) 0,1. 45

Tabelle 25: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sortiert in absteigender Reihenfolge nach der absoluten Anzahl der detektierten Peptide. *Mean* = Mittelwert, *CCI* = *Chronic Constriction-Injury*..... 70

Anhang

Anhang

Protein Name	Peptide	Mean CCI	Mean Sham	t-test
Apolipoprotein B-100	267	1704700000	1869500000	-0,631576
Komplementfaktor C3	142	4126420000	3342020000	1,19896
Anastellin	118	1773470000	2041150000	-0,771346
Fibronectin	117	156308000	190867000	-0,205234
Myosin-6	114	94636400	77772800	0,59628
Filamin A	111	165086000	156880000	0,184855
Talin 1	105	112933000	96903500	0,454994
Komplementfaktor C4	93	2344430000	1787420000	1,64927
Complement C4A	91	18676500	17726600	-1,88019
Komplementfaktor C5	86	351383000	350938000	0,0616989
Komplement C4a	86	185692000	186228000	-0,00676941
Komplementfaktor H	78	1869720000	1598530000	1,061
Thrombospondin 1	75	7387170000	7046720000	0,0362433
Multimerin 1	44	178690000	179060000	-0,110785
Alpha-2-Makroglobulin	43	73879700	67785700	0,271611
von Willebrand factor	43	29120200	23507200	0,823739
Komplementfaktor C6	43	94031500	100517000	-0,314997
Albumin	41	172092000	134328000	1,16918
Plasminogen	41	54065800	55851800	-0,123767
Alpha-1-Makroglobulin	40	34861200	32113200	0,0875064
C4b-binding protein alpha chain	36	1795370000	1575680000	0,499125
Alpha-actinin-1	36	25733600	24815700	-0,139382
Peroxidase	35	28875000	26764500	0,419836
Komplementfaktor C7	35	163830000	170663000	-0,265133
Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	35	170582000	181502000	-0,438161
Murinoglobulin-1	33	14711700	11621300	1,11967
Reelin	33	10324800	8990850	0,581068
Complement component C8 beta chain	31	102095000	119893000	-0,828663
Fibulin-1	30	129869000	142058000	-0,482637
Clathrin heavy chain 1	30	8905550	7243730	0,713853
Complement component C9	30	114145000	123894000	-0,538055
Fibulin-1	29	88600200	91002700	-0,184979
Integrin subunit alpha 2b	29	67395400	61970200	0,520548
Vinculin	28	11717500	9835630	0,618189
Complement C8 alpha chain	28	53026000	51743000	0,186168
Transferrin	28	32928700	29153800	0,462322
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	27	96982800	83278200	0,444631
Integrin beta-3	27	57883700	47415200	0,837879
von Willebrand factor type A	25	4523450	3747700	0,36018
Fermitin family member 3	25	27937200	26037200	0,191143
Fibrinogen beta chain	25	44964700	34963200	0,506736
Actin	25	331675000	269843000	1,00405
Fibrinogen alpha chain	25	52894200	38539000	0,748017
Coagulation factor V	24	35597800	43042500	-1,19095
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	24	21588800	24469000	-0,594555
Immunoglobulin heavy constant mu	23	2017680000	1935000000	-0,0572073
Ras GTPase-activating protein 3	23	13493400	15122300	-0,613017
Pyruvate kinase PKLR	23	18127500	8699950	0,366596
Complement subcomponent C1r	23	66882500	60945200	0,465374

Tabelle 25: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sortiert in absteigender Reihenfolge nach der absoluten Anzahl der detektierten Peptide. Mean = Mittelwert, CCI = Chronic Constriction-Injury

Anhang

Complement factor H-related 2	23	178233000	157303000	0,267725
Vitamin K-dependent protein S	23	291222000	241877000	0,929443
Coagulation factor XIII	23	7541360	9426780	-1,23165
Extracellular matrix protein 1	23	65407200	54482500	0,917941
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	22	20755300	12820100	1,96784
Apolipoprotein E	21	1575530000	1427930000	0,62831
Thrombospondin-4	21	24211800	17373200	1,09324
Transferrin receptor protein 1	21	20088400	23042800	-0,32116
Similar to complement factor H-related protein	20	17874100	10132100	1,35014
Fibrinogen-like 2	20	290903000	297225000	-0,169708
Integrin subunit alpha 6	19	13407200	12016200	0,565685
Prothrombin	19	39613800	43935300	-0,666998
Fibrinogen gamma chain	19	58971000	45341200	0,549895
Anion exchange protein	18	27216000	18543800	0,543766
Complement C1s subcomponent	18	53543000	43494000	1,07577
Apolipoprotein A-I	18	80747500	94703100	-0,926168
Complement C1s subcomponent	18	10297300	7697150	0,889059
Cytochrome P450	17	21654900	7346750	0,180554
Serine protease inhibitor A3N	17	9841480	12168700	-0,87465
Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1	17	25957500	30880800	-0,929142
Heat shock 70 kDa protein 1A	17	17745000	13368800	1,26992
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	17	23978200	26017200	-0,394144
Tubulin beta chain	17	16659500	17028200	-0,109081
Serine protease inhibitor A3L	17	5133850	7548520	-2,0855
Mannan-binding lectin serine protease 2	16	24688700	23216800	0,284208
Endoplasmic reticulum chaperone	16	11155200	5315330	0,800134
Cytochrome P450 2D26	16	18648700	7084770	-0,0533414
Ig gamma-2C chain C region	16	121025000	168338000	-0,844433
Mannan-binding lectin serine protease 1	15	20718000	19395000	0,593467
Complement factor properdin	15	221642000	147027000	1,7959
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	15	26928300	32201700	-0,773019
Apolipoprotein A-IV	15	31523500	25783800	0,734812
Antithrombin-III	15	17250700	16251800	0,352404
Serine or cysteine proteinase inhibitor	14	6024160	11943600	-2,62718
Protein disulfide-isomerase A3	14	7156500	2495960	0,677276
Hemoglobin subunit beta-1	14	395935000	306783000	0,402702
Serine protease inhibitor A3K	14	4245500	7633470	-0,72905
Vitronectin	14	208004000	143593000	0,469147
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	14	5071720	4999420	0,153015
Integrin beta	13	16070700	18494800	-0,488415
Complement factor H-related protein B	13	167020000	122737000	1,20092
Annexin	13	21207500	20447300	0,0342148
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	13	22594000	20488000	0,272795
Histidine-rich glycoprotein	12	21201200	17233000	0,981472
Cytochrome P450 2B1	12	17084500	8063770	0,324947
Angiopietin-like 6	12	4582200	3909680	0,350935
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	12	13473500	19179000	-1,37689
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	12	2725600	2325870	0,844462
Glia-derived nexin	12	11958400	19259500	-1,94684
C-type lectin domain family 11 member A	12	36260200	29764000	0,639829
Epoxide hydrolase 1	12	20363700	3030340	-0,0440194
Ig gamma-2A chain C region	12	48496700	50092000	0,216115
CD5 antigen-like	12	120621000	115490000	-0,0197013
Beta-2-glycoprotein 1	12	34421200	33897000	0,0611798
Tubulin alpha-4A chain	12	42734500	42667500	-0,160628
Plasma protease C1 inhibitor	12	27439700	21026300	0,853416
Alpha-1-antitrypsin	11	24862800	21347200	0,798962
Ig kappa chain C region	11	311047000	421478000	-1,08514
Cytoplasmic FMR1-interacting protein	11	9345770	8125250	0,74357
Spectrin	11	4692570	727987	1,33452

Fortsetzung der Tabelle 25

Anhang

Protein unc-13 homolog D (Munc13-4)	11	3321730	5154670	-1,29205
Hemopexin	11	8678800	7781520	0,275714
Tubulin alpha-1A chain	11	4378420	5074980	-0,41491
Adenylyl cyclase-associated protein 2	11	9095370	8274880	0,466114
Metalloproteinase inhibitor 3	11	82475000	81460500	-0,175147
Protein Z-dependent protease inhibitor	11	25821300	23622200	0,48641
Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Hensin)	11	30693700	30450300	0,170687
Dimethylaniline monooxygenase	10	9315700	1514650	0,675381
EH domain-containing protein 3	10	4973050	4973000	0,213157
Calpain-5	10	7367130	7786450	-0,390067
Ceruloplasmin	10	4725500	5728130	-0,446386
Complement C8 gamma chain	10	44517300	48180500	-0,434395
Collagen type VI alpha 1 chain	10	7041870	8057320	-0,358373
Neurobeachin-like 2	10	2140630	2550930	0,188029
Angiopoietin-1	10	8763600	7907980	0,303922
Uncharacterized protein	10	2342270	2618350	-0,478125
Clusterin	10	21623700	16171000	1,49775
Protein disulfide-isomerase	10	4212060	1422530	1,12927
Cytochrome P450 2A1	10	7076240	1200460	1,18889
Mannose-binding protein A	10	199443000	159853000	0,769909
Retinol dehydrogenase 7	10	18039600	7455620	0,138494
14-3-3 protein zeta/delta	10	30607300	26745500	0,767925
Tubulin beta-5 chain	10	13992800	21741700	-1,31963
Endoplasmic	9	9668920	1751100	0,521256
Protein disulfide-isomerase A6	9	11548700	11056400	0,395922
Hemoglobin, beta adult s chain	9	11157000	15834600	-1,64773
Protein-tyrosine-phosphatase	9	9933560	10072800	-0,833936
Serum amyloid P-component	9	47220700	3116270	0,968695
C4b-binding protein beta chain	9	135482000	104208000	0,853915
Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Hensin)	9	15594800	20232800	0,601037
Immunoglobulin heavy constant mu	9	19020800	20079700	-0,841036
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9	48593000	33628500	1,59065
UDP-glucuronosyltransferase 2B17	9	21970700	4893480	0,551001
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	9	3116600	2604900	0,29119
Ficolin-1	9	186217000	128813000	1,29797
Ras-related protein Rap-1A	9	104043000	83850500	0,889611
Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Hensin)	8	12534500	8700800	1,29612
Galectin-3-binding protein	8	9871780	7308140	1,13702
Hemoglobin subunit alpha-1/2	8	346778000	241019000	0,780774
Phospholipase A2	8	81462200	54478800	2,09844
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	8	7678760	1738210	0,394619
Ig gamma-2B chain C region	8	209695000	243787000	-0,539233
Alpha-2-HS-glycoprotein	8	21118700	21365000	-0,227918
Complement C1q subcomponent subunit A	8	382303000	310895000	0,785545
Complement component factor h-like 1	8	27603200	20540500	1,66863
Stomatin	8	12552700	11717400	0,239845
Carboxypeptidase B2	8	13660300	13939300	-0,226673
Bile acyl-CoA synthetase	8	18206700	2619000	0,40787
Spectrin beta chain	7	1826000	1780440	0,00398894
Tenascin C	7	1830530	2452200	-1,53635
Immunoglobulin heavy constant mu	7	29307300	34135800	-0,761785
UDP-glucuronosyltransferase	7	8287850	953907	0,493962
Serine protease inhibitor A3N	7	7270860	4934330	-0,435372
Complement C1q subcomponent subunit C	7	385737000	341598000	0,460222
Sorcin	7	12514500	9464150	1,18352
Collectin sub-family member 11	7	15381800	11710700	1,24659
Peptidase M20 domain-containing 1	7	8241850	5291780	1,23306
Coatomer subunit alpha	7	3106470	3159900	-0,502147
Complement C1q subcomponent subunit B	7	556437000	462037000	0,65523
Ig kappa chain C region	7	1025760000	652833000	1,31518

Fortsetzung der Tabelle 25

Anhang

Fatty acid synthase	7	949880	1686280	0,328961
Carboxylesterase 1D	7	6056570	5895360	-0,166522
Transforming growth factor beta-1 proprotein	7	4392260	4558200	-0,752485
Coatomer subunit beta	7	3129460	3065480	-0,407833
Cytochrome P450 2C23	7	9220550	852730	0,822944
Heat shock protein HSP 90-beta	7	3708520	2996830	0,0326572
Biglycan	7	7177720	8829810	-0,674823
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1	7	12001500	6391870	1,4426
14-3-3 protein eta	7	14523800	11225900	1,13345
Serine or cysteine proteinase inhibitor	7	21522800	26847700	-0,712801
Dynamin-1	6	126234000	74716500	0,348796
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	6	2519160	2747470	-0,520502
Heparin cofactor 2	6	4926280	4293730	-0,356251
Glycoprotein Ib platelet subunit alpha	6	4368740	4921650	-1,04961
Collagen type VI alpha 2 chain	6	3838040	4360800	-1,04794
Protein Z	6	7450680	4992080	1,07993
Ig-like domain-containing protein	6	50372300	64082700	-0,784935
Glutathione peroxidase	6	2191130	6502060	-0,454055
Transthyretin	6	31485700	27221800	0,724266
Vitamin D-binding protein	6	2611830	2333170	0,531863
G protein subunit alpha transducin 1 subunit alpha-3	6	7416680	6216830	0,757156
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	6	2669720	1963800	1,01802
UDP-glucuronosyltransferase 1-6	6	11122800	2301100	1,41226
Apolipoprotein M	6	167873000	155428000	0,293492
Calreticulin	6	8854420	2057300	1,0539
Ig lambda-2 chain C region	6	129479000	118598000	0,0242236
CD9 antigen	6	47558700	40495200	0,561814
Cofilin-1	6	24236800	21040000	0,536746
14-3-3 protein theta	6	4081400	3399800	2,40444
Annexin A2	6	5147870	489500	1,33675
Lipopolysaccharide-binding protein	6	13859500	17171500	-1,02056
WD repeat-containing protein 1	6	4434820	3515750	1,0557
Fetuin-B	6	7290330	8134870	-0,643507
T-complex protein 1 subunit delta	6	6111370	8865420	-0,976646
HGF/SF receptor	6	8286380	7975430	0,177426
P-selectin	5	8805100	5896780	0,268525
Aldehyde dehydrogenase	5	7125330	632828	0,755612
Ras-related protein Rab-11B	5	6297320	5855750	0,57891
Choline transporter-like protein 1	5	6924100	6896770	-0,0880336
Plasma kallikrein	5	3809750	4293500	-2,555
Anoctamin	5	2155940	1941160	0,467262
Ras-related protein Rab-10	5	1607500	1491420	-0,19989
Ig-like domain-containing protein	5	297182000	237737000	0,154196
Pleckstrin	5	13679000	12429400	-0,721665
Glutathione peroxidase 3	5	14875700	13836300	0,330181
Ig-like domain-containing protein	5	17905500	18796700	-0,112162
Polymeric immunoglobulin receptor	5	3347920	3587120	-0,731365
Myosin light chain 3	5	11837900	8693640	0,141203
Haptoglobin	5	13439000	8725000	2,15713
Collectin sub-family member 10	5	8804920	12321200	-0,853305
Cytochrome P450 2C7	5	6740030	2163650	0,166053
Polyunsaturated fatty acid lipoygenase ALOX12	5	2761320	2551530	0,436765
Insulin-like growth factor-binding protein	5	3352070	3382520	0,0332917
Ig-like domain-containing protein	5	57990600	112379000	-1,92448
C3/C5 convertase	5	6327600	3221970	-0,281923
Immunoglobulin joining chain	5	45998200	42782500	-0,0113885
Ras-related protein Rab-1B	5	13822000	13018600	0,957591
Ig-like domain-containing protein	5	16983300	19420700	-0,590736
Ig-like domain-containing protein	5	9124100	29122800	-1,07833
L-lactate dehydrogenase A chain	5	10539100	8800100	0,637833

Fortsetzung der Tabelle 25

Anhang

Microsomal glutathione S-transferase 1	5	15076900	5036820	0,032768
Acetyl-CoA carboxylase	5	6482520	7724730	-0,630466
Apolipoprotein C-I	5	84313500	54093300	1,32163
Serum paraoxonase/arylesterase 1	5	11442300	11214600	0,0285948
Aspartyl aminopeptidase	5	5835760	2381700	1,04646
Alpha-1-microglobulin	5	11407500	17679800	-1,76826
Annexin	5	12108100	10761800	0,38774
Rac family small GTPase 3	5	12525500	10076900	1,01586
Ras-related protein Rab-27B	5	6085200	7505800	-0,92386
Myosin regulatory light chain 12B	4	4828480	3564050	0,721189
Ig-like domain-containing protein	4	81160200	84225200	-0,226143
Ig-like domain-containing protein	4	4125700	5646280	-1,53035
Ig-like domain-containing protein	4	5673550	4647420	-0,165827
Ig-like domain-containing protein	4	29074800	21665300	0,580371
Ig-like domain-containing protein	4	13598500	8169270	-0,595771
Ig-like domain-containing protein	4	34537700	34130700	-0,278404
Ig-like domain-containing protein	4	23826100	12835000	1,41233
Myosin regulatory light polypeptide 9	4	6869480	5515420	0,474102
Coactosin-like protein	4	2259970	1938330	-0,206467
Choline transporter-like protein 2	4	25773800	28348800	-0,158497
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein	4	5570100	5125550	-1,10714
Ig-like domain-containing protein	4	12443700	20608700	-1,17127
Pentraxin 3	4	16964500	7152700	0,640245
Ig-like domain-containing protein	4	16363300	16455200	-0,996668
Ras suppressor protein 1	4	6190520	4636820	-0,240934
Ig-like domain-containing protein	4	15786400	37893000	-0,680358
Phospholipid transfer protein	4	9737780	6134400	1,69049
Polyubiquitin-B	4	8203620	8457050	-0,168047
Ig-like domain-containing protein	4	24821300	27811200	-0,347462
Ig-like domain-containing protein	4	37686500	9131730	0,182338
Ig-like domain-containing protein	4	11719400	30883500	-1,68458
Ig-like domain-containing protein	4	4384780	3114350	-0,577016
Serpin family F member 2	4	30142000	19629800	0,100504
Syntaxin-binding protein 2	4	2056020	3023840	-1,48953
Ig-like domain-containing protein	4	34590800	25563700	0,281984
Ig-like domain-containing protein	4	138811000	188538000	-1,66433
Ig-like domain-containing protein	4	60772500	94459800	-0,994433
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	4	2023900	1852370	1,18787
Coatomer subunit beta	4	1060050	1346370	0,899076
Cytochrome b5	4	16300000	6116340	-0,0788543
Platelet factor 4	4	2121570000	1357150000	1,33461
Mannose-binding protein C	4	11400000	13414300	-0,370879
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4	13116800	11998800	-0,605738
Pyruvate kinase PKM	4	4480450	3320070	1,47375
C-reactive protein	4	13677300	18705200	-1,22709
Apolipoprotein C-IV	4	183238000	168630000	0,491944
Ras-related protein Rab-8B	4	4296950	4533240	-0,475327
Hermansky-Pudlak syndrome 5 protein homolog	4	14281200	9857300	2,17942
Liver carboxylesterase 1F	4	3317630	805007	0,892096
Bridging integrator 2	4	3161600	4800300	-0,505295
Alpha-2 antiplasmin	4	1493420	1602240	0,0472432
Junctional adhesion molecule A	4	4139480	3660130	-0,471714
Platelet glycoprotein Ib beta chain	4	27461000	18783500	1,45116
Fibulin-5	4	5086800	5377720	-0,529871
Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f	3	2050330	2213620	-0,564778
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member	3	4117350	3019830	0,066937
Triosephosphate isomerase	3	1132920	804287	2,21057
Ig-like domain-containing protein	3	6626300	9510360	-1,85464
Ig-like domain-containing protein	3	22917000	24966000	-0,400759
Ras-related protein Rab-7a	3	3862400	3040220	0,641446

Fortsetzung der Tabelle 25

Anhang

C1q and TNF-related 3 protein	3	21860400	11956800	0,653899
Ig-like domain-containing protein	3	7192870	7304680	1,26724
RCG21066	3	31814300	38105600	-1,08029
Copine-1	3	2918170	2678370	0,411077
Nidogen-1	3	2343020	2246620	-0,631969
Ig kappa chain V-IV region-like	3	18958200	16823100	0,443221
GLI pathogenesis-related 2	3	2314660	2118500	-0,0686436
Elongation factor 1-alpha 1	3	5518060	2322880	1,02834
cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	3	1883750	1713820	-0,374095
Apolipoprotein C-II	3	63355600	138145000	-0,348292
Ig-like domain-containing protein	3	46033400	54656500	-1,03881
Fructose-bisphosphate aldolase A	3	6202550	4477750	0,219398
T-kininogen 2	3	5625920	5796170	-0,797697
Aquaporin-1	3	9854200	8487400	0,185763
Monocarboxylate transporter 1	3	5758550	3164900	-0,179597
Calpain-2 catalytic subunit	3	11006500	10103300	0,462975
Apolipoprotein N	3	3320520	2646920	0,544753
Destrin	3	3889400	3037820	0,641933
Cell division control protein 42 homolog	3	5723350	5127120	-0,451488
Complement component C1q receptor	3	3219840	3551900	-0,782164
Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	2	3367250	4199220	-0,893411
Moesin	2	1637150	2048550	-1,1189
Major urinary protein	2	8050770	3850700	-0,00408779
Ras-related protein Rab-6A	2	8314450	7542360	1,07796
Ig-like domain-containing protein	2	10311400	16231900	-2,02744
Ig-like domain-containing protein	2	2336830	4136260	-0,143182
Ig-like domain-containing protein	2	2464760	2866370	-1,02877
Ig-like domain-containing protein	2	7045250	9388020	-1,33696
Apolipoprotein C-III	2	86759700	71178300	0,0157004
Ig-like domain-containing protein	2	26318300	19374200	0,747357
Abl interactor 1	2	2627180	2783840	-1,19517
Carbonic anhydrase 1	2	1488250	1727550	-0,0121484
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	2	3560500	2803740	0,00784549
Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	2	2601800	2270380	0,66497
Ig-like domain-containing protein	2	8733430	8493980	0,739663
Sushi, Nidogen and EGF-like domain-containing protein 1	2	1564220	1228650	0,727577
Ig-like domain-containing protein	2	35246600	48098300	-1,31375
Ig-like domain-containing protein	2	1777270	3832300	-1,99748
Ig-like domain-containing protein	2	20702500	22853500	-1,02541
Ig-like domain-containing protein	2	5380670	6284200	-0,0147317
Ig-like domain-containing protein	2	5292750	6604580	-1,42864
Phosphoglycerate kinase 1	2	2294000	2210320	0,420173
Ig-like domain-containing protein	2	59349000	22251700	2,48306
Ig-like domain-containing protein	2	6659770	7034210	-0,345301
Ig-like domain-containing protein	2	4506000	6840020	-1,01597
Calnexin	2	2583080	2226580	0,713809
Ras-related protein Rap-2b	2	2316030	3059800	-1,65846
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	2	2324900	1921100	0,143069
Glycoprotein 9	2	23899800	16621500	1,51923
Ly6-C antigen	2	2054230	2173080	-0,814618
CD151 antigen	2	3707980	3568320	-0,527886
Extended synaptotagmin-1	2	2796630	2855070	0,162101

Fortsetzung der Tabelle 25

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich in dieser Zeit mit großen und kleinen Taten unterstützt haben.

Mein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Timo Brandenburger und an Frau Dr. Anne Kuebart für euer Engagement und die tatkräftige Unterstützung in allen Belangen dieser Dissertation.

Ein großes Danke geht an das Team im Labor der experimentellen Anästhesiologie unter der Leitung von Frau Prof. Inge Bauer. Vielen Dank auch an Frau Claudia Dohle für die Einarbeitung in die Labormethoden und das allseits offene Ohr.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Geschwistern für eure unermüdliche Unterstützung vor, während und nach dieser Dissertation.