

## Zusammenfassung

POMC ist der Precursor verschiedener biologisch aktiver Peptide wie ACTH und END. Neben der Hypophyse produzieren auch nicht-hypophysäre Gewebe wie Immunzellen POMC und die davon abgeleiteten Peptide. Immunzellen setzen END beispielsweise in entzündetem Gewebe frei und durch die Bindung dieses Opioids an Opioidrezeptoren auf peripheren Nervenendigungen kann Entzündungsschmerz vermindert werden. Während alle Sequenzen der biologisch aktiven Peptide auf dem dritten Exon des POMC-Gens kodiert sind, befindet sich die Sequenz zur Translation des Signalpeptids, welches für den Eintritt des Vorläufermoleküls in den sekretorischen Weg unverzichtbar ist, auf dem zweiten Exon. In Lymphozyten wird die Expression von Signalsequenz-kodierender POMC mRNA seit längerem kontrovers diskutiert, da diese Immunzellen vorwiegend am 5'-Ende verkürzte Moleküle ohne Signalsequenz exprimieren. Unter der Annahme, dass die Transkription Signalsequenz-kodierender POMC mRNA unter pathologischen Bedingungen in Lymphozyten induziert wird, untersuchte die vorliegende Studie die Expression von POMC mRNA und den END-Gehalt im drainierenden Lymphknoten im Verlauf einer schmerzhaften, lokalen Pfotenentzündung an Ratten. Mittels RT- und RACE-PCR konnten eine Vielzahl an verschiedenen POMC mRNA-Molekülen identifiziert werden, darunter das schwer detektierbare, Exon 1, 2 und 3 einschließende *Full-length* POMC und diverse am 5'-Ende verkürzte Moleküle. In Übereinstimmung mit anderen Studien wiesen die verkürzten POMC mRNAs keine Signalsequenz auf. Die Quantifizierung von Exon 2-3 überspannenden POMC mRNA Transkripten mittels qRT-PCR zeigte, dass diese nach 2 Stunden Entzündungszeit um ein Vielfaches hochreguliert wurde, dagegen zeigten sich bei verkürzter POMC mRNA keine Expressionsunterschiede. Da das Expressionsniveau von Exon 2-3 überspannender POMC mRNA nach Induktion der Pfotenentzündung in der Hypophyse unverändert blieb, scheint kein systemischer Effekt an der Erhöhung dieser POMC mRNA in den Lymphozyten beteiligt zu sein. Die Analyse von Lymphknoten mittels Immunfluoreszenz zeigte, dass POMC und END in Lymphknotenzellen co-lokalisiert sind und mittels Durchflusszytometrie und Immunohistochemie konnten Opioidpeptide wie END in T-Helferzellen, in zytotoxischen T-Zellen, in B-Zellen und Monozyten/Makrophagen identifiziert werden. Entsprechend konnte die Expression von Signalsequenz-kodierender POMC mRNA

in T- und B-Zellfraktionen separierter Lymphknoten gezeigt werden. T-Lymphozyten exprimierten zudem die mRNA des POMC Prozessierungsenzyms PC2, das für die Konvertierung von  $\beta$ -LPH in END zuständig ist. In B-Zellen war die Expression von PC2 erst nach Induktion der Entzündung detektierbar. Die Prohormonkonvertase PC1/3, die POMC in ACTH und  $\beta$ -LPH konvertiert, war ausschließlich in B-Zellen entzündeter Lymphknoten nachweisbar. Die kinetische Peptidanalyse ergab, dass sich der zelluläre END-Gehalt von Lymphozyten innerhalb von 12 - 24 h Entzündungsdauer mehr als verdoppelte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Neusynthese von END im Entzündungsverlauf auf eine verstärkte Transkription von Signalsequenz-kodierender POMC mRNA zurückgeführt werden kann. Diese Ergebnisse erbringen zudem den Nachweis eines wichtigen fehlenden Bindegliedes bei der Demonstration der klassischen Prozessierung von POMC in biologisch aktive und sezernierbare Peptide in Immunzellen. Im Einklang mit ähnlichen Befunden aus der Hypophyse scheinen in Lymphozyten zwischen erhöhter Transkription und Peptidanstieg unter Entzündungsbedingungen etwa 6 - 12 Stunden zu vergehen.