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

DISSERTATION

Der Formylpeptidrezeptor in der opioidpeptidvermittelten Antinozizeption der frühen Entzündungsphase

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Stolz

aus St. Ingbert

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H. Rittner

2. Prof. Dr. med. C. Nau

3. Priv.-Doz. Dr. med. G. Riemekasten

Datum der Promotion: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 5

1.1 Aktueller Stand der Forschung 5

1.2 Fragestellungen 12

2 METHODEN 13

2.1 Versuchstiere 13

2.2 „buffy coat“ 13

2.3 Durchflusszytometrie 13

2.4 Untersuchungen zum Schmerzverhalten 19

2.5 Opioidfreisetzung 20

2.6 Radioimmunoassay 21

2.7 Versuchsprotokolle 23

2.8 Chemikalien 26

2.9 Verwendete Lösungen 26

2.10 Statistische Auswertung 27

2.11 Software 29

2.12 Geräte 29

3 ERGEBNISSE 30

3.1 fMLP-FITC Bindung von Granulozyten und Monozyten des entzündeten Pfotengewebes 30

3.2 Charakterisierung des FPR-Antagonisten Boc 31

3.3 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 h FCA unter FPR Blockade mit Boc 32

3.4 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 h FCA unter FPR Blockade mit CsH 34

3.5 Dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten Pfote nach i.pl. fMLP Injektion 35

3.6 fMLP-FITC Bindung von humanen Granulozyten 36

3.7 FPR vermittelte Freisetzung von Opioiden aus Granulozyten 37

3.8 Hemmung der fMLP und Mycobact. abhängigen Freisetzung aus humanen Granulozyten mit Boc 39

3.9 Monozytenreinheit nach der magnetischen Separation 41

3.10 fMLP-FITC Bindung von humanen Monozyten 41

3.11 β-Endorphin und Met-Enkephalinfreisetzung aus Monozyten des peripheren Blutes 42

4 DISKUSSION UND AUSBLICK 44

4.1 Diskussion von Material und Methoden 44

4.2 Diskussion der Ergebnisse 45

4.3 Ausblick 52

5 ZUSAMMENFASSUNG 54

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 56

7 LITERATURVERZEICHNIS 58

8 DANKSAGUNG 63

9 LEBENSLAUF 64

10 PUBLIKATIONSLISTE 65

11 ERKLÄRUNG 66

1 Einleitung

1.1 Aktueller Stand der Forschung

In der medizinischen Schmerztherapie sind die Gruppe der Opioide die potentesten Analgetika (Schmerzmittel). Unter dem Begriff Opioide werden natürliche und synthetische Substanzen mit morphinartigen Eigenschaften zusammengefasst, die die zentrale Schmerzleitung und Schmerzempfindung hemmen. Ihre Anwendung ist durch die Nebenwirkungen Atemdepression, Sedierung oder Obstipation eingeschränkt (Hildebrandt 1998). Daher ist die Suche nach neuen, starken und nebenwirkungsarmen Schmerzmitteln ein wichtiges Feld der medizinischen Forschung.

Nach der Definition der „International Association for the Study of Pain“ (IASP) ist Schmerz ein subjektiv unangenehmes sensorisches und emotionales Erlebnis, das mit einer Gewebeschädigung in Verbindung gebracht wird. Eine verstärkte Antwort auf einen schmerzhaften Stimulus wird als Hyperalgesie bezeichnet. Unter Analgesie versteht man die Hemmung von Schmerz nach einem normalerweise schmerzauslösenden Ereignis. Die Weiterleitung des Schmerzes über das Nervensystem ist als Nozizeption definiert, die Hemmung der Weiterleitung als Antinozizeption (IASP).

Stein et al. konnten in mehreren Arbeiten die antinozizeptive Wirkung von endogenen (d.h. im Körper selbst entstandenen) Opioiden aus Immunzellen nachweisen (Stein, Millan et al. 1989; Stein, Gramsch et al. 1990; Stein, Hassan et al. 1990). Zur Gruppe der endogenen Opioidpeptide gehören die Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (Karow 2003). Deren antinozizeptiver Effekt kommt über die Interaktion von Opioidrezeptoren auf peripheren, sensorischen Neuronen unter Entzündungsbedingungen zustande (Stein, Millan et al. 1989; Stein, Gramsch et al. 1990; Stein, Hassan et al. 1990). Die bekannten Nebenwirkungen der Opioide entstehen durch die Bindung an Rezeptoren des Zentralen Nervensystems (ZNS). Aus diesem Grund verspricht der periphere Angriffsort der endogenen Opioide eine effektive und nebenwirkungsarme Schmerztherapie.

1.1.1 Opioidpeptidvermittelte Antinozizeption im entzündeten Gewebe

Eine Entzündung ist eine Reaktion des Organismus und seiner Gewebe auf verschiedenartige Reize. Im akuten Stadium einer Entzündung kommt es zu den Kardinalsymptomen Tumor, Rubor, Calor, Dolor und Functio laesa. An diesen Abwehrreaktionen sind die Zellen des körpereigenen Abwehrsystems, des Immunsystems wesentlich beteiligt (Hildebrandt 1998).

Stein et al. zeigten, dass die intraplantare (i.pl.) Injektion von Freund's complete adjuvans (FCA), einer abgetötete Mycobacterien-haltigen Suspension, eine lokale Entzündung der Rattenpfote auslöst. Im Vergleich zur unbehandelten Pfote, zeigen sich in der FCA injizierten Pfote lokale Entzündungszeichen wie Schwellung, Überwärmung, Rötung, Schmerz und eine eingeschränkte Belastbarkeit (Stein, Millan et al. 1988). Die kontralaterale Pfote zeigt dagegen weder Entzündung noch Hyperalgesie und kann so experimentell als interne Kontrolle benutzt werden.

In der entzündeten Rattenpfote wurden opioidhaltige Immunzellen nachgewiesen (Stein, Hassan et al. 1990). Es handelt sich um Leukozyten, d.h. weiße Blutkörperchen, welche in Granulozyten (60 - 70 %), Lymphozyten (20 - 30 %) und Monozyten unterteilt werden (2 - 6 % der Blutleukozyten) (Hildebrandt 1998). Im zeitlichen Verlauf einer Entzündungsreaktion wechseln die Anteile der Leukozytenpopulation. In der Frühphase (2 h) stellen die Granulozyten den Hauptteil, während in der Spätphase (96 h) Monozyten/Makrophagen die vorherrschende Leukozytensubpopulation sind (Rittner, Brack et al. 2001). Der Nachweis, dass diese Leukozytensubpopulationen endogene Opioide enthalten, wurde mit histomorphologischen Verfahren und der Durchflusszytometrie erbracht (Przewlocki, Hassan et al. 1992; Rittner, Brack et al. 2001).

Im entzündeten Gewebe ist die Nozizeption komplex. Einerseits werden Mediatoren ausgeschüttet, die eine Hyperalgesie bedingen (z.B. Bradykinin, Prostaglandine). Andererseits können endogene Opioide eine lokale, peripher vermittelte Antinozizeption bewirken, indem sie mit Opioidpeptidrezeptoren auf peripheren sensorischen Nervenendigungen interagieren (Stein, Millan et al. 1989; Stein, Gramsch et al. 1990; Stein, Hassan et al. 1990). Unter Rezeptoren versteht man Makromoleküle, die als Wirkort von Hormonen, Neurotransmittern oder Pharmarka mittels einer spezifischen Bindung eine spezifische Wirkung ausüben (Karow 2003). Dieses antinozizeptive System kann durch äußere Auslöser wie Stress (Terman, Shavit et al. 1984; Stein, Gramsch et al. 1990) oder durch die i.pl. Gabe von Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), ein unter Stressbedingungen ausgeschüttetes Hormon aktiviert werden (Schäfer, Carter et al. 1994).

Da Tiere das Empfinden von Schmerz nicht äußern können, kann man sich neben anderen Methoden der Pfotendruckschwellenmessung (engl. paw pressure threshold (PPT)) bedienen. Hierbei befindet sich die Pfote unter einem Stempel, auf den ansteigender Druck ausgeübt wird. Es wird das Gewicht erfasst, welches die Ratte aushält, bis sie ihre Pfote wegzieht (Stein, Millan et al. 1988; Stein, Gramsch et al. 1990).

1.1.1.1 Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten durch chemotaktische Substanzen

Die Einwanderung von Leukozyten aus der Blutzirkulation zum Ort der Entzündung ist ein geregeltes Zusammenspiel von vielen Faktoren (Machelska und Stein 2002). Sie gliedert sich in die Leukozytenadhäsion und die Migration durch das Endothel (Springer 1994; Butcher und Picker 1996). Die Migration ist zielgerichtet entlang eines Gradienten aus chemotaktischen Faktoren (sog. Chemotaxinen, z.B. fMLP, Komplementfaktoren, Arachidonsäuremetabolite) in das Gebiet mit deren höchster Konzentration (Hildebrandt 1998). Eine wichtige Gruppe von chemotaktischen Faktoren sind die Chemokine. Zwischen 40 und 50 menschliche Chemokine sind heute bekannt (Rollins 1997). Chemokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 - 12 kD, die durch die Position von vier Cysteinresten am Aminoende definiert werden. Die Aminosäuresequenzen, die Sekundär- sowie die Tertiärstruktur der Chemokine ähneln sich. Ihre Wirkung entfalten die Chemokine über ihren Angriff an Chemokinrezeptoren (Rollins 1997; Baggiolini 1998).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wiesen Brack et al. die Bedeutung von Granulozyten und deren Rekrutierung durch Chemokine in der peripher vermittelten Antinozizeption im 2 h entzündeten Pfotengewebe nach. Sie zeigten, dass die i.pl. CRH-Injektion eine dosisabhängige und Naloxon (Opioidantagonist)-reversible Antinozizeption bewirkt, die nach Granulozytendepletion mit Anti-Granulozytenserum reduziert wird. Die Menge der opioidhaltigen Leukozyten wird durch die Granulozytendepletion ebenfalls gemindert. Die Zahl der Granulozyten verringert sich um ca. 90 % signifikant, während die Zellzahl der Monozyten/Makrophagen fast unbeeinflusst bleibt. Die opioidhaltigen Leukozyten exprimieren den Chemokinrezeptor 2 (CXCR2). Im entzündeten Gewebe steigt die Nachweisbarkeit von zwei für die Granulozytenrekrutierung wesentlichen Chemokinen, Keratinozyten-abstammendes Chemokin (KC) und Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) an. Deren kombinierte Blockade mindert den Gehalt an opioidhaltigen Leukozyten und die nachweisbare Antinozizeption deutlich. Die Zellzahl der Granulozyten wird um 30 - 40 % reduziert, wohingegen die Anzahl der Monozyten/Makrophagen durch die gemeinsame Blockade der Chemokine nicht tangiert wird (Brack, Rittner et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass weitere chemotaktische Faktoren für die Zellrekrutierung essentiell sind.

1.1.1.2 Freisetzung von Opioiden aus Granulozyten und Monozyten

Die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase durch Granulozyten und Makrophagen/Monozyten und deren Teilnahme an der Immunantwort beruhen auf ihrer

Fähigkeit zellinterne, aus dem Golgi-Apparat stammenende Granula zu mobilisieren und deren Inhalt in den Extrazellulärraum zu entleeren (Tapper 1996). Die Freisetzung von Granula aus dem Zytosol läuft exozytotisch ab, d.h. die sekretgefüllten Granula wandern zur Zellmembran, verschmelzen mit ihr und setzen ihren Inhalt nach außen frei (Sengelov, Kjeldsen et al. 1993; Rittner, Machelska et al. 2005). Die Extrusion, d.h. die Austreibung eines Sekretes aus Granula, ist in der Gegenwart von Cytochalasin B verstärkt (Tapper 1996). Cytochalasin B ist ein Metabolit aus dem Pilz *Drechslera dematiodeum*, der zellmembranpermeabel ist und die Zellteilung sowie die Zellbewegung durch die Blockierung von Mikrofilamenten hemmt. Auch die Immunantwort von neutrophilen Granulozyten verlängert und verstärkt sich in der Anwesenheit von Cytochalasin B (Bylund, Björstad et al. 2003).

Die Leukozyten entfalten nach adäquater Stimulation ihre antinozizeptive Wirkung durch die Freisetzung ihrer Opioidpeptide. In vivo wurde dies durch die Hemmung der CRH-auslösbaren Antinozizeption durch Antikörper gegen β-Endorphin und Met-Enkephalin gezeigt (Schäfer, Carter et al. 1994). In vitro existieren Untersuchungen zur Opioidsekretion aus Lymphozyten aus Rattenlymphknoten (Schäfer, Carter et al. 1994; Cabot, Carter et al. 1997; Cabot, Carter et al. 2001) und humanen Granulozyten (Vindrola, Padrós et al. 1990; Rittner, Labuz et al. 2006; Rittner, Labuz et al. 2007). β-Endorphin ist in vesikulären Granula in der Zellperipherie von Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten angeordnet (Mousa, Shakibaei et al. 2004). Die Freisetzung von β-Endorphin aus Lymphozyten ist calciumabhängig, rezeptorspezifisch und durch erhöhte, extrazelluläre Kaliumwerte imitierbar. Diese Kennzeichen entsprechen dem regulierten Stoffwechselweg der vesikulären Freisetzung (Cabot, Carter et al. 1997).

Die Freisetzung von β-Endorphin und Met-Enkephalin aus humanen Granulozyten durch die Stimulation mit CXCR2-bindenden Chemokinen und eine CXCR2-induzierte Antinozizeption konnte im Tierexperiment (2 h FCA) nachgewiesen werden. Die Untersuchungen des Signalübertragungsweges der Opioidfreisetzung zeigten, dass dieser von intrazellulärem Calcium abhängig ist und über Inositoltriphosphat (IP_3) und Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelt wird (Rittner, Labuz et al. 2006).

1.1.2 Der Formylpeptid Rezeptor (FPR)

Im Zusammenhang der Leukozytenrekrutierung von der Blutzirkulation zum Ort der Entzündung und deren Aktivierung sind zahlreiche Faktoren und deren Rezeptoren beschrieben. Zu den mitunter am längsten bekannten chemotaktischen Faktoren gehört die Gruppe der N-Formylpeptide (Prossnitz und Ye 1997; Panaro und Mitolo 1999; Le,

Oppenheim et al. 2001; Le, Murphy et al. 2002; Le, Yang et al. 2002). Eine Formylgruppe ist chemisch gesehen eine Aldehydgruppe (H-C=O). Die Vorsilbe „Formyl“ kennzeichnet die Aldehydgruppe als eine funktionell besondere Gruppe (Mortimer 2003). In der Natur werden Formylpeptide von *Eschericia coli* und anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien produziert (Schiffmann, Corcoran et al. 1975; Marasco, Phan et al. 1984). Die Bakterien benötigen die Formylpeptide zur Initiierung ihrer Proteinsynthese (Schiffmann, Corcoran et al. 1975; Chun, Serbina et al. 2001). Des Weiteren zeigten Carp et al., dass Mitochondrien ebenfalls in der Lage sind Formylpeptide zu synthetisieren und diese bei Zelluntergang freizusetzen (Carp 1982). Somit sind Mitochondrien die einzigen Organellen in eukaryotischen Zellen, die Formylpeptide enthalten. Dieser Umstand könnte sich durch die Endosymbiontenhypothese erklären. Der eigene Stoffwechsel, sowie die Fähigkeit Proteine zu synthetisieren stützen die These, dass Mitochondrien ursprünglich Bakterien waren. Im Laufe der Evolution sind sie in die eukaryotische Zelle gelangt. Mitochondrien stehen im Dienst der Energiegewinnung der Zelle (Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese) und werden von der Zelle unterhalten (Hildebrandt 1998; Koecke 2000).

Der FPR wurde 1976 von Showell et al. als eine Oberflächenstruktur auf intraperitonealen Kaninchen-Granulozyten beschrieben, die hochaffin N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin (fMLP) bindet (Showell, Freer et al. 1976). Später gelang es die Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) eines FPR herzustellen (Boulay, Tardif et al. 1990). Mit Hilfe verschiedener biochemischer und histomorphologischer Methoden konnte die Expression des FPR auf einer Vielzahl von Zellen und Geweben nachgewiesen werden, unter anderem auf neutrophilen Granulozyten des Rattenblutes (Walker, Seiler et al. 1991), peritonealen neutrophilen Granulozyten der Ratte (Marasco, Fantone et al. 1983; Walker, Seiler et al. 1991), humanen neutrophilen Granulozyten (Williams, Snyderman et al. 1977; Remes, Petäjä-Repo et al. 1991; Allen, Broom et al. 1992; Loitto, Rasmusson et al. 2001) und humanen Monozyten des peripheren Blutes (Weinberg, Muscato et al. 1981; Benyunes und Snyderman 1984; Locati, Riboldi et al. 2001). Becker et al. zeigten mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das FPR-Protein die Expression des Rezeptors auf glatten Muskel- und endokrinen Zellen, auf gewebstypischen Makrophagen der Lunge und Leber, den Schwann-Zellen des peripheren, sowie Zellen des sensorischen (z.B. Nervenkerne des Thalamus, des Nervus trigeminus, des Nervus vestibularis und Zellen des Hinterhorns) und motorischen (z.B. Vorderhornzellen und Pyramidenbahnzellen) zentralen Nervensystems (Becker, Forouhar et al. 1998).

Der Mensch besitzt für den FPR drei Gene, die den drei Subtypen des FPR entsprechen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen Rezeptoren besteht in ihrer Affinität zu fMLP. Der FPR ist ein hochaffiner Rezeptor für fMLP, während der FPR-ähnliche-1. Rezeptor (FPRL-1) eine niedrigere Affinität zu fMLP hat. Der FPR-ähnliche-2. Rezeptor (FPRL-2) bindet fMLP überhaupt nicht (Le, Yang et al. 2002). Aufgrund der hohen Affinität von fMLP zum FPR, ist fMLP die Referenzsubstanz für biologische, funktionelle Studien. Aus diesem Grund wird fMLP in der vorliegenden Studie als Agonist verwendet. Ursprünglich nahm man an, dass FPR-Agonisten eine Formylgruppe bräuchten um den FPR potent zu aktivieren. Heute sind jedoch sowohl eine Vielzahl von synthetischen Peptiden (z.B. MMK-1, WKYMVM), als auch aus natürlichen Quellen (z.B. HIV-Hüllprotein, Hp 2-20 aus *Helicobacter pylori*, Annexin I, ein Glucocorticoid reguliertes Protein etc.) stammende Agonisten bekannt, die dieses chemische Merkmal nicht aufweisen (Dalpiaz, Spisani et al. 2003). Die Vielfalt der neu entdeckten Agonisten zeigt, dass die Funktionen des FPR, beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung oder von Prionerkrankungen, vielfältig sind (Le, Oppenheim et al. 2001; Le, Murphy et al. 2002; Le, Yang et al. 2002). Als bakterieller Agonist kommt in dieser Studie *Mycobacterium butyricum* zum Einsatz. *Mykobakterien* sind eine Gruppe von grampositiven, säurefesten, obligat aeroben, unbeweglichen Bakterien (Hahn 2005). *Mycobacterium butyricum* ist eine saprophytäre Art (Hunter 1953), die in FCA enthalten ist. Für *Mycobacterium tuberculosis*, den bekanntesten Vertreter der *Mykobakterien*, ist die Aktivierung des Toll-ähnlichen Rezeptors (Takeda, Kaisho et al. 2003), sowie die Freisetzung von Formylpeptiden bekannt (Chun, Serbina et al. 2001). N-t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc) ist ein kompetetiver Antagonist von fMLP (Le, Oppenheim et al. 2001; Le, Murphy et al. 2002; Le, Yang et al. 2002; Dalpiaz, Spisani et al. 2003). Es handelt sich um ein synthetisches Peptid, das die Zellaktivierung verhindert (Wenzel-Seifert und Seifert 1993). Cyclosporin H (CsH) ist als ein zyklisches Peptid ebenfalls ein potenter und selektiver FPR Antagonist. CsH ist ein Pilzprodukt (Le, Oppenheim et al. 2001; Le, Murphy et al. 2002; Le, Yang et al. 2002; Dalpiaz, Spisani et al. 2003). In einem direkten Vergleich von Boc und CsH bezüglich der Hemmung, einerseits der Bindung von fMLP auf zu Granulozyten differenzierten Zellkulturen, andererseits der messbaren Stoffwechselvorgänge (Hydrolyse des G-Proteins, intrazellulärer Calcium-Anstieg, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Enzymen) durch die Aktivierung des FPR charakterisierten Wenzel-Seifert und Seifert CsH als einen potenteren Antagonisten. Im Hinblick auf die Hemmung der fMLP-Bindung erwies sich CsH 14 mal stärker und auf die Hemmung der Stoffwechselvorgänge 4 - 6 mal stärker als Boc (Wenzel-Seifert und Seifert 1993).

Der FPR ist an ein guaninbindendes, inhibierendes-Protein (Gi) gekoppelt (Le, Oppenheim et al. 2001; Le, Murphy et al. 2002; Seifert und Wenzel-Seifert 2003; Selvatici, Falzarano et al. 2006). G-Proteine sind intrazelluläre, membranständige heterotrimere Proteine, die als Glied der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und zweitem Botenstoff stehen (Hildebrandt 1998). Nach der Bindung des Liganden dissoziert dieses in die α- und βγ-Untereinheiten. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Enzyme Phospholipase C (PLC) und der PI3K. PI3K überführt Phosphatidylinositol-4,5-bisposphat (PIP_2) in Phosphatidylinositol-3,4,5,-triphosphat (PIP_3). Die PLC spaltet durch Hydrolyse das PIP_3 in die „second messenger“ (engl. zweiter Botenstoff) Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3). „Second messenger“ sind Glieder in der Signalübertragungskette zwischen membranständigen Proteinen und intrazellulären Effektorproteinen, die eine Signalverstärkung bewirken (Hildebrandt 1998). IP3 mobilisiert die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, während DAG ein weiteres Stoffwechselenzym, die Proteinkinase C aktiviert, welche durch Phosphorylierung (d.h. die Übertragung eines Phosphorsäureesters auf organische Verbindungen) von Proteinen deren Funktion verändern kann (Le, Oppenheim et al. 2001; Seifert und Wenzel-Seifert 2003).

1.1.2.1 Die Rolle des FPR

Basierend auf seiner Fähigkeit aus Bakterien stammende Peptide zu erkennen, wurde dem FPR eine Rolle in der Immunantwort des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen zugeschrieben. Die Leukozytenrekrutierung von der Blutzirkulation zum Ort der Entzündung wird unter anderem durch den FPR vermittelt. Dafür spricht z.B. die Hochregulierung von L-Selektin, einem Zelladhäsionsmolekül, auf neutrophilen Granulozyten (Jutila, Kishimoto et al. 1990; Berg, McEvoy et al. 1993), sowie die Aktivierung von Integrin (Transmembranmolekül, das an der Leukozytenwanderung beteiligt ist) durch fMLP (Simon, Burns et al. 1995). Weiterhin ist der FPR ein wichtiger Rezeptor für potente chemotaktische Faktoren, d.h. eine gerichtete Zellbewegung als Antwort auf einen Entzündungsmediator wird durch ihn gefördert (Showell, Freer et al. 1976; Williams, Snyderman et al. 1977; Weinberg, Muscato et al. 1981). Die Bedeutung dieser chemotaktischen Migration konnte in einem Mausmodell verdeutlicht werden. Bei FPR-„knockout“ (d.h. das Gen für den FPR wurde ausgeschaltet) Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ist die *in vitro* Chemotaxis (45 min bei 37°C) von neutrophilen Granulozyten und die *in vivo* Mobilisation von neutrophilen Granulozyten 90 min nach der subkutanen Gabe von fMLP im peripheren Blut vermindert (Gao, Lee et al. 1999). Einige der wichtigsten Abwehrmechanismen des Körpers gegen Mikroorganismen sind die Freisetzung von lysosomalen Enzymen, des Superoxidanions und

die Phagozytose, d.h. die Aufnahme von Partikeln und deren intrazellulärer Abbau. Diese Funktionen sind für den durch einen Agonisten aktivierten FPR beschrieben (Showell, Freer et al. 1976; Prossnitz und Ye 1997; Bylund, Björstad et al. 2003). Des Weiteren ist die Freisetzung von Zytokinen, also von Stoffen, die von Immunzellen ausgeschüttet werden, um die Immunantwort zu regulieren bekannt (Beaulieu, Paquin et al. 1992). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der FPR vielseitig an der Immunantwort des Körpers beteiligt ist.

1.2 Fragestellungen

Die Fragestellungen dieser Studie leiten sich von Brack et al. ab (siehe 1.1.1.1). Die lokale Blockierung zweier für die Rekrutierung von Granulozyten essentieller Chemokine reduzierte die Zahl der opioidhaltigen Granulozyten in der Pfote signifikant, jedoch nur um ca. 30 - 40 % (Brack, Rittner et al. 2004). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass noch weitere chemotaktische Faktoren oder Chemokine für die Zellrekrutierung von Granulozyten wichtig sind.

fMLP ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Granulozyten und Monozyten und setzt darüber hinaus auch Granula frei. Daraus leitet sich die Hypothese dieser Studie ab: Formylpeptide rekrutieren über den FPR opioidpetidhaltige Leukozyten zum Ort der Entzündung und setzen dort endogene Opioide frei, die zu einer potenten Antinozizeption führen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden folgende Fragen untersucht:

1. In welchen Leukozytensubpopulationen wird der FPR im entzündeten Pfotengewebe 2 h nach FCA Gabe exprimiert?
2. Beeinflusst die systemische intravenöse Gabe eines spezifischen FPR-Antagonisten die Anzahl der opioidpeptidhaltigen Leukozyten nach 2 h FCA Entzündung?
3. Wird der FPR auf humanen Granulozyten und Monozyten exprimiert?
4. Werden *in vitro* nach Stimulation des FPR Opioidpeptide aus humanen Leukozyten freigesetzt?
5. Kann *in vivo* die Gabe von fMLP i.pl. in entzündetes Gewebe eine Antinozizeption über die Freisetzung von Opioiden auslösen?

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Arbeitschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin genehmigt (Aktenzeichen G 0246/03 (genehmigt am 20.02.04) und G 0290/04 (genehmigt am 15.03.2005)). Die Versuchsprotokolle entsprechen der IASP (Zimmermann 1983).
Die Tierversuche wurden mit männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 170 - 220 g durchgeführt. Die Tiere wurden in einem 12-h-Tag-12-h-Nacht-Rhythmus bei Raumtemperatur (20 - 25°C) gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter. Sie stammten aus der Zucht des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin. Die Induktion einer Entzündung, sowie die intravenöse Medikamentengabe wurden unter kurzer Isofluran-Narkose durchgeführt.

2.2 „buffy coat“

Ein „buffy coat“ ist ein Leukozytenkonzentrat, welches durch Abzentrifugieren von Vollblut während der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten anfällt. Aus dem Leukozytenkonzentrat lassen sich mittels verschiedener Separationsmethoden Monozyten, beziehungsweise Granulozyten isolieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten „buffy coats“ wurden vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Berlin und Brandenburg GmbH, Am Großen Wannsee 80, 14109 Berlin Wannsee geliefert.

2.3 Durchflusszytometrie

In diesem Abschnitt wird zuerst das Prinzip der Durchflusszytometrie dargestellt. Es folgt eine Erläuterung über die Gewinnung der zu untersuchenden Zellen. Danach werden die durchgeführten Färbungen der Zellen erklärt. Abschließend werden die technischen Einzelheiten der Abstimmung des Gerätes, sowie der quantitativen Analyse erklärt.

2.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)) ist eine Technik zur Messung von Zellen und deren Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Die Zellproben werden

angesaugt und durch hydrodynamische Fokussierung, d.h. einzeln im Flüssigkeitsstrom, zur Messkammer transportiert. In dieser wird die Zelle von einem Laser bestrahlt. Das gestreute und fluoreszierte Licht fällt auf einen Photodetektor, der es in elektrische Signale umwandelt.
Das Streulicht wird an zwei Stellen gemessen. Zum einem wird das Vorwärtsstreulicht in Richtung des ursprünglichen Strahls (engl. Forward Light Scatter (FSC)) gemessen. Dieses gibt die Größe der Zelle wieder. Der zweite Messpunkt befindet sich im 90°-Winkel zum ursprünglichen Strahl und misst das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter (SSC)). Das Seitwärtsstreulicht ist abhängig von der Granularität der Zelle, d.h. körnige Zellen erzeugen ein hohes Seitwärtsstreulicht und weniger körnige ein entsprechend geringeres. Weiterhin kommen zur Zellcharakterisierung mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper zum Einsatz, welche an intrazelluläre und Oberflächenproteine binden können. Durch den Laserstrahl werden die Elektronen des fluoreszierenden Farbstoffes in der Messkammer angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rückfall auf das ursprüngliche Energieniveau geben die Elektronen Energie (in Form von Photonen) ab. Diese emittierte Photonenkonzentration, die ebenfalls durch einen Photodetektor gemessen wird, ist spezifisch für die einzelnen Farbstoffe. Fluorescein Isothiocyanat (FITC) emittiert bei 530 nm, Phycoerythrin (PE) bei 575 nm und Cy5 PE (bestehend aus Cychrome (Cy 5) und PE) bei 682 nm.
Zur graphischen Darstellung der Analyse des Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie der Fluoreszenz kommen in dieser Studie zwei Abbildungsformen zum Einsatz. Zum einen wurde ein zweidimensionales Punktdiagramm, der so genannte Dot Plot, verwendet. Hierbei entspricht jedem registrierten Ereignis ein Punkt in der Abbildung und somit stellen sich die Zellpopulationen als Punktwolken dar. Zum anderen wird das Histogramm verwendet, das die eindimensionale Darstellung der relativen, logarithmisch verstärkten Fluoreszenzintensitäten über eine Zellpopulation ermöglicht. Aufgrund der Verteilung der Zellen und der Messung einer homogen gefärbten Population ist die Verteilung symmetrisch um den Mittelwert und entspricht annähernd einer Gauß'schen Normalverteilung (Radbruch 1992; Ormerod 2000).

2.3.2 Gewebegewinnung

2.3.2.1 Pfotengewebe

Zur Induktion der Entzündung wurden in die rechte Hinterpfote 150 µl FCA appliziert. Im Vergleich zur nicht-entzündeten Pfote zeigten sich in der FCA injizierten Pfote lokale Entzündungszeichen wie Schwellung, Hyperthermie, Rötung und eine eingeschränkte Belastbarkeit der entzündeten Pfote (Stein, Millan et al. 1988). Zwei Stunden später wurden

die Ratten mit einer Überdosis Isofluran getötet. Nach einem Schnitt distal des Calcaneus und zwei Längsschnitten seitlich entlang der Fellgrenze wurde das Gewebe mit einem Skalpell unter Zug von der tiefen Beugersehne abpräpariert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das gewonnene Pfotengewebe auf Eis in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline (PBS)) gelagert. Im nächsten Schritt wurde das subkutane Pfotengewebe von der Haut abpräpariert und gewogen. Danach wurde es in ca. 1 - 2 mm große Stücke zerschnitten und bei 37°C für eine Stunde enzymatisch in einer Verdaulösung (siehe 2.9) gespalten. Anschließend wurde das Gewebe durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (Falcon™, BD Bioscienes) gedrückt und mit 10 ml Komplettmedium (siehe 2.9) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde für 10 min bei 350 g (Megafuge 2.0 R, Heraeus) zentrifugiert, dekantiert und in je 3,5 ml PBS aufgenommen. Pro Zellfärbung wurden 1000 µl der Zellsuspension verwendet, die vor der Färbung für 5 min bei 350 g (Megafuge 2.0 R, Heraeus) zentrifugiert, dekantiert und resuspendiert wurden (Rittner, Brack et al. 2001).

2.3.2.2 Granulozyten

Der „buffy coat“ (70 - 80 ml) wurde gleichmäßig auf vier 50 ml Röhrchen verteilt und mit RPMI 1:1 verdünnt. 25 ml des „buffy coat“/RPMI Gemischs wurden auf jeweils 25 ml 3 % Dextranlösung gegeben und anschließend für 35 min inkubiert. Dies führt zur Geldrollenbildung der Erythrozyten, d.h. im Blutplasma trennen sich die Leukozyten und die Erythrozyten. Das leukozytenreiche Plasma wurde für 10 min bei 450 g (Mulifuge 4 KR, Heraeus) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das zurückgebliebene Zellsediment in RPMI resuspendiert, gewaschen und gepoolt. Zur Auftrennung der Leukozyten in die einzelnen Subpopulationen wurden die in RPMI resuspendierten Zellen auf Ficoll verteilt und für 40 min bei 400 g (Multifuge 4 KR, Heraeus), Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Das dabei entstehende Sediment enthält die gewünschten polymorphonukleären Zellen (Granulozyten). Um die restlichen Erythrozyten zu zerstören wurde eine Erythrozytenlyse mit hypotoner Salzlösung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuerst in 0,2 % NaCl für 30 s resuspendiert und danach 1:1 mit 1,6 % NaCl wieder in eine isotone Lösung gebracht.

2.3.2.3 Monozyten

Das Prinzip der Monozytenseparation ist eine positive Selektionsstrategie, d.h. die gewünschten Zellen werden direkt durch Antikörper, die mit Magnetpartikeln gekoppelt sind, gewonnen. Alle Arbeitschritte der Monozytengewinnung wurden auf Eis durchgeführt. Der erste Schritt der Monozytenseparation ist die hypotone Lyse der im „buffy coat“ verbliebenen

Erythrozyten. Dazu wurden je 5 ml „buffy coat“ auf je 25 ml EL-Puffer (Erythrocyte lysis buffer) für 15 min auf Eis inkubiert und abschließend für 10 min bei 350 g (Multifuge 4 KR, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in je 10 ml kaltem EL-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Danach wurde das gewonnene Leukozytensediment in 50 ml frisch angesetztem MACS-Puffer (siehe 2.9) aufgenommen und gefiltert (70 µm (Falcon)) um eventuelle Zellaggregate zu entfernen. Die Leukozyten wurden mit Hilfe der Trypan-Blau-Färbung mikroskopisch ausgezählt. Trypan-Blau färbt tote Zellen an und somit werden nur lebende Zellen in der Zählung erfasst. Anschließend erfolgte die Markierung der Monozyten mit den $CD14^+$ Magnetpartikeln. Dazu wurden 1 x 10^8 Zellen in 950 µl MACS-Puffer resuspendiert, filtriert (30 µm (Milteny)) und mit 50 µl $CD14^+$ Magnetpartikel für 15 min bei 4°C im MACS-Mixer gemixt. Danach wurde die Zell-$CD14^+$-Suspension für 10 min zentrifugiert und zweimal mit je 10 ml MACS-Puffer gewaschen, um die überschüssigen Magnetpartikel zu entfernen. Vor der magnetischen Separation wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer pro 1 x 10^8 Zellen resuspendiert. Die Separationsäule wurde in das magnetische Feld platziert und mit einem 30 µm Filter bestückt. Die Filterung diente dazu Zellverklumpungen zu entfernen, welche die Säule verstopfen könnten. Unterhalb der Säule befand sich ein Auffangröhrchen. Im ersten Schritt wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert. Danach wurde das Auffangröhrchen gewechselt und die Zellsuspension mit einer 1 ml Pipette vorsichtig aufgetragen. Abschließend wurde die Säule mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die magnetisch markierten Zellen verblieben so im Feld des Magneten, während die nicht markierten Zellen die Säule durchquerten und ausgewaschen wurden. Im letzten Schritt wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein neues Auffangröhrchen gesteckt und mit 5 ml MACS-Puffer ausgespült. Der Puffer wurde mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Im Auffangröhrchen sammelten sich die $CD14^+$-Zellen an. Der Vorgang der Separation wurde mit einer zweiten magnetischen Säule wiederholt, um die Reinheit der gewonnenen Zellen zu erhöhen. Zur Effektivitätskontrolle der Selektion wurde eine Probe jeweils vor der Separation aus den Zellen nach der Erythrozytenlyse, aus der Negativkontrolle, welche die nicht markierten, ausgewaschenen Zellen enthielt und der Positivprobe, d.h. der in der magnetischen Säule verbliebenen Monozytenpopulation entnommen. Diese Proben wurden mit anti-human $CD14^+$ FITC Antikörper gefärbt (Protokoll Miltenyi Biotec).

2.3.3 Antikörperfärbung

Um das Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden, wurden alle Färbungen bei Raumtemperatur und in Dunkelheit durchgeführt. An jeden Waschschritt (Saponin oder PBS) schlossen sich je eine Zentrifugation über 5 min bei 350 g (Megafuge 2.0 R, Heraeus), das Dekantieren und das Lockern der Zellen an. Bis zur Analyse wurden alle Proben in 250 µl PBS bei 4ºC in Dunkelheit gelagert (Rittner, Brack et al. 2001).

2.3.3.1 Oberflächenfärbung

Die primären Antikörper wurden in der entsprechenden Menge auf die Zellsuspension gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die überschüssigen Antikörper mit je 2 ml PBS gewaschen (Rittner, Brack et al. 2001).

2.3.3.2 Intrazelluläre Färbung

Im ersten Schritt wurden die Zellen in 500 µl frisch zubereitetem 1 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen mit 2 ml Saponin-Puffer permeabilisiert.

Im ersten Färbeschritt wurden die intrazellulären Antikörper zugegeben (Bsp. Rattenpfote: Ratten RP1 PE, anti-Ratten CD68 (= ED1) FITC, anti-pan Opioid 3E7 Ak oder seine Isotypenkontrolle IgG_{2a} PE). Simultan wurden Färbungen mit extrazellulären Antikörpern (Bsp. Rattenpfote: CD45 Färbung) durchgeführt. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen zuerst mit 2 ml Saponinpuffer und anschließend mit 2 ml PBS gewaschen, um die Permeabilisierung rückgängig zu machen.

Bei der 3E7-Färbung der Rattenpfotenzellen erfolgte nach der Färbung mit dem primären Antikörper die Färbung mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper (Ratten anti-Maus IgG_{2a} PE sowie Maus anti-Ratte CD45 Cy5-PE). Nach 15 min Inkubation wurden die Proben mit je 2 ml Saponinpuffer und PBS gewaschen (Rittner, Brack et al. 2001).

Bezeichnung	Antigen	Zielzelle	Fluorochrom	Bindungsstelle	Firma	Konzentration
Maus anti-Ratte CD45	Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)	Alle hämato-poetischen Zellen	Cy5-PE	Extrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	2 µg/ml
Maus anti-Ratte CD3	T-Zell-Rezeptor assoziiertes Zellmembran-Protein	T-Zellen	PE	Extrazellulär		4 µg/ml
Maus anti-Ratte RP-1	Nicht charakterisiert	Neutrophile Granulozyten	PE	Intrazellulär		12 µg/ml
anti-human CD14	Glycosylphos-Phatidylinosit-ol (GPI) verankertes Glykoprotein	Monozyten, interfollikuläre Makrophagen, DC, Langerhans-Zellen	FITC	Extrazellulär		anti-human CD14
Maus IgG2a		Isotypen-Kontrolle	PE	Keine		20 µg/ml
RAM (Ratten anti-Maus) IgG2a+b		Sekundärer Antikörper	PE	Intrazellulär und Extrazellulär		20 mg/ml
Maus anti-Ratte ED1, heute CD68	Lysosomales Membran-Antigen	Monozyten/ Makrophagen	FITC	Intrazellulär	Serotec, Raleigh, USA	2 µg/ml
fMLP	FPR		FITC	Extrazellulär	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	100 nM (Ratte) 1 µM (humane Zellen)
Maus anti-pan-Opioid 3E7	Opioidpeptide, außer Endo-morphinen	Opioid-peptidhaltige Zellen	unkonjugiert	Intrazellulär	Gramsch, Schwabhausen, Deutschland	20 µg/ml

Tabelle 1: Verwendete Durchflusszytometrie-Antikörper

2.3.4 Kompensation und Kalibrierung

Die Emissionspektren der einzelnen Farbstoffe überlappen. Aus diesem Grund müssen am FACS-Gerät die Schwellen, die Verstärker und die Kompensation für die Messung eingestellt werden. Das bedeutet, dass eine Korrektur der Fluoreszenzumgebung der einzelnen Farbstoffe durchgeführt wird. Hierzu werden Kontrollproben mit den jeweiligen Farbstoffen gefärbt. Mit diesen wird die Lage der Zellpopulationen im Dot Plot kontrolliert. Eine optimale Kompensation bedeutet, dass die einfach gefärbten Zellen in einem rechten Winkel im Zwei-Parameter Dot Plot liegen. Die Zellen für die Kontrollproben müssen von der gleichen Art wie die zu testenden sein, so dass an jedem Versuchstag ein Zellpool für die Kontrollproben zusammengestellt wurde.

Mit standardisierten Partikel-Mixturen, den so genannten CaliBRITE Partikeln, wurde das FACS-Gerät regelmäßig geeicht (Kalibrierung). CaliBRITE Partikel bestehen aus ungefärbten und standardisierten FITC und PE Partikeln. Wie zuvor beschrieben, werden so die Schwellen, die Verstärker und die Kompensation für die jeweiligen Farbstoffe eingestellt (nach Angaben des Herstellers).

2.3.5 Quantitative FACS-Analysen

Durch die Mischung der Zellproben mit TruCount Partikeln war die quantitative Analyse möglich. TruCount Partikel fluoreszieren in allen Kanälen und haben eine definierte Größe. Durch die Analyse des prozentualen Anteils der Zellpopulation im Verhältnis zu den TruCount Partikeln, ließ sich die absolute Zellzahl der Probenpopulation berechnen (Rittner, Brack et al. 2001).

2.4 Untersuchungen zum Schmerzverhalten

Zur Verdeutlichung der funktionellen Relevanz der in dieser Arbeit durch fMLP Stimulation beschriebenen Ergebnisse werden Verhaltensuntersuchungen dargestellt. Diese Experimente wurden von Frau Dr. D. Labuz (Klinische Forschungsgruppe „Molekulare Mechanismen der Opiatanalgesie unter Entzündungsbedingungen“, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt.

An den Versuchsaufbau wurden die Ratten durch die tägliche Entnahme aus dem Käfig über 4 Tage gewöhnt (Handling) (Stein, Hassan et al. 1990; Brack, Rittner et al. 2004). Das Verhaltensexperiment beinhaltet die Messung der Schmerzempfindlichkeit der Pfote. Auf sie wird über einen Stempel im Pfotendruck-Algesiometer (Ugo Basle, Comerio, Italien) ansteigender Druck ausgeübt, bis das Tier die Pfote wegzieht. Die PPT wird in g angegeben

und entspricht dem ausgeübten Gewicht. Zum Schutz vor Gewebeschädigung wird ein Wert von 250 g nicht überschritten (Cutoff). Es wurden die Ausgangswerte der PPT der entzündeten und der nicht entzündeten Pfote (Basalwert) und die Werte 5 min nach i.pl. Injektion von fMLP bestimmt. Pro Pfote wurden drei Messungen im Abstand von 10 s durchgeführt. Als Ergebnis wird der Mittelwert in Abhängigkeit der fMLP-Konzentration mit Standardabweichung dargestellt.

2.5 Opioidfreisetzung

2.5.1 Prinzip

Durch die Bindung von Agonisten können Rezeptoren aktiviert werden. Dieses führt zur Auslösung einer Signalkaskade (Karow 2003), welche die Freisetzung sekretorischer Vesikel aus den Zellen bewirkt. Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten enthalten β-Endorphin- und Met-Enkephalinhaltige Granula in der Zellperipherie (Mousa, Shakibaei et al. 2004). Diese Granula können durch adäquate Stimulation ihre Opioidpeptide freisetzen (Cabot, Carter et al. 1997; Cabot, Carter et al. 2001). In dieser Studie wurden humane Granulozyten und Monozyten über den FPR stimuliert, um zu überprüfen, ob es zur Freisetzung von β-Endorphin und Met-Enkephalin kommt.

2.5.2 Technische Vorgehensweise

Wie unter 2.3.2 beschrieben wurden die aus dem peripheren Blut separierten Granulozyten und Monozyten in HBSS* aufgenommen (siehe 2.9 Lösungen). Jede Monozytenprobe enthielt 1 x 10^7 Zellen und jede Granulozytenprobe 5 x 10^7 Zellen in 400 µl HBSS*.

2.5.2.1 β-Endorphin- und Enkephalinfreisetzung aus Granulozyten

Zur Überprüfung der optimalen fMLP-Dosis wurden die Granulozyten 5 min mit Cytochalasin B (5 µg/ml) auf dem 37°C warmen Thermomixer (Eppendorf) bei 700 Runden pro Minute (rpm) vorbehandelt. Des Weiteren folgte eine 7 min Stimulation mit verschiedenen fMLP-Konzentrationen. In einem weiteren Experiment, in dem die FPR vermittelte Freisetzung überprüft wurde, wurden die separierten Granulozyten mit Cytochalasin B (5 µg/ml) und mit Boc (10 µM) für 5 min vorbehandelt. Anschließend wurde das 2. Freisetzungsagens, fMLP (1000 nM) oder *Mycobact.* (0,666 mg/ml) hinzu gegeben. Als Kontrolle diente HBSS*. Die Proben wurden für weitere 7 min bei 700 rpm bei 37°C im Thermomixer stimuliert. Um die Reaktionen zu beenden wurden die Proben auf Eis gelegt und bei 1500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert (Biofuge, Heraeus). Aus dem Überstand

wurden je 200 µl (für β-Endorphin und Met-Enkephalin) abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.2.2 β-Endorphin- und Met-Enkephalinfreisetzung aus CD14$^+$ Monozyten

Die Monozytenproben wurden ebenfalls mit Cytochalasin B (5 µg/µl) für 5 min vorbehandelt und anschließend mit fMLP (1000 nM) oder *Mycobact.* (0,666 mg/ml) für 7 bzw. 15 min bei 37ºC und 700 rpm (Thermomixer, Eppendorf) stimuliert.
Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt und bei 1500 g und 4°C über 5 min zentrifugiert. Pro Probe wurden 2 x 200 µl Überstand abgenommen, jeweils für den β-Endorphin und Met-Enkephalin Nachweis im Radioimmunoassay. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20ºC gelagert.

2.6 Radioimmunoassay

2.6.1 Prinzip

Ein Radioimmunoassay ist eine quantitative Messung, in der das zu messende Antigen der Probe mit einer bekannten Menge radioaktiv markiertem Antigen, dem so genannten Tracer, um eine bekannte Menge Antikörper konkurriert.

$$Ag + Ak + Ag^* \quad \leftrightarrow \quad AgAk + Ag^*Ak$$

Bei dem hier verwendeten Radioimmunoassay wurde kovalent gebundenes ^{125}I, ein γ-Strahler mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen, zur radioaktiven Antigenmarkierung benutzt. Die Radioaktivität wird in „counts per minute“ (cpm) gezählt.
Bei dem verwendeten Radioimmunoassay handelt sich um einen sequenziellen Assay, d.h. zuerst bindet das Antigen der Probe an den im Überschuss vorliegenden Antikörper. Im nächsten Schritt wird das radioaktiv markierte Antigen hinzu gegeben, um die noch freien Antikörperbindestellen zu besetzen. Nach der Gleichgewichtseinstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion ist die Trennung des freien und des antikörpergebundenen Anteils des Antigens erforderlich. Als Trennmethode kommt die Immunkomplexfällung durch die „Doppelantikörper-Methode“ zum Einsatz. Die Präzipitation erfolgt durch einen zweiten Antikörper, der gegen das Immunglobulin der Antikörper-Spenderart des ersten Antikörpers gerichtet ist. Somit führt er zur Vernetzung und Ausfällung der Immunkomplexe. Da der erste Antikörper (gegen das zu bestimmende Antigen) sehr verdünnt vorliegt, wird Normalserum

der Spenderspezies zugesetzt, um die überschüssigen zweiten Antikörper zu eliminieren (Thomas 2005).

Durch das Einsetzen einer bekannten Menge Antigen und der bekannten Menge von Antikörper erhält man die Standardkurve, eine graphische Darstellung der Antigenkonzentration in Bezug auf die gemessene gebundene Aktivität. Die Antigenkonzentration wird auf der x-Achse und die gebundene Aktivität des ^{125}I auf der y-Achse dargestellt. Durch den Vergleich mit dieser Kurve lassen sich die Konzentrationen der zu untersuchenden Proben berechnen. Zur Charakterisierung der radiometrischen Messung müssen die Gesamtzählrate (engl. total count (TC)), die unspezifische Bindung in Abwesenheit vom Antikörper (engl. nonspecific binding (NSB)) und die totale am Antikörper gebundene Radioaktivität in Abwesenheit vom Antigen (engl. total binding (TB)) gemessen werden. Diese Werte werden bei jedem RIA bestimmt (siehe Tabelle 2) (Begleitheft zu RIA-Kit).

2.6.2 Technische Vorgehensweise

Die technische Durchführung des Radioimmunoassays gliederte sich in drei Tage. Aus organisatorischen Gründen wurde der Großteil der RIA Messungen von Frau Susanne Kotré und Frau Katharina Kuschfeldt durchgeführt. Gemessen wurden die, wie unter 2.5 beschrieben, gewonnenen Überstände aus den Opioidpeptidfreisetzungsexperimenten. Ziel ist es hierbei das freigesetzte β-Endorphin und Met-Enkephalin nachzuweisen. Das hier beschriebene Vorgehen richtet sich nach den Empfehlungen von Peninsula Laboratories, Bachem, USA.

Am ersten Tag wurden die Proben für die Standardkurve (100 µl) und die Überstände (100 µl) aus den Freisetzungsexperimenten mit dem primären Antikörper (100 µl), entweder anti-Met-Enkephalin oder anti-human-β-Endorphin, inkubiert. Zur Qualitätssicherung wurden die Proben als Doppelwerte angelegt. Zur Herstellung der Standardkurve wurde das Standardpeptid-Pulver, welches die bekannte Menge Antigen enthält, in RIA-Puffer gelöst und eine Verdünnungsreihe angelegt. Den Proben wurde der primäre Antikörper im Überschuss hinzu gegeben und für mindestens 16 bis maximal 24 h bei 4°C inkubiert.

Röhrchen	Probeninhalt	HBSS* Puffer	RIA Puffer	Volumen Standardkurve	Volumen Antikörperlösung
TC-1,2	TC	100 µl	100 µl		
NSB-3-5	NSB	100 µl	100 µl		
TB-6-8	TB	100 µl			100 µl
9, 10	H Standard			100 µl	100 µl
11, 12	G Standard			100 µl	100 µl
13, 14	F Standard			100 µl	100 µl
15, 16	E Standard			100 µl	100 µl
17, 18	D Standard			100 µl	100 µl
19, 20	C Standard			100 µl	100 µl
21. 22	B Standard			100 µl	100 µl
23, 24	A Standard			100 µl	100 µl
25, 26	Probe 1 100 µl				100 µl
27, 28	Probe 2 100 µl				100 µl
Etc.	Etc.				100 µl

Tabelle 2: Pipettierschema RIA

Am nächsten Tag wurde der Tracer, d.h. entweder ^{125}I-END oder ^{125}I-ENK (100 µl, 12,000 - 15,000 cpm) hinzugefügt. Wieder erfolgte eine Inkubationszeit für mindestens 16 bis maximal 24 h bei 4°C.

Am dritten Tag wurde mit dem zweiten Ak („goat anti-rabbit IgG serum“ (GARGG)) und Normalserum (NRS) der gebundene Antikörper vernetzt und gefällt. Hierzu wurden je 100 µl GARGG und NRS auf jede Probe aufgetragen und für 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl RIA-Puffer gewaschen und bei 1700 g (Rotixa 50 RS, Hettich) für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Bis auf das TC Röhrchen wurden alle Überstände abgesaugt. Danach wurden die Proben im γ-Counter gemessen.

2.7 Versuchsprotokolle

2.7.1 fMLP-FITC Bindung von Granulozyten und Monozyten der entzündeten Rattenpfote

Die Ratten wurden in die rechte Hinterpfote mit je 150 µl FCA i.pl. injiziert. Nach 2 h wurde das Pfotengewebe, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, entnommen.

Einzelzellsuspensionen der entzündeten Pfote wurden für Leukozyten (anti-Ratten CD45 Cy5 PE), Granulozyten (RP1 PE), Makrophagen/Monozyten (ED1 PE, alte Bezeichnung, heute

CD68) gefärbt. Der FPR wurde mit fMLP-FITC dargestellt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

2.7.2 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 h FCA und 400 µg Boc i.v. und 3 mg CsH i.v.

Die Ratten wurden in 2 Gruppen randomisiert und mit NaCl (0,9 %) oder mit 400 µg Boc in 0,9 % NaCl i.v. (in die Schwanzvene) injiziert. Simultan wurde 150 µl FCA subkutan in die Pfote verabreicht. Nach 2 h wurde das Pfotengewebe entnommen und aufbereitet (2.3.2.1). Färbungen wurden für Einzelzellsuspensionen der entzündeten Pfote für Leukozyten (anti-Ratten CD45 Cy5 PE), opioidhaltige Leukozyten (anti-pan Opioid 3E7 PE) und die Leukozytensubpopulationen der Granulozyten (RP1 PE), Makrophagen/Monozyten (ED1 PE) und T-Helferzellen (anti-Ratten CD3 PE) hergestellt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

Die Versuche mit CsH 3 mg i.v. wurden nach dem gleichen Schema durchgeführt. Die Konzentrationen für Boc (400 µg) und CsH (3 mg) wurden der Literatur entnommen: die Dosierungen von Boc variierten in der Literatur für in vivo Experimente von 80 - 400 µg pro Ratte (200 g KG) (La, D'Amico et al. 2001; Perretti, Getting et al. 2001; Gavins, Yona et al. 2003). Für die Experimente in der vorliegenden Studie wurde eine Konzentration von 400 µg/Ratte gewählt. Die Konzentration für CsH betrug 15 mg/kg (Rucinski, Liu et al. 1994), somit pro Ratte 3 mg CsH.

2.7.3 FPR-Expression auf humanen Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes

Die Granulozyten wurden wie unter 2.3.2.2 und die Monozyten wie unter 2.3.2.3 beschrieben separiert. Pro Färbung wurden 1 x 10^6 Zellen pro ml PBS verwendet. Die Färbung erfolgte mit fMLP-FITC für 20 min.

2.7.4 Charakterisierung des FPR-Antagonisten Boc

Die Granulozyten wurden wie unter 2.3.2.2 beschrieben separiert. Pro Färbung wurden 1 x 10^6 Zellen pro ml PBS verwendet. Die Granulozyten wurden mit je 10 µM und 100 µM Boc vorinkubiert und dann mit fMLP-FITC gefärbt

2.7.5 β-Endorphin- und Met-Enkephalinfreisetzung aus humanen Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes

Die entsprechenden Zellen wurden wie unter 2.3.2.2 und 2.3.2.3 beschrieben gewonnen und anschließend wie unter 2.5.2.1 und 2.5.2.2 beschrieben mit dem jeweiligen Freisetzungsagens stimuliert.

	Zellen	**1. Cytochalasin B 1µl**	**min**	**2. Freisetzungsagens 100 µl**	**min**
1	Granulozyten	+	5	HBSS*	7
2	Granulozyten	+	5	fMLP (10 nM)	7
3	Granulozyten	+	5	fMLP (100 nM)	7
4	Granulozyten	+	5	fMLP (1000 nM)	7

Tabelle 3: Stimulationsschema der β-Endorphin- u. Met-Enkephalinfreisetzung in Abhängigkeit von der fMLP-Dosis

	Zellen	**1. Cytochalasin B 1µl**	**2. Vorbehandlung 50 µl**	**min**	**3. Freisetzungsagens 50 µl**	**min**
1	Granulozyten	+	HBSS*	5	HBSS*	7
2	Granulozyten	+	HBSS*	5	fMLP (1000 nM)	7
3	Granulozyten	+	Boc 10 µM	5	fMLP (1000 nM)	7
4	Granulozyten	+	HBSS*	5	HBSS*	7
5	Granulozyten	+	HBSS*	5	Mycobact. (0,666 mg/ml)	7
6	Granulozyten	+	Boc 10 µM	5	Mycobact. (0,666 mg/ml)	7

Tabelle 4: Stimulationsschema der β-Endorphin- u. Met-Enkephalinfreisetzung mit Boc Vorbehandlung

	Zellen	**1. Cytochalasin B 1µl**	**min**	**2. Freisetzungsagens 100 µl**	**min**
1	Monozyten	+	5	HBSS*	7
2	Monozyten	+	5	fMLP (1000 nM)	7
3	Monozyten	+	5	Mycobact. (0,666 mg/ml)	7
4	Monozyten	+	5	HBSS*	15
5	Monozyten	+	5	fMLP (1000 nM)	15
6	Monozyten	+	5	Mycobact. (0,666 mg/ml)	15

Tabelle 5: Stimulationsschema der β-Endorphin- u. Met-Enkephalinfreisetzung aus $CD14^+$ Zellen

Die gewonnenen Überstände wurden mit Hilfe des Radioimmunoassay wie unter 2.6 beschrieben auf ihren β-Endorphin- und Met-Enkephalingehalt untersucht.

2.8 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Freunds Complete Adjuvans	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Boc	Bachem, Bubendorf, Schweiz
CsH	Sandoz, Basel, Schweiz
Calibrite Partikel	BD Bioscienes, Heidelberg, Deutschland
TruCount Partikel	
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare BioScienes AB, Uppsala, Schweden
Trypan Blue (0,4 %)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
$CD14^+$ Mikrobeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	
fMLP	
Mycobacterium butyricum	DIFCO, Detroit, MI, USA
RIA-Kit (anti-met Enkephalin, anti-human-β-Endorphin, ^{125}I-Endorphin, ^{125}I- Enkephalin, GARGG, NRS)	Bachem, San Carlos, CA, USA

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Hersteller

2.9 Verwendete Lösungen

Phosphat gepuffertes Kochsalz (Phosphate buffered saline)

(GIBCO, Paisley, UK)

Komplettes Medium

500 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco, Paisley, UK), 100 U/ml Penicillin, 10 mg/dl Streptomycin, 10 % fetales Kälberserum (alle von Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die Antibiotika schützen vor dem Wachstum von Bakterien.

Verdaulösung

30 mg Kollagenase, 10 mg Hyaluronidase (beide von Sigma, Steinheim, Deutschland), 0,5 ml HEPES, 1 M (Gibco, Paisley, UK), 10 ml komplettes Medium, vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Fixierlösung

1 % Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Buchs, Deutschland) in PBS. Da sich PFA nur im alkalischen Milieu löst, wurden 90 ml PBS mit 1 ml Natronlauge (NaOH 10 M, Fluka, Buchs, Deutschland) alkalisiert, 1 g PFA hinzugefügt und mit dem Rührmagneten gelöst. Unter pH-Kontrolle wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert (HCl, 11,7 N, Sigma, Steinheim, Deutschland). Ziel pH war dabei 7,45.

Saponin-Puffer

0,5 % Saponin + 0,5 % Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin, BSA) und 0,05 % Natriumazid (NaN_3) (alle von Sigma, Steinheim, Deutschland) in PBS. Saponin ist ein Detergenz und dient der Permeabilisation der Zellmembran. BSA sättigt unspezifische Bindungen ab. NaN_3 ist ein Zellgift und hemmt den Zellstoffwechsel.

MACS-Puffer

250 ml PBS (GIBCO, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) + 1,25 g BSA (0,5 %) + 186 mg Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Erythrozyten lysierender Puffer (EL-Puffer)

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

HBSS (Hanks Balanced Sodium Solution)

1,26 mM $CaCl_2$, 0,81 mM Mg_2SO_4, 5,36 mM KCl, 0,44 mM KH_2PO_4, 136,89 mM NaCl, 0,34 mM Na_2HPO_4, 5,94 mM D-Glucose + 0,035 % Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$, alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland). Der Ziel pH liegt bei 7,35. Vor Gebrauch Steril-Filtrierung.

HBSS = HBSS + Proteinaseinhibitoren*

1 ml HBSS + 4 µl Bestatin (c = 10 mg/ml)/ml HBSS + 1 µl Aprotinin (c = 10 mg/ml)/ml HBSS + 1 µl Thiorphan (c = 25,33 mg/ml)/ml HBSS (alle von Sigma, Steinheim, Deutschland). Bestatin ist ein kompetitiver und spezifischer Inhibitor von Aminopeptidasen, Aprotinin hemmt das Verdauungsenzym Trypsin und Thiorphan ist ein spezifischer Antagonist von Neprilysin, einer Protease. Durch die Zugabe dieser Proteinaseinhibitoren wird die Freisetzung der Opioide durch zelleigene Proteasen verhindert.

RIA-Puffer

0,1 M Na_2HPO_4 + 0,05 M NaCl + 0,1 % BSA + 0,1 % Triton X100 + 0,01 M NaN_3. Alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland. Der Ziel pH-Wert ist 7,4.

2.10 Statistische Auswertung

Bei den Leukozytenrekrutierungsexperimenten wurde ein Zweistichproben-t-Test zur Untersuchung der Erwartungswerte der Kontrollgruppe (NaCl 0,9 %) und der Testgruppe (Boc oder CsH) durchgeführt. Für diesen Test ist die Normalverteilung der untersuchten Zufallsvariablen Vorraussetzung, welche jeweils durch einen Vortest überprüft wurde. Des Weiteren muss das Kriterium der Varianzhomogenität für den Zweistichproben-t-Test erfüllt sein. Varianzhomogenität bedeutet, dass zwei oder mehrere unabhängige Zufallsvariablen die gleiche Varianz (mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert) besitzen, und somit einer

gemeinsamen, normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Bei Nichterfüllen eines dieser Kriterien wurde der allgemeinere Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet, welcher die gleiche Hypothese prüft.

Die Ergebnisse der Opioidpeptidfreisetzung wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (Analysis of Variance (ANOVA)) ausgewertet, da hier mehr als zwei unabhängige Stichproben verglichen wurden. Mit Hilfe der Varianzanalyse können Unterschiede in den Erwartungswerten einer normalverteilten Zufallsvariable in mehreren Gruppen beurteilt werden. Es wird die Wirkung einer unabhängigen Variable (hier: Stimulans) auf eine abhängige Variable (hier: Freisetzung) untersucht. Zellseparationstechnisch bedingt stammen die Werte der Freisetzungsexperimente von verschiedenen Individuen. Aus diesem Grund wurde die ANOVA für wiederholte Messungen (One Way Repeated Measures (RM)) verwendet. Die RM-ANOVA hat den Vorteil, dass sie Unterschiede zwischen den Gruppen und Unterschiede innerhalb der Gruppe trennen kann. Somit vergleicht sie die Freisetzung zwischen den Freisetzungsstimulantien an einem Individuum. Wird ein Unterschied zwischen den Erwartungswerten festgestellt, schließt sich ein mehrfacher Erwartungswertsvergleich an, mit welchem die Gruppen identifiziert werden, zwischen denen signifikante Mittelwertunterschiede bestehen.

Waren die empirisch gewonnenen Mittelwerte normalverteilt und varianzhomogen wurde der Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt, bei Nichterfüllung einer dieser Eigenschaften wurde die Dunnett's-Methode verwendet.

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ wurde als statistisch signifikant gewertet (Sachs 1999; Backhaus 2006).

2.11 Software

Tabelle 7 zeigt die verwendete Software.

Verwendung	**Software**	**Hersteller**
FACS-Analyse	CellQuest Pro	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Textverarbeitung	Microsoft Word 2003	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Statistik	Microsoft Excel 2003	
	Sigmastat Version 2.03	SPSS Inc., Chicago, IL,USA
Grafik	Sigmaplot Version 8.0	
Literatur	Endnote Plus 10.0	Niles & Associates Inc., San Francisco, CA, USA

Tabelle 7: Verwendete Software und Hersteller

2.12 Geräte

Tabelle 8 zeigt die verwendeten Geräte.

Geräte	**Hersteller**
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Nylon-Zellsieb Falcon	Pharmingen/Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland
Inkubator Function line B 12	
Multifuge 4 KR	
Biofuge fresco	
MACS-Mixer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Vario MACS	
MACS Separation Column	
LS Column	
MACS Pre-Separation Filter	
13 ml Röhrchen, 100 x 16 mm PP	SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland
Pfotendruck-Algesiometer	Ugo Basle, Comerio, Italien
Thermomixer Comfort 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Königs Wusterhausen, Deutschland
Wallac Wizard γ-Counter	Wallac Wizard, Freiburg, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Hersteller

3 Ergebnisse

3.1 fMLP-FITC Bindung von Granulozyten und Monozyten des entzündeten Pfotengewebes

Das Pfotengewebe wurde 2 h nach der Injektion mit 150 µl FCA aufgearbeitet und mit Antikörpern gegen hämatopoetische Zellen und Granulozyten gefärbt. Ein Teil der Zellen wurde mit fMLP-FITC gefärbt. In der Analyse wurden zuerst die hämatopoetischen Leukozyten anhand der $CD45^+$ Fluoreszenz und der Zellgröße identifiziert und eingegrenzt (Abb. 1 links). Die Eingrenzung diente dem Ausschluss nicht hämatopoetischer Zellen (z.B. Fibroblasten) und Zelltrümmern aus der weiteren Analyse. Aus dieser Leukozytenpopulation wurden die Zellen auf ihre RP1 PE Färbung untersucht und als $RP1^+$ Granulozyten hervorgehoben (Abb. 1 Mitte). Der Unterschied der $RP1^+$ Granulozyten in der fMLP-FITC Färbung wird im Histogramm dargestellt (Abb. 1 rechts). Im Vergleich der Granulozytenpopulation der ungefärbten und der fMLP-FITC gefärbten Population wird die Differenz im Mittelwert der Fluoreszenz (Δ m.f.) sichtbar (Abb. 1 rechts). Diese Differenz im Mittelwert der Fluoreszenz (Δ m.f.) entspricht einem Anstieg der fluoreszierenden Färbung. Das bedeutet, dass die verschobenen Granulozyten positiv für die Eigenschaft der fMLP-FITC Fluoreszenz sind (Radbruch 1992). Die Granulozyten binden fMLP-FITC. Somit exprimieren sie den FPR.

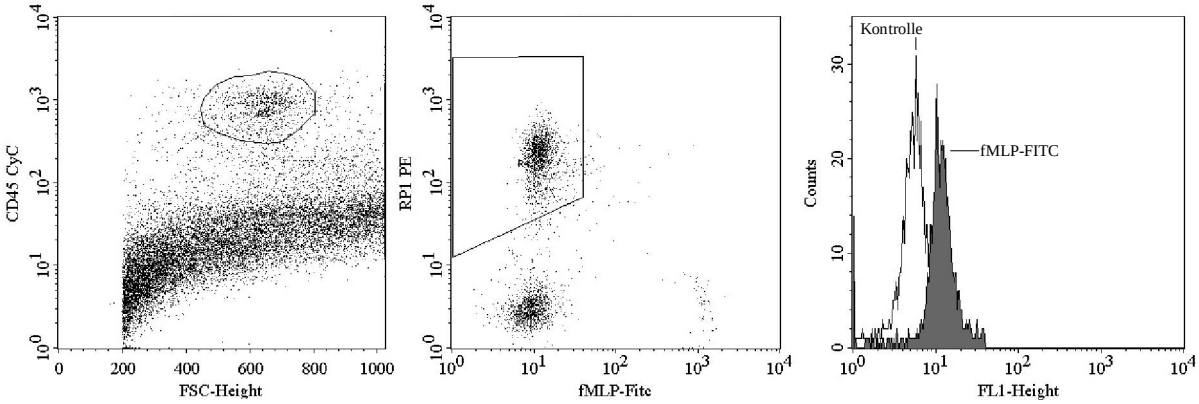

Abb. 1 **fMLP-FITC Bindung von Granulozyten in der entzündeten Rattenpfote nach 2 h FCA**
Linke Abb.: Fenster für $CD45^+$ Leukozyten, *Mittlere Abb.*: Fenster für $RP1^+$ Granulozyten, *Rechte Abb.:* $RP1^+$ Zellpopulation im Vergleich der ungefärbten (schwarze Linie) und mit der fMLP-FITC (dunkelgrau) gefärbten Population (exemplarisch eine Färbung aus n = 8)

Bei der Untersuchung, ob Monozyten/Makrophagen des Pfotengewebes den FPR ebenfalls exprimieren, gestaltete sich das Vorgehen analog. Das Pfotengewebe wurde wieder mit einem

Antikörper gegen CD45$^+$ Leukozyten und mit einem Antikörper gegen Monozyten/Makrophagen und fMLP-FITC gefärbt. Zuerst erfolgte die Eingrenzung der hämatopoetischen Leukozyten (Abb. 2 links), aus welchen dann die ED1$^+$ Monozyten/Makrophagen hervorgehoben wurden (Abb. 2 Mitte). Auf diese wurde ein Fenster gelegt, um die Monozyten/Makrophagen auf ihre Eigenschaft, fMLP-FITC zu binden und zu fluoreszieren, zu untersuchen. Der Vergleich zeigte eine Verschiebung der gefärbten Population (Abb. 2 rechts), was zeigt, dass Monozyten/Makrophagen den fMLP-FITC binden und somit den FPR exprimieren.

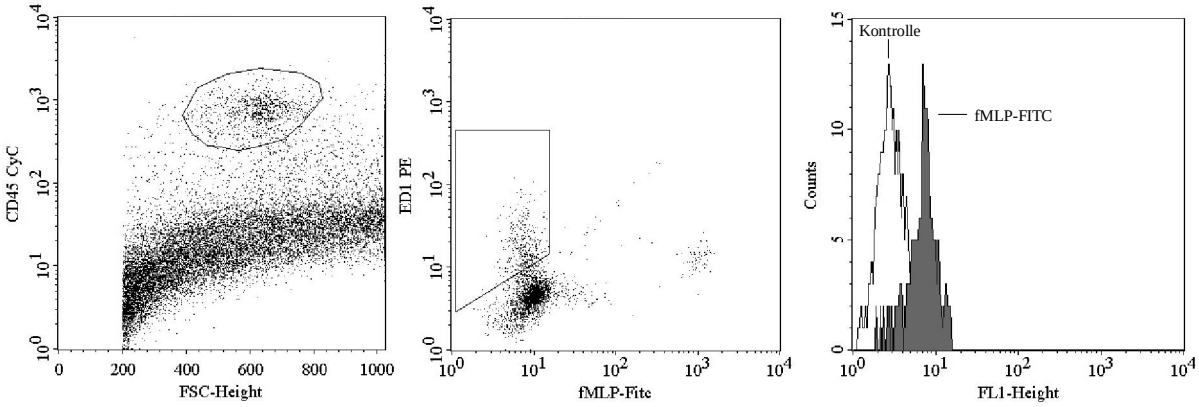

Abb. 2 **fMLP-FITC Bindung von Monozyten/Makrophagen in der entzündeten Rattenpfote nach 2 h FCA**
Linke Abb.: Fenster für CD45$^+$ Leukozyten, *Mittlere Abb.*: Fenster für ED1$^+$ Monozyten/Makrophagen, *Rechte Abb.*: ED1$^+$-Population im Vergleich der ungefärbten (schwarze Linie) und mit der fMLP-FITC (dunkelgrau) gefärbten Population (exemplarisch eine Färbung aus n = 8)

3.2 Charakterisierung des FPR-Antagonisten Boc

Die Charakterisierung des FPR-Antagonisten Boc ist im Histogramm folgendermaßen dargestellt: die fMLP-FITC-Fluoreszenzintensitäten einer Negativkontrolle, d.h. einer Leukozytenpopulation ohne fMLP-FITC Färbung, einer Positivkontrolle, d.h. einer Leukozytenpopulation mit fMLP-FITC Färbung, im Vergleich zu zwei mit fMLP-FITC gefärbten Leukozytenpopulationen, die mit 10 µM bzw. 100 µM Boc vorinkubiert wurden. Die Fluoreszenzverschiebung von fMLP-FITC ist in den mit Boc behandelten Zellen konzentrationsabhängig geringer als in der Positivkontrollgruppe (Abb. 3). Somit sind zwei Kriterien erfüllt, die die fMLP-bindende Stelle als FPR identifizieren. Der FPR lässt sich mit fMLP-FITC als Fluoreszenzverschiebung darstellen, welche durch einen FPR spezifischen Antagonisten hemmbar ist.

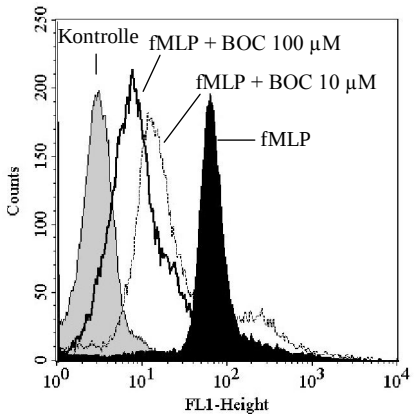

Abb. 3 **Hemmung der fMLP-FITC Bindung auf humanen Granulozyten**

Die Fluoreszenzverschiebung von fMLP-FITC der mit Boc vorbehandelten Granulozyten (gepunktete, schwarze Linie) ist im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die nur Granulozyten ohne Boc Vorinkubation und ohne fMLP-FITC Färbung (grau) und zu einer weiteren Kontrollgruppe ohne Boc Vorinkubation mit fMLP-FITC-Färbung (schwarz) dargestellt (exemplarisch eine Färbung aus n = 3)

3.3 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 h FCA unter FPR Blockade mit Boc

Zwei Stunden nach der Gabe von FCA i.pl. und der simultanen Injektion von 400 µg Boc i.v. wurden die $CD45^+$ Leukozyten anhand von Zellgröße (FSC) und der CD45 Cy5 PE Färbung identifiziert. Aus ihnen wurden die opioidhaltigen Leukozyten (3E7 Färbung) analysiert (Abb. 4 A und B). Die durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten ($CD45^+$ Zellen) und der opioidhaltigen Leukozyten ($CD45^+$ und $3E7^+$ Zellen) zeigte keine signifikante Abnahme der Zellzahl in der mit Boc behandelten Gruppe (Abb. 4).

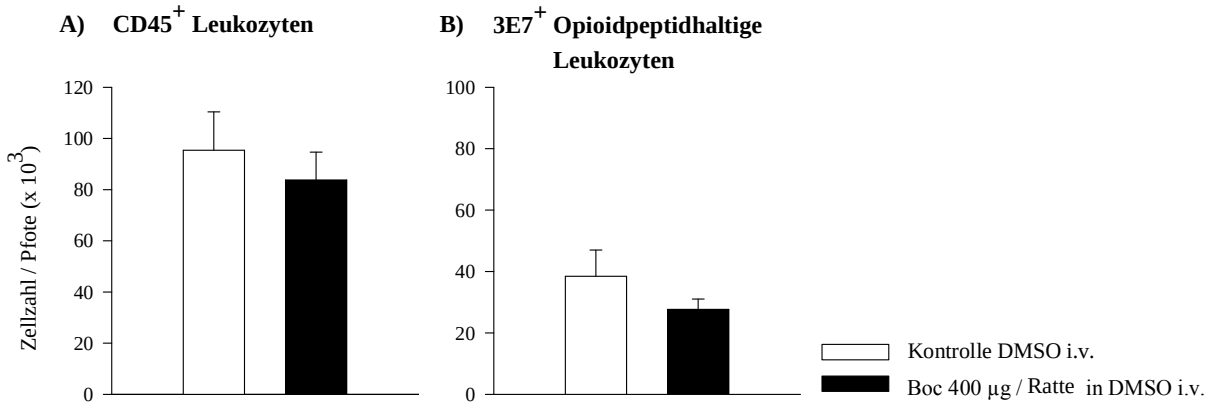

Abb. 4 **Einfluss der FPR Blockade mit Boc i.v. auf die Anzahl der Leukozyten ($CD45^+$ Zellen, Abb. 4 A) und opioidhaltigen Leukozyten ($CD45^+/3E7^+$ Zellen, Abb. 4 B) der Pfote nach 2 h FCA Entzündung**

Angegeben ist jeweils die absolute Zellzahl als Mittelwert pro Pfote und der Standardfehler des Mittelwertes (n = 8, t-Test, $p > 0,05$)

Auch in den einzelnen Leukozytensubpopulationen $RP1^+$ Granulozyten, $ED1^+$ Monozyten/Makrophagen und den $CD3^+$ T-Helferzellen ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl zwischen der Kontrollgruppe und der mit Boc behandelten Gruppe nachweisen (Abb. 5).

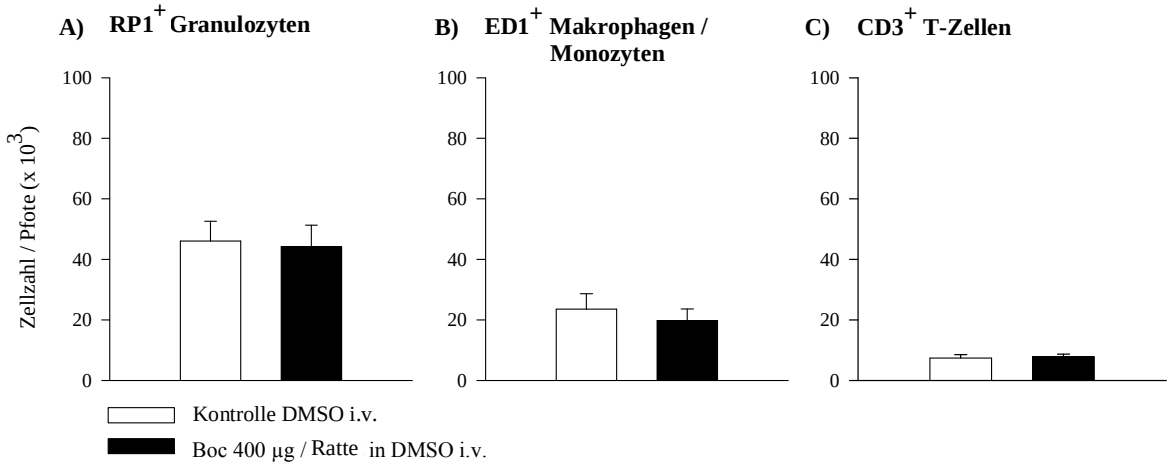

Abb. 5 **Einfluss der FPR Blockade mit Boc i.v. auf die Anzahl der Granulozyten ($RP1^+$ Zellen, Abb. 5 A), der Monozyten/Makrophagen ($ED1^+$ Zellen, Abb. 5 B) und der T-Helferzellen ($CD3^+$ Zellen, Abb. 5 C) der Pfote nach 2 h FCA Entzündung**

Angegeben ist jeweils die absolute Zellzahl als Mittelwert pro Pfote und der Standardfehler des Mittelwertes (n = 8, t-Test, $p > 0,05$)

Um eine systemische immunsuppressive Wirkung des i.v. verabreichten Boc auszuschließen, wurden die Leukozytensubpopulationen des Rattenblutes mit Hilfe der FACS-Analyse

aufgearbeitet. Es ließen sich keine Veränderungen der Zellzahlen zwischen der Kontroll- und Boc-Gruppe feststellen.

3.4 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 h FCA unter FPR Blockade mit CsH

In der entzündeten Pfote (2 h FCA) der mit CsH (3 mg i.v.) behandelten Gruppe ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (Cremophor in NaCl 0,9 %) keine signifikante Abnahme der $CD45^+$ Leukozyten und der $3E7^+$ opioidpeptidhaltigen Leukozyten nachweisen (Abb. 6).

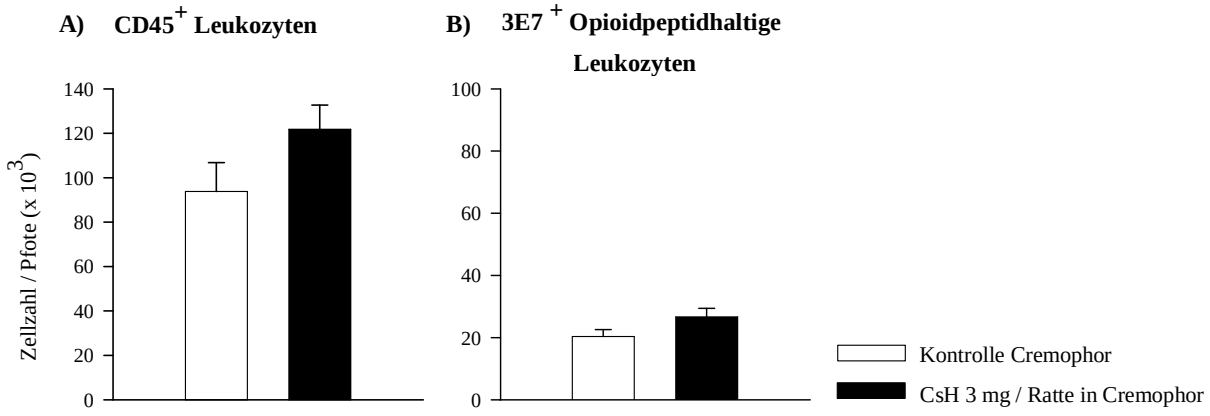

Abb. 6 **Einfluss der FPR Blockade mit CsH i.v. auf die Anzahl der Leukozyten ($CD45^+$ Zellen, Abb. 6 A) und opioidhaltigen Leukozyten ($CD45^+/3E7^+$ Zellen, Abb. 6 B) der Pfote nach 2 h FCA Entzündung**
Angegeben ist jeweils die absolute Zellzahl als Mittelwert pro Pfote und der Standardfehler des Mittelwertes (n = 10 - 11, t-Test, $p > 0,05$)

Die einzelnen Leukozytensubpopulationen wurden wie unter 3.3 beschrieben identifiziert und analysiert. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Abnahme der Zellzahl der mit 3 mg CsH i.v. behandelten Gruppe (Abb. 7).

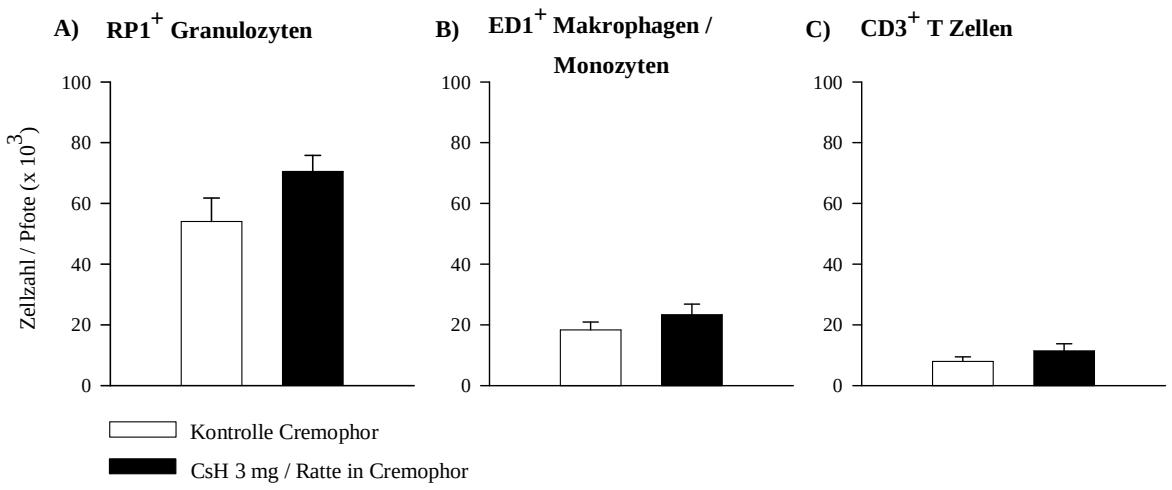

Abb. 7 **Einfluss der FPR Blockade mit CsH i.v. auf die Anzahl der Leukozytensubpopulationen, Granulozyten (RP1$^+$ Zellen, Abb. 7 A), Monozyten/Makrophagen (ED1$^+$ Zellen, Abb. 7 B) und die T-Helferzellen (CD3$^+$ Zellen, Abb. 7 C) der Pfote nach 2 h FCA Entzündung**

Angegeben ist jeweils die absolute Zellzahl als Mittelwert pro Pfote und der Standardfehler des Mittelwertes (n = 10 - 11, t-Test, $p > 0,05$, bei CD3$^+$ -Zellen, alle anderen Subpopulationen Mann-Whitney Rank Sum Test, $p > 0,05$)

Zum Ausschluss einer immunsuppressiven Wirkung wurden die Blutleukozyten gemessen. Auch mit der Behandlung durch CsH zeigten sich keine Veränderungen des Blutbildes.

3.5 Dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten Pfote nach i.pl. fMLP Injektion

Nach der i.pl. Injektion von fMLP zeigte sich nach 5 min in der entzündeten Pfote eine signifikante (ANOVA, $p < 0,05$) Erhöhung der PPT mit ansteigender Dosis von fMLP. Vom Ursprungswert der Lösungsmittelkontrolle auf die Höchstdosis von 3 µg fMLP nahm die PPT um 43 % zu. Ebenfalls dargestellt sind die Werte der nicht entzündeten Pfote. Hier kommt es zu keiner Zunahme der Antinozizeption mit der verabreichten fMLP-Konzentration (Abb. 8).

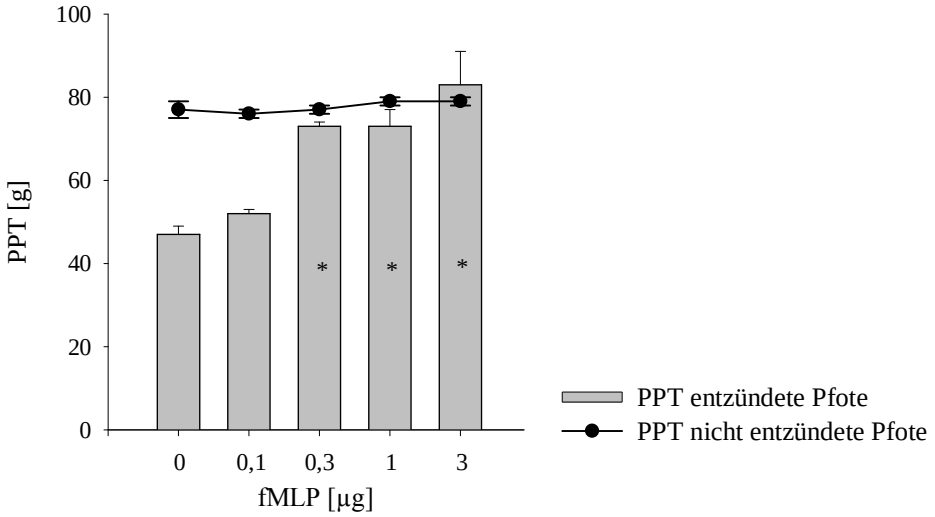

Abb. 8 **Dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten und nicht entzündeten Pfote nach fMLP i.pl.** Angegeben sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (n = 6, ANOVA, $p < 0,05$ in der entzündeten Pfote und $p > 0,05$ in der nicht entzündeten Pfote)

3.6 fMLP-FITC Bindung von humanen Granulozyten

Zur Untersuchung, ob humane Granulozyten des peripheren Blutes eine fMLP-FITC bindende Stelle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden sie mit fMLP-FITC Antikörper gefärbt. In der Analyse wurden die Granulozyten anhand ihrer Zellgröße und Granularität in der FSC/SSC Darstellung identifiziert und eingegrenzt. Die Granulozyten des peripheren Blutes zeigten eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität, der mit fMLP-FITC gefärbten Probe im Vergleich zur ungefärbten Kontrollgruppe (Abb. 9). Das bedeutet, dass die Granulozyten fMLP-FITC binden und den FPR exprimieren (Radbruch 1992).

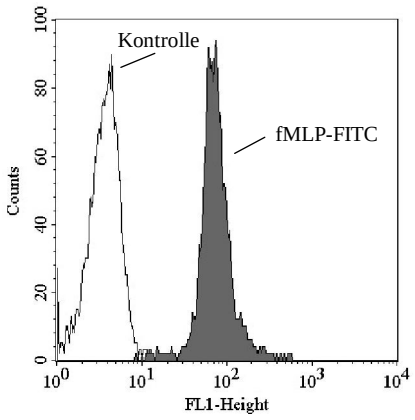

Abb. 9 **fMLP-FITC Bindung auf humanen Granulozyten**

Vergleich der ungefärbten (schwarze Linie) mit der fMLP-FITC (dunkelgrau) gefärbten Population (exemplarisch ist eine Färbung dargestellt aus n = 3)

3.7 FPR vermittelte Freisetzung von Opioiden aus Granulozyten

3.7.1 fMLP

Um eine optimale Dosierung von fMLP zur Freisetzung von Opioiden aus humanen Granulozyten zu finden, wurden diese mit 10 nM, 100 nM und 1000 nM fMLP stimuliert. Vor der Inkubation mit fMLP wurden die Zellen mit 1 µl Cytochalasin B (5 µg/ml) vorbehandelt. Die Opioide Met-Enkephalin und β-Endorphin wurden im RIA nachgewiesen. In der Konzentration von 100 nM und 1000 nM setzte fMLP signifikant Met-Enkephalin frei (Abb. 10 A).

Bei der β-Endorphinfreisetzung bewirkte nur die fMLP-Konzentration von 1000 nM eine signifikante Freisetzung (Abb. 10 B).

Für die weiteren Experimente wurde eine Dosis von 1000 nM fMLP verwendet.

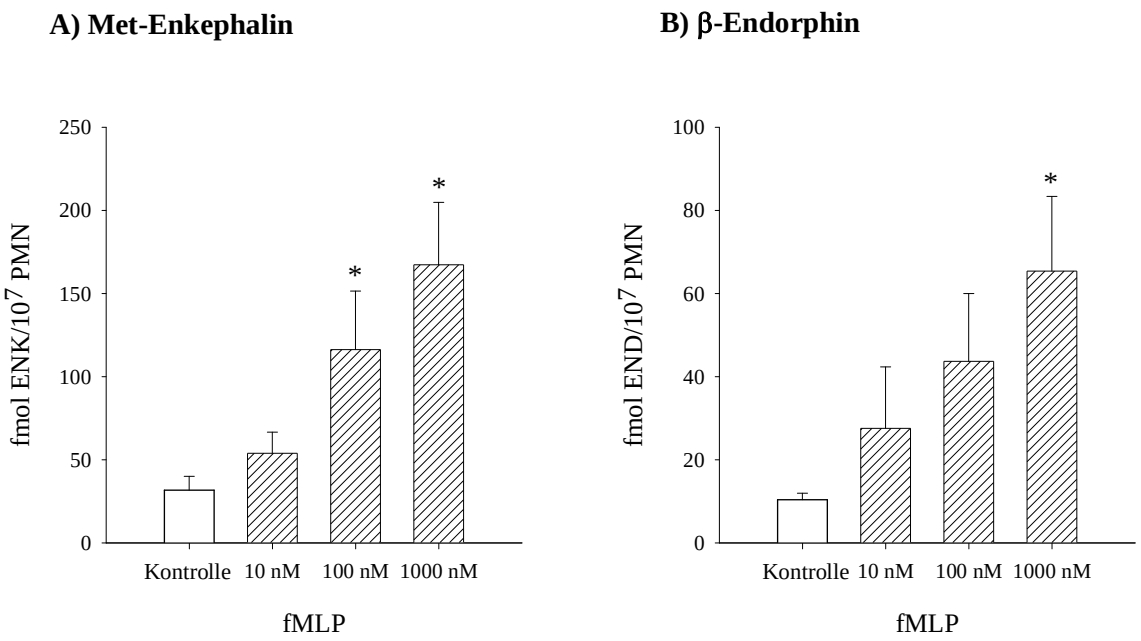

Abb. 10 **Dosis-Antwortverhalten der Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten**

A: Freisetzung von Met-Enkephalin nach Vorinkubation mit Cytochalasin B und anschließender Stimulation mit fMLP für 7 min, B: Freisetzung von β-Endorphin nach Vorinkubation mit Cytochalasin B und anschließender Stimulation mit fMLP für 7 min. Dargestellt sind der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (Met-Enkephalin, n = 22, One Way Repeated Measures ANOVA, Dunnett´s Methode, $p < 0,05$ und β-Endorphin, n = 12, One Way Repeated Measures ANOVA, Student-Newman-Keuls-Methode, $p < 0,05$)

3.7.2 *Mycobact.*

Weiterhin wurden in einem Pilotexperiment für *Mycobact.* die Konzentrationen 0,0666 mg/ml und 0,666 mg/ml miteinander verglichen. In der Met-Enkephalinfreisetzung erwies sich die höhere Konzentration als signifikant. Tabelle 9 zeigt die Met-Enkephalin und β-Endorphinfreisetzung nach der 7 min Stimulation mit 0,666 mg/ml *Mycobact.*. Daher wurde die Konzentration von 0,666 mg/ml zur Standardkonzentration der weiteren Freisetzungsexperimente gewählt.

	Met-Enkephalin (fmol/10^7 Zellen)	β-Endorphin (fmol/10^7 Zellen)
Kontrolle	34,58 ± 2	9,76 ± 1
0,666 mg/ml *Mycobact.*	147,49 ± 54,28	58,37 ± 10

Tabelle 9: Met-Enkephalin- und β-Endorphinfreisetzung nach 7 min Stimulation mit *Mycobact.*

Die Werte werden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes gezeigt (n = 5, bei Met-Enkephalin Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$ und bei β-Endorphin t-Test, $p < 0,05$)

3.7.3 Boc

Die Konzentration für Boc zur Hemmung der FPR bedingten Aktivität wurde in Pilotexperimenten ermittelt. Dazu wurden Granulozyten mit Boc in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit Cytochalasin B vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit fMLP (1000 nM) stimuliert. Die statistische Evaluierung erfolgte mit One Way Repeated Measures ANOVA (Student-Newman-Keuls-Methode, $p < 0,05$). Es zeigte sich, dass die Boc-Konzentration von 10 µM zu einer statistisch signifikanten Abnahme des freigesetzten β-Endorphins und Met-Enkephalins führte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die Konzentration von 10 µM zur Standardkonzentration der weiteren Freisetzungsexperimente.

3.8 Hemmung der fMLP und *Mycobact.* abhängigen Freisetzung aus humanen Granulozyten mit Boc

Um zu zeigen, dass die fMLP induzierte Opioidpeptidfreisetzung über den FPR vermittelt wird, wurden die β-Endorphin und Met-Enkephalin Freisetzung unter Proben, die 1. nur mit HBSS, 2. mit HBSS und fMLP und 3. mit Boc und fMLP stimuliert wurden verglichen. Die Kontrollprobe, die zweimal mit HBSS inkubiert wurde, setzte signifikant weniger Met-Enkephalin und β-Endorphin frei, als die Gruppe die zuerst mit HBSS und als zweites Agens fMLP (1000 nM) erhielt. Auch die zuerst mit Boc (10 µM) und anschließend mit fMLP (1000 nM) stimulierte Probe setzte signifikant weniger β-Endorphin und Met-Enkephalin frei, als die fMLP/HBSS behandelte Gruppe. Die Werte der mit Boc gehemmten Gruppe fielen nahezu auf das Niveau der Kontrollgruppe zurück (Abb. 11 A).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die *Mycobact.* bedingte Opioidfreisetzung FPR vermittelt ist. Hierzu wurde eine Kontrollprobe nur mit HBSS, eine Probe mit HBSS und *Mycobact.* (0,666 mg/ml) und letztlich eine Probe mit Boc (10 µM) und *Mycobact.* (0,666 mg/ml) stimuliert. Die Kontrollprobe setzte signifikant weniger Met-Enkephalin und β-Endorphin frei, als die Positivprobe die zuerst mit HBSS und als zweites Freisetzungsagens *Mycobact.* erhielt. Die mit dem FPR-Antagonisten Boc vorbehandelte Probe setzte signifikant weniger β-Endorphin und Met-Enkephalin frei. Auch hier waren die Werte für die freigesetzten Opioide der Boc Gruppe fast mit der Kontrollgruppe identisch (Abb. 11 B).

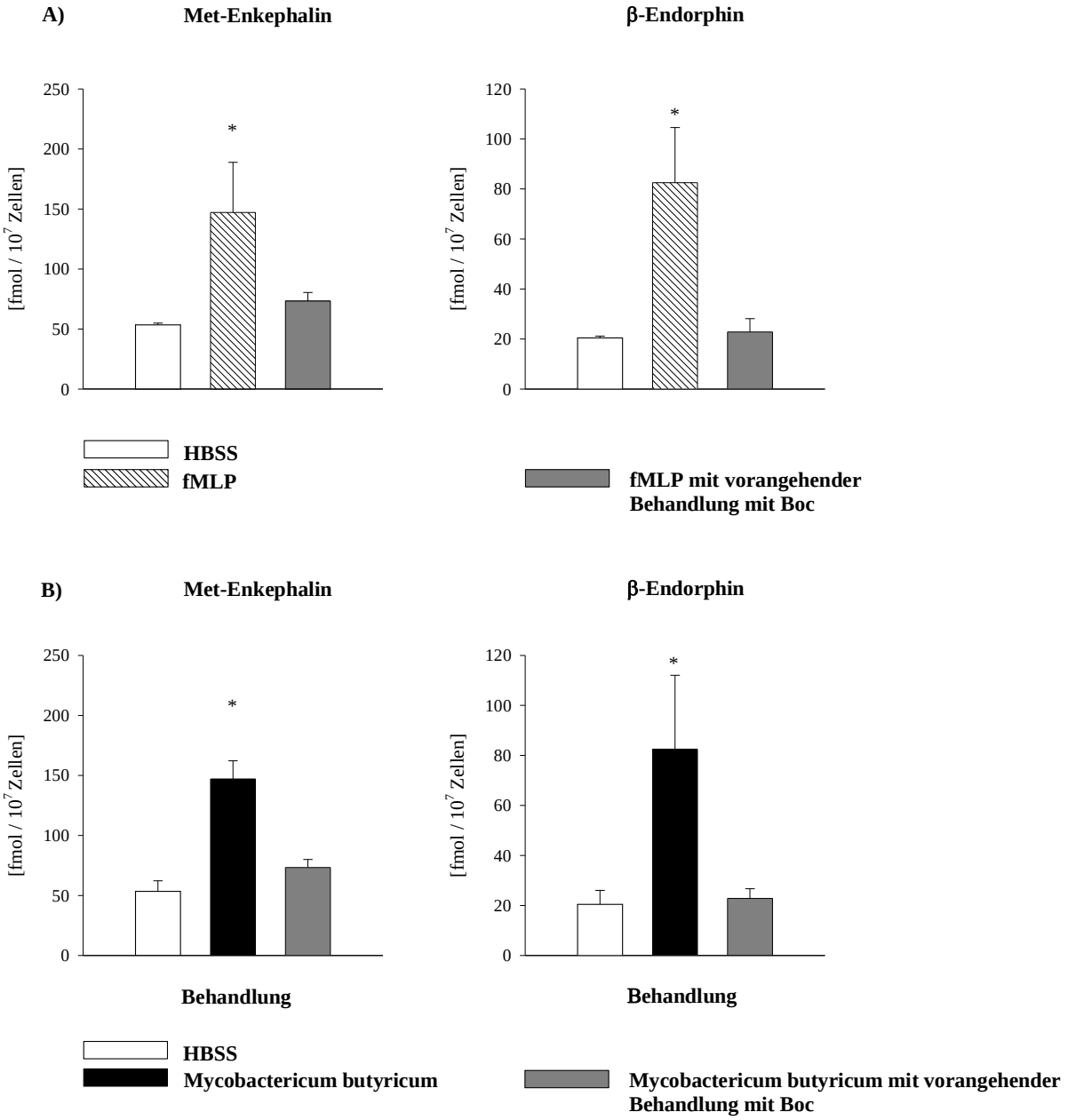

Abb. 11 **Met-Enkephalin- und β-Endorphin Freisetzung nach Vorbehandlung mit Boc in Granulozyten**

A: Opioidfreisetzung nach Vorinkubation mit Cytochalasin B (5 µg/ml) und Boc (10 µM) für 10 min und anschließender Stimulation mit fMLP für 7 min (n = 7 - 14, One Way Repeated Measures ANOVA, Dunnett´s Methode, $p < 0{,}05$), B: Opioidfreisetzung nach Vorinkubation mit Cytochalasin B (5 µg/ml) und Boc (10 µM) für 10 min und anschließender Stimulation mit *Mycobact.* für 7 min (n = 12, One Way Repeated Measures ANOVA, Student-Newman-Keuls- für Met-Enkephalin und Dunnett's Methode für β-Endorphin, $p < 0{,}05$). Abgebildet ist der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes.

3.9 Monozytenreinheit nach der magnetischen Separation

In Vorversuchen wurde die Konzentration von 5 µl $CD14^+$ magnetischen Partikeln auf 1 x 10^8 Zellen als die effektivste Dosis bezüglich der Reinheit und Anzahl der separierten Proben identifiziert. Zusätzlich wurde die Reinheit der separierten Proben an jedem Versuchstag überprüft. In der anschließenden FACS Analyse stellte sich in den Quadranten für die CD14 FITC Färbung die Anzahl der für diese Eigenschaft positiven Zellen in Prozent dar. Im aufgeführten Beispiel enthielt die Probe vor der Reinigung 9 % Monozyten (Abb. 12 A), die Negativkontrolle enthielt noch 1 % Monozyten (Abb. 12 B), während in der Probe aus den positiv selektierten Monozyten 95 % der Zellen $CD14^+$ waren (Abb. 12 C). Ab einem Anteil von 85 % Monozyten in der Probe wurden die separierten Zellen für die Freisetzungsexperimente verwendet.

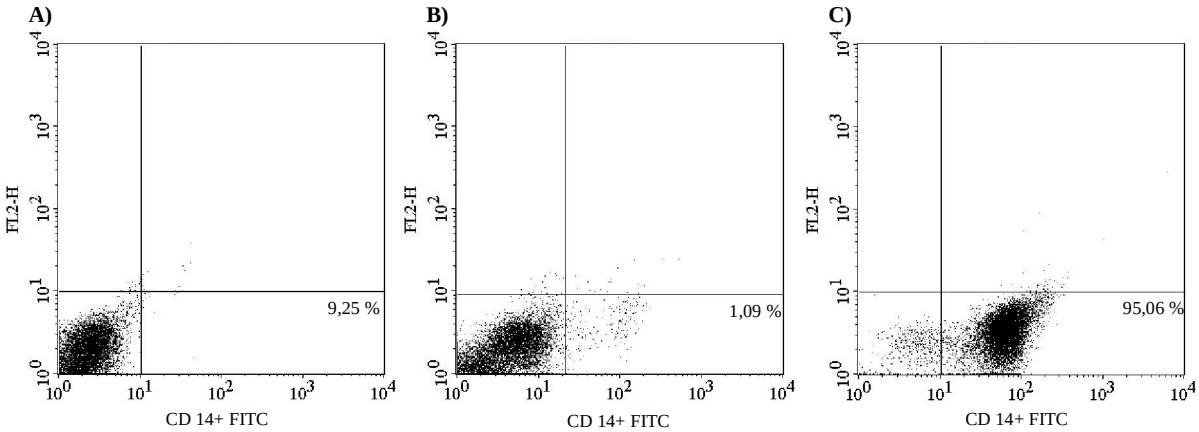

Abb. 12 **Darstellung der Monozytenreinheit vor und nach der magnetischen Separation**

A: Im humanen peripheren Blut waren vor der Positivselektion 9 % der Zellen der Probe Monozyten, B: 1 % der Zellen in der Negativprobe sind positiv für den $CD14^+$ Antikörper, C: In der Probe aus den positiv separierten Zellen sind 95 % der Zellen Monozyten (exemplarisch eine Färbung aus n = 10)

3.10 fMLP-FITC Bindung von humanen Monozyten

Zur Identifizierung einer fMLP-FITC Bindung wurden die gewonnenen humanen Monozyten des peripheren Blutes mit fMLP-FITC gefärbt. In der FSC/SSC Darstellung wurde die Monozytenpopulation anhand ihrer Größen- und Granularitätseigenschaften eingegrenzt. In der fMLP-FITC Fluoreszenzdarstellung (Abb. 13) ergab sich eine deutliche Verschiebung der gefärbten im Vergleich zur ungefärbten Population. Somit binden humane Monozyten fMLP-FITC, d.h. sie exprimieren den FPR.

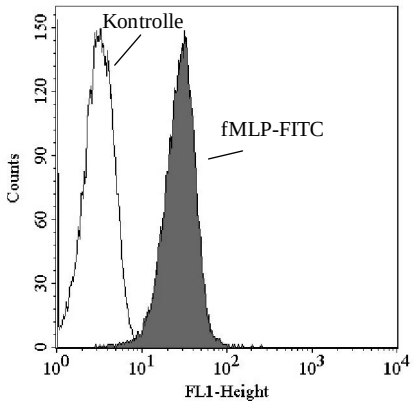

Abb. 13 **fMLP-FITC Bindung auf humanen Monozyten**

Vergleich der ungefärbten (schwarze Linie) mit der fMLP-FITC gefärbten (dunkelgrau) Population (Exemplarisch eine Färbung dargestellt aus n = 3)

3.11 β-Endorphin und Met-Enkephalinfreisetzung aus Monozyten des peripheren Blutes

Die Konzentrationen der Freisetzungsagentien wurden analog zu den Granulozyten-experimenten verwendet. Um zu testen, ob der FPR eine Funktion auf Monozyten hat, wurden die separierten humanen Monozyten mit *Mycobact.* (0,666 mg/ml) und mit fMLP (1000 nM) stimuliert. Der eigentlichen Stimulation ging eine 5 min Inkubation mit 1 µl Cytochalasin B (5 µg/ml) voraus. Anschließend wurden die humanen Monozyten für je 7 min (Abb. 14 A) beziehungsweise für 15 min (Abb. 14 B) mit dem Freisetzungsagens stimuliert. Im Vergleich zur Kontrollprobe war bei der *Mycobact.*- und fMLP-Probe nach 7 min kein signifikanter Unterschied in der Met-Enkephalinfreisetzung sichtbar (Abb. 14 A links). Hingegen war nach 7 min Stimulation mit fMLP eine signifikante β-Endorphinfreisetzung zu beobachten (Abb. 14 A rechts).

Die Stimulation der Monozyten über 15 min zeigte in der Met-Enkephalinfreisetzung ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Stimulantien (Abb. 14 B links). Währenddessen zeigte die 15 min Stimulation mit fMLP wieder eine signifikante β-Endorphinfreisetzung (Abb. 14 B rechts). Zur Positivkontrolle der Freisetzung von Opioiden aus Monozyten wurden die Proben mit Ionomycin, einem Ca-Salz aus *Streptomyces conglobatus* stimuliert. Ionomycin führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration und zu einer Met-Enkephalin- und β-Endorphinfreisetzung (Rittner, Labuz et al. 2006). Die Stimulation mit Ionomycin (10 µM) führte zu einer signifikanten Freisetzung von Met-Enkephalin- und β-Endorphin aus $CD14^+$-Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

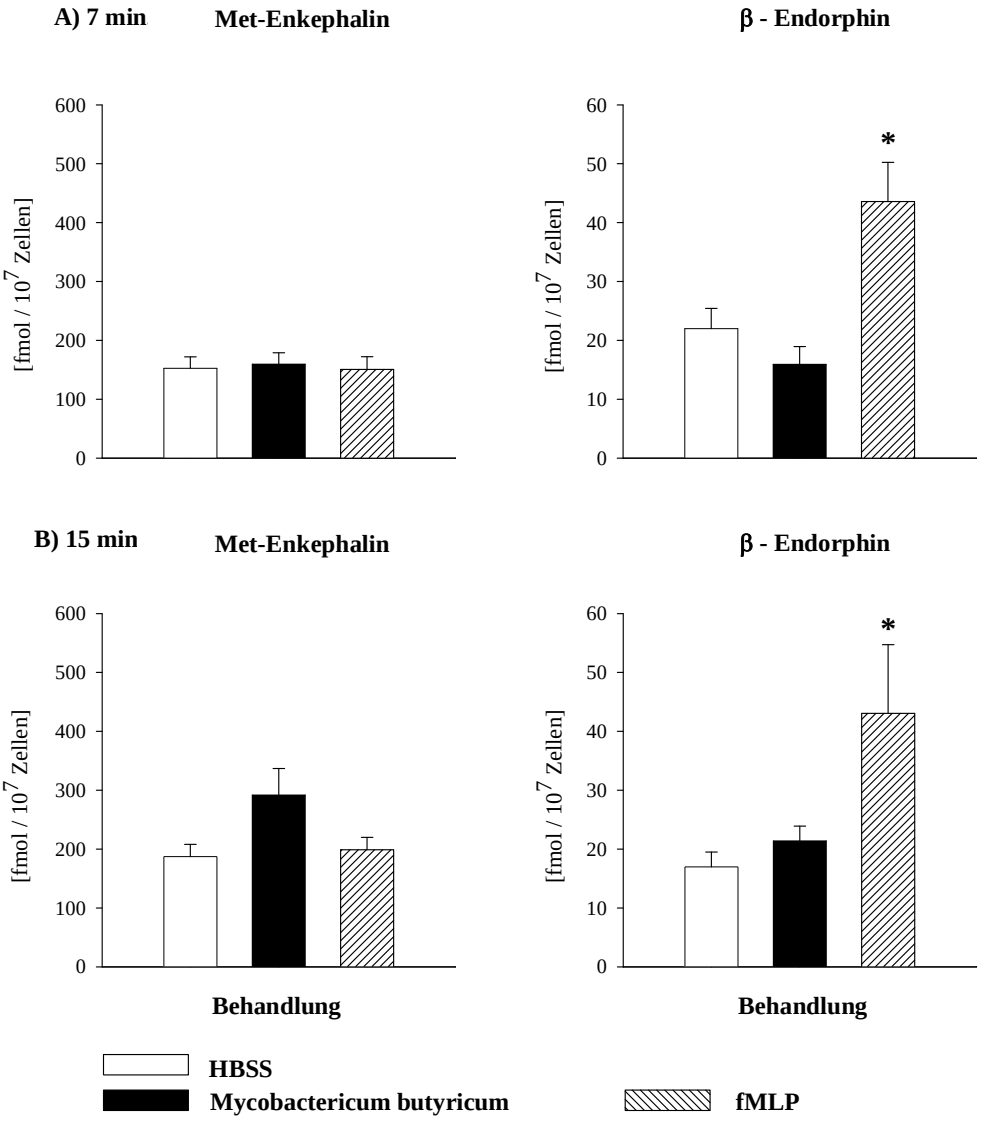

Abb. 14 **Opioidfreisetzung durch *Mycobact.* (0,666 mg/ml) und fMLP (1000 nM) in humanen Monozyten**
A: Met-Enkephalinfreisetzung und β-Endorphinfreisetzung nach 7 min Stimulation (Met-Enkephalin, n = 8 - 12, One Way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls-Methode, $p > 0{,}05$, β-Endorphin, n = 6 - 9, One Way RM ANOVA, Dunnett´s Method, $p < 0{,}05$); B: Met-Enkephalinfreisetzung und β-Endorphinfreisetzung nach 15 min Stimulation (Met-Enkephalin, n = 7 - 8, One Way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls-Methode, $p > 0{,}05$, β-Endorphin, n = 10 - 18, One Way RM ANOVA, Dunnett´s Method, $p < 0{,}05$). Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Entzündungsmodell und Entzündungszeitpunkt

Das Modell der FCA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote wurde von unserer Arbeitsgruppe bisher ausführlich charakterisiert (Stein, Millan et al. 1988; Stein, Hassan et al. 1990; Rittner, Brack et al. 2001; Brack, Rittner et al. 2004). In klinischen Studien konnte die Bedeutung der durch dieses Entzündungsmodell gefundenen Erkenntnisse weiter untermauert werden. Stein et al. wiesen bei Untersuchungen an Kniegelenkssynovia immunhistochemisch das Vorhandensein von endogenen Opioidpeptiden bei akuten, sowie chronischen Läsionen des Kniegelenkes nach. In der gleichen Studie zeigten sie, dass die Blockade von intraartikulären Opioidrezeptoren, durch den Opioidrezeptorantagonisten Naloxon den postoperativen Schmerz und Bedarf an Analgetika steigert, somit dass die endogenen Opioide an der postoperativen Analgesie beteiligt sind (Stein, Hassan et al. 1993). Bei Patienten, die arthroskopisch am Knie operiert wurden, führte die intraartikuläre Gabe von Morphin zu einer stärkeren Analgesie als die systemische Gabe. Beim Vorliegen einer Kniegelenksentzündung (Gonarthritis) verstärkte sich dieser Effekt. Im Gegensatz zum zentralen Angriff von Opioiden zeigt die intraartikuläre Gabe von Morphin keine Toleranzentwicklung (Stein, Pflüger et al. 1996). Folglich ist durch die periphere Applikation unter Entzündungsbedingungen eine effektivere und nebenwirkungsärmere Analgesie möglich. Bisher wurde postuliert, dass das Ausbleiben der Toleranzentwicklung durch die mangelnde Downregulation von Opioidrezeptoren (Hassan, Ableitner et al. 1993) und einer geringeren Inaktivierung von Rezeptor gekoppelten G-Proteinen bei sauren ph-Werten unter Entzündungsbedingungen (Rasenick und Childers 1989; Selley, Breivogel et al. 1993) zustande kommen könnte. Zöllner et al. zeigten im Tierexperiment, dass es in der entzündeten Rattenpfote zur vermehrten Rezeptorendozytose kommt. Des Weiteren werden G-Proteine geringer inaktiviert und cAMP gehemmt. Die Summe dieser Prozesse führt zu einer erhaltenen Rezeptorfunktion. Diese Prozesse werden von endogenen Opioiden aus Granulozyten, Markrophagen/Monozyzten und Lymphozyten unterhalten und wirken auf diesem Weg einer Toleranzentwicklung entgegen. Die lokale Blockade der endogenen Opioidpeptide mit anti-Opioidpeptidantikörper oder die systemische Depletion aller Leukozyten mit Cyclophosphamid hebt diese Effekte auf (Zöllner, Mousa et al. 2008).

Die in vivo Untersuchungen der vorliegenden Studie beschränken sich auf den frühen (2 h) Zeitpunkt der Entzündung. Zu diesem Zeitpunkt ist der antinozizeptive Effekt durch opioidpeptidhaltige Leukozyten noch nicht voll ausgeprägt, jedoch signifikant nachweisbar. Diese Antinozizeption stützt sich zum größten Teil auf die Granulozyten des Pfotengewebes, da die Granulozyten zu diesem frühen Zeitpunkt der Entzündung die größte opioidhaltige Leukozytenpopulation repräsentieren (Rittner, Brack et al. 2001). Aufgrund der Beschränkung des Entzündungsmodells auf 2 h können keine Aussagen über die Rolle des FPR zu einem späteren Zeitpunkt gemacht werden.

4.1.2 Stimulation der Opioidfreisetzung aus humanen Leukozyten

Die separierten Granulozyten und Monozyten des peripheren, menschlichen Blutes wurden aus „buffy coats“ von unbekannten Blutspendern gewonnen. Die Zahl der gewonnenen Zellen, somit der resultierenden Proben variierte z.T. erheblich. Daher gibt es numerische Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern, die die Aussagekraft der hier gewonnenen Ergebnisse geringfügig einschränken.

4.1.3 Positive Selektion der $CD14^+$-Monozyten des peripheren Blutes

Humane Monozyten aus dem peripheren Blut zu separieren gestaltet sich mitunter sehr schwierig, da sie in einer weitaus geringeren Anzahl als Granulozyten im menschlichen Blut vorhanden sind. Aus diesem Grund wurde die magnetische Markierung mit $CD14^+$ Mikropartikeln etabliert. Es zeigte sich, dass die Konzentration von 50 µl pro 1 x 10^8 Zellen die besten Ergebnisse bezüglich der Zellreinheit und Anzahl der separierten Zellen lieferte. Trotzdem wurde die Reinheit der Proben immer durch eine FACS-Analyse kontrolliert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Vorangegangenen wurde der Einfluss des FPR auf die Leukozytenrekrutierung in vivo zum frühen Entzündungszeitpunkt und die Freisetzung von Opioiden aus Immunzellen in vitro untersucht. Es zeigte sich, dass Granulozyten und Monozyten im 2 h entzündeten Pfotengewebe den FPR exprimieren. Die i.v. Gabe der FPR Antagonisten Boc und CsH hat keine Auswirkungen auf die Zahl der rekrutierten Leukozyten, somit hat der FPR während dieser Phase keine Bedeutung für die Leukozyteneinwanderung ins entzündete Pfotengewebe. Die i.pl. Injektion von 0,3 – 3 µg fMLP bedingt jedoch eine signifikante Antinozizeption in der entzündeten Pfote. Hierfür könnten sowohl Granulozyten als auch Monozyten/Makrophagen verantwortlich sein, da beide Zellpopulationen den FRP exprimieren. Des Weiteren konnte der FPR auf Granulozyten und Monozyten des peripheren

menschlichen Blutes dargestellt werden. Die Stimulation des FPR auf humanen Granulozyten führt zur Opioidfreisetzung, die durch fMLP auslösbar und durch Boc hemmbar ist. Auf humanen Monozyten löst der FPR durch fMLP eine Freisetzung von β-Endorphin aus, während fMLP keine Auswirkung auf die Met-Enkephalinfreisetzung hat. *Mycobact.* beeinflusst weder die β-Endorphin-, noch die Met-Enkephalinfreisetzung.

4.2.1 FPR-Expression auf Granulozyten und Monozyten im entzündeten Pfotengewebe

Die FPR-Expression auf Rattenzellen wurde für verschiedene Zelltypen gezeigt. Marasco et al. charakterisierten den FPR auf peritonealen Rattenneutrophilen als eine Stelle die hochaffin fMLP bindet (Marasco, Fantone et al. 1983). In einer weiteren Studie wurde durch funktionelle Studien der Nachweis für neutrophile Granulozyten des Rattenblutes erbracht (Walker, Seiler et al. 1991). Eine eindeutige visuelle Darstellung des FPR auf Zellen der Rattenpfote in der Literatur fehlt bisher. In der vorliegenden Arbeit wurde die FPR Expression auf Entzündungszellen der Rattenpfote mit Hilfe der Durchflusszytometrie belegt.

4.2.2 Zellrekrutierung in der Rattenpfote nach 2 FCA und 400 µg Boc oder 3 mg CsH i.v.

Eine Vielzahl von Studien untermauern, dass der FPR die Rekrutierung von Granulozyten in vivo vermittelt: Raiden et al. untersuchten die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge von Wistar Ratten und zeigten, dass die intratracheale Gabe von fMLP nach 4 h zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten führt und die i.v. Gabe von Losartan, ursprünglich ein AT1-Antagonist, der seit 1997 auch als FPR-Antagonist charakterisiert ist (Raiden, Giordano et al. 1997), die Zellzahl unabhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung vermindert (Raiden, Pereyra et al. 2000). In einem Mausmodell, welches die Rolle von Chemokinen und Formylpeptiden in der Pneumokokken induzierten Pneumonie (48 h) vergleicht, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Boc 6 h nach Injektion die FPR-vermittelte Rekrutierung von Makrophagen/Monozyten und neutrophilen Granulozyten effektiv hemmt (Fillion, Ouellet et al. 2001). Diese Studien weisen auf die Bedeutung der Formylpeptide in der Leukozytenrekrutierung zu späteren Entzündungszeitpunkten hin.

Gao et al. wiesen 90 min nach der s.c. Gabe von fMLP eine Erhöhung der Blutleukozytenzahl bei Mäusen um 70 % nach (Gao, Lee et al. 1999). Aus diesem Grund war eine Wirkung des FPR auf die Zellrekrutierung zu diesem frühen Zeitpunkt zu erwarten. Jedoch sind eine Vielzahl von Faktoren in einem mehrstufigen Prozess an der Zellrekrutierung beteiligt. Dies könnte erklären, warum die FPR-Blockade die Rekrutierung von Leukozyten nicht inhibiert. Am Ort einer bakteriellen Entzündung entstehen Chemoattraktoren aus verschiedenen

Quellen: wirtseigene Chemotaxine, sowie Komplementaktivatoren und -faktoren (C5a), Chemokine und aus eindringenden Bakterien und Mitochondrien stammendes fMLP (Tomhave, Richardson et al. 1994; Foxman, Campbell et al. 1997). Ihnen ist gemeinsam, dass sie über G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine zielgerichtete Zellmigration entlang ihres Konzentrationsgradienten vermitteln. Die Leukozytensubtypen können mit verschiedenen Chemoattraktoren interagieren (Foxman, Campbell et al. 1997). Die Studie von Raiden et al. weist darauf hin, dass diese Chemotaxine unterschiedliche Rezeptoren verwenden. Im Gegensatz zur fMLP vermittelten Rekrutierung war die Rekrutierung durch aggregierte humane Immunglobuline (aIgG), Immunkomplexe (IC) und Zymosan (Hefe-Polysaccharid, dass die Komplementreaktion ermöglicht) nicht durch Losartan hemmbar (Raiden, Pereyra et al. 2000). Neben der Signalübertragung über verschiedene Rezeptoren existieren weitere Regulationsmechanismen, um die einzelnen Informationen der Chemotaxine Ziel gerichtet zu verarbeiten. Die heterologe Rezeptordesensibilisierung, das heißt die Unerregbarkeit eines Rezeptors nach Stimulation durch einen anderen Agonisten, ist einer davon (Tomhave, Richardson et al. 1994; Campbell, Foxman et al. 1997). Im zeitlichen Verlauf einer Entzündungsreaktion unterscheidet sich der Einfluss der einzelnen Chemoattraktoren. Für KC und MIP-2, die maßgeblich an der Granulozyteneinwanderung beteiligt sind, besteht der Konzentrationshöhepunkt nach 4 h. Hingegen steigt die Konzentration von Monozyten-chemotaktisch-anziehendem-Protein-1 (MCP-1), das verantwortlich für die Monozytenrekrutierung ist, nach 24 - 48 h post Entzündungsinduktion an (Fillion, Ouellet et al. 2001). Dieser zeitliche Verlauf der Entzündungszellen und ihrer Chemoattraktoren, wird durch die Studien von Brack et al. und Rittner et al. gestützt. Während der frühen Entzündungsphase sind die vorherrschende Leukozytensubpopulation die Granulozyten. Im weiteren Verlauf nimmt die Bedeutung der Monozyten zu (Rittner, Brack et al. 2001; Brack, Labuz et al. 2004). Für den frühen (2 h) Zeitpunkt der Entzündung stellten sie den Einfluss der Chemokine auf die Granulozytenrekrutierung dar (Brack, Rittner et al. 2004). In Zusammenschau mit den hier vorliegenden Ergebnissen lässt sich festhalten, dass der FPR in der Frühphase der Entzündung keinen wesentlichen Einfluss auf die Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten hat.

4.2.3 Dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten und nicht entzündeten Pfote nach fMLP i.pl.

Die funktionelle Bedeutung des FPR in der opioidpeptidvermittelten Antinozizeption unter Entzündungsbedingungen wurde durch den antinozizeptiven Effekt nach i.pl. Injektion von fMLP in die entzündete Pfote gezeigt. Im Gegensatz dazu blieb die PPT der nicht entzündeten

Pfote mit ansteigender fMLP-Gabe unverändert (Abb. 8). Da schon gezeigt wurde, dass diese Antinozizeption Opioidpeptid- und Opioidpeptidrezeptor-vermittelt ist (Stein, Hassan et al. 1990) liegt die Vermutung nahe, dass die i.pl. fMLP-Injektion zu einer verstärkten Freisetzung von Opioiden führt. In weiterführenden Experimenten mit dem Opioidrezeptorantagonisten Naloxon, welcher i.pl. verabreicht wurde, konnte die Abnahme der PPT nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung PD Dr. H. Rittner).

4.2.4 FPR-Expression auf Granulozyten und humanen Monozyten des peripheren Blutes

Auf humanen Granulozyten des peripheren Blutes wurde der FPR schon 1977 als eine Stelle charakterisiert, die radioaktiv markiertes fMLP bindet (Williams, Snyderman et al. 1977). In der vorliegenden Studie gelang die durchflusszytometrische Darstellung mit Hilfe des fMLP-FITC Farbstoffes auf humanen Granulozyten des peripheren Blutes (Abb. 9). Allen et al. kamen zu dem gleichen Ergebnis, indem sie den FPR ebenfalls mit einem fluoreszierenden Liganden durchflusszytometrisch abbildeten (Allen, Broom et al. 1992). Auch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung mit Hilfe von Agonisten und Antikörpern zeigt (Loitto, Rasmusson et al. 2001), dass der FPR auf Granulozyten des peripheren Blutes exprimiert wird.

Die Expression des FPR auf humanen Monozyten wurde als radioaktive Markierung auf adhärenten Blutmonozyten beschrieben (Weinberg, Muscato et al. 1981; Benyunes und Snyderman 1984). Eine durchflusszytometrische Untersuchung des FPR auf Monozyten mit Hilfe eines FITC-markierten fMLP-Farbstoffes wurde von Locati et al. durchgeführt (Locati, Riboldi et al. 2001). Deren Darstellung ist mit dem vorliegenden Ergebnis (Abb. 13) identisch. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorliegenden Ergebnisse, die eine Expression des FPR auf humanen Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes zeigen, mit den Beschreibungen in der Literatur konsistent sind.

4.2.5 Dosis-Antwortverhalten der FPR vermittelten Freisetzung aus Granulozyten

Die Dosis oder die Konzentration bei der in 50 % der Fälle der zu erwartende Effekt eintritt (= EC_{50} oder ED_{50}) ist für fMLP für die Lysozymsekretion aus Granulozyten bei ~ 20 nM beschrieben (Showell, Freer et al. 1976; Snyderman und Pike 1984). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur wenige Daten zur fMLP-vermittelten Freisetzung von Opioiden beschrieben, aus diesem Grund wurden verschiedene fMLP-Konzentrationen untersucht. In Abb. 10 A und 10 B sind die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Stimulation von fMLP auf die Met-Enkephalin- und β-Endorphinfreisetzung dargestellt. In den Versuchen zeigte sich, dass fMLP in den Konzentrationen von 100 nM und 1000 nM eine signifikante Met-

Enkephalinfreisetzung und bei der Konzentration von 1000 nM eine signifikante β-Endorphinfreisetzung bewirkt. In der Studie von Vindrola et al. erwies sich der Wert von 1000 nM, mit vorangegangener Cytochalasin B-Inkubation (5 min) ebenfalls als effektivste Dosis der Stimulation der Freisetzung von Met-Enkephalin. Die Stimulationsdauer von 7 min zeigte in diesem Experiment die höchste Menge an freigesetztem Met-Enkephalin. Im weiteren Verlauf nahm die Menge an freigesetzten Opioiden ab (Vindrola, Padrós et al. 1990). Die Äquivalenz-Dissozationskonstante K_D für fMLP, welche das Bestreben des Wirkstoffes an den Rezeptor zu binden angibt und deren Wert der Besetzung von 50 % der Rezeptoren mit Wirkstoff entspricht, liegt für Granulozyten bei 10 - 22,3 nM (Snyderman und Pike 1984). Für humane Monozyten liegt die K_D bei 30,2 nM (Snyderman und Pike 1984). Da die EC_{50} im Wert oftmals unter der K_D liegt, bestätigt sich die Wahl der höheren Konzentration von 1000 nM fMLP für die Opioidfreisetzungsversuche für humane Granulozyten und Monozyten.

Die Dosis für *Mycobact.* ermittelte sich zu Beginn der Versuchsreihe experimentell. Die Konzentration von 0,666 mg/ml *Mycobact.* zeigte in der Met-Enkephalin-Freisetzung die höhere Effektivität im Vergleich mit 0,0666 mg/ml (Tabelle 9).

Die IC_{50} entspricht der Konzentration bei der 50 % der Effekte durch agonistische Stimulation inhibierbar sind (Le, Oppenheim et al. 2001; Le, Yang et al. 2002). Für Boc wurde als IC_{50} ein Wert von 0,44 - 3,7 µM beschrieben. Daher wurde der hemmende Effekt einer Vorbehandlung mit je 1 µM oder 10 µM Boc auf die anschließende Stimulation mit fMLP (1000 nM) in Vorexperimenten ausgetestet. Dieser war in der höheren Dosis signifikant nachweisbar. In ihrer Studie zur Rolle von Cyclosporin A und Cyclosporin H auf die Freisetzung von vorgeformten (z.B. Histamin) und neu synthetisierten inflammatorischen Mediatoren (z.B. Leukotrien C_4) aus basophilen Granulozyten verglichen de Paulis et al. ebenfalls CsH mit Boc. In einer Dosis von 2,8 und 15 µM hemmte Boc (5 min Vorinkubation) dosisabhängig die fMLP-induzierte Histaminfreisetzung (de Paulis, Ciccarelli et al. 1996). Wenn auch nicht genau der hier verwendeten Boc-Konzentration von 10 µM entsprechend, so weisen die Ergebnisse von de Paulis et al. daraufhin, dass mit dieser Konzentration eine effektive Freisetzungshemmung erreicht werden kann.

4.2.6 FPR vermittelte Opioidfreisetzung aus Granulozyten

Für Granulozyten ist die Freisetzung von Proteinen aus Granula und Met-Enkephalin nach fMLP Stimulation beschrieben (Showell, Freer et al. 1976; Vindrola, Padrós et al. 1990; Prossnitz und Ye 1997; Panaro und Mitolo 1999). Die Untersuchung der FPR abhängigen Freisetzung von Opioiden zeigte, dass die Stimulation mit einem potenten Agonisten (fMLP

1000 nM) eine signifikante Met-Enkephalin- sowie β-Endorphinfreisetzung ermöglicht. Dieser Effekt ist durch die Vorbehandlung mit dem spezifischen FPR-Antagonisten Boc (10 nM) blockierbar (Abb. 11 A). Wenzel-Seifert et al. zeigten mit einer ähnlichen Vorgehensweise, dass fMLP die Freisetzung des Enzyms β-Glucuronidase aus primären Granula vermittelt. Zu Neutrophilen differenzierte HL-60 Zellkulturen inkubierten sie mit Cytochalasin B und Boc für 5 min vor. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit fMLP stimuliert. In diesen Versuchen wurde eine IC_{50} für Boc von 8,8 µM bezüglich der β-Glucuronidase-Freisetzung festgestellt (Wenzel-Seifert und Seifert 1993). Diese Studie bestätigt die Vorgehensweise dieser Arbeit zum Beweis der FPR-vermittelten-Freisetzung von Opioiden.

Obwohl im ursprünglichen FCA Hitze-getötete und getrocknete *Mycobacteriae tuberculosis* verwendet wurden, ist in den heute handelsüblichen Freund's Complete Adjuvantien hauptsächlich der avirulente Stamm *Mycobact. butyricum* enthalten (Stills 2005). Aus diesem Grund kam in dieser Studie *Mycobact. butyricum* zum Einsatz. Auch diese Stimulation zeigte, dass die Vorbehandlung mit Boc die *Mycobact.* bedingte Freisetzung von Met-Enkephalin und β-Endorphin aus Granulozyten signifikant vermindert (Abb. 11 B). Durch die Hemmung mit einem FPR spezifischen Antagonisten und in Anbetracht der zuvor beschriebenen Ergebnisse, scheint es, dass auch die *Mycobact.* bedingte Opioidpeptidfreisetzung vom FPR abhängig ist. Dies ist insofern neu, da für Mycobakterien eine Interaktion vorwiegend über den TLR beschrieben ist (Yang, Mark et al. 1998; Heldwein und Fenton 2002; Stills 2005). Initial wurde der Toll-Rezeptor bei der Fliege Drosophila beschrieben und dient ihr in der Abwehr gegen Pilzinfektionen. Seit dem Jahr 1997 ist mit dem TLR die menschliche Variante dieses Rezeptors bekannt (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Mittlerweile sind zahlreiche Varianten identifiziert. Die TLR induzieren die Expression von inflammatorischen Zytokinen (Yang, Mark et al. 1998) und sind Teil des angeborenen Immunsystems (Yang, Mark et al. 1998; Heldwein und Fenton 2002). TLR erkennen verschiedene Bestandteile von Mykobakterien und agieren vor allem über den TLR2 und TLR4 (Heldwein und Fenton 2002).

In einer Studie über das Gewebsverträglichkeitskomplex-(MHC) Klasse-I b-Molekül durchsuchten Chun et al. das komplette Genom von *Mycobacterium tubercolusis* auf N-formylierte Peptide und bildeten diese synthetisch nach (Chun, Serbina et al. 2001). Also enthält *Mycobacterium tuberculosis* Formylpeptide. Die Zugehörigkeit zur gleichen Bakterienfamilie, sowie die Tatsache, dass Bakterien ihre Proteinbiosynthese durch Formylpeptide initiieren (Chun, Serbina et al. 2001), könnten die Stimulation des FPR durch

Mycobact. damit erklären, dass aus *Mycobact.* freigesetzte Formylpeptide den FPR stimulieren.

4.2.7 FPR vermittelte Opioidfreisetzung aus Monozyten des peripheren Blutes

Für humane Monozyten ist die Freisetzung von Met-Enkephalin nach 24 h Stimulation mit PMA (Phorbol Myristat Acetat), einem rezeptorunabhängigen Zellstimulans beschrieben (Kuis, Villiger et al. 1991). Mit Hilfe des RIA wurde β-Endorphin in humanen Monozyten nachgewiesen (van Woudenberg, Hol et al. 1992). Zur Überprüfung der Rolle des FPR in der Opioidpeptidfreisetzung wurden die humanen Monozyten mit fMLP und *Mycobact.* mit den gleichen Konzentrationen, die sich in den Granulozytenversuchen als wirksam erwiesen hatten stimuliert. Die Stimulation mit fMLP erbrachte keine signifikante Met-Enkephalinfreisetzung, jedoch eine β-Endorphinfreisetzung. Hingegen setzte die Stimulation mit *Mycobact.* weder β-Endorphin noch Met-Enkephalin frei.

Die fehlende oder deutlich geringere Freisetzung von Opioiden aus Monozyten könnte beispielsweise durch die Vorinkubation mit Cytochalasin B bedingt sein. Auf Granulozyten hat die Vorinkubation mit Cytochalasin B eine verlängernde und verstärkende Wirkung auf die FPR vermittelte Aktivität (Bylund, Björstad et al. 2003). Indessen zeigte eine Studie, die die FPR vermittelte Monozytenansammlung mit Hilfe eines Zwei-Strahl-Aggregometers misst, dass die Vorinkubation mit Cytochalasin B nicht verstärkend, sondern minimal hemmend wirkt (Yasaka, Boxer et al. 1982). Auch die Polarisation, d.h. die Verformung der Zellen in Richtung einer chemotaktischen Substanz, kann bei Monozyten durch die Vorinkubation mit Cytochalasin B verhindert werden (Cianciolo und Snyderman 1981).

Des Weiteren könnte die verminderte Opioidfreisetzung aus Monozyten auf einer ungleichen Expression des FPR auf humanen Granulozyten und Monozyten beruhen. In Chemotaxisexperimenten konnte die Existenz von Granulozyten- und Monozytensubpopulationen nachgewiesen werden, die nicht auf chemotaktische Reize wandern (Cianciolo und Snyderman 1981; Falk, Harvath et al. 1982; Harvath und Leonard 1982). Bei den Granulozyten ist die Anzahl der exprimierten FPR auf der Zelloberfläche von wandernden und nicht wandernden Gruppen gleich, während bei den isolierten Monozyten dieser Unterschied der Migration mit einer verminderten bis fehlenden FPR-Expression einhergeht (Falk, Harvath et al. 1982). Zumindest kann die ungleiche Rezeptorexpression als Erklärung für die mangelnde Stimulation durch *Mycobact.* dienen. Die aus *Mycobact.* freigesetzten Formylpeptide reichen nicht aus, um die geringe Anzahl der FPR auf den Monozyten adäquat zu stimulieren. Letztendlich könnte die Differenz in der

Opioidfreisetzung zwischen Monozyten und Granulozyten durch Unterschiede in der Signaltransduktion bedingt sein. Beispielsweise ist der fMLP/Cytochalasin B induzierte „respiratory burst“ bei Granulozyten siebenmal stärker als bei Monozyten und der fMLP/Cytochalasin B induzierte Calciumfluss in Monozyten weniger sensitiv auf den G_i-Protein Hemmer Pertussis Toxin (Lund-Johansen und Olweus 1992).
Das Ergebnis, dass fMLP zwar β-Endorphin, nicht aber Met-Enkephalin freisetzt könnte sich dadurch erklären, dass die absoluten Level von freigesetztem Met-Enkephalin von Spender zu Spender variieren. So konnten Kuis et. al nachweisen, dass humane Monozyten von einzelnen Spendern trotz 24 h Stimulation mit PMA, einem rezeptorunabhängigen Zellstimulans, kein Met-Enkephalin freisetzen (Kuis, Villiger et al. 1991). Des Weiteren zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung des Met-Enkephalins, dass eine Met-Enkephalinfärbung nur nach 24 h Stimulation mit PMA nachweisbar war. Nach 24 h Stimulation ist die stärkste Darstellbarkeit erreicht. In unstimulierten Monozyten waren nur 15 % der Zellen immunoreaktiv für Met-Enkephalin. In dieser Studie wurde auch die Expression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) von Präproenkephalin untersucht. Dieses war nach 2 h nachweisbar (Kuis, Villiger et al. 1991). Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass in unstimulierten Zellen noch nicht ausreichend Met-Enkephalin für die Freisetzung durch fMLP enthalten ist. Met-Enkephalin müsste folglich in den Monozyten zuerst gebildet werden. Wohingegen β-Endorphin in den Zellen in einer ausreichenden Menge vorhanden sein müsste, damit die Zelle auf die Stimulation von fMLP mit einer Freisetzung von β-Endorphin reagieren kann. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von van Woudenberg et. al gestützt, die in unstimulierten, frisch separierten humanen Monozyten β-Endorphin Immunreaktivität nachweisen konnten (van Woudenberg, Hol et al. 1992). Vorraussetzung für diese Erklärung müsste das Vorhandensein von verschiedenen Speichergranula von β-Endorphin und Met-Enkephalin sein. Aus der konfokalen Mikroskopie ist für Granulozyten bekannt, dass sowohl β-Endorphin und Met-Enkephalin in primären Granula gespeichert werden (Rittner, Labuz et al. 2007). Für Monozyten gibt es hierzu bislang keine Untersuchungen. Die Tatsache, dass Ionomycin sowohl β-Endorphin als auch Met-Enkephalin freisetzt, könnte sich damit erklären, dass Ionomycin ein so starker Stimulus ist, dass die 15 % Met-Enkephalin positive Zellen dieses freisetzen.

4.3 Ausblick

Die therapeutische Anwendung von Opioiden ist von der Behandlung von Tumorschmerzen auf die Behandlung von chronischen nicht tumorbedingten Schmerzen angewachsen. Von

großem Vorteil beim Einsatz von Opioiden ist das Fehlen von organbezogenen toxischen Nebenwirkungen. Der Einsatz wird vielmehr durch zentrale Nebenwirkungen eingeschränkt.
Die Förderung der Freisetzung von endogenen, peripher wirksamen Opioiden, die eine potente Analgesie vermitteln und somit relativ frei von zentralen Nebenwirkungen sind, könnten Analgetika der Zukunft zu sein (Stein, Schäfer et al. 2003; Rittner, Machelska et al. 2005). In der vorliegenden Untersuchung zur Rolle des FPR auf diese antinozizeptiven Mechanismen konnte die Erhöhung der PPT in der 2 h entzündeten Rattenpfote nach i.pl. Gabe von fMLP nachgewiesen werden. Unveröffentlichete Experimente weisen daraufhin, dass nach Granulozyten-Depletion diese fMLP-induzierte Antinozizeption nicht mehr nachweisbar ist. Somit werden zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich β-Endorphin und Met-Enkephalin aus Granulozyten freigesetzt (Rittner, Brack et al. 2001). Die Tatsache, dass Mykobakterien den FPR stimulieren, was sich wohlmöglich über Formylpeptide als Bestandteil von Mykobakterien erklärt, postuliert die dauernde Präsenz von Formylpeptiden in der FCA entzündeten Pfote. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Formylpeptide endogene Opioide freisetzen. Zöllner et. al wiesen die fehlende Toleranzentwicklung bei chronischer Morphingabe unter Entzündungsbedingungen nach und erklärten dieses Phänomen durch die kontinuierliche Freisetzung von endogenen Opioiden (Zöllner, Mousa et al. 2008). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse weist daraufhin, dass der FPR an der kontinuierlichen Freisetzung von endogenen Opioiden und somit neben seiner direkten analgetischen Effekte auch an einer Verhinderung von Toleranz gegenüber Opioiden beteiligt sein könnte. Die klinische Relevanz dieser Zusammenhänge ist in der Behandlung von chronischen Schmerzen bei Osteomyelitiden denkbar, deren kausale Therapie aufgrund von Abzessbildungen schwierig bis unmöglich ist. Dieses Beispiel zeigt, dass es weiterhin die Funktion des FPR bezüglich der endogenen opioidpeptidvermittelten Antinozizeption im Verlauf der Entzündung zu erforschen gilt.

5 Zusammenfassung

Einleitung Die effektivsten Schmerzmittel der modernen Medizin sind nach wie vor die Gruppe der Opioide. Allerdings ist ihre schmerzhemmende Wirkung mit starken, zum Teil lebensbedrohlichen Nebenwirkungen verbunden (Karow 2003). Durch den Nachweis der Interaktion endogener Opioide mit Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen im entzündeten Gewebe, die eine potente Antinozizeption vermitteln, eröffneten sich neue Perspektiven der Schmerztherapie (Stein, Hassan et al. 1990). Bestandteil der Forschung ist die Entdeckung von Mechanismen, die das Einwandern von opioidhaltigen Immunzellen und die Freisetzung von Opioiden fördern. In diesem Zusammenhang richtet sich das Interesse dieser Studie auf den FPR, einen chemotaktischen Rezeptor für den der Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung und die Freisetzung von lysosomalen Enzymen nachgewiesen ist.

Material und Methoden In der 2 h FCA entzündeten Rattenpfote wurde mit Hilfe der PPT die fMLP-vermittelte Antinozizeption untersucht. Zur Analyse der Leukozytensubpopulationen und der FPR-Expression wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Zellen der entzündeten Pfote sowie aufgereinigte humane Granulozyten und Monozyten wurden in Freisetzungsexperimenten mit fMLP, *Mycobact.* und Boc stimuliert, um die Rolle des FPR auf die Opioidfreisetzung zu untersuchen. Die freigesetzten Opioide wurden im RIA nachgewiesen.

Ergebnisse Es zeigte sich, dass Granulozyten und Monozyten des entzündeten Pfotengewebes den FPR exprimieren. Eine fMLP-bedingte Antinozizeption ließ sich in der entzündeten Pfote nachweisen. Allerdings hatte die i.v. Gabe von den FPR Antagonisten Boc und CsH keine Auswirkung auf die Rekrutierung der opioidhaltigen Leukozyten von der Blutzirkulation in die entzündete Pfote. Die Expression des FPR auf humanen Granulozyten und Monozyten konnte nachgewiesen werden. Durch die Stimulation mit fMLP und *Mycobact.* setzen humane Granulozyten sowohl β-Endorphin als auch Met-Enkephalin frei. Diese Freisetzung ist durch den spezifischen FPR-Antagonisten Boc hemmbar, was dafür spricht, dass diese Freisetzung spezifisch durch den FPR vermittelt wird. Im Gegensatz dazu setzen humane Monozyten fMLP getriggert nur β-Endorphin frei. Die Stimulation mit *Mycobact.* zeigt weder eine signifikante Freisetzung von β-Endorphin, noch von Met-Enkephalin.

Schlussfolgerung Der FPR ist auf Monozyten/Makrophagen und Granulozyten der entzündeten Pfote nachweisbar. Seine Hauptfunktion zu diesem frühen Entzündungszeitpunkt (2 h) scheint die Freisetzung von β-Endorphin und Met-Enkephalin zu sein. Diese Opioidfreisetzung führt zu antinozizeptiven Effekten, die mit Hilfe der PPT und der i.pl. fMLP-Injektion nachgewiesen werden konnten. Durch den Nachweis der unveränderten Leukozytenrekrutierung nach der i.v. Gabe eines FPR-Antagonisten scheint diese Antinozizeption im Wesentlichen durch die Opioidfreisetzung bedingt zu sein. Humane Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes exprimieren beide den FPR. Die Funktion des FPR variiert jedoch auf den beiden Zellarten. Aus Granulozyten sind β-Endorphin und Met-Enkephalin freisetzbar. Wohingegen aus Monozyten nur β-Endorphin freisetzbar ist. Im 2 h entzündeten Pfotengewebe sind hauptsächlich Granulozyten nachweisbar (Rittner, Brack et al. 2001). Die FPR-induzierte Antinozizeption des 2 h entzündeten Pfotengewebes wird hauptsächlich durch die Freisetzung von Opioiden aus Granulozyten bedingt.

Ausblick Die Erforschung der genauen Mechanismen der Freisetzung von Opioiden aus Immunzellen könnte neue Ansätze in der Schmerztherapie liefern. Die Suche nach neuen Liganden und deren Rezeptoren, die die Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten erhöhen und deren Freisetzung fördern ist ein zukunftsreicher Faktor der aktuellen medizinischen Forschung. Endogene peripher vermittelte Opioidanalgesie lässt sich auch postoperativ bei Patienten nachweisen (Stein, Hassan et al. 1993; Likar, Mousa et al. 2007). Wegen der geringen Nebenwirkungen ist die Nutzung dieses therapeutischen Systems in der Zukunft wünschenswert.

6 Abkürzungsverzeichnis

aIgG	Aggregierte humane Immunglobuline
Ak	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	N-t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe
cAMP	Cyclo-Adenosin-3,5-Mononukleotid
cDNA	Komplementäre (engl. complementary) Desoxyribonukleinsäure
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
CRH	Corticotropin-freisetzendes (engl. releasing) Hormon
CsH	Cyclosporin H
CWS	Kalt-Wasser-Schwimmen (engl. cold water swim)
CXCR2	Chemokinrezeptor 2
Cy5 PE	Cychrome (= Cy 5) und Phycoerythrin
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zellen (engl. dentritic cells)
EC_{50}	Mittlere effektive Konzentration (engl. effectiv concentration 50)
ED_{50}	Mittlere effektive Dosis (engl. effectiv dosis 50)
END	β-Endorphin
ENK	Met-Enkephalin
FCA	Freund´s Complete Adjuvans
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Isothiocyanat
fMLP	N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FPR	Formylpeptidrezeptor
FPRL-1	FPR-ähnlicher (engl. like)-1. Rezeptor
FPRL-2	FPR-ähnlicher (engl. like)-2. Rezeptor
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter)
GARGG	2. Ak (engl. goat anti-rabbit IgG serum)
Gi	Guaninbindend, inhibierend
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
I	Jod
IASP	International Association for the Study of Pain

IC	Immunkomplexe (engl. immune complexes)
IP_3	Inositoltriphosphat
i.pl.	intraplantar
i.v.	intravenös
KC	Keratinozyten-abstammendes (engl. derived) Chemokine
kD	Kilo Dalton, nicht SI-konforme Maßeinheit, entspricht der atomaren Masseneinheit
K_D	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
RAM	Ratten anti-Maus
RM	Wiederholte Messung (engl. repeated measures)
MACS	Magnetische Zellseparation
MCP-1	Monozyten-chemotaktisch-anziehendes-Protein-1 (engl. monocyte chemoattractant protein)
MHC	Gewebsverträglichkeitskomplexe (engl. major histocompatibility complex)
MIP-2	Makrophagen inflammatorisches Protein-2
mRNA	Boten = engl. „messenger“ Ribonukleinsäure
Mycobact.	Mycobacterium butyricum
NRS	Normalserum, zur Eliminierung des 2. Ak (engl. normal rabbits serum)
NSB	unspezifische Bindung (engl. nonspecific binding)
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PPT	Pfotendruckschwelle (engl. paw pressure threshold)
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Runden pro Minute (engl. rounds per minute)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
TB	Totale gebundene Aktivität (engl. total binding)
TC	Gesamtzählrate (engl. total count)
TLR	Toll-ähnlicher (engl. like) Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

Allen, C. A., M. F. Broom, et al. (1992). "Flow cytometry analysis of the expression of neutrophil FMLP receptors." J Immunol Methods **149**(2): 159-64.

Backhaus, K. E., Bernd; Plinke, Wullf; Weiber, Rolf, Ed. (2006). Multivariate Analysemethoden. Berlin, Springer.

Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-8.

Beaulieu, A. D., R. Paquin, et al. (1992). "Nuclear signaling in human neutrophils. Stimulation of RNA synthesis is a response to a limited number of proinflammatory agonists." J Biol Chem **267**(1): 426-32.

Becker, E. L., F. A. Forouhar, et al. (1998). "Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells." Cell Tissue Res. **292**(1): 129-35.

Benyunes, M. C. and R. Snyderman (1984). "Characterization of an oligopeptide chemoattractant receptor on human blood monocytes using a new radioligand." Blood **63**(3): 588-92.

Berg, E. L., L. M. McEvoy, et al. (1993). "L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1." Nature **366**(6456): 695-8.

Boulay, F., M. Tardif, et al. (1990). "Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1103-9.

Brack, A., D. Labuz, et al. (2004). "Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception." Anesthesiology **101**(1): 204-11.

Brack, A., H. L. Rittner, et al. (2004). "Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells." Pain **112**(3): 229-38.

Brack, A., H. L. Rittner, et al. (2004). "Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression." Pain **108**(1-2): 67-75.

Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.

Bylund, J., A. Björstad, et al. (2003). "Reactivation of formyl peptide receptors triggers the neutrophil NADPH-oxidase but not a transient rise in intracellular calcium." J Biol Chem **278**(33): 30578-86.

Cabot, P. J., L. Carter, et al. (1997). "Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats." J Clin Invest **100**(1): 142-8.

Cabot, P. J., L. Carter, et al. (2001). "Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain." Pain **93**(3): 207-12.

Campbell, J. J., E. F. Foxman, et al. (1997). "Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration." Eur J Immunol **27**(10): 2571-8.

Carp, H. (1982). "Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils." J Exp Med **155**(1): 264-75.

Chun, T., N. V. Serbina, et al. (2001). "Induction of M3-restricted cytotoxic T lymphocyte responses by N-formylated peptides derived from Mycobacterium tuberculosis." J Exp Med **193**(10): 1213-20.

Cianciolo, G. J. and R. Snyderman (1981). "Monocyte responsiveness to chemotactic stimuli is a property of a subpopulation of cells that can respond to multiple chemoattractants." J Clin Invest **67**(1): 60-8.

Dalpiaz, A., S. Spisani, et al. (2003). "Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **3**(1): 33-42.

de Paulis, A., A. Ciccarelli, et al. (1996). "Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine." J Allergy Clin Immunol **98**(1): 152-64.

Falk, W., L. Harvath, et al. (1982). "Only the chemotactic subpopulation of human blood monocytes expresses receptors for the chemotactic peptide N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine." Infect Immun **36**(2): 450-4.

Fillion, I., N. Ouellet, et al. (2001). "Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment." J Immunol **166**(12): 7353-61.

Foxman, E. F., J. J. Campbell, et al. (1997). "Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis." J Cell Biol **139**(5): 1349-60.

Gao, J. L., E. J. Lee, et al. (1999). "Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor." J Exp Med **189**(4): 657-62.

Gavins, F. N., S. Yona, et al. (2003). "Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms." Blood **101**(10): 4140-7.

Hahn, H. F. K. U., Ed. (2005). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin, Springer.

Harvath, L. and E. J. Leonard (1982). "Two neutrophil populations in human blood with different chemotactic activities: separation and chemoattractant binding." Infect Immun **36**(2): 443-9.

Hassan, A. H., A. Ableitner, et al. (1993). "Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue." Neuroscience **55**(1): 185-95.

Heldwein, K. A. and M. J. Fenton (2002). "The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection." Microbes Infect **4**(9): 937-44.

Hildebrandt, H., Ed. (1998). Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch. Berlin, de Gruyter.

Hunter, G. J. (1953). "Acid formation in cultures of Mycobacterium butyricum." J Bacteriol **66**(6): 676-82.

Jutila, M. A., T. K. Kishimoto, et al. (1990). "Regulation and lectin activity of the human neutrophil peripheral lymph node homing receptor." Blood **76**(1): 178-83.

Karow, T. R. L.-R., Ed. (2003). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Pulheim, Karow.

Koecke, H.-U. E., Peter; Härle Eckhart, Ed. (2000). Biologie. Stuttgart, Schattauer

Kuis, W., P. M. Villiger, et al. (1991). "Differential processing of proenkephalin-A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes." J Clin Invest **88**(3): 817-24.

La, M., M. D'Amico, et al. (2001). "Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action." Faseb J **15**(12): 2247-56.

Le, Y., P. M. Murphy, et al. (2002). "Formyl-peptide receptors revisited." Trends Immunol **23**(11): 541-8.

Le, Y., J. J. Oppenheim, et al. (2001). "Pleiotropic roles of formyl peptide receptors." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 91-105.

Le, Y., Y. Yang, et al. (2002). "Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets." Int Immunopharmacol **2**(1): 1-13.

Likar, R., S. A. Mousa, et al. (2007). "Involvement of intra-articular corticotropin-releasing hormone in postoperative pain modulation." Clin J Pain **23**(2): 136-42.

Locati, M., E. Riboldi, et al. (2001). "Selective induction of phospholipase D1 in pathogen-activated human monocytes." Biochem J **358**(Pt 1): 119-25.

Loitto, V. M., B. Rasmusson, et al. (2001). "Assessment of neutrophil N-formyl peptide receptors by using antibodies and fluorescent peptides." J Leukoc Biol **69**(5): 762-71.

Lund-Johansen, F. and J. Olweus (1992). "Signal transduction in monocytes and granulocytes measured by multiparameter flow cytometry." Cytometry **13**(7): 693-702.

Machelska, H. and C. Stein (2002). "Immune mechanisms in pain control." Anesth Analg **95**(4): 1002-8, table of contents.

Marasco, W. A., J. C. Fantone, et al. (1983). "Characterization of the rat neutrophil formyl peptide chemotaxis receptor." Am J Pathol **111**(3): 273-81.

Marasco, W. A., S. H. Phan, et al. (1984). "Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli." J Biol Chem **259**(9): 5430-9.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.

Mortimer, C. E. M. U., Ed. (2003). Chemie: das Basiswissen der Chemie. Stuttgart, Thieme

Mousa, S. A., M. Shakibaei, et al. (2004). "Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain." Endocrinology **145**(3): 1331-41.

Ormerod, M. G., Ed. (2000). Flow Cytometry: a practical approach. Oxford, Oxford University Press.

Panaro, M. A. and V. Mitolo (1999). "Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review." Immunopharmacol Immunotoxicol **21**(3): 397-419.

Perretti, M., S. J. Getting, et al. (2001). "Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics." Am J Pathol **158**(6): 1969-73.

Prossnitz, E. R. and R. D. Ye (1997). "The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function." Pharmacol Ther **74**(1): 73-102.

Przewlocki, R., A. H. Hassan, et al. (1992). "Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception." Neuroscience **48**(2): 491-500.

Radbruch, A., Ed. (1992). Flow cytometry and cell sorting. Berlin, Springer.

Raiden, S., M. Giordano, et al. (1997). "Losartan, a selective inhibitor of subtype AT1 receptors for angiotensin II, inhibits the binding of N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine to neutrophil receptors." J Pharmacol Exp Ther **281**(2): 624-8.

Raiden, S., Y. Pereyra, et al. (2000). "Losartan, a selective inhibitor of subtype AT1 receptors for angiotensin II, inhibits neutrophil recruitment in the lung triggered by fMLP." J Leukoc Biol **68**(5): 700-6.

Rasenick, M. M. and S. R. Childers (1989). "Modification of Gs-stimulated adenylate cyclase in brain membranes by low pH pretreatment: correlation with altered guanine nucleotide exchange." J Neurochem **53**(1): 219-25.

Remes, J. J., U. E. Petäjä-Repo, et al. (1991). "Rat and human neutrophil N-formyl-peptide chemotactic receptors. Species difference in the glycosylation of similar 35-38 kDa polypeptide cores." Biochem J **277 (Pt 1)**: 67-72.

Rittner, H. L., A. Brack, et al. (2001). "Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain." Anesthesiology **95**(2): 500-8.

Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2007). "CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo." Brain Behav Immun **21**(8): 1021-32.

Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2006). "Pain control by CXCR2 ligands through Ca2+-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells." Faseb J **20**(14): 2177-88.

Rittner, H. L., H. Machelska, et al. (2005). "Leukocytes in the regulation of pain and analgesia." J Leukoc Biol **78**(6): 1215-22.

Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.

Rucinski, B., C. C. Liu, et al. (1994). "Utilization of cyclosporine H to elucidate the possible mechanisms of cyclosporine A-induced osteopenia in the rat." Metabolism **43**(9): 1114-8.

Sachs, L., Ed. (1999). Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. Berlin, Springer.

Schäfer, M., L. Carter, et al. (1994). "Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4219-23.

Schiffmann, E., B. A. Corcoran, et al. (1975). "N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1059-62.

Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert (2003). "The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors." Life Sci **73**(18): 2263-80.

Selley, D. E., C. S. Breivogel, et al. (1993). "Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatment of membranes from NG108-15 cells: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins." Mol Pharmacol **44**(4): 731-41.

Selvatici, R., S. Falzarano, et al. (2006). "Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils." Eur J Pharmacol **534**(1-3): 1-11.

Sengelov, H., L. Kjeldsen, et al. (1993). "Control of exocytosis in early neutrophil activation." J Immunol **150**(4): 1535-43.

Showell, H. J., R. J. Freer, et al. (1976). "The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils." J Exp Med **143**(5): 1154-69.

Simon, S. I., A. R. Burns, et al. (1995). "L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin." J Immunol **155**(3): 1502-14.

Snyderman, R. and M. C. Pike (1984). "Chemoattractant receptors on phagocytic cells." Annu Rev Immunol **2**: 257-81.

Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.

Stein, C., C. Gramsch, et al. (1990). "Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin." J Neurosci **10**(4): 1292-8.

Stein, C., A. H. Hassan, et al. (1993). "Local analgesic effect of endogenous opioid peptides." Lancet **342**(8867): 321-4.

Stein, C., A. H. Hassan, et al. (1990). "Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5935-9.

Stein, C., M. J. Millan, et al. (1988). "Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds." Pharmacol Biochem Behav **31**(2): 445-51.

Stein, C., M. J. Millan, et al. (1989). "Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors." J Pharmacol Exp Ther **248**(3): 1269-75.

Stein, C., M. Pflüger, et al. (1996). "No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia." J Clin Invest **98**(3): 793-9.

Stein, C., M. Schäfer, et al. (2003). "Attacking pain at its source: new perspectives on opioids." Nat Med **9**(8): 1003-8.

Stills, H. F., Jr. (2005). "Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants." Ilar J **46**(3): 280-93.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Tapper, H. (1996). "The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils." J Leukoc Biol **59**(5): 613-22.

Terman, G. W., Y. Shavit, et al. (1984). "Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress." Science **226**(4680): 1270-7.

Thomas, L., Ed. (2005). Labor und Diagnose. Frankfurt/Main, TH-Books-Verl.-Ges.

Tomhave, E. D., R. M. Richardson, et al. (1994). "Cross-desensitization of receptors for peptide chemoattractants. Characterization of a new form of leukocyte regulation." J Immunol **153**(7): 3267-75.

van Woudenberg, A. D., E. M. Hol, et al. (1992). "Endorphin-like immunoreactivities in uncultured and cultured human peripheral blood mononuclear cells." Life Sci **50**(10): 705-14.

Vindrola, O., M. R. Padrós, et al. (1990). "Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin." J Clin Invest **86**(2): 531-7.

Walker, B. A., A. J. Seiler, et al. (1991). "Absence of FMLP receptors on rat macrophages." J Leukoc Biol **50**(6): 600-6.

Weinberg, J. B., J. J. Muscato, et al. (1981). "Monocyte chemotactic peptide receptor. Functional characteristics and ligand-induced regulation." J Clin Invest **68**(3): 621-30.

Wenzel-Seifert, K. and R. Seifert (1993). "Cyclosporin H is a potent and selective formyl peptide receptor antagonist. Comparison with N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L- leucyl-L-phenylalanine and cyclosporins A, B, C, D, and E." J Immunol **150**(10): 4591-9.

Williams, L. T., R. Snyderman, et al. (1977). "Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(3): 1204-8.

Yang, R. B., M. R. Mark, et al. (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." Nature **395**(6699): 284-8.

Yasaka, T., L. A. Boxer, et al. (1982). "Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) and platelet-activating factor (PAF)." J Immunol **128**(5): 1939-44.

Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." Pain **16**(2): 109-10.

Zöllner, C., S. A. Mousa, et al. (2008). "Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain." J Clin Invest **118**(3): 1065-73.

8 Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. Heike Rittner für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung. Ihr und Herrn PD Dr. med. Alexander Brack danke ich insbesondere für die ausgezeichnete Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten, alle praktischen Ratschläge und ihrer Geduld bezüglich der Durchführung der Experimente, der statistischen Auswertung und schließlich der schriftlichen Fertigstellung der Arbeit. Frau Susanne Kotré und Frau Katharina Kuschfeldt danke ich für die kompetente und nette Unterstützung bei den Durchflusszytometrieexperimenten und die Durchführung der RIA. Frau Dr. Dominika Labuz bin ich für die Durchführung der Verhaltensexperimente zu Dank verpflichtet.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, die mit ihrer moralischen und finanziellen Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat. Herrn Dr. Eckhard Lindemann bin ich für das schnelle Korrekturlesen und seine unverwechselbare motivierende Unterstützung dankbar.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationsliste

Heike L. Rittner, Dagmar Hackel, Philipp Voigt , Shaaban Mousa, Andrea Stolz, Dominika Labuz, Michael Schäfer , Michael Schaefer, Christoph Stein, Alexander Brack. “Mycobacteria Attenuate Nociceptive Responses by Formyl Peptide Receptor Triggered Opioid Peptide Release from Neutrophils” PLoS Pathogens 2009 im Druck.

11 Erklärung

„Ich, Andrea Stolz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Formylpetidrezeptor in der opioidpeptidvermittelten Antinozizeption in der frühen Entzündungsphase“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

31.03.2009 Andrea Stolz