Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Norbert Roewer

Monozyten und Prostaglandine in der Schmerzentstehung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna Partheil

aus Marburg

Würzburg, März 2013

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Heike Rittner

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Erhard Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2013

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Stand der Forschung 1

1.1.1 Allgemeine Einführung 1

1.1.2 Leukozyten und Schmerz 2

1.1.3 Proalgetische Entzündungsmediatoren 3

1.1.3.1 Zytokine 3

1.1.3.2 Chemokine 4

1.1.3.3 Prostaglandine 8

1.1.4 Sensitivierung von Nozizeptoren und Schmerzweiterleitung 8

1.2 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 10

1.2.1 CCL2 vermittelte Hyperalgesie 10

1.2.2 Rolle von Leukozyten in der CCL2 vermittelten Hyperalgesie 11

1.2.3 Wirkung von Cox-Inhibitoren auf die CCL2 vermittelte Hyperalgesie 12

1.2.4 CCR2 Expression auf Monozyten und Makrophagen 13

1.3 Fragestellungen 15

2 Material und Methoden 17

2.1 Versuchstiere 17

2.2 Isolierung humaner Monozyten 17

2.3 Isolierung humaner Granulozyten 18

2.4 Gewinnung von Peritonealmakrophagen der Ratte 18

2.5 Gewinnung von Granulozyten der Ratte 19

2.6 Gewinnung von Rückenmark der Ratte 19

2.7 Gewinnung von Liquor der Ratte 19

2.8 Zellstimulation mit CCL2 19

2.9 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) 20

2.9.1 Prinzip 20
2.9.2 Durchführung 21
2.10 Western Blot 21
2.10.1 Probenaufbereitung und Proteinbestimmung 21
2.10.1.1 Bradford-Test 21
2.10.1.1 BCA-Test 21
2.10.2 SDS-Gelelektrophorese 22
2.10.3 Membrantransfer 23
2.10.4 Coomassie-Blau-Färbung 23
2.10.5 Immundetektion von Proteinen 24
2.10.6 Densitometrie 25
2.11 mRNA-Analyse mittels Polymerasekettenreaktion 25
2.11.1 Prinzip 25
2.11.2 RNA-Extraktion 26
2.11.3 cDNA-Synthese 27
2.11.4 Durchführung der konventionellen PCR 27
2.11.5 Durchführung der quantitativen Real-time PCR 28
2.12 Verhaltensexperimente 30
2.13 Verwendete Lösungen 30
2.14 Geräte 31
2.15 Software 32
2.16 Statistik und Auswertung 32
3 Ergebnisse 33
3.1 Cox-2 in humanen Monozyten nach CCL2 Stimulation 33
3.2 PGE_2 Freisetzung von Monozyten und Granulozyten 36
3.3 Cox-2 in Peritonealmakrophagen der Ratte 36

3.4 Zentrale Cox-2 Expression nach intraplantarer CCL2 Injektion 38
3.5 Cox-2 Expression in der entzündeten Pfote 40
3.6 Lokale Hemmung von Cox-2 in der Pfote 41
4 Diskussion 43
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 43
4.2 Diskussion der Methoden 43
4.2.1 Zellisolation 43
4.2.2 Verwendung von Thioglykollat-Makrophagen 44
4.2.3 Wahl des Kulturmediums 44
4.2.4 Messung von PGE_2 45
4.2.5 PCR 45
4.3 Diskussion der Ergebnisse 46
4.3.1 Cox-2 Induktion in Monozyten 46
4.3.1.1 Cox-2 Induktion durch CCL2 46
4.3.1.2 Cox-2 Induktion durch andere Mediatoren 47
4.3.1.3 Intrazelluläre Signalwege 48
4.3.2 Cox-2 Induktion in anderen Zellen 49
4.3.3 Zentrale Cox-2 50
4.3.4 Beteiligung weiterer Zellen oder Mediatoren 51
4.4 Ausblick 51
5 Zusammenfassung 53
6 Literaturverzeichnis 55
7 Abkürzungsverzeichnis 64

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Allgemeine Einführung

Schmerz ist ein klassischer Bestandteil von Entzündungsreaktionen. Bereits vor 2000 Jahren beschrieb Celsus in seinem Werk De Medicina die noch heute gültigen vier Säulen einer lokalen Entzündung: *Calor*, *Rubor*, *Tumor* und *Dolor*. Die Entstehung jeder dieser verschiedenen Komponenten beruht auf einer lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Eine Rötung (*Rubor*) und Erwärmung (*Calor*) der Haut entsteht durch vasoaktive Mediatoren wie zum Beispiel Histamin, die eine Vasodilatation verursachen. *Tumor*, die Gewebeschwellung, ist durch ein entzündliches Exsudat infolge lokaler Hyperämie und Permeabilitätsstörung bedingt [1]. *Dolor*, der Schmerz, ist nach Definition der International Association for the Study of Pain (IASP) eine unangenehme sensorische und emotionale Empfindung, die mit einer aktuellen oder potentiellen Gewebsschädigung einhergeht oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird. Nach dieser Definition ist Schmerz eine Sinneswahrnehmung von der nur beim Menschen gesprochen werden kann, nicht aber bei Tieren. Der Begriff Hyperalgesie bezeichnet eine verstärkte Schmerzantwort auf einen schmerzhaften Reiz (IASP). Diese kann im Gegensatz zu Schmerz auch im Tiermodell gemessen werden. Ein Beispiel ist die Bestimmung von Pfotendruckschwellen nach Randall-Sellito. Dabei wird mit einem Stempel Druck auf die Pfote der Ratte ausgeübt. Im Rahmen einer Hyperalgesie zieht das Tier schon bei geringerem Druck die Pfote zurück als unter Normalbedingungen. Die neuronale Weiterleitung und Verarbeitung von schmerzhaften Reizen wird als Nozizeption bezeichnet. Schmerz im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist bedingt durch eine Freisetzung von proalgetischen Mediatoren. Diese verursachen eine Aktivierung oder Sensitivierung von Nozizeptoren [2]. Eine Nozizeptorsensitivierung kann zu einer verstärkten Schmerzantwort sowohl auf schmerzhafte Reize (Hyperalgesie) als auch auf nicht schmerzhafte Reize (Allodynie) führen. Eine wichtige Rolle bei der Freisetzung dieser proalgetischen Mediatoren spielen Leukozyten. Residente Gewebemakrophagen sezernieren sowohl Lipidmediatoren wie Prostaglandine oder Leukotriene, als auch Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine, die weitere Entzündungszellen rekrutieren und so zum Entzündungsgeschehen beitragen

[3]. Die Bedeutung des Chemokins CCL2 und der Bildung von Prostaglandinen durch Monozyten am Ort des Entzündungsgeschehens als ein möglicher Mechanismus der peripheren Schmerzentstehung soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.2 Leukozyten und Schmerz

Leukozyten sind als Bestandteile der angeborenen Immunantwort an Entzündungsreaktionen wesentlich beteiligt. Schon kurz nach einer Verletzung wandern neutrophile Granulozyten in großer Zahl in das Gewebe ein. Im weiteren zeitlichen Verlauf erreichen auch Monozyten aus dem Blut den Entzündungsort [4]. Sie werden durch Chemokine sowie die Expression von Oberflächenmolekülen wie Selektinen und Integrinen zum Entzündungsort rekrutiert [5, 6]. Innerhalb der Monozyten gibt es verschiedene Untergruppen. Sie unterscheiden sich in der Expression von Oberflächenmarkern und Rezeptoren und entsprechend auch in ihren migratorischen Eigenschaften und Funktionen. Die humanen Monozyten werden in zwei große Gruppen eingeteilt: $CD14^{+}$ $CD16^{-}$ und $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ Monozyten. Die $CD14^{+}$ $CD16^{-}$ Monozyten exprimieren die inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CXCR1 sowie CXCR2 und entsprechen den klassischen inflammatorischen Monozyten, die in entzündetes Gewebe einwandern. Die $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ Monozyten dagegen exprimieren ein anderes Chemokinrezeptorprofil, u.a. den CX3CR1 und entsprechen den residenten Makrophagen, deren Migration nicht von inflammatorischen Stimuli abhängt [7-9]. Bei Ratten gibt es eine ähnliche Unterteilung in $CD43^{low}$ $CCR2^{+}$ $CX3CR1^{low}$ Monozyten als inflammatorische Zellen und $CD43^{high}$ $CCR2^{-}$ $CX3CR1^{high}$ Monozyten entsprechend den residenten Gewebemakrophagen [8].

Über die Freisetzung von Mediatoren sind die eingewanderten Leukozyten an der Entstehung und Modulation von Entzündungsschmerz beteiligt [10]. Sie können sowohl proalgetisch als auch, über die Freisetzung von Opioiden, analgetisch wirken [11]. Endogene Opioide wie Endorphine oder Enkephaline bewirken über die Aktivierung von Opioidrezeptoren auf den Nozizeptoren eine Schmerzhemmung. In der frühen Entzündungsphase sind Granulozyten die dominierende opioidhaltige Zellpopulation während in späteren Stadien der Entzündung die Opioidfreisetzung aus Monozyten von vorrangiger Bedeutung ist [12, 13]. Eine Beteiligung von neutrophilen Granulozyten an der Entstehung von mechanischer Hyperalgesie wird diskutiert. Chemotaktische

Substanzen wie N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Komplementfaktor C5a und Leukotrien B_4 führen nach Injektion zu einer Hyperalgesie, die abhängig ist von der Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten. Glykogen dagegen rekrutiert Granulozyten ohne eine Hyperalgesie zu verursachen [14, 15]. Schröder et al. untersuchten das Zytokinprofil isolierter Granulozyten, unstimuliert sowie nach Zymosan- und Lipopolysaccharid (LPS)- Stimulation und stellten fest, dass es nicht zur Produktion der proalgetischen Zytokine Interleukin 1 (IL-1), IL-6 oder Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α kommt. Gebildet werden IL-8 und der antiinflammatorische IL1β-Rezeptorantagonist. Schon geringe Kontamination mit Monozyten führte jedoch zu der Detektion von IL-1β und IL-6 [16]. Cunha et al. postulieren eine Beteiligung von Granulozyten an der Entstehung von Hyperalgesie. Sie beobachteten, dass Granulozytendepletion die Carrageenan-induzierte Hyperalgesie verringert und dass die IL-1 induzierte PGE_2 Produktion in der Pfote durch Leukozytendepletion verringert wird. [17]. Granulozyten allein scheinen jedoch nicht zur Schmerzentstehung beizutragen. Die Injektion von CXCL1 oder CXCL2/3 (als selektiv neutrophile Granulozyten rekrutierende Chemokine) führt nicht zu einer Hyperalgesie [18]. Möglicherweise sind an der Entstehung von Hyperalgesie andere Leukozytensubpopulationen wie z.B. Monozyten beteiligt, oder die Interaktion von verschiedenen Zelltypen, was im Folgenden untersucht wurde.

1.1.3 Proalgetische Entzündungsmediatoren

1.1.3.1 Zytokine

Zu den wichtigsten proalgetischen Entzündungsmediatoren gehören die Zytokine. Dabei handelt es sich um kleine lösliche Proteine, die von verschiedenen Zellen im Körper freigesetzt werden. Sie regulieren Prozesse wie Wachstum, Zelldifferenzierung und steuern die Immunreaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Zytokine können autokrin, parakrin und auch endokrin wirken [3]. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Schmerz sind besonders die proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1, IL-6 und verschiedene Chemokine von Bedeutung [19, 20]. Es konnte gezeigt werden, dass TNF-α, IL-1 und IL-6 in Ratten über einen Prostaglandin-gekoppelten Mechanismus eine Hyperalgesie nach intraplantarer Injektion verursachen. TNF-α bewirkt auch über IL-8 und Freisetzung von sympathischen Aminen eine Hyperalgesie

[21, 22]. Zytokine können das Entzündungsgeschehen verstärken, indem sie die Freisetzung anderer proinflammatorischer Zytokine fördern oder über autokrine Mechanismen ihre eigene Freisetzung stimulieren. Die proalgetischen Eigenschaften der Zytokine werden durch verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt. Sie können über eine direkte Wirkung an Nervenendigungen zu einer Sensibilisierung oder Aktivierung führen, oder aber über zwischengeschaltete Rezeptoren und Mediatoren wirken. Zu den proalgetischen Mediatoren, die in der Zytokin-vermittelten Entzündungskaskade involviert sind, gehören Neuropeptide (z.B. Substanz P), Bradykinin und Prostaglandine. Durch Zytokine modulierte Rezeptoren sind beispielsweise der Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 (TRPV1) in Spinalganglien oder Glutamatrezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS) [23]. TRPV1 ist ein nichtselektiver Kationenkanal, der u.a. durch Hitze oder Capsaicin aktiviert wird und Schmerzreize vermittelt. TNFα verstärkt die Capsaicin-Antwort in sensorischen Neuronen, vermutlich über die Freisetzung von Prostaglandinen [24]. Bei Applikation von TNFα und IL-1 auf sensorische Neurone in Lamina II von Rückenmarksquerschnitten kommt es zu verstärkten exzitatorischen Potentialen über Glutamatrezeptoren, ebenso wie IL-1 und IL-6 inhibitorische Potentiale über GABA- und Glycinrezeptoren hemmen [25]. Somit können Zytokine sowohl peripher als auch zentral zur Schmerzentstehung oder Schmerzverstärkung beitragen.

1.1.3.2 Chemokine

Allgemeine Systematik der Chemokine

Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine mit chemotaktischen Eigenschaften. Chemokine sind deutlich kleiner und wirken alle über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die systematische Einteilung der Chemokine erfolgt anhand ihrer molekularen Struktur. Man unterscheidet vier Gruppen von Chemokinen nach Position der Cysteinreste am N-Terminus. Bei der CC-Gruppe liegen zwei an Disulfidbrücken beteiligte Cysteine (C) benachbart, bei der CXC-Gruppe sind sie durch eine andere Aminosäure (X) getrennt. Die XC-Gruppe enthält nur eine statt zwei Disulfidbrücken am N-Terminus und bei der CX3C-Gruppe sind zwei Cysteine durch drei andere Aminosäuren getrennt. Die verschiedenen Chemokine in einer Gruppe sind nummeriert. Die Chemokinrezeptoren werden anhand ihrer Liganden ebenfalls in diese 4 Gruppen

unterteilt, nur mit einem „R“ für Rezeptor anstelle eines „L“ für Ligand. Chemokine weisen allerdings im Gegensatz zu Zytokinen eine hohe Redundanz auf. Ein Chemokin kann an verschiedene Rezeptoren seiner Gruppe binden, ebenso wie ein Rezeptor häufig Signale mehrerer Chemokine weiterleitet [26, 27]. Eine Übersicht über die wichtigsten Chemokine und ihre Bezeichnungen und Rezeptoren gibt Tabelle 1. Inzwischen sind knapp 50 humane Chemokine mit unterschiedlichen Funktionen bekannt. Über ihre chemotaktische Wirkung spielen sie eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion [28]. Die verschiedenen Leukozytenpopulationen exprimieren unterschiedliche Chemokinrezeptoren. Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und Basophile weisen einige gemeinsame Rezeptoren auf. Es sind aber auch selektive Rezeptoren bekannt. CXCR2 ist beispielsweise vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten zu finden, während CCR2 vorwiegend auf Monozyten, dendritischen Zellen, Basophilen und T-Lymphozyten, aber nicht auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist [29]. Durch die unterschiedliche Rezeptorverteilung können selektiv bestimmte Leukozytenpopulationen rekrutiert werden [30, 31]. Die Beteiligung von Chemokinen ist in verschiedensten pathophysiologischen Zusammenhängen beschrieben worden. Sie scheinen bei vielen Autoimmunerkrankungen, Allergien, Transplantationsreaktionen und Artheriosklerose eine Rolle zu spielen [30]. Entsprechend stellen sie ein mögliches Ziel für die medikamentöse Therapie dieser Erkrankungen dar [32].

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Chemokine mit ihren alten und neuen Bezeichnungen und den entsprechenden Rezeptoren [27, 33]

Systematischer Name	**Ursprünglicher Name**	**Rezeptor**
CCL2	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	CCR2
CCL3	Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α)	CCR1, CCR5
CCL5	Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES)	CCR1, CCR3, CCR5
CXCL1	Growth-related oncogene-alpha (GRO-α)	CXCR1, CXCR2

CXCL2	Growth-related oncogene-beta (GRO-β)	CXCR2
CXCL3	Growth-related oncogene-gamma (GRO-γ)	CXCR2
CXCL8	Interleukin-8 (IL-8)	CXCR1, CXCR2

Chemokine und Schmerz

Zur Schmerzentstehung können Chemokine, ähnlich wie Zytokine, auf verschiedenen Wegen beitragen. Es gibt Chemokine, die direkt Nozizeptoren aktivieren können. Es wurde gezeigt, dass in nozizeptiven Neuronen aus neonatalen Spinalganglien die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR4, CCR5 und CX3CR1 exprimiert werden und Stimulation mit entsprechenden Chemokinen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt [34]. CCL3 kann über den Rezeptor CCR1 in Spinalganglienneuronen TRPV1 sensitivieren [35]. Andere Chemokine führen zur Schmerzentstehung indem sie die Freisetzung weiterer proalgetischer Mediatoren verursachen. Ein Beispiel hierfür ist das Chemokin CXCL8 (IL-8). Es führt über eine Freisetzung von sympathischen Aminen zu einer Hyperalgesie in Ratten [36]. Chemokine können auch über zentrale Mechanismen eine proalgetische Wirkung haben. Die intrathekale Applikation von CCL2 oder CX3CL1 führt zu einer mechanischen Allodynie [37, 38]. Andererseits können Chemokine auch schmerzhemmend wirken. CXCL2/3 bewirkt über den Rezeptor CXCR2 auf Granulozyten eine Opioidfreisetzung und kann damit in Complete Freund’s Adjuvant (CFA)-induzierter Entzündung antinozizeptiv wirken [39].

CCL2

In einer aktuellen Metaanalyse wurden verschiedene Mikroarray-Studien der letzten Jahre zu Genregulation im Rahmen von Schmerz betrachtet. Dabei wurden CCL2 und regenerating islet-derived 3 beta; pancreatitis associated protein (reg3b) als die wichtigsten im Zusammenhang mit Schmerz regulierten Gene identifiziert. Beide Gene wurden in dieser Analyse bei Ratten sowohl in einem Modell für neuropathischen Schmerz (chronic constriction injury, CCI) als auch für inflammatorischen Schmerz (CFA-induzierte Entzündung) in Rückenmark und Spinalganglion heraufreguliert [40]. Auch beim Menschen zeigte eine Mikroarray-Analyse die Bedeutung von CCL2 in der

Schmerzentstehung. In humanem Gewebe war 3 h nach Zahnextraktion die CCL2-Expression deutlich angestiegen und es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von CCL2, IL-6 und IL-8 und der vom Patienten angegebenen Schmerzintensität [41]. CCL2 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und ist vor allem in Zusammenhang mit neuropathischem Schmerz vielfältig untersucht. Es wird bei Nervenverletzungen von Schwann-Zellen freigesetzt, führt zu einer Einwanderung von Monozyten in den geschädigten Nerv und kann eine Demyelinisierung und Degeneration des Nerven bewirken [37]. CCR2 und CCL2 Heraufregulation erfolgt nicht nur im Bereich der Nervenverletzung, sondern auch in Spinalganglien [38]. In Spinalganglien ist CCL2 hauptsächlich in nozizeptiven Neuronen, die Substanz P und Calcitonin-gene-related-protein (CGRP) produzieren, zu finden. Intrathekale Applikation von CCL2 führt zu einer thermalen Hyperalgesie und einer mechanischen Allodynie bei Ratten. Diese Effekte sind durch einen selektiven CCL2-Antagonisten reversibel [42]. Mäuse, die CCL2 überexprimieren zeigen eine gesteigerte Schmerzempfindlichkeit [43]. In CCR2 Knockout-Mäusen dagegen ist die mechanische Allodynie nach Nervenligatur vollständig aufgehoben [44]. Durch Konstruktion einer bitransgenen Maus mit Fluoreszenzmarkierung von CCL2 und CCR2 konnte die Chemokin- und Rezeptorexpression und ihre Interaktion in vivo untersucht werden. Nach Induktion einer peripheren fokalen Nervendemyelinisierung (als Modell für neuropathischen Schmerz) kam es zu einer deutlich verstärkten Expression und Chemokin-Rezeptor-Interaktion in dem geschädigten Nerv und den zugehörigen Spinalganglien. Bei den CCR2-positiven Zellen in dem Nerv handelte es sich vorwiegend um Leukozyten, während in den Spinalganglien Neurone und Gliazellen positiv für CCR2 und CCL2 waren [45]. Neurone in Spinalganglien zeigen nach chronischer Kompression eine deutlich gesteigerte Exzitabilität durch CCL2 [46, 47]. Diese Sensitivierung ist wahrscheinlich Folge einer gesteigerten Expression von TRPV1 und dem Tetrodotoxin(TTX)-resistenten Natriumkanal $Na_V1.8$ auf nozizeptiven Neuronen in den Spinalganglien [48]. CCL2 führt auch zu einer Freisetzung von CGRP aus Spinalganglienneuronen [49]. Bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz handelt es sich vermutlich vor allem um direkte Effekte von CCL2 an nozizeptiven Neuronen, infolge einer Heraufregulation von CCR2 im Rahmen von Nervenverletzungen [50, 51]. Unter Normalbedingungen werden CCL2 und CCR2 in Rücken-

mark, Spinalganglion und peripherem Nerv jedoch kaum exprimiert [45]. Über die Bedeutung von CCL2 in Zusammenhang mit akutem Schmerz ist daher weniger bekannt. In dieser Arbeit soll als ein möglicher peripherer Mechanismus von Schmerzentstehung untersucht werden, ob CCL2 über einen indirekten Mechanismus durch Monozytenrekrutierung und Prostaglandinfreisetzung am Entzündungsort zu Schmerzentstehung beiträgt.

1.1.3.3 Prostaglandine

Eine Gruppe wichtiger Mediatoren, die zu Nozizeptorsensitivierung und Schmerzentstehung führen, sind die Prostaglandine. Es handelt sich dabei um Arachidonsäurederivate, die durch Cyclooxygenasen (Cox) gebildet werden. Sie werden nicht gespeichert sondern bei Bedarf produziert. Arachidonsäure wird aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A_2 abgespalten und dann durch die Cox-Isoenzyme in Prostaglandin H_2 umgewandelt. Dieses dient als Ausgangssubstanz für die weiteren Prostaglandine D_2, E_2 und F_2 sowie Prostacyklin (PGI_2) und Thromboxan (TXA_2). Die verschiedenen Prostaglandine gelangen über erleichterte Diffusion aus der Zelle und wirken autokrin oder parakrin am Ort ihrer Entstehung. Sie haben vielfältige und zum Teil entgegengesetzte Funktionen wie Vasokonstriktion und Vasodilatation, und tragen wesentlich zu Entzündungsreaktionen, Schmerz und Fieberentstehung bei [52]. Von besonderer Bedeutung bei der Prostaglandin-Produktion sind die beiden Cox-Isoenzyme 1 und 2. Cox-1 kommt in fast allen Zellen vor, ist konstitutiv aktiv und dient der basalen Prostaglandin-Produktion. Cox-2 ist ein induzierbares Enzym und unter Normalbedingungen in den meisten Zellen nicht zu finden. Erst durch Induktion durch verschiedene inflammatorische Stimuli wird Cox-2 in Entzündungszellen heraufreguliert. Diese Einteilung ist stark vereinfacht. Eine Ausnahme bildet beispielsweise das ZNS. Hier kommen beide Cox-Isoenzyme konstitutiv aktiv vor [53, 54]. Es sind Präferenzen der Isoenzyme bezüglich ihrer Prostaglandinbildung beschrieben. So soll Cox-2 nach Induktion bevorzugt PGE_2 und PGI_2 bilden [55]. Bekannte Induktoren von Cox-2 sind IL-1, TNF-α, LPS, Wachstumsfaktoren, Phorbolester und Ceramide [56-60].

1.1.4 Sensitivierung von Nozizeptoren und Schmerzweiterleitung

1971 wurde erstmals die Hemmung der Prostaglandin-Bildung als möglicher Wirkmechanismus von nicht-steroidalen Entzündungshemmern (NSAID) vorgeschlagen

[61]. Inzwischen ist PGE_2 als Mediator in der Schmerzentstehung etabliert. Eine wichtige Erkenntnis war die Beobachtung, dass PGE_2 alleine bei intradermaler Injektion nicht, oder nur in hohen Konzentrationen, zu Schmerz führt. Es steigert jedoch die Sensibilität für andere proalgetische Substanzen wie Bradykinin und Histamin [62]. Dieses Phänomen der Senkung von Schmerzschwellen und gesteigerter Aktivität auf Schmerzreize wird als Nozizeptorsensitiverung bezeichnet. Sensitivierung kann sowohl auf peripherer als auch zentraler Ebene erfolgen [63, 64]. Periphere Nozizeptor-sensitivierung durch PGE_2 erfolgt über EP-Rezeptoren auf den Nozizeptoren. EP-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit vier verschiedenen Subtypen. EP_1 wirkt über einen intrazellulären Calciumanstieg, EP_2 und EP_4 über einen Anstieg von cyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und EP_3 über eine Senkung der cAMP-Konzentration [52]. Aus diesen Veränderungen resultieren Modulationen von verschiedenen Ionenkanälen auf den Nozizeptoren. Spannungsabhängige TTX-resistente Natrium-Kanäle, die an der Weiterleitung nozizeptiver Informationen beteiligt sind, werden durch PGE_2 phosphoryliert und darüber ihre Aktivierungsschwelle gesenkt [54, 65, 66]. Prostaglandine können auch Kalium-Kanäle in den Spinalganglien inhibieren und so zur Sensitivierung beitragen [23, 54, 67]. Außerdem erhöhen sie die Empfindlichkeit von TRPV1 für Capsaicin [68].

Neben ihrer Wirkung auf periphere Nozizeptoren sind Prostaglandine auch an zentralen Sensitivierungsprozessen beteiligt. PGE_2 wird nach nozizeptiver Stimulation im Rückenmark freigesetzt, wobei die genauen Mechanismen der zentralen Sensitivierung an den Neuronen noch nicht vollständig geklärt sind. Auch periphere Entzündung kann zu einer Induktion von Cox-2 im ZNS führen. Samad et al. konnten zeigen, dass intraplantare Injektion von CFA oder intrathekale Applikation von IL-1β im Rückenmark und weiteren Teilen des ZNS zu einer Cox-2 Induktion und einem deutlichen Anstieg von PGE_2 im Liquor führen [69]. Normalerweise können Zytokine wie IL-1β die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren, sodass ein Mechanismus über die Induktion von Cox-2 in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke mit Sekretion von PGE_2 sowie weiteren Mediatoren in den Liquor angenommen wird [70]. Für verschiedene Entzündungsmodelle wurde die spinale Freisetzung von PGE_2 und die Cox-2 Induktion in Neuronen des Rückenmarks nachgewiesen [53, 71, 72]. Mittels einer neuronalen Cox-2 Knockout-Maus konnte gezeigt werden, dass besonders für die Entstehung von

mechanischer Hyperalgesie die zentrale Cox-2 von Bedeutung ist [73]. Die meisten Cox-2-Inhibitoren sind liquorgängig und wirken sowohl auf periphere als auch zentrale Cox [74, 75].

1.2 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

1.2.1 CCL2 vermittelte Hyperalgesie

Im Rahmen von Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Bedeutung von Leukozytensubpopulationen bei der Schmerzentstehung, wurden Verhaltensexperimente mit verschiedenen Chemokinen durchgeführt [76]. Als Monozyten rekrutierendes Chemokin wurde CCL2 verwendet. Es zeigte sich, dass die intraplantare Injektion von CCL2 sowohl eine mechanische als auch eine thermische Hyperalgesie in Ratten verursacht. Abbildung 1 zeigt die Pfotendruckschwellen (PPT) im Zeitverlauf nach Injektion von 3 µg CCL2. Bereits nach 1 h kommt es zu einem signifikanten Abfallen der Pfotendruckschwelle, entsprechend einer mechanischen Hyperalgesie. Diese Hyperalgesie erreicht maximale Intensität nach 3-6 h und normalisiert sich innerhalb von 24 h wieder. Eine Injektion von Kochsalzlösung führt zu keiner Veränderung der Pfotendruckschwellen. Auch die Pfotendruckschwellen der kontralateralen (=nicht injizierten) Seite verändern sich nicht. Untersuchungen zur thermischen Hyperalgesie (nicht abgebildet) zeigen einen ähnlichen Verlauf.

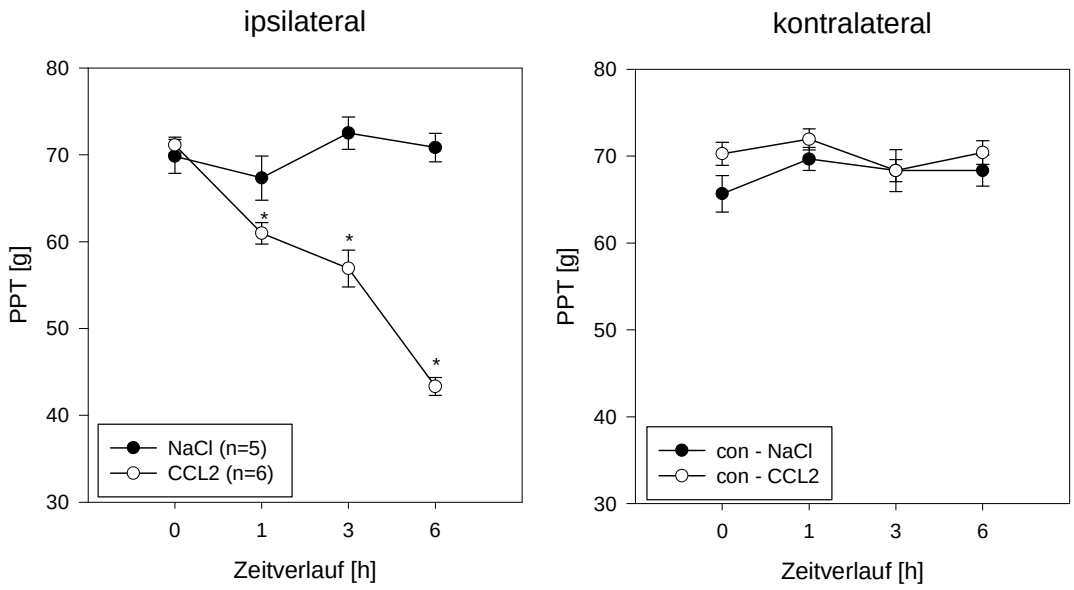


Abbildung 1: Pfotendruckschwellen im Zeitverlauf nach NaCl- und CCL2-Injektion, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte für ipsilaterale (=injizierte) und kontralaterale (=nicht injizierte) Pfote (n = 5-6, Two-way RM-ANOVA, Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$)

1.2.2 Rolle von Leukozyten in der CCL2 vermittelten Hyperalgesie

Um zu differenzieren, ob direkte Nozizeptorsensitivierung oder Leukozyten indirekt eine Rolle spielen, wurden die Ratten immundepletiert mit Cyclophosphamid. Dabei handelt es sich um ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien. Durch die Alkylierung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) kommt es zu abnormen Basenpaarungen und einer Vernetzung von DNA- bzw. RNA-Strängen, wodurch die Replikation gestört wird [77]. Davon sind besonders sich schnell teilende Zellen wie Leukozyten betroffen. Nach Leukozytendepletion war die CCL2 vermittelte Hyperalgesie vollständig aufgehoben. Dies spricht gegen einen direkten Effekt von CCL2 an Nozizeptoren. Anschließend wurden Rekonstitutionsexperimente mit einzelnen Leukozytensubpopulationen durchgeführt. Nach Injektion von Makrophagen konnte die Hyperalgesie teilweise rekonstruiert werden. Durch die gleichzeitige Injektion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten war sie wieder in vollem Ausmaß vorhanden (Abbildung 2).

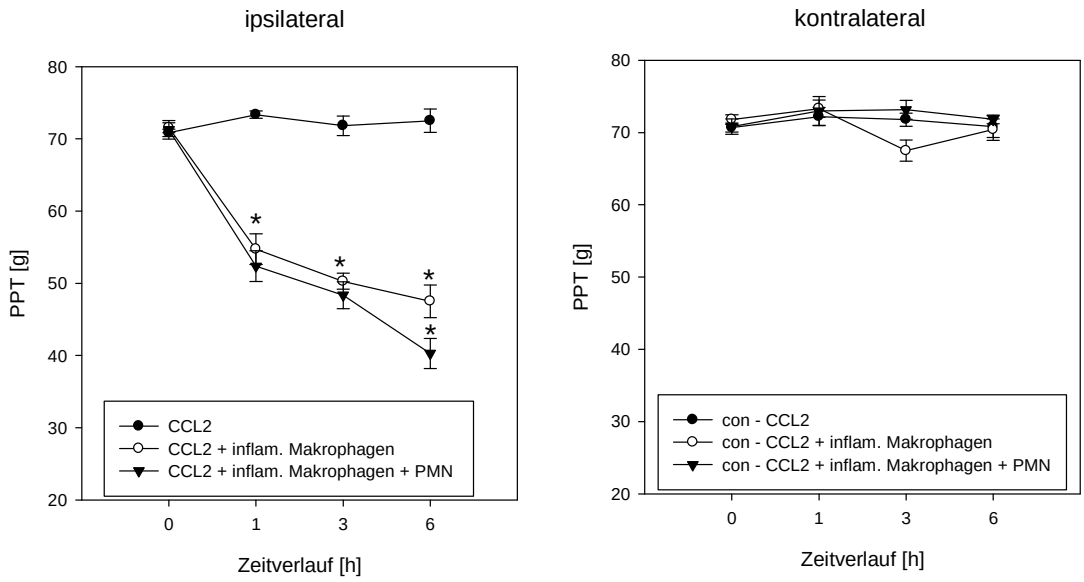


Abbildung 2: Pfotendruckschwellen im Zeitverlauf nach systemischer Leukozytendepletion mit Cyclophosphamid, die Rekonstitution erfolgte mit Thioglykollat-Peritonealmakrophagen und PMN von verschiedenen Spenderratten (n = 6, Two-way RM-ANOVA, Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$)

1.2.3 Wirkung von Cox-Inhibitoren auf die CCL2 vermittelte Hyperalgesie

Um die Bedeutung von Cox-2 für die CCL2-vermittelte Hyperalgesie zu untersuchen, wurden die Pfotendruckschwellen nach Applikation eines selektiven Cox-2 Inhibitors bestimmt. Es wurden 5 mg Parecoxib (Dynastat, Pfizer) systemisch verabreicht. Dies konnte die CCL2-vermittelte Hyperalgesie vollständig aufheben, während sich in der Kontrollgruppe mit Kochsalzapplikation die erwartete Hyperalgesie einstellte. Dies weist auf eine Beteiligung von Cox-2 in der Entstehung der Hyperalgesie nach CCL2 Injektion hin.

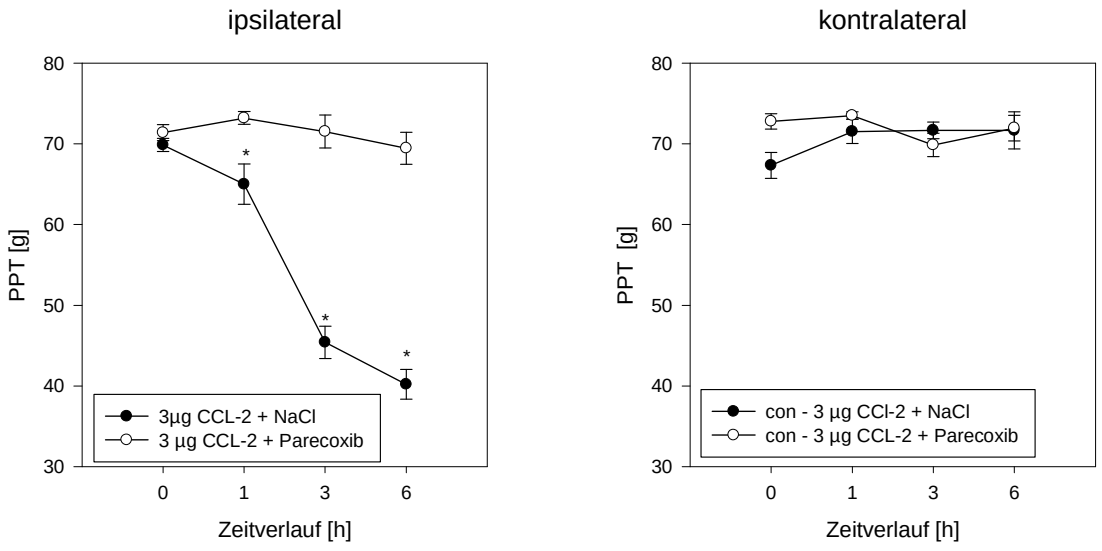
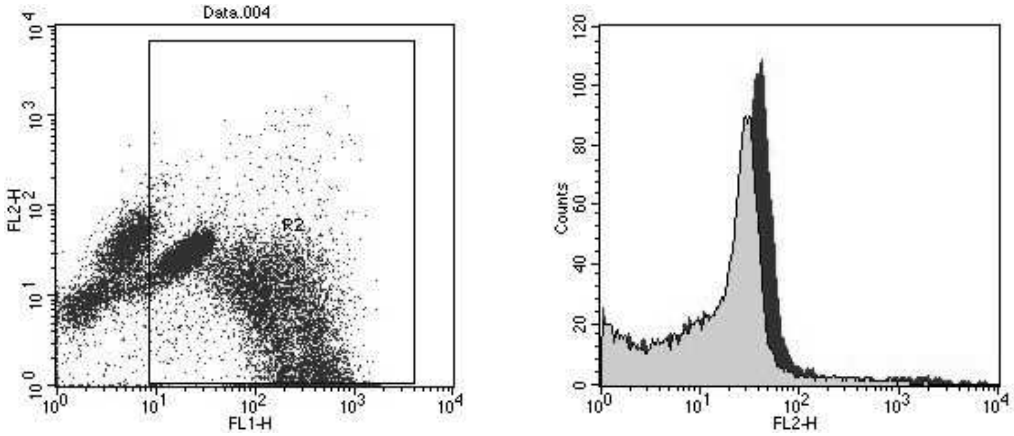


Abbildung 3: Pfotendruckschwellen im Zeitverlauf nach CCL2 Injektion und intraperitonealer Applikation von Parecoxib (Dynastat) oder NaCl, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte für ipsilaterale (=injizierte) und kontralaterale (=nicht injizierte) Pfote (n = 6, Two-Way-RM-ANOVA, Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$)

1.2.4 CCR2 Expression auf Monozyten und Makrophagen

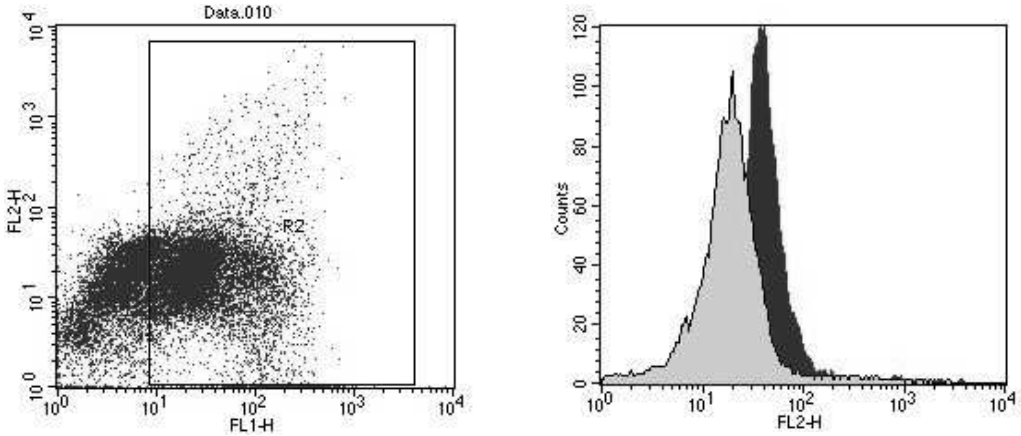
Die Rekonstitutionsexperimente legen eine Beteiligung von Monozyten/ Makrophagen an der Entstehung der CCL2-vermittelten Hyperalgesie nahe. Für eine Aktivierung der Monozyten und Makrophagen durch CCL2 ist die Expression des Rezeptors (CCR2) auf den Zellen erforderlich. Diese wurde durchflusszytometrisch untersucht. Mit Thioglykollatmakrophagen der Ratte (Abbildung 4A und B) und humanen $CD14^+$ Monozyten (Abbildung 4C) wurde einer Intrazellulärfärbung für CCR2 durchgeführt. Beide Zellpopulationen exprimieren den CCR2.

A


Data.004
FL2-H
FL1-H
R2
Counts
FL2-H

ED1

B


Data.010
FL2-H
FL1-H
R2
Counts
FL2-H

ED2

C

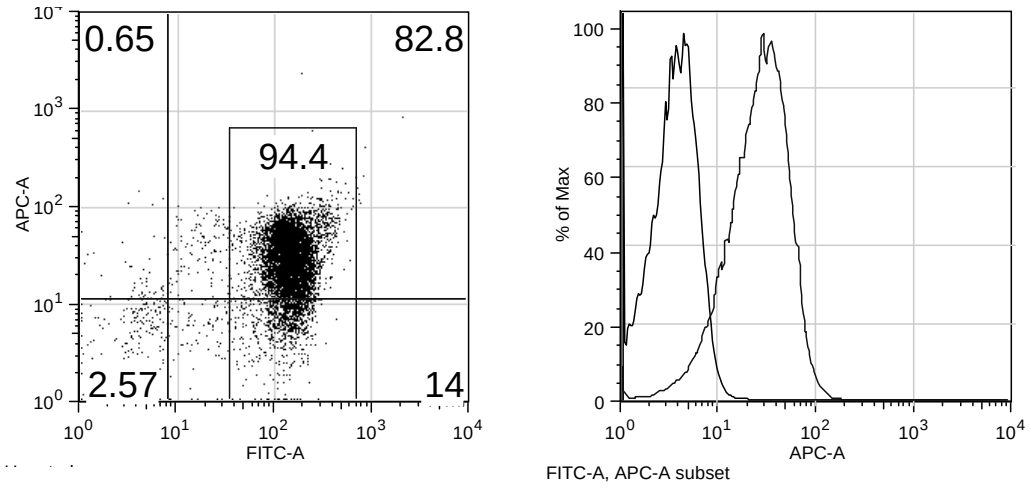


Abbildung 4: CCR2-Färbung von Thioglykollat-Makrophagen der Ratte (A und B) und humanen CD14+ Monozyten (C), ED1 und ED2 wurden als Marker für Makrophagenpopulationen verwendet. *Oben links:* Fenster für ED1-positive Makrophagen, *oben rechts:* Vergleich der CCR2- gefärbten ED1+ Makrophagen (schwarz) mit der Isotypkontrolle (grau), *B:* analog für ED2-positive Makrophagen, C: analog für humane Monozyten

1.3 Fragestellungen

Aus den beschriebenen Vorversuchen der Arbeitsgruppe leiten sich die Fragestellungen dieser Arbeit ab. Das Chemokin CCL2 führt nach intraplantarer Injektion zu einer Hyperalgesie. Zur Entstehung dieser Hyperalgesie sind Leukozyten, insbesondere Monozyten notwendig, und durch Cox-Inhibitoren lässt sich die Hyperalgesie vollständig aufheben. Daraus ergibt sich die Hypothese: CCL2 aktiviert Monozyten und führt zu einer Induktion von Cox-2 und einer Freisetzung von Prostaglandinen.

Dazu sollen folgende Fragen untersucht werden:

- Führt CCL2 in vitro in humanen Monozyten zu einer Induktion von Cox-2 und einer Freisetzung von PGE_2?

- Kommt es durch CCL2 in vitro zu einer Cox-2 Induktion und PGE_2-Freisetzung in differenzierten Peritonealmakrophagen der Ratte?
- Verursacht CCL2 in vivo eine Induktion von zentraler Cox-2 im lumbalen Rückenmark mit Freisetzung von PGE_2 in den Liquor?
- Führt CCL2 in vivo zu einer Cox-2 Induktion in der entzündeten Pfote?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250 g (±25 g) verwendet (Harlan, Rossdorf). Die Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierung von Unterfranken) genehmigt. Die Tiere wurden in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle Injektionen wurden unter kurzer Isofluran-Narkose durchgeführt.

2.2 Isolierung humaner Monozyten

Die Monozyten wurden mithilfe von magnetischer Zellseparation aus dem Blut gesunder Spender gewonnen. Es handelt sich dabei um ein positives Selektionsverfahren, bei dem die Monozyten mit Antikörper-gebundenen magnetischen Partikeln ($CD14^+$ MicroBeads, Miltenyi Biotec) markiert und von den übrigen Zellen getrennt werden [78]. Als Ausgangssubstanz wurde Blut aus Thrombozytenapheresefiltern verwendet, da sich hier ein höherer Anteil Monozyten befindet als in normalem Vollblut (bedingt durch die Filterkonstruktion). Diese Thrombozytenapheresefilter wurden von dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde 1:1 mit RPMI verdünnt. Jeweils 5 ml wurden mit 25 ml EL-Puffer (erythrocyte lysis buffer) für 15 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in je 10 ml EL-Puffer resuspendiert und erneut 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen, über einen Filter (pre-separation filter, Miltenyi Biotec) gegeben um Zellaggregate zu entfernen, und mit einer Trypanblau-Färbung mikroskopisch gezählt. Da Trypanblau tote Zellen blau anfärbt, ist es möglich die Zahl der lebenden Zellen zu ermitteln. Im nächsten Schritt wurden die Monozyten mit den MicroBeads markiert. Dazu wurden $1x10^8$ Zellen mit 200 µl $CD14^+$ MicroBeads unter ständigem Schütteln bei 4° C für 15 min inkubiert. Danach wurde die Zell-$CD14^+$-Suspension 10 min zentrifugiert und einmal mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen um überschüssige Mikropartikel zu entfernen. Zur Zellseparation wurden $1x10^8$ Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Separationssäule wurde in dem Magnetfeld platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die

Zellsuspension wurde über einen Filter auf die Säule gegeben um zu verhindern, dass Zellaggregate die Säule verstopfen. Nach dem Durchlaufen der Zellsuspension wurde die Säule viermal mit 3 ml MACS-Puffer gespült, um alle CD14-negativen Zellen aus der Säule auszuwaschen. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die verbleibenden Zellen mit 5 ml MACS-Puffer in einem Reagenzglas aufgefangen. Nun wurde mit einer Trypanblau-Färbung die Zahl der lebenden $CD14^+$-Zellen bestimmt. Die Reinheit der Zellseparation wurde mit FACS-Analysen überprüft.

2.3 Isolierung humaner Granulozyten

Zur Gewinnung humaner Granulozyten wurde gesunden Spendern mit einer heparinisierten Spritze 25 ml Blut abgenommen. Das antikoagulierte Blut wurde 1:1 mit Komplettmedium verdünnt und jeweils 25 ml zu 25 ml Dextran-Lösung gegeben. Das Polysaccharid Dextran fördert die Geldrollenbildung der Erythrozyten und führt dazu, dass die Erythrozytenaggregate schneller absinken [79]. Nach 30 min wurde die leukozytenreiche obere Fraktion von der erythrozytenreichen unteren Fraktion abgetrennt und zentrifugiert. Die Zellen wurden in 16 ml Komplettmedium resuspendiert und je 4 ml vorsichtig auf 6 ml Ficoll-Hypaque-Lösung pipettiert. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin und dient der Dichtegradientenzentrifugation [80]. Die Zellen wurden bei 400 g ohne Bremse für 40 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei sammeln sich die Granulozyten und verbliebene Erythrozyten im Zellsediment, während sich die Monozyten und Lymphozyten an der Ficoll-Plasma-Grenze ablagern. Das Zellsediment wurde geerntet und mit 2 ml Komplettmedium in einem neuen Röhrchen resuspendiert. Um die verbliebenen Erythrozyten zu entfernen, wurde im nächsten Schritt eine hypotone Lyse auf Eis durchgeführt. Dazu wurde kalte 0,2 % Kochsalzlösung für 30 s hinzugegeben und dann mit der entsprechenden Menge 1,6 % Kochsalzlösung neutralisiert. Danach wurde für 10 min bei 400 g zentrifugiert und die Lyse wiederholt. Die isolierten Granulozyten wurden schließlich in Komplettmedium aufgenommen und mit einer Trypanblaufärbung gezählt.

2.4 Gewinnung von Peritonealmakrophagen der Ratte

Zur Rekrutierung von Makrophagen wurde der Ratte 1 ml einer 3 % Thioglykollat-Lösung intraperitoneal injiziert. Dies induziert eine Entzündung in der Bauchhöhle und

nach vier Tagen sind ausreichend Makrophagen eingewandert [81-83]. Nach Tötung der Ratte durch intrakardiale Injektion von T61 wurde eine peritoneale Lavage mit 20 ml PBS + 100 µl 0,2 M EDTA durchgeführt und in weiteren 30 ml PBS + 400 µl 0,2 M EDTA aufgefangen. Diese Zellsuspension wurde für 10 min bei 400 g zentrifugiert, die Zellen in Komplettmedium aufgenommen und mit einer Trypanblau-Färbung gezählt. Bei sehr geringer Zellzahl wurden in Einzelfällen die Makrophagen von 2-4 Ratten gepoolt.

2.5 Gewinnung von Granulozyten der Ratte

Zur Induktion einer Entzündung mit konsekutiver Einwanderung von Granulozyten wurden den Ratten 20 ml einer 1 % Glykogenlösung intraperitoneal injiziert. Nach 4 h wurde die Ratte getötet, eine peritoneale Lavage mit 10 ml PBS + 100 µl 0,2 M EDTA durchgeführt und in 30 ml PBS + 400 µl 0,2 M EDTA aufgefangen. Es wurde für 10 min bei 400 g zentrifugiert, die Zellen in Komplettmedium aufgenommen und mithilfe einer Trypanblau-Färbung die Zellzahl bestimmt.

2.6 Gewinnung von Rückenmark der Ratte

Zur Entnahme von lumbalem Rückenmark wurde die Ratte getötet und die Wirbelsäule freipräpariert. Mit einer Hohlmeißelzange wurden die Processus spinosi und die hinteren Wirbelbögen entfernt und das Rückenmark freigelegt. Rechte und linke Rückenmarkshälfte wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt und separat entnommen. Beide Hälften wurden eingefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.7 Gewinnung von Liquor der Ratte

Die Ratten wurden getötet und die Cisterna magna mit einer 1 ml Spritze unterhalb des Os occipitale punktiert. Es konnten pro Tier 80-130 µl klarer Liquor gewonnen werden. Die Liquorentnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. Christian Geis der Neurologischen Klinik und Poliklinik Würzburg durchgeführt.

2.8 Zellstimulation mit CCL2

Zur Stimulation der gewonnenen Monozyten mit dem Chemokin CCL2 (PeproTech) wurden 12-Loch-Zellkulturplatten verwendet. Es wurden $1x10^7$ Zellen/ml Komplettmedium gelöst und mit 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, und 0,01 µg/ml CCL2 für3 h bei 37° C in-

kubiert. Eine Positivkontrolle wurde mit 2 µg/ml LPS durchgeführt. Nach 3 Stunden wurden die Zellen geerntet und für 3 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und sofort bei -80° C eingefroren. Bei Proben für Western Blot wurde das Zellsediment in 250 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden auch diese Proben bei -80°C eingefroren. Bei Proben für PCR wurde das Zellsediment in 350 µl RA1-Lyse-Puffer + 3,5 µl Mercaptoethanol resuspendiert und ebenfalls bei -80° C eingefroren. Bei Koinkubation von Granulozyten und Monozyten wurde in gleicher Weise verfahren. Es wurden $1x10^7$ Monozyten und $1x10^7$ Granulozyten in 1 ml Komplettmedium mit den oben genannten Chemokin-Konzentrationen stimuliert.

2.9 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

2.9.1 Prinzip

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit daran gekoppelter Farbreaktion. Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um einen kompetitiven Assay. Er basiert auf Konkurrenz zwischen einem markierten Antigen (Tracer) und dem zu messenden Antigen um die gleichen Antikörperbindungsstellen. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto weniger Tracer kann an den Antikörper binden und später nachgewiesen werden. Der Tracer ist an ein Enzym gekoppelt, das eine Farbreaktion katalysiert. Im Fall des verwendeten Assays zur Detektion von PGE_2 ist der Tracer an Acetylcholinesterase gekoppelt. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung von überschüssigem Tracer wird Ellman's Reagenz (bestehend aus Acetylthiocholin und 5,5 Dithio-bis-2- Nitrobenzoesäure) hinzugefügt. Je nach Menge des gebundenen Tracers wird nun aus Acetylthiocholin durch Hydrolyse Thiocholin freigesetzt. Dieses reagiert mit 5,5-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, einem gelben Farbstoff mit starker Absorbanz bei 412 nm. Die Absorption ist entsprechend proportional zur Menge an gebundenem Tracer und umgekehrt proportional zu der PGE_2 Konzentration. Durch Vergleich zu einem Standard mit bekanntem Prostaglandingehalt wurde die Konzentration in den Proben errechnet.

2.9.2 Durchführung

Zur Bestimmung der PGE_2 Konzentrationen wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit (Cayman Chemicals) verwendet. Das Protokoll orientiert sich an den Herstellerangaben. Alle Proben wurden in Duplikaten bestimmt. Es wurden 50 µl Standard oder Probe pro Loch aufgetragen. Dann wurde jeweils 50 µl Tracer und 50 µl Antikörper dazugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 200 µl Ellman's Reagenz pro Loch hinzugefügt. Nach 60-90 min wurde mit einem Mikrotestplattenlesegerät die Absorbanz bei 405 nm gemessen.

2.10 Western Blot

2.10.1 Probenaufbereitung und Proteinbestimmung

Die Proben für Western Blot wurden auf Eis aufgetaut. Zum Zellaufschluss erfolgte eine fünfmalige Behandlung mit 50 W für 0,5 s mithilfe eines Ultraschallhomogenisators. Um eine definierte Proteinmenge bei der Gelelektrophorese aufzutragen, musste der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden. Hierbei kamen die im Folgenden beschriebenen Methoden zum Einsatz.

2.10.1.1 Bradford-Test

Der Bradford-Test beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bei Bindung an Protein sein Absorptionsmaximum verschiebt. In Abwesenheit von Protein liegt das Absorptionsmaximum bei 465 nm, im Beisein von Protein bei 595 nm. Aus der Zunahme der Absorption bei 595 nm kann auf die Proteinkonzentration geschlossen werden [84]. Es wurden 1 µl Probe und 1 ml Bradford-Reagenz in einer Küvette vermischt und die Extinktion im Photometer bei 595 nm gemessen. Zum Vergleich diente eine Eichgerade mit einem BSA-Standard.

2.10.1.1 BCA-Test

Bicinchoninsäure (BCA) reagiert mit Cu -Ionen zu einem violetten Farbkomplex. Dadurch eignet es sich zur Messung der freigesetzten Cu-Ionen bei Reaktion von Protein mit alkalischen Cu (Biuret-Reaktion) [85]. Für die Proteinbestimmung nach BCA-Methode wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo

Scientific) verwendet. Die Durchführung orientiert sich an den Herstellerangaben. Mit dem mitgelieferten BSA-Standard (2 mg/ml) wurde eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Die Proben wurden vor der Messung 1:10 verdünnt. Auf eine Mikrotiterplatte wurden pro Loch 25 µl BSA-Lösung oder Probe aufgetragen. Pro Loch wurden 200 µl Arbeitsreagenz hinzugefügt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Absorbanz bei 540 nm mit einem Mikrotestplattenlesegerät gemessen und die Proteinkonzentrationen errechnet.

2.10.2 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Auftrennungsverfahren von Proteinen nach ihrer Größe. Es basiert darauf, dass Moleküle verschiedener Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell durch eine Gelmatrix aus Polyacrylamid wandern. Das stark negativ geladene Sodiumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Proteine an und überdeckt ihre Eigenladung. Außerdem verhindert es hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Moleküle und löst so die höheren Proteinstrukturen auf. Es entstehen negative linearisierte SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse. Dementsprechend werden die negativ geladenen Proteine nur noch nach ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proben wurden zur Denaturierung vor dem Auftragen für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte mit diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli [86]. Zwischen 2 vertikale Glasplatten mit 1,5 mm Abstand (Bio-Rad) wurde zunächst das Trenngel auf eine Höhe von 5,5 cm gegossen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde darüber 1,5 Sammelgel pipettiert und mit einem Plastikkamm 10 Taschen geformt. Die Polymerisation der Monomere Acrylamid und Methylenbisacrylamid erfolgt durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED). In dem Sammelgel mit geringerem Acrylamidgehalt (3 %) werden die Proteine fokussiert um dann nahezu gleichzeitig in das Trenngel einzuwandern. Das Trenngel verfügt über wesentlich kleinere Poren (10 % Acrylamid) und einen höheren pH-Wert. Hier erfolgt die eigentliche Auftrennung nach Molekulargröße.

Die Proben wurden 1:1 in Lämmli-Laufpuffer verdünnt und aufgetragen. Darin enthalten sind SDS und β-Mercaptoethanol um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen und Disulfidbrücken zu spalten. Die Auftrennung erfolgte bei

einer elektrischen Spannung von 60 V im Sammelgel und 140 V im Trenngel. Zur Überprüfung wurde immer ein Marker (PeqGold V, Peqlab) mit gefärbten Proteinen bekannter Größen in eine der Taschen aufgetragen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Elektrophoresegele

Material	**Sammelgel**	**Trenngel 10 %**
H_2O	2,85 ml	4 ml
3M Tris pH 8,8	-	2,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-
10% SDS	50 µl	100 µl
Acrylamid	850 µl	3,33 ml
APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.10.3 Membrantransfer

Nach Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran [87]. Dies erfolgte nach der Semi-Dry-Methode. Auf zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und darauf blasenfrei das Gel. Dieses wurde wiederum von zwei Filterpapieren bedeckt. Alle Komponenten wurden in Transferpuffer getränkt in einer Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad) platziert, und für 75 min eine Spannung von 16 V angelegt. In dem elektrischen Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.

2.10.4 Coomassie-Blau-Färbung

Nach dem Transfer wurde das Gel mit einer Coomassie-Färbung angefärbt um die Transfereffizienz zu überprüfen und die verbliebenen Banden darzustellen [88]. Das Gel wurde für 15 min in Coomassie-Brillant-Blau-Farblösung eingelegt. Dann wurde es für 10 min mit einem Schnellentfärber (10 % Eisessig + 30 % Methanol) entfärbt. Das Gel wurde über Nacht in Aqua dest. auf dem Schüttler bewegt und am nächsten Tag fotografiert.

2.10.5 Immundetektion von Proteinen

Auf der Nitrozellulosemembran wurden mittels Antikörpermarkierung spezifisch Proteine nachgewiesen. Dazu verwendet man einen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein und einen Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym, z.B. Meerrettichperoxidase gekoppelt, das dann ein Farbsignal erzeugt. Direkt nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für 45 min in Blockierlösung (2,5 % Michpulver + 2,5 % BSA) bedeckt um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Daraufhin erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein bei 4° C. Die Membran wurde dreimal für 10 min in TBS-Tween gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei 4° C inkubiert. Nach Inkubation wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Visualisierung erfolgte nach der ECL-Methode. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Reaktion von Meerrettichperoxidase (HRP) mit Luminol im Beisein von H_2O_2 zu einer Lichtemission führt [89]. Luminol ist in der ECL-Lösung I und H_2O_2 in der ECL-Lösung II enthalten. Die beiden ECL-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für mindestens eine Minute darin geschwenkt. Das entstehende Lichtsignal wurde fotografisch festgehalten.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Typ	Hersteller	Konzentration
a-Cox-2 (human)	Polyklonal, Ziege	SantaCruz	1:200
a-Cox-2 (Ratte)	Polyklonal, Kaninchen	ThermoScientific	1:200
a-GAPDH	Monoklonal, Maus	Millipore	1:3000
a-β-Actin	Monoklonal, Maus	Sigma	1:20000

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Schaf-anti-Maus IgG, HRP	GE Healthcare	1:10000
Esel-anti-Kaninchen IgG, HRP	GE Healthcare	1:5000
Esel-anti-Ziege IgG, HRP	Santa Cruz	1:3000

2.10.6 Densitometrie

Zur Auswertung der Western Blots wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt. Die IDV (integrated density values) für Cox-2 wurden durch die IDV für GAPDH (als ein konstant und in immer gleicher Menge vorhandenes Protein) geteilt, um Unterschiede in der Beladung der Taschen auszugleichen. In jedem Set wurden die Werte auf die Kontrolle (ohne Stimulation) bezogen und als Vielfache der Kontrolle angegeben.

2.11 mRNA-Analyse mittels Polymerasekettenreaktion

2.11.1 Prinzip

Um die Expression eines Gens zu untersuchen, kann die Ribonukleinsäure (RNA) isoliert werden und mittels einer reversen Transkriptase in komplementäre Desoxyribonuleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Diese cDNA der gesuchten messenger RNA (mRNA) lässt sich dann mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigen und analysieren.

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Man benötigt ein Primerpaar, das mit den flankierenden Sequenzen des Zielgens hybridisiert, alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase [90]. Zunächst wird die Probe auf 95° C erhitzt um die Doppelstränge zu trennen. Darauf folgt eine Abkühlung der Lösung auf eine Temperatur, bei der die Primer mit jeweils einem Strang hybridisieren können (Annealing). Im nächsten Schritt wird die Lösung auf das Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase erhitzt und es erfolgt die DNA-Synthese (Elongation). Diese drei Schritte bilden einen Amplifikationszyklus und werden wiederholt bis die gewünschte Menge an DNA entstanden ist [91]. Das Amplifikationsprodukt kann mithilfe einer Gelelektrophorese dargestellt werden.

Die Real-time PCR stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar. Hierbei steht nicht so sehr das Endergebnis der PCR, sondern die Reaktionskinetik während der Vervielfältigung im Vordergrund. Das Prinzip basiert darauf, dass man dem Reaktionsansatz eine Substanz zugibt, die bei Bindung an doppelsträngige DNA ihre Fluoreszenz verändert. In jedem Amplifikationszyklus wird zu einem festgelegten Zeitpunkt die Fluoreszenz gemessen. Aus der Fluoreszenzkinetik lassen sich Rückschlüsse auf die

ursprüngliche Menge an Ziel-cDNA in dem Reaktionsansatz ziehen. Je weniger Zyklen notwendig sind, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen, umso größer war die ursprüngliche Zahl der Kopien in dem Ansatz [92]. Die Expression des Zielgens wird in jeder Probe auf ein Referenzgen mit konstanter Expression (18 S rRNA) bezogen. Die Auswertung erfolgte nach der 2^{-ddCt} Methode zur relativen Quantifizierung [93].

2.11.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Das Prinzip beruht darauf, die Zellen zu lysieren und die RNA von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, ohne dass die RNA dabei durch ubiquitär vorhandene RNAsen zerstört wird. Dazu dient ein Lysepuffer mit hohen Konzentrationen an chaotropen Salzen die zu einer Zelllyse und Inaktivierung der DNAsen führen. Außerdem werden so optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an eine Silica-Membran geschaffen. Kontaminierende DNA, die ebenfalls an die Membran bindet, wird im nächsten Schritt durch Zugabe von DNAse zerstört. Durch verschiedene Waschschritte werden Salze, Metaboliten und Zellbestandteile entfernt. Die reine RNA wird schließlich in RNAsefreies Wasser aufgenommen. Vor Beginn der RNA-Isolierung wurden die Zellen durch 10 maliges Aufziehen mit einer Insulinspritze homogenisiert, sowie Rückenmark und Pfotengewebe im Homogenisator mechanisch zerkleinert. Das folgende Protokoll orientiert sich an den Herstellerangaben des Kits. Die Probe wurde auf den violetten Filter geben und 1 min bei 11000 g zentrifugiert (Homogenisierung). Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70 % Ethanol vermischt, auf den blauen Filter (enthält Silica-Membran) gegeben und für 30 s bei 11000 g zentrifugiert (Bindung an die Membran). Es wurden 350 µl MDB (membrane desalting buffer) hinzugegeben und für 1 min zentrifugiert. 95 µl Reaktionsmix (90 µl Reaction Buffer + 10 µl rDNase pro Reaktion) wurden auf die Membran pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert zur Zerstörung der DNA. Nun folgten mehrere Waschschritte: 200 µl RA2-Wasch-Puffer und 30 s zentrifugieren, 600 µl RA3-Wasch-Puffer und 30 s zentrifugieren, 250 µl RA3 Puffer und 2 min zentrifugieren. Schließlich erfolgte die Elution in ein neues Röhrchen mit 40 µl Aqua dest. und 1 min zentrifugieren. Die RNA wurde bei -80° C gelagert.

2.11.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Das Prinzip besteht darin, die RNA mithilfe einer reversen Transkriptase in DNA umzuwandeln [94]. Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um eine rekombinante Moloney murine leukaemia virus reverse Transkriptase. Random Primer sind Oligonukleotide aus einer zufälligen Kombination von Nukleotiden. Sie dienen der Anlagerung der reversen Transkriptase und sind somit Startpunkt der cDNA-Synthese. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) fungieren als DNA-Bausteine. Pro Reaktion wurden 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM) 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µl RNAse Inhibitor sowie 1 µg RNA in 13,2 µl Nuclease-freiem Wasser eingesetzt. Das Pipettieren aller Schritte erfolgte auf Eis. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, im Cycler platziert und durchliefen ein Programm von 10 min bei 25° C, 120 min bei 37° C und 5 min bei 85° C. Die Lagerung der Proben erfolgte kurzfristig bei 4° C oder langfristig bei -20° C.

2.11.4 Durchführung der konventionellen PCR

Zur Vervielfältigung der erstellten cDNA diente ein Mastermix aus PCR Puffer, $MgCl_2$, dH_2O, GoldTAQ (alle Applied Biosystems), den Primern (forward und reverse) sowie der cDNA (Tabelle 5). Bei der GoldTAQ handelt es sich um eine DNA-Polymerase, die von dem Bakterium Thermus aquaticus (TAQ) abstammt, und sich durch eine sehr große Hitzestabilität auszeichnet. Die GoldTAQ stellt eine Modifikation der ursprünglichen TAQ-Polymerase dar. Sie liegt zunächst in inaktiver Form vor und wird erst durch 10 minütiges Erhitzen auf 95° C zu Beginn der PCR aktiviert. Dadurch wird die Bildung von unspezifischen Nebenprodukten verringert und somit Ausbeute und Spezifität verbessert [95]. Das $MgCl_2$ stellt freie Mg^{2+} Ionen zur Verfügung, die für die Funktion der Polymerase notwendig sind. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben in dem Cycler platziert. Es erfolgte ein Programm aus 10 min bei 95° C zur Aktivierung der DNA-Polymerase und dann 35 Zyklen bestehend aus 30 s Strangtrennung bei 95° C, 30 s Annealing bei 57° C (Cox-2) oder 62° C (GAPDH) und 30 s Elongation bei 72° C. Anschließend erfolgten 10 min bei 72° C und dann 4° C bis zur Entnahme der Proben. Zur Visualisierung wurden die Proben im Anschluss auf ein Gel aufgetragen. Das Gel besteht aus 2 g Agarose auf 100 ml H_2O + 10 µl SYBR Safe

DNA Gel Stain (Invitrogen). SYBR Safe ist ein Farbstoff, der an die cDNA bindet und durch UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Es wurden 10 µl Probe mit 2 µl 10x BlueJuice Laufpuffer (Invitrogen) gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Es erfolgte eine Elektrophorese bei 90 V für 35 min. Dann wurde das Gel bei UV-Licht fotografiert.

Tabelle 5: Pipettierschema pro Reaktionsansatz der konventionellen PCR

Substanz	Menge
10x PCR Puffer II	2 µl
$MgCl_2$	1 µl
dH_2O	18 µl
GoldTAQ	0,25 µl
Primer (forward und reverse, jeweils 1:10 verdünnt mit H_2O)	1,75 µl
cDNA	2,5 µl

Tabelle 6: Verwendete Primer (konventionelle PCR)

Gen	Forward Primer (5‘-3‘)	Reverse Primer (5‘-3‘)
Cox-2	GAACAACATTCCCTTCCTTCG	GAAGTTCCTTATTTCCTTTCACACC
GAPDH	GGTCGGTGTGAACGGATTTG	GTGAGCCCCAGCCTTCTCCAT

2.11.5 Durchführung der quantitativen Real-time PCR

Ein Reaktionsmix-Ansatz besteht aus 12,5 µl Absolute SYBR Green ROX Mix (ThermoScientific), 1,75 µl Forward Primer, 1,75 µl Reverse Primer (beide 1:33 verdünnt) und 4 µl nuklease-freiem Wasser. Der Absolute SYBR Green ROX Mix enthält eine Thermo-Start DNA-Polymerase, dNTPs, einen Reaktionspuffer, SYBR Green I und ROX. Die Thermo-Start DNA-Polymerase wird durch 15 minütiges Erhitzen auf 95° C vor Beginn der PCR aktiviert. Bei SYBR Green I handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an Doppelstrang-DNA anlagert und dabei fluoresziert.

Das Fluoreszenzsignal ist proportional zu der Menge an Doppelstrang-DNA. ROX ist ein Referenzfarbstoff zur Normalisierung der Daten. Jeweils 20 µl Reaktionsmix wurden auf eine 96-Loch-PCR-Platte (ThermoScientific) pipettiert. Die cDNA wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und davon 5 µl zu dem Reaktionsmix dazugegeben. Es erfolgten immer Dreifachbestimmungen. Die Platte wurde mit einer durchsichtigen Klebefolie (ThermoScientific) überzogen, kurz zentrifugiert und in dem Cycler platziert. Es folgte ein Programm mit 15 min bei 95° C zur Aktivierung der Polymerase und dann 50 Zyklen bestehend aus 1 min Annealing und Elongation bei 60° C und 15 s Strangtrennung bei 95° C. Am Ende der Elongationsphase wurde in jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Im Anschluss daran wurde zur Überprüfung der Primer-Spezifität eine Schmelzkurve erstellt. Dabei wird die Platte langsam bis auf 95° C erhitzt und in kurzen Abständen die Fluoreszenz gemessen. Da jedes bei der Vervielfältigung entstandene Produkt eine spezifische Schmelztemperatur hat, kann man an dem Verlauf der Schmelzkurve sehen, ob unerwünschte Nebenprodukte entstanden sind. In den Schmelzkurven ist die Änderungsrate der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Die Ergebnisse wurden nur verwertet, wenn die Schmelzkurve eine hohe Primer-Spezifität zeigte (Abbildung 5). Zur Auswertung wurde manuell eine Linie im Bereich der exponentiellen Vervielfältigung gelegt und die Schnittpunkte der Amplifikationskurven mit dieser Linie ermittelt. Da immer eine Dreifachbestimmung vorlag, wurden die Schnittpunkte gemittelt und Ausreißer eliminiert. Dann wurde die Differenz aus dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve für Cox-2 und dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve des Referenzgens (18S rRNA) gebildet und dieses als negative Potenz von 2 gesetzt. Jeweils eine Probe wurde als Kontrolle auf eins normiert und für die anderen Proben die vielfache mRNA Expression im Vergleich zu dieser Kontrolle errechnet.

Tabelle 7: Verwendete Primer (quantitative PCR)

Gen	**Forward Primer (5‘-3‘)**	**Reverse Primer (5‘-3‘)**
Cox-2	TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG	GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC
18 S-rRNA	ATGGTTCCTTTGGTCGCTCG	GAGCTCACCGGGTTGGTTTT

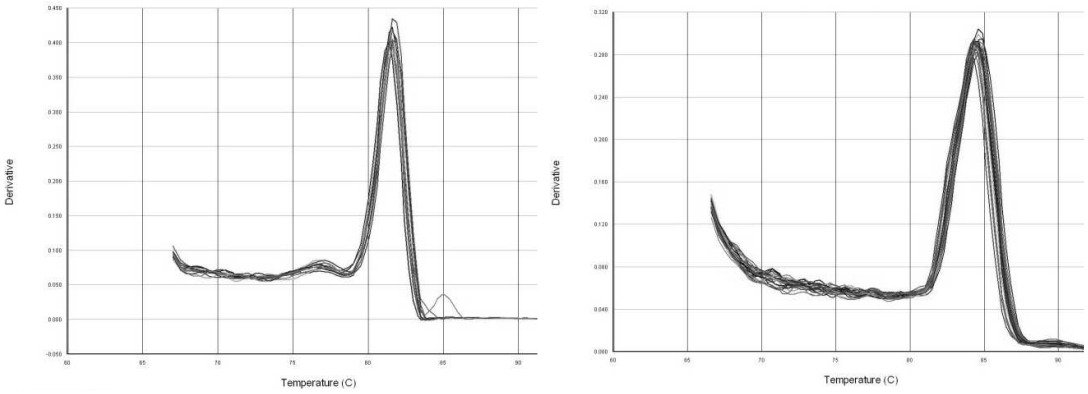


Abbildung 5: Darstellung der Schmelzkurven für Cox-2 (links) und 18S rRNA (rechts)

2.12 Verhaltensexperimente

Die Verhaltensexperimente stellen die Grundlage der Untersuchungen dar und wurden von Frau Diana Pflücke (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Würzburg) durchgeführt. Zur Messung von mechanischer Hyperalgesie wurden die Pfotendruckschwellen (PPT) nach modifiziertem Randall-Selitto Test bestimmt. Dazu wird mit dem Stempel eines Pfotendruckalgesiometers (Ugo Basile, Comerio, Italien) zunehmend Druck ausgeübt bis zum Wegziehen der Pfote. Die Werte in g entsprechen dem auf den Stempel einwirkenden Gewicht. Die PPT wurden jeweils für beide Seiten bestimmt, vor und nach einseitiger intraplantarer Injektion von 3 µg CCL2.

2.13 Verwendete Lösungen

Blockierlösung: 2,5 % Trockenmilchpulver (Roth) + 2,5 % Bovines Serumalbumin (Sigma) in TBS-Tween

Bradford-Reagenz: Bio-Rad Protein Assay 1:5 verdünnt in Aqua dest.

Dextran-Lösung: 3 % Dextran (Roth) in 0,9 % Kochsalzlösung

ECL-Lösung I: 44,25 mg Luminol + 6,512 mg p-Hydroxycoumarinsäure (beide Sigma) + 5 ml Tris 1 M pH 8,8 auf 50 ml H_2O

ECL-Lösung II: 5 ml Tris 1 M pH 8,8 + 32 µl H_2O_2 (Sigma) auf 50 ml H_2O

Elektrophorese-Puffer: 3 g Tris + 14,4 g Glycin + 1 g SDS (alle Sigma) auf 1 l H_2O

Komplettmedium: 500 ml RPMI (Gibco Invitrogen) + 50 ml FCS (PAA Laboratories) + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

Lämmli-Laufpuffer: 12,5 ml 1 M Tris (AppliChem) + 40 ml 10 % SDS + 37,7 g Glycerol + 1 ml Bromphenolblau auf 100 ml H_2O, vor Gebrauch Zugabe von 50 µl ß-Mercaptoethanol (alle Sigma) auf 950 µl Laufpuffer

MACS-Puffer: 250 ml PBS (Biochrom AG) + 0,5 % BSA (Sigma) + 2 mM EDTA (Roth)

RIPA-Puffer: 1 % Igepal CA-630 + 0,5 % Natriumdesoxycholat + 0,1 % SDS (alle Sigma) in PBS, vor Gebrauch 1 Tablette Protease-Inhibitoren (Roche) auf 10 ml Puffer

TAE-Puffer: 4,848 g Tris + 2 ml 0,5 M Na_2 EDTA + 1,2 ml Eisessig auf 1 H_2O

TBS-Tween: 1,21 g Tris + 8,77 g NaCl + 500 µl Tween 20 auf 1 l H_2O

Thioglykollat-Lösung: 3 % Thioglykollat (Sigma) in Aqua dest.

Transferpuffer: 3 g Tris + 14,4 g Glycin + 200 ml Methanol auf 1 l H_2O

2.14 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FluorChem FC2, MultiImage II	Alpha Innotech, Cell Biosciences, USA
Image Master VDS Gel Documentation System	Pharmacia Biotech, Schweden
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, USA
Photometer HP 8453	Hewlett Packard Company, USA
Sonopuls HD 3080	Bandelin electronic, Berlin
Steri-Cult 200 Incubator	Thermo Scientific, USA
Sunrise Microplate Reader	Tecan, Schweiz
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, USA
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, USA
VarioMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

2.15 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Programm	Verwendung	Hersteller
7300 System Software	Real-time PCR	Applied Biosystems, USA
Alpha View Version 1.3.0.7	Western Blot	Alpha Innotech,Cell Biosciences, USA
EndNote X4	Literatur	Thomson Reuters, USA
Magellan Version 5.01	ELISA	Tecan, Schweiz
Microsoft Excel 2003	Statistik	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word 2007	Textverarbeitung	Microsoft Corporation, USA
Sigma Plot Version 11.0	Grafik	Systat Software Inc., USA
Sigma Stat Version 3.5	Statistik	Systat Software Inc., USA

2.16 Statistik und Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler angegeben. Bei Vergleichen von zwei Gruppen und vorliegender Normalverteilung wurde ein t-Test durchgeführt, bei nicht normalverteilten Daten ein Mann-Whitney-Rangsummentest. Bei Vergleichen von mehreren Gruppen wurden Varianzanalyen (ANOVA) verwendet, bei nicht normalverteilten Daten ANOVA on ranks. Zur Subgruppenanalyse wurde bei Normalverteilung die Holm-Sidak-Methode gewählt und bei nicht normalverteilten Daten wurde die Dunnett's Methode verwendet. Ergebnisse mit $p < 0{,}05$ wurden als signifikant gewertet.

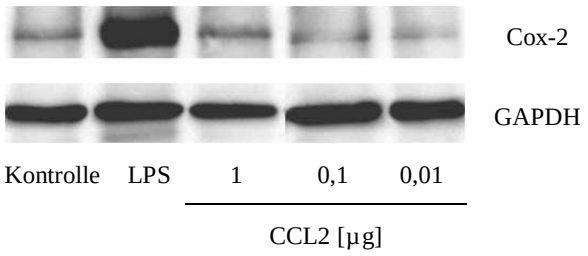
3 Ergebnisse

Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass CCL2 nach intraplantarer Injektion zu einer Hyperalgesie in Ratten führt und diese Hyperalgesie durch systemische Applikation eines selektiven Cox-2 Hemmers reversibel ist. Daher sollte nun untersucht werden, inwieweit CCL2 in vitro zu einer Cox-2 Induktion in Monozyten/ Makrophagen führt. Gegenstand der Untersuchungen waren sowohl humane Monozyten als auch Peritonealmakrophagen der Ratte.

3.1 Cox-2 in humanen Monozyten nach CCL2 Stimulation

Die Cox-2 Proteinexpression in humanen Monozyten wurde mittels Western Blot untersucht. Parallel erfolgte die Bestimmung der PGE_2-Konzentration in den Überständen dieser Zellen. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um CD14+-Monozyten, die durch magnetische Zellseparation aus dem Blut gewonnen wurden. Bereits unter Basalbedingungen besteht eine schwache Cox-2 Expression. LPS, als ein starker Induktor der Cox-2 in Monozyten [96, 97] wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Stimulation von $1x10^7$ Zellen erfolgte mit CCL2 in den Konzentrationen 1, 0,1 und 0,01 µg/ml. Nach 3 h Stimulation kommt es zu keiner verstärkten Expression von Cox-2, während eine deutliche Cox-2 Induktion durch LPS zu erkennen ist. Auch verschiedene andere Zeitpunkte (1, 6 und 12 h) wurden untersucht und ergaben ebenfalls keine Cox-2 Induktion durch CCL2 (nicht dargestellt). Abbildung 6A zeigt exemplarisch einen Western Blot und Abbildung 6B die densitometrische Auswertung von verschiedenen Western Blots (n = 4-8). Die Werte wurden auf die Kontrolle (ohne Stimulation) bezogen und als Vielfache der Kontrolle angegeben.

A



B

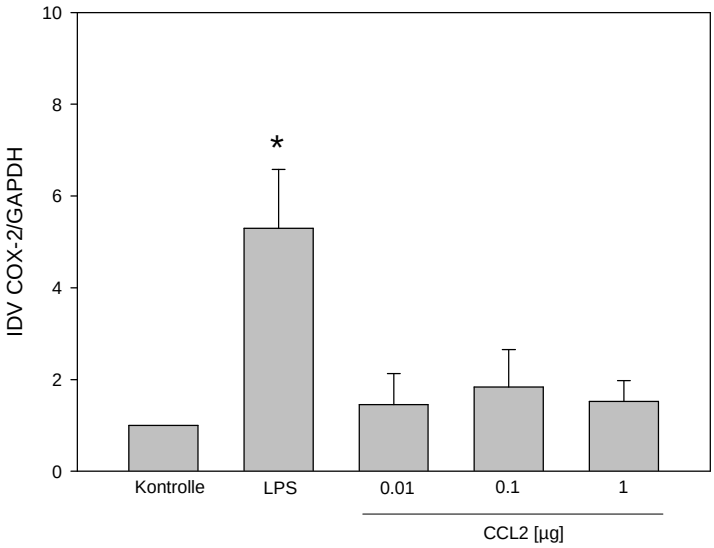


Abbildung 6: Cox-2 Expression in humanen Monozyten. (**A**) Western Blot nach 3 h LPS- und CCL2-Stimulation in drei verschiedenen Konzentrationen, GAPDH diente als Ladekontrolle (**B**) Densitometrische Auswertung verschiedener Cox-2 Western Blots, IDV Cox-2/IDV GAPDH, die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt (n = 4-6, RM-ANOVA Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$)

Die Zellüberstände der CCL2-stimulierten Monozyten wurden von den Zellen getrennt und der Gehalt an PGE_2 mittels ELISA bestimmt. LPS führt zu einem signifikanten Anstieg der PGE_2 Konzentration ($p < 0,001$), während CCL2 nicht zu einer Freisetzung von PGE_2 aus humanen Monozyten führt (n = 8). Unter Kontrollbedingungen lag die mittlere PGE_2 Konzentration bei 39,86 pg/ml und wurde durch Stimulation mit LPS auf 2939,88 pg/ml gesteigert.

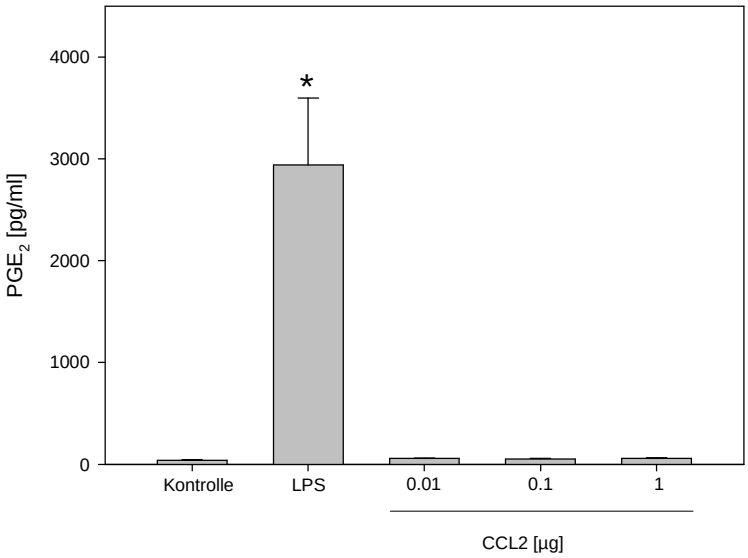


Abbildung 7: PGE_2-Gehalt in Überständen von humanen Monozyten nach 3 h Inkubation mit LPS oder CCL2 in verschiedenen Konzentrationen (n = 8, RM-ANOVA Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$)

3.2 PGE_2 Freisetzung von Monozyten und Granulozyten

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob für die Cox-2 Induktion eine Interaktion von Monozyten und Granulozyten notwendig ist. Dazu wurden humane Monozyten und Granulozyten (PMN) im Verhältnis 1:1 koinkubiert. Die Stimulation mit CCL2 erfolgte in den gleichen Konzentrationen wie bei den Monozyten. Nach 3 h wurden die Zellüberstände auf ihren PGE_2 Gehalt untersucht. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen unstimulierten Monozyten und den mit CCL2-stimulierten Monozyten und Granulozyten.

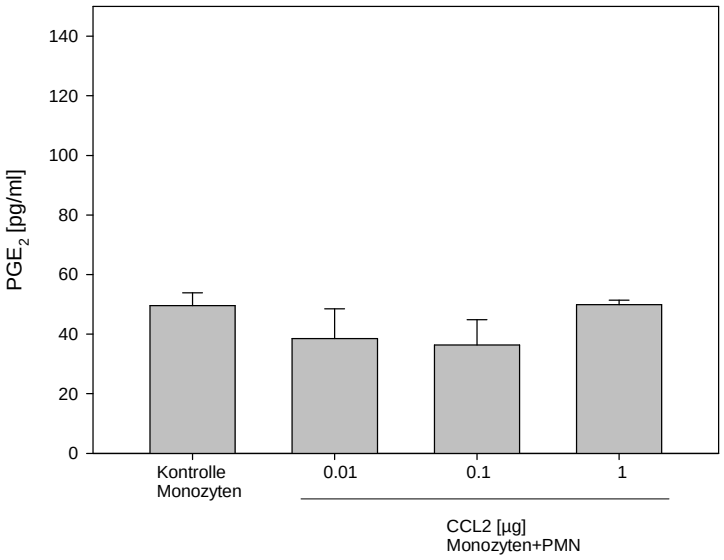


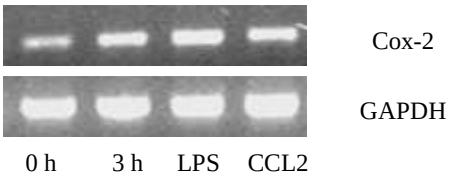
Abbildung 8: PGE_2 Gehalt in Zellüberständen von humanen Monozyten und Granulozyten nach 3 h Stimulation mit CCL2 in verschiedenen Konzentrationen (n = 3)

3.3 Cox-2 in Peritonealmakrophagen der Ratte

Neben den humanen Monozyten wurden auch Makrophagen der Ratte mit CCL2 stimuliert und die Cox-2 Expression untersucht. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Peritonealmakrophagen nach Thioglykollat-Injektion. Die Cox-2 mRNA wurde nach CCL2 Stimulation mittels RT-PCR bestimmt. Abbildung 9A zeigt die Agarose-Gelelektrophorese einer konventionellen RT-PCR. 3 h Kulturbedingungen ohne Chemokin-Stimulation führen bereits zu einem Anstieg an Cox-2 mRNA. Dieser wird durch LPS Stimulation weiter gesteigert, durch CCL2 Stimulation jedoch nicht. Abbildung 9B zeigt die Auswertung der quantitativen Real-time PCR. Es erfolgte eine

relative Quantifizierung, der mRNA Gehalt ist als Vielfaches der Kontrolle angegeben. Bei bereits hoher Cox-2 Expression unter Kontrollbedingungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und den LPS oder CCL2-stimulierten Zellen (n = 3, ANOVA p > 0,05).

A



B

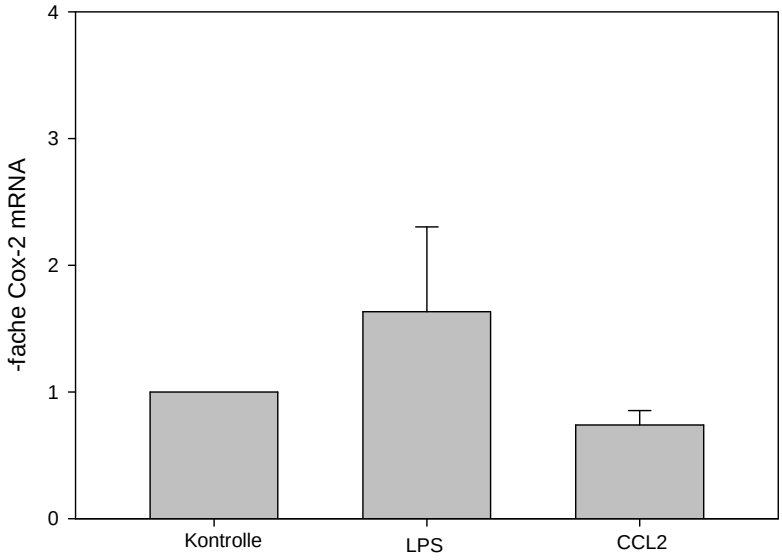


Abbildung 9: Cox-2 mRNA in Peritonealmakrophagen der Ratte. (**A**) Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte, unstimulierte Zellen nach 0 und 3 h sowie LPS- und CCL2-Stimulation mit 3 h Inkubation. (**B**) Real-time PCR mit relativer Quantifizierung der Cox-2 mRNA aus Peritonealmakrophagen der Ratte nach 3 h LPS- und CCL2-Stimulation (n = 3, ANOVA p > 0,05)

In den Zellüberständen wurden, analog zu den humanen Monozyten, die PGE_2 Konzentrationen bestimmt (Abbildung 10). Insgesamt zeigen sich bereits in nicht stimuliertem Zustand deutlich höhere PGE_2 Konzentrationen als bei humanen Monozyten. Sie lagen bei 863,76 pg/ml und nach LPS Stimulation bei 1237,01 pg/ml. Entsprechend kommt es durch LPS zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Freisetzung von PGE_2. CCL2 führt nicht zu einer PGE_2-Freisetzung (n = 6-9, RM-ANOVA $p > 0,05$).

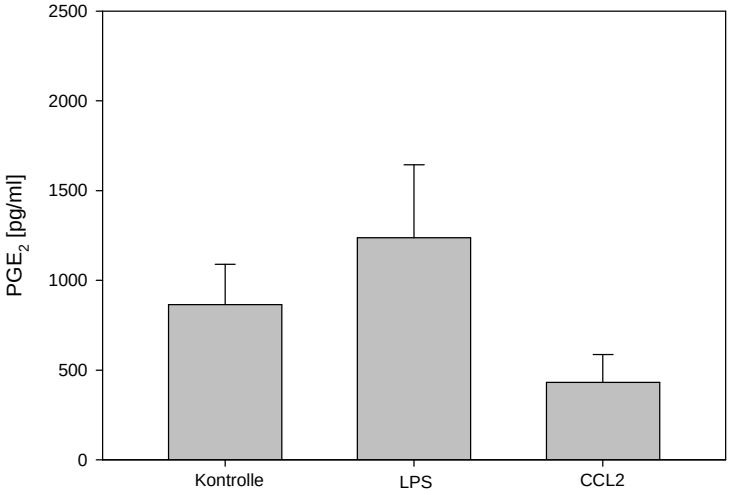


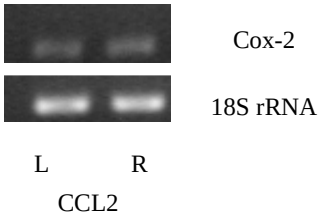
Abbildung 10: PGE_2-Gehalt in Zellüberständen von Peritonealmakrophagen der Ratte nach 3 h LPS oder CCL2 Inkubation (n = 6-9, RM-ANOVA $p > 0,05$)

3.4 Zentrale Cox-2 Expression nach intraplantarer CCL2 Injektion

Da es im Rahmen von peripheren Entzündungsreaktionen auch zu einer Induktion von Cox-2 im ZNS kommen kann [69] sollte im nächsten Schritt die Cox-2 Expression im lumbalen Rückenmark und die PGE_2 Konzentration im Liquor nach intraplantarer CCL2 Injektion untersucht werden. 3 h nach CCL2 Injektion in die rechte Pfote wurde das lumbale Rückenmark entnommen und rechte und linke Hälfte separat auf ihren Cox-2 mRNA Gehalt untersucht. Abbildung 11A zeigt eine konventionelle RT-PCR der Rückenmarkhälften. Es ist kein Unterschied zwischen rechter (=injizierter) und linker (=nicht-injizierter) Hälfte zu erkennen. In Abbildung 11B ist die relative Quantifizierung der Cox-2 mRNA im Rückenmark durch Real-time PCR dargestellt. Auch hier zeigt sich kein Unterschied zwischen injizierter und nicht-injizierter

Rückenmarkhälfte. Injektion von CCL2 in die Pfote führt also zu keiner Herauf-regulation von Cox-2 mRNA im lumbalen Rückenmark der Ratte.

A



B

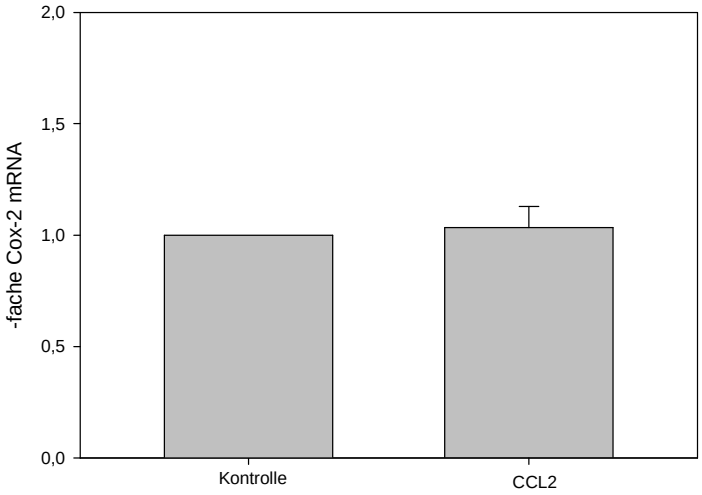


Abbildung 11: Cox-2 Expression in lumbalem Rückenmark der Ratte nach intraplantarer CCL2 Injektion. (**A**) Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte: Vergleich von linker und rechter Rückenmarkhälfte 3 h nach CCL2 Injektion in die rechte Pfote (**B**) Real-time PCR mit relativer Quantifizierung der Cox-2 mRNA aus Rückenmark der Ratte 3 h nach intraplantarer CCL2 Injektion (n = 8, Mann-Whitney-Rangsummentest $p > 0,05$)

Zur Untersuchung von zentraler Prostaglandin-Produktion nach intraplantarer CCL2 Injektion wurde den Ratten nach 3 h Liquor aus der Cisterna magna entnommen und mittels ELISA die PGE_2-Konzentration bestimmt. Als Positivkontrolle wurde komplettes Freundsches Adjuvans (CFA), eine entzündungsverursachende Substanz, verwendet. CFA führt zu einer signifikanten PGE_2-Freisetzung in den Liquor (n = 3, ANOVA $p < 0,05$). Der PGE_2 Gehalt im Liquor wird durch CFA von 242,78 pg/ml auf

701,96 pg/ml gesteigert. Durch intraplantare CCL2 Injektion dagegen wird der PGE_2 Gehalt im Liquor nicht signifikant verändert (n = 8) (Abbildung 12).

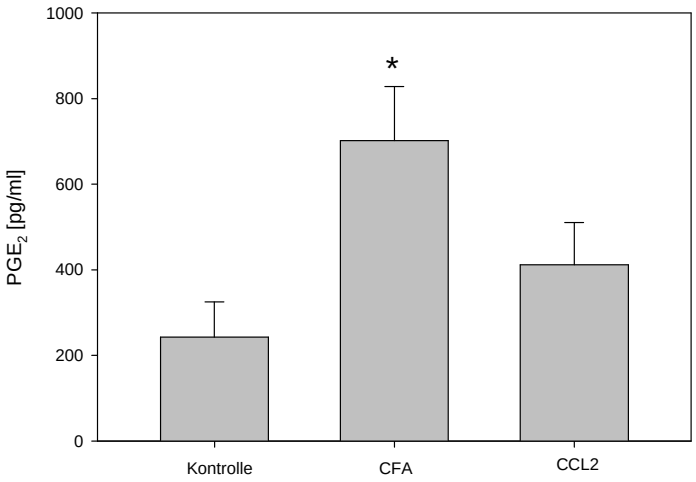
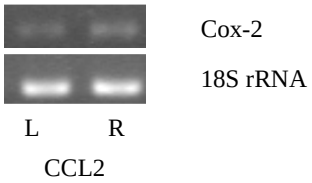


Abbildung 12: PGE_2-Konzentrationen im Liquor 3 h nach CFA oder CCL2 Injektion (für CFA n = 3, Kontrolle und CCL2 n = 8, ANOVA $p < 0,05$)

3.5 Cox-2 Expression in der entzündeten Pfote

Da CCL2 nicht zu einer direkten Cox-2 Induktion in Monozyten/ Makrophagen in vitro führt, sollte nun untersucht werden ob es in vivo zu einer lokalen Cox-2 Induktion nach CCL2 Exposition kommt. Dazu wurde CCL2 in die Rattenpfote injiziert und nach 3 h das Pfotengewebe entnommen. Die Cox-2 Expression in der entzündeten Pfote wurde mit RT-PCR untersucht. Die nicht-injizierte Gegenseite diente als Kontrolle. Abbildung 13A zeigt eine konventionelle PCR und Abbildung 13B die relative Quantifizierung nach Real-time PCR des Pfotengewebes. Die Injektion von CCL2 führt zu einem signifikanten Anstieg der Cox-2 mRNA in der Pfote (n = 14, Mann-Whitney-Rangsummentest $p < 0,05$). Nach 3 h verdoppelt sich die Cox-2 mRNA in der entzündeten Pfote.

A



B

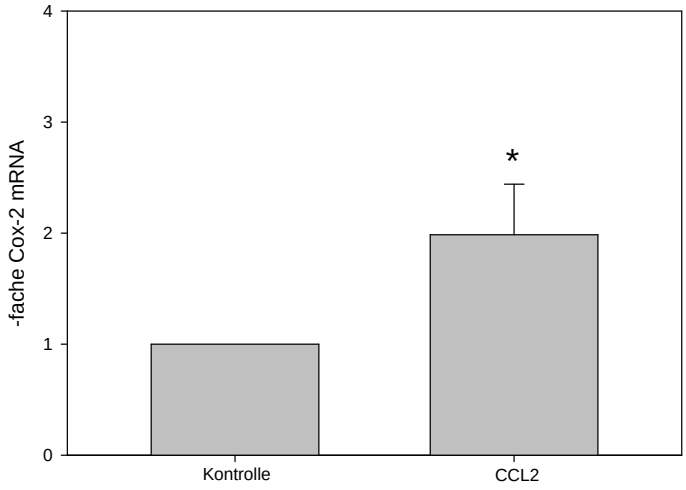


Abbildung 13: Cox-2 Expression in der Pfote nach CCL2 Injektion. (**A**) Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte von Pfotengewebe 3 h nach CCL2 Injektion in die rechte Pfote, die Gegenseite (links) diente als Kontrolle (**B**) Real-time PCR mit relativer Quantifizierung der Cox-2 mRNA (n = 14, Mann-Whitney-Rangsummentest $p < 0{,}05$).

3.6 Lokale Hemmung von Cox-2 in der Pfote

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CCL2 Injektion zu einer Induktion von Cox-2 in der Pfote aber nicht im ZNS führt, sollte nun untersucht werden ob auch eine lokale Applikation des Cox-2 Hemmers Parecoxib zu einer Aufhebung der Hyperalgesie führt. Dazu wurde den Ratten vor intraplantarer Injektion von CCL2 1 mg/kg Parecoxib in die Pfote injiziert. Die mechanischen Pfotendruckschwellen wurden vor und nach CCL2 Injektion bestimmt. Lokale Applikation von Parecoxib konnte die CCL2-vermittelte Hyperalgesie aufheben. Bei Injektion von Parecoxib in die kontralaterale Pfote kam es jedoch zu der erwarteten Hyperalgesie ($n = 6$, Two-way RM-ANOVA, Holm-Sidak-Methode $p < 0.05$).

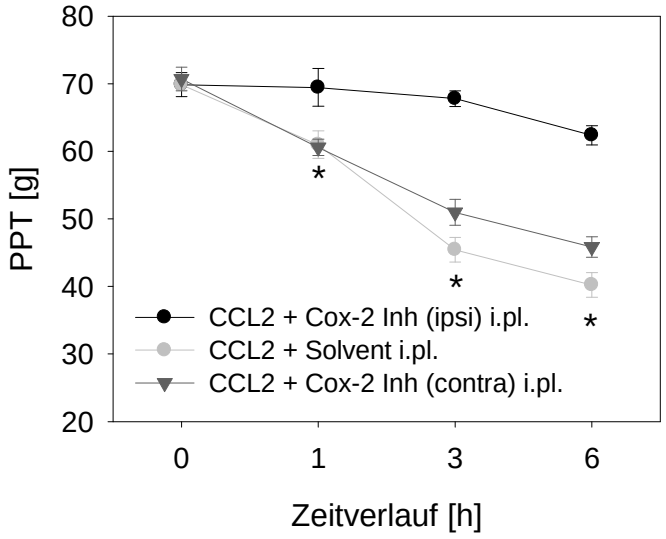


Abbildung 14: Pfotendruckschwellen im Zeitverlauf nach CCL2 Injektion und lokaler Applikation von Parecoxib, schwarze Kreise: ipsilaterale Injektion von Parecoxib vor CCL2 Injektion, graue Dreiecke: kontralaterale Injektion von Parecoxib, graue Kreise: ipsilaterale Applikation von NaCl, jeweils vor CCL2 Injektion. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (n = 6, Two-way RM-ANOVA, Holm-Sidak-Methode $p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Mechanismus in der Entstehung von Entzündungsschmerz untersucht. Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass CCL2 nach intraplantarer Injektion zu einer mechanischen und thermischen Hyperalgesie der untersuchten Ratten führt und dass diese von der Anwesenheit von Leukozyten abhängig ist. Durch Cox-Inhibitoren kann die Hyperalgesie vollständig aufgehoben werden. In isolierten humanen Monozyten und Peritonealmakrophagen der Ratte lässt sich jedoch in vitro weder eine Cox-2 Induktion noch eine PGE_2-Freisetzung durch CCL2 Stimulation beobachten. Auch die Koinkubation von humanen Monozyten und Granulozyten führt in vitro nicht zu einer PGE_2-Freisetzung nach CCL2 Stimulation, während es in der Rattenpfote zu einer Heraufregulation der Cox-2 Expression nach CCL2 Injektion kommt. Daraus schließen wir, dass die Wirkung von CCL2 nicht direkt sondern vermutlich indirekt zu einer Cox-2 Heraufregulation führt. Die intraplantare Injektion von CCL2 führt zu keiner Induktion von zentraler Cox-2 oder einer Freisetzung von PGE_2 in den Liquor, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um einen peripheren Mechanismus handelt.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Zellisolation

Humane Monozyten wurden durch magnetische Zellseparation aus Thrombozytenapheresefiltern von gesunden Spendern gewonnen. Es ergab sich eine gewisse spenderbedingte Variabilität in der Ausbeute der gewonnenen Zellen. Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde mit FACS-Analysen überprüft und lag bei etwa 95 %. Neutrophile Granulozyten wurden aus Blut von Labormitarbeitern isoliert. Auch hier wurde die Reinheit mit FACS-Analysen untersucht. Bei Koinkubation von Monozyten und neutrophilen Granulozyten war es nicht möglich Zellen des gleichen Spenders zu verwenden. Es ist daher denkbar, dass diese Ergebnisse durch Interaktion von individuumsspezifischen Oberflächenmolekülen der verschiedenen Spender beeinflusst wurden.

4.2.2 Verwendung von Thioglykollat-Makrophagen

Die Peritonealmakrophagen der Ratte wurden nach Thioglykollat-Injektion gewonnen, da es sich dabei vorwiegend um inflammatorische Makrophagen handelt. Nach Thioglykollat-Injektion kommt es innerhalb von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen zu einem Einwandern von inflammatorischen Makrophagen, während die Zahl an residenten Makrophagen im Peritonealraum abnimmt [98]. Bei den durch Thioglykollat einwandernden Makrophagen handelt es vorwiegend um CCR2-positive Zellen. In CCR2 Knockout-Mäusen kommt es zu einer deutlich eingeschränkten Makrophageneinwanderung in das Peritoneum durch Thioglykollat im Vergleich zu Wildtyp-Tieren [99]. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine Aktivierung durch Thioglykollat den Arachidonsäurestoffwechsel von Monozyten beeinflussen kann. Peres et al. konnten Unterschiede in der Aufnahme und Oxidation von Fettsäuren in Thioglykollat-Makrophagen im Vergleich zu residenten Peritonealmakrophagen der Ratte feststellen. Die Aufnahme von Arachidonsäure und anderen Fettsäuren aus dem umgebenden Medium über sechs Stunden war in Thioglykollat-Makrophagen um 50 % reduziert, gleichzeitig jedoch die Oxidationsrate deutlich erhöht [100]. Andererseits hätten bei Verwendung von residenten Peritonealmakrophagen die Zellen mehrerer Ratten gepoolt werden müssen, um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten. Die möglichen Interaktionen von Makrophagen verschiedener Ratten stellen ebenfalls einen unbekannten Einflussfaktor dar. Außerdem erscheint es wahrscheinlicher, dass bei der CCL2-induzierten Hyperalgesie inflammatorische Makrophagen beteiligt sind, und die Expression von CCR2 ist eine wichtige Voraussetzung für die beschriebenen Experimente. Daher wurden nach Thioglykollat-Injektion eingewanderte Makrophagen verwendet.

4.2.3 Wahl des Kulturmediums

Als Kulturmedium für die Experimente wurde Komplettmedium bestehend aus RPMI, 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin und Streptomycin verwendet. Von Bedeutung bei der Wahl des Kulturmediums ist, dass es keine Moleküle enthalten darf, die eine Cox-2 Induktion oder PGE_2-Freisetzung aus Monozyten verursachen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass FCS eine Ausschüttung von Arachidonsäuremetaboliten bewirken kann. Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von PGE_2 und TXB_2 aus

humanen Monozyten nach Stimulation mit dem Komplementfaktor C3b durch Anwesenheit von FCS deutlich verstärkt war. Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete auch, dass FCS in unstimulierten Zellen die spontane Eicosanoidfreisetzung hemmt [101]. Um den Effekt von FCS auf die PGE_2 Freisetzung nach CCL2 Stimulation zu untersuchen, wurden in Vorversuchen Zellen in RPMI ohne FCS stimuliert und diese Ergebnisse mit den PGE_2 Konzentrationen nach Stimulation in Anwesenheit von FCS verglichen. In dem gewählten Zeitraum von 3 h ergaben sich keine Unterschiede in den PGE_2 Konzentrationen.

4.2.4 Messung von PGE_2

Wie die meisten Eicosanoide werden Prostaglandine nicht in den Zellen gespeichert, sondern neu aus Arachidonsäure synthetisiert und freigesetzt. Im menschlichen Körper hat PGE_2 eine Halbwertszeit von ungefähr 30 s und wird schnell durch Dehydrogenasen zu inaktiven Metaboliten umgewandelt. Die Proben wurden sofort nach Gewinnung bei -80° C eingefroren und zur Messung auf Eis wieder aufgetaut. Die Proben eines Spenders wurden immer genau gleich behandelt, sodass eventuelle Abbauvorgänge in allen Proben gleichermaßen auftreten sollten. In der Auswertung wurden die PGE_2 Konzentrationen auf eine Kontrollprobe innerhalb des Sets bezogen.

4.2.5 PCR

Der Nachweis von mRNA mittels PCR ist eine sehr sensitive Methode [102]. Von Nachteil ist jedoch, dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob das entsprechende Protein auch tatsächlich synthetisiert wird. Die Real-time PCR mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff ist in ihrer Sensitivität mit anderen Real-time PCR Methoden vergleichbar. Die Spezifität ist jedoch gegenüber der Verwendung von Sonden deutlich geringer. Eventuell gebildete Nebenprodukte erzeugen ebenfalls ein Fluoreszenzsignal mit SYBR Green [102]. Um die Entstehung von Nebenprodukten auszuschließen wurde im Anschluss an die PCR immer eine Schmelzkurve erstellt (Abbildung 5). Die Ergebnisse wurden auf ein Referenzgen bezogen, wobei nicht sicher auszuschließen ist, dass dessen Expression gewissen Schwankungen unterliegt. Bei der relativen Quantifizierung kann keine Aussage über den absoluten Gehalt an mRNA gemacht werden [93].

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Cox-2 Induktion in Monozyten

4.3.1.1 Cox-2 Induktion durch CCL2

Es konnte in vitro keine Cox-2 Induktion in humanen Monozyten oder Peritoneal-makrophagen der Ratte durch CCL2 gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Tanaka et al. Diese Autoren konnten in humanen Monozyten eine Cox-2 Induktion durch CCL2 Stimulation nach einer Inkubationszeit von 24 h nach-weisen [103]. Die gewählte CCL2 Konzentration von 10 ng/ml entspricht der niedrigsten von uns untersuchten Konzentration. Die Zellen wurden jedoch im Unterschied zu unseren Experimenten nach Isolation zunächst für 12 h in Kulturmedium ausgesät um eine Adhärenz und Differenzierung der Monozyten zu erzielen. Danach erfolgte die Stimulation mit CCL2 über 24 h. Der zeitliche Rahmen unterscheidet sich wesentlich von unseren Untersuchungen. Da die CCL2 vermittelte Hyperalgesie in den Verhaltensexperimenten nach 3-6 h maximal war, wurden diese Zeitpunkte untersucht. Die unterschiedlichen Ergebnisse können sowohl durch den Zeitpunkt, als auch durch Unterschiede in dem verwendeten Kulturmedium oder dem Differenzierungsgrad der stimulierten Monozyten bedingt sein.

Die Expression des CCR2 auf den Monozyten/ Makrophagen ist eine notwendige Voraussetzung für die durchgeführten Experimente. Die humanen Monozyten wurden über magnetische Zellseparation mit CD14-Microbeads gewonnen wurden, sodass es sich bei den untersuchten Zellen vorwiegend um den inflammatorischen Typ der CD14+ CD16- Zellen handelt, die den CCR2 exprimieren. Dies konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durch CCR2-Färbungen der isolierten Zellen bestätigt werden (siehe Einleitung, Abbildung 4C). Die verwendeten Rattenzellen wurden nach Thioglykollat Injektion gewonnen, da es sich dabei vorwiegend um inflammatorische CCR2-positive Makrophagen handelt [98, 99]. Auch hier wurde die CCR2 Expression der isolierten Zellen im Vorfeld untersucht (siehe Einleitung, Abbildung 4A und B).

Als Positivkontrolle für Cox-2 Induktion wurde LPS verwendet. In den isolierten humanen Monozyten konnte immer eine signifikante Cox-2 Induktion durch LPS beo-bachtet werden. In den Thioglykollat-Makrophagen führte LPS jedoch weder zu einer

signifikanten Cox-2 Induktion, noch zu erhöhter PGE_2 Freisetzung im Vergleich zu nichtstimulierten Zellen. Möglicherweise ist dies durch eine Präaktivierung der Zellen durch Thioglykollat bedingt. Schon direkt nach der Entnahme der Zellen ist eine deutliche Cox-2 Expression zu beobachten, die durch die Kulturbedingungen allein, ohne Stimulation, noch gesteigert wird (siehe Ergebnisteil, Abbildung 9). Diese hohe basale Aktivität von Cox-2 in den isolierten Zellen könnte einen induzierenden Effekt von LPS oder CCL2 verdecken. Humes et al. zeigten in Peritonealmakrophagen der Maus, dass die PGE_2-Freisetzung nach Stimulation mit Zymosan in Thioglykollat-Makrophagen gegenüber residenten Peritonealmakrophagen deutlich herabgesetzt war [104]. Scott et al. beobachteten, dass in vitro Exposition von residenten Makrophagen mit Thioglykollat zu einer Hemmung des Arachidonsäuremetabolismus führte [105]. Auch die Reaktion auf LPS scheint in Thioglykollat-Makrophagen im Vergleich zu residenten Peritonealmakrophagen verändert zu sein. Nach 18 h Inkubation mit LPS kam es nur zu einer geringen Cox-2 Induktion in Thioglykollat-Makrophagen während LPS zu einer deutlichen Cox-2 Induktion in residenten Makrophagen führte [106]. Dies steht im Einklang mit unseren Beobachtungen, dass LPS in Thioglykollat-Makrophagen keine, oder nur eine geringe Cox-2 Induktion bewirkt. Die gewonnenen Daten zu Thioglykollat-Makrophagen der Ratte sind daher weniger aussagekräftig als die Daten zu humanen Monozyten, in denen eine grundsätzliche Induzierbarkeit von Cox-2 durch LPS gezeigt wurde.

4.3.1.2 Cox-2 Induktion durch andere Mediatoren

Neben exogenen pathogen-assoziierten Mustern wie dem bakteriellen LPS oder Mannoseresten auf unterschiedlichen Mikroorganismen [107] können auch verschiedene endogene Mediatoren, vor allem Zytokine, zu einer Cox-2 Induktion in Monozyten führen. IL-1 gehört zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen und kann von Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Neuronen und Immunzellen wie Makrophagen oder Mastzellen sezerniert werden [108]. Inkubation von humanen Makophagen mit IL-1 führt innerhalb von zwei Stunden zu einem deutlichen Anstieg der Cox-2 mRNA. Dieser Effekt scheint vor allem über eine Stabilisierung der Cox-2 mRNA bedingt zu sein [109]. Auch TNF-α ist ein bekannter Induktor von Cox-2 und führt in humanen Monozyten innerhalb von einer Stunde zu einer Cox-2 Induktion auf mRNA

Ebene, beziehungsweise innerhalb von zwei Stunden zu einem Cox-2 Anstieg auf Proteinebene [110]. Diese Zytokine könnten nach CCL2 Injektion in die Rattenpfote von umgebenden Zellen freigesetzt werden und eine Cox-2 Induktion in Monozyten bewirken. Auch durch T-Lymphozyten sezerniertes IL-17 bewirkt parakrin eine Cox-2 Induktion in humanen Monozyten [111]. Neben den Zytokinen kommen auch weitere endogene Mediatoren für eine Cox-2 Induktion in Frage. So zum Beispiel Lipidmediatoren wie Ceramide [56] oder Oxidationsprodukte reaktiver Sauerstoffradikale, wie 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Diese Aldehyde sind, im Gegensatz zu den Sauerstoffradikalen selbst, relativ stabil und an verschiedenen Zellprozessen beteiligt [112]. Kumagai et al. beobachteten, dass HNE und Cox-2 in Makrophagen kolokalisieren und HNE in einer Makrophagen-Zelllinie innerhalb von wenigen Stunden zu einer Cox-2 Induktion führt [113]. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen in Immunzellen im Rahmen der Infektabwehr. CCL2 kann in Makrophagen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies auslösen [114] und könnte somit über die Bildung von HNE zu einer Cox-2 Induktion in Makrophagen in der Rattenpfote führen.

4.3.1.3 Intrazelluläre Signalwege

Es sind je nach Stimulus, Zelltyp und Spezies verschiedene Signalwege der Cox-2 Induktion beschrieben. LPS bindet über ein vermittelndes Bindungsprotein an CD14. Dieser Komplex interagiert mit dem Toll-like receptor 4 (TLR4) und führt unter anderem zu einer Aktivierung von NFκB. Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Modulation der weiteren Vorgänge beteiligt [3]. Im Rahmen der LPS Stimulation kommt es zu einer Freisetzung von IL-1 und TNF-α durch die Monozyten. Die Regulation der Cox-2 Expression durch LPS ist jedoch unabhängig von diesen Mediatoren und erfolgt direkt auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene [115]. Insgesamt spielt der Transkriptionsfaktor NFκB eine Schlüsselrolle in der Induktion von Cox-2 und ist in den meisten Signalwegen involviert. Weitere, an der Induktion von Cox-2 beteiligte Faktoren sind EGR1, C/EBP und CRE. Sie können über die Proteinkinase C oder MAP-Kinasen aktiviert werden [116-118]. Auch die mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1 (mPGES-1) wird über NFκB etwas zeitversetzt parallel zu Cox-2 reguliert [117]. Die intrazellulären Signalwege nach Aktivierung des CCR2 sind nicht vollständig geklärt. Für chemotaktische Effekte, Integrinaktivierung und transendotheliale Migration

scheinen unterschiedliche Signalkaskaden verantwortlich zu sein. Beteiligt sind verschiedene MAP-Kinasen und Rho GTPasen [119, 120]. Unter den gegebenen Bedingungen scheint keine direkte Induktion von Cox-2 in Monozyten durch Stimulation mit CCL2 zu erfolgen. Möglicherweise fehlt dazu die Aktivierung eines weiteren Faktors in der intrazellulären Signalkaskade. Dies könnte über eine Interaktion mit anderen Zellen oder weiteren Mediatoren erfolgen.

4.3.2 Cox-2 Induktion in anderen Zellen

CCL2 wirkt hauptsächlich auf Monozyten. Zu einem geringen Anteil werden jedoch auch neutrophile Granulozyten durch CCL2 zum Entzündungsort rekrutiert. Es ist daher denkbar, dass in diesen Zellen durch CCL2 Cox-2 induziert wird. Allerdings zeigen die Verhaltensexperimente, dass nach Leukozytendepletion und Rekonstitution von Granulozyten alleine keine Hyperalgesie entsteht [76]. Erst durch die Rekonstitution von Monozyten kommt es zu einer Hyperalgesie, die durch Koinjektion von Monozyten und Granulozyten noch verstärkt wird. Daher erscheinen auch direkte Effekte von CCL2 auf andere Zellen am Entzündungsort wie Fibroblasten oder Endothelzellen unwahrscheinlich. Indirekte Effekte sind jedoch möglich. Es wäre denkbar, dass von den Monozyten Partikel oder Mediatoren freigesetzt werden, die Cox-2 in anderen Zellen induzieren. Jüngel et al. konnten zeigen, dass Mikropartikel aus Monozyten in Synovialfibroblasten zu einer Induktion von Cox-2 und mPGES-1 führen [121]. Mikropartikel sind kleine Vesikel, die von aktivierten Zellen abgeschnürt werden und entsprechend aus Membranbestandteilen und Oberflächenmarkern ihrer Ursprungszelle bestehen. Die Arbeitsgruppe konnte sogar zeigen, dass über diese Mikropartikel Arachidonsäure von den Leukozyten zu den Synovialfibroblasten transportiert wurde, und diese dann als Substrat für die PGE_2 Synthese diente [121]. In ähnlicher Weise könnten Monozyten zu einer Cox-2 Induktion in umliegenden Zellen im Pfotengewebe führen. Auch in Granulozyten können Monozyten eine Cox-Induktion bewirken. Die Überstände LPS-stimulierter Monozyten führen zur Bildung von PGE_2 in humanen Granulozyten, vermutlich über die Freisetzung von TNF-α [122]. Granulozyten allein scheinen keine proinflammatorischen Mediatoren freizusetzen oder eine Hyperalgesie auszulösen [16, 18], in Kombination mit aktivierten Monozyten könnten sie jedoch eine Quelle proalgetischer Zytokine und Prostaglandine darstellen.

4.3.3 Zentrale Cox-2

Die Verhaltensexperimente zeigen, dass die CCL2 vermittelte Hyperalgesie durch systemische Applikation des Cox-2 Inhibitors Parecoxib vollständig reversibel ist. Dies lässt eine Beteiligung von Cox-2 an der Entstehung der Hyperalgesie vermuten. Es lässt sich jedoch nicht sagen, inwieweit der Effekt von Parecoxib durch Hemmung von Cox-2 in der entzündeten Pfote oder durch Inhibierung von zentraler Cox-2 und Schmerzverarbeitungsprozessen im Rückenmark oder Gehirn zustande kommt. Cox-Inhibitoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Selektivität bezüglich Cox-1 und Cox-2 als auch in ihrer Applikationsart und ihren pharmakokinetischen Eigenschaften. Parecoxib wird nach parenteraler Applikation sofort in das äußerst Cox-2 selektive Valdecoxib umgewandelt, welches bereits nach 15 min das ZNS erreicht [75, 123]. Urdaneta et al. untersuchten zentrale antinozizeptive und periphere antiinflammatorische Effekte von Parecoxib im Vergleich Ketoprofen, das überwiegend auf Cox-1 wirkt. Sie stellten fest, dass die periphere entzündungshemmende Wirkung von Parecoxib stärker war als die von Ketoprofen. Die Effekte auf zentrale Schmerzprozesse, gemessen an der c-Fos Expression im Hinterhorn des Rückenmarks, hingen von dem Applikationszeitpunkt ab. Bei Medikamentenapplikation vor Induktion der Entzündung waren beide Cox-Inhibitoren effektiv, während bei bereits bestehender Entzündung nur Ketoprofen die c-Fos Expression verringern konnte [124]. Da beide Cox-Inhibitoren gleichermaßen das ZNS erreichen, scheinen die Unterschiede eher durch ihre Cox-Selektivität bedingt zu sein als durch pharmakokinetische Unterschiede. Cox-2 ist neben der Bildung von Prostaglandinen auch an dem Abbau von Endocannabinoiden beteiligt und könnte so zu Antinozizeption beitragen [125].

Wie in 1.1.4 erläutert, kann eine periphere Entzündung zu einer Induktion von Cox-2 im Rückenmark und einem Anstieg von PGE_2 im Liquor führen. Die analgetische Wirkung von Parecoxib in den Verhaltensexperimenten könnte daher auch durch zentrale Effekte bedingt sein. Um diese Frage zu klären, wurde die Cox-2 Expression im lumbalen Rückenmark sowie die Prostaglandinfreisetzung in den Liquor nach intraplantarer CCL2 Injektion bei Ratten untersucht. Es ergab sich keine gesteigerte Expression von zentraler Cox-2. Daher scheint der antinozizeptive Effekt von Parecoxib in der CCL2-vermittelten Hyperalgesie durch periphere Cox-2 Hemmung bedingt zu sein. Dies wird

unterstützt durch die Beobachtung, dass sich die Cox-2 Expression in der Pfote durch CCL2 Injektion verdoppelt und die lokale Injektion von Parecoxib in die Pfote zu einer Aufhebung der Hyperalgesie führt.

4.3.4 Beteiligung weiterer Zellen oder Mediatoren

Da CCL2 alleine in Monozyten nicht zu einer Induktion von Cox-2 führt, ist eine Beteiligung weiterer Mediatoren wahrscheinlich. Die Interaktion von Monozyten mit anderen Zellen könnte zu der Freisetzung eines Mediators führen, der dann Cox-2 induziert. Bekannte Entzündungsmediatoren, die zu einer verstärkten Cox-2 Expression in Monozyten führen, sind TNF-α oder IL-1. Dixon et al. konnten zeigen, dass die Cox-2 Expression in Monozyten durch Interaktion mit Thrombozyten beeinflusst wird [110]. Durch Interaktion von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche mit dem P-Selektin Glycoprotein-Liganden 1 (PSGL-1) auf Leukozyten können sowohl Transkription als auch posttranskriptionelle Mechanismen beeinflusst werden. Sie beobachteten eine Cox-2 Induktion in Monozyten durch aktivierte Thrombozyten. Die Überstände der Thrombin-aktivierten Thrombozyten waren nicht ausreichend um diesen Effekt zu erzielen, erst in Aggregaten von Monozyten und Thrombozyten kam es zu einer Cox-2 Induktion. In der frühen Phase war diese Induktion nur auf mRNA Ebene zu beobachten, da die gebildete Cox-2 mRNA sofort wieder abgebaut wurde. Im späteren Verlauf kam es zu einem erneuten Anstieg der Cox-2 mRNA und in diesem Fall auch zu einer Proteinsynthese. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese zweite Phase der Cox-2 Induktion über IL-1β vermittelt wird. Es wird nach Monozyten-Thrombozyten-Interaktion sezerniert und stabilisiert die Cox-2 mRNA. Dadurch wird ihr Abbau verhindert und es kommt zu einer gesteigerten Proteinsynthese [110]. Ein ähnlicher Mechanismus über eine Freisetzung von IL-1β wäre auch für CCL2 denkbar. Neben der Interaktion mit Thrombozyten sind ähnliche Interaktionen von Monozyten mit Endothelzellen beschrieben, die zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α führen [126]. Diese können dann wiederum Cox-2 in Monozyten induzieren und eine Hyperalgesie bewirken.

4.4 Ausblick

Cox-Inhibitoren gehören zu den am häufigsten verwendeten Schmerzmitteln. Leider sind sie nicht frei von Nebenwirkungen. Magenbeschwerden treten häufig auf, Ero-

sionen oder Ulcera bis hin zu schweren gastrointestinalen Blutungen sind wichtige Komplikationen. Auch Ödeme, Natrium- und Wasserretention, Nierenschädigungen, Kopfschmerzen, Schwindel, Hör- und Sehstörungen gehören zu dem Nebenwirkungsspektrum von Cox-Inhibitoren [77]. Die modernen selektiven Cox-2 Hemmer verursachen zwar weniger gastrointestinale Blutungen, haben dafür aber zum Teil ernstzunehmende kardiovaskuläre Nebenwirkungen. Durch ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Schmerzentstehung beitragen, wird es vielleicht in Zukunft möglich sein spezifischer mit therapeutischen Mitteln anzusetzen. Schmerz ist ein sehr komplexer Zustand, der auf dem Zusammenspiel vieler Faktoren beruht und einer differenzierten Therapie bedarf [127]. Erste CCR2 Antagonisten werden derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus und multipler Sklerose getestet [32]. Die Bedeutung von CCL2 in der Entstehung von Entzündungsschmerz sollte weiter untersucht werden, da hier vermutlich noch weitere Mediatoren und ungeklärte Mechanismen beteiligt sind. Diese könnten ebenfalls ein therapeutisches Ziel darstellen.

5 Zusammenfassung

Schmerz ist eine wichtige Komponente von Entzündungsreaktionen. Im Rahmen des Entzündungsgeschehens werden Zytokine und Chemokine freigesetzt, die Leukozyten zum Entzündungsort rekrutieren. Über die Freisetzung weiterer proalgetischer Mediatoren tragen diese zur Aktivierung und Sensibilisierung von Nozizeptoren und damit zur Schmerzentstehung bei. Zu den klinisch bedeutendsten Analgetika gehören die NSAID, deren Wirkmechanismus über die Hemmung von Cyclooxygenasen erfolgt. Sie blockieren Cox und damit die Bildung von PGE_2, welches über eine Sensibilisierung von Nozizeptoren an der Schmerzentstehung beteiligt ist. Das Monozyten rekrutierende Chemokin CCL2 verursachte in Verhaltensexperimenten eine Hyperalgesie bei Ratten. Diese Hyperalgesie war durch den Cox-2 Inhibitor Parecoxib vollständig reversibel. Diese Arbeit untersucht daher die Beteiligung von Monozyten und Prostaglandinen an der CCL2-vermittelten Hyperalgesie als einen möglichen Mechanismus der Entstehung von Entzündungsschmerz.

Es wurden humane Monozyten sowie Peritonealmakrophagen der Ratte isoliert und in vitro mit CCL2 stimuliert. In den Zellüberständen wurden mittels ELISA die PGE_2 Konzentrationen bestimmt und in den Zellen die Cox-2 Expression untersucht. Dies erfolgte über die Quantifizierung von Cox-2 mRNA durch Real-time PCR sowie dem Nachweis von Cox-2 Protein mittels Western Blot. Desweiteren wurde die PGE_2 Konzentrationen nach Koinkubation von humanen Monozyten und Granulozyten analysiert. Die Rolle von zentraler Cox-2 wurde durch Bestimmung der PGE_2 Konzentration im Liquor und der Cox-2 mRNA im lumbalen Rückenmark nach intraplantarer CCL2 Injektion untersucht. In der Pfote wurde der Cox-2 mRNA Gehalt nach CCL2 Injektion mittels PCR bestimmt. Abschließend wurde die Wirksamkeit einer lokalen Applikation von Parecoxib überprüft.

Durch in vitro Stimulation mit CCL2 kam es weder in humanen Monozyten noch in Peritonealmakrophagen der Ratte zu einer Cox-2 Induktion oder erhöhten PGE_2 Konzentrationen. Auch Koinkubation von Monozyten und Granulozyten ergab keine verstärkte PGE_2 Freisetzung nach CCL2 Stimulation. Die Cox-2 Expression im lumbalen Rückenmark sowie die spinale PGE_2 Konzentration wurden durch intraplantare CCL2

Injektion nicht beeinflusst, während es in der Pfote nach CCL2 Injektion zu einem signifikanten Anstieg der Cox-2 mRNA kam. Lokale Parecoxib Applikation konnte die CCL2-vermittelte Hyperalgesie vollständig aufheben.

Im Rahmen der CCL2-vermittelten Hyperalgesie wird Cox-2 in der Rattenpfote induziert. Dabei handelt es sich um einen lokalen Effekt, zentrale Cox-2 scheint an der Entstehung der Hyperalgesie nicht beteiligt zu sein. CCL2 führt jedoch nicht direkt zu einer Cox-2 Induktion in Monozyten, sondern diese scheint erst durch Interaktion von verschiedenen Zellpopulationen oder der Beteiligung weiterer Entzündungsmediatoren zu entstehen. Mögliche an der Cox-2 Induktion beteiligte Mediatoren sind IL-1 oder HNE.

Da Cox-Inhibitoren sehr häufig verwendete Medikamente sind, jedoch verschiedene Nebenwirkungen besitzen, wäre ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen von Schmerzentstehung wünschenswert. Damit könnte man spezifischer ansetzen und möglicherweise nebenwirkungsärmere Medikamente entwickeln. Erste CCR2 Antagonisten werden derzeit klinisch getestet. Die genaueren Mechanismen, über die CCL2 an der Schmerzentstehung beteiligt ist, müssen jedoch noch weiter erforscht und beteiligte Mediatoren identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Böcker, W., et al., *Pathologie*. 4 ed2008, München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
2. Gold, M.S. and G.F. Gebhart, *Nociceptor sensitization in pain pathogenesis.* Nat Med. **16**(11): p. 1248-57.
3. Murphy, K.T., P.; Walport, M., *Janeway Immunologie*, 2009, Spektrum Akademischer Verlag, Springer: Heidelberg.
4. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat, *The role of neutrophils and monocytes in innate immunity.* Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 118-46.
5. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
6. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
7. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
8. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
9. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets.* Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
10. Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon, *Role of the immune system in chronic pain.* Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(7): p. 521-32.
11. Rittner, H.L., H. Machelska, and C. Stein, *Leukocytes in the regulation of pain and analgesia.* J Leukoc Biol, 2005. **78**(6): p. 1215-22.
12. Brack, A., et al., *Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception.* Anesthesiology, 2004. **101**(1): p. 204-11.
13. Brack, A., et al., *Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells.* Pain, 2004. **112**(3): p. 229-38.
14. Levine, J.D., et al., *The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia.* J Neurosci, 1985. **5**(11): p. 3025-9.
15. Levine, J.D., et al., *Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes.* Science, 1984. **225**(4663): p. 743-5.
16. Schroder, A.K., et al., *Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators.* Immunology, 2006. **119**(3): p. 317-27.
17. Cunha, T.M., et al., *Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 824-32.

18. Rittner, H.L., et al., *Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(5): p. 1022-32.

19. Sommer, C. and M. Kress, *Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.* Neurosci Lett, 2004. **361**(1-3): p. 184-7.

20. Verri, W.A., Jr., et al., *Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?* Pharmacol Ther, 2006. **112**(1): p. 116-38.

21. Cunha, F.Q., et al., *The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia.* Br J Pharmacol, 1992. **107**(3): p. 660-4.

22. Ferreira, S.H., et al., *Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue.* Nature, 1988. **334**(6184): p. 698-700.

23. Uceyler, N., M. Schafers, and C. Sommer, *Mode of action of cytokines on nociceptive neurons.* Exp Brain Res, 2009. **196**(1): p. 67-78.

24. Nicol, G.D., J.C. Lopshire, and C.M. Pafford, *Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons.* J Neurosci, 1997. **17**(3): p. 975-82.

25. Kawasaki, Y., et al., *Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord.* J Neurosci, 2008. **28**(20): p. 5189-94.

26. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature.* J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.

27. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity.* Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.

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

29. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.* N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.

30. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine.* J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.

31. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.* Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.

32. Wells, T.N., et al., *Chemokine blockers--therapeutics in the making?* Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(1): p. 41-7.

33. White, F.A. and N.M. Wilson, *Chemokines as pain mediators and modulators.* Curr Opin Anaesthesiol, 2008. **21**(5): p. 580-5.

34. Oh, S.B., et al., *Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons.* J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5027-35.

35. Zhang, N., et al., *A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4536-41.

36. Cunha, F.Q., et al., *Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain.* Br J Pharmacol, 1991. **104**(3): p. 765-7.

37. Abbadie, C., *Chemokines, chemokine receptors and pain.* Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 529-34.

38. Tanaka, T., et al., *Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain.* Neurosci Res, 2004. **48**(4): p. 463-9.

39. Rittner, H.L., et al., *Pain control by CXCR2 ligands through Ca2+-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells.* FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2627-9.

40. LaCroix-Fralish, M.L., et al., *Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain.* Pain. **152**(8): p. 1888-98.

41. Wang, X.M., et al., *Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain.* Pain, 2009. **142**(3): p. 275-83.

42. Dansereau, M.A., et al., *Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats.* J Neurochem, 2008. **106**(2): p. 757-69.

43. Menetski, J., et al., *Mice overexpressing chemokine ligand 2 (CCL2) in astrocytes display enhanced nociceptive responses.* Neuroscience, 2007. **149**(3): p. 706-14.

44. Abbadie, C., et al., *Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7947-52.

45. Jung, H., et al., *Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain.* J Neurosci, 2009. **29**(25): p. 8051-62.

46. Sun, J.H., et al., *MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia.* J Neurophysiol, 2006. **96**(5): p. 2189-99.

47. White, F.A., et al., *Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 14092-7.

48. Kao, D.J., et al., *CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Na(v)1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons.* J Neuroinflammation. **9**: p. 189.

49. Qin, X., Y. Wan, and X. Wang, *CCL2 and CXCL1 trigger calcitonin gene-related peptide release by exciting primary nociceptive neurons.* J Neurosci Res, 2005. **82**(1): p. 51-62.

50. White, F.A., H. Jung, and R.J. Miller, *Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20151-8.

51. White, F.A. and R.J. Miller, *Insights into the regulation of chemokine receptors by molecular signaling pathways: functional roles in neuropathic pain.* Brain Behav Immun. **24**(6): p. 859-65.

52. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.

53. Beiche, F., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation.* FEBS Lett, 1996. **390**(2): p. 165-9.

54. Burian, M. and G. Geisslinger, *COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites.* Pharmacol Ther, 2005. **107**(2): p. 139-54.

55. Brock, T.G., R.W. McNish, and M. Peters-Golden, *Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11660-6.

56. Doyle, T., et al., *Intraplantar-injected ceramide in rats induces hyperalgesia through an NF-{kappa}B- and p38 kinase-dependent cyclooxygenase 2/prostaglandin E2 pathway.* FASEB J.

57. Jones, D.A., et al., *Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.* J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 9049-54.

58. Maier, J.A., T. Hla, and T. Maciag, *Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells.* J Biol Chem, 1990. **265**(19): p. 10805-8.

59. McAdam, B.F., et al., *Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation.* J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1473-82.

60. O'Sullivan, M.G., et al., *Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase.* J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14547-50.

61. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.* Nat New Biol, 1971. **231**(25): p. 232-5.

62. Ferreira, S.H., *Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia.* Nat New Biol, 1972. **240**(102): p. 200-3.

63. Woolf, C.J., *Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity.* Nature, 1983. **306**(5944): p. 686-8.

64. Woolf, C.J. and M.W. Salter, *Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.* Science, 2000. **288**(5472): p. 1765-9.

65. Gold, M.S., et al., *Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na+ current in nociceptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1108-12.

66. Julius, D. and A.I. Basbaum, *Molecular mechanisms of nociception.* Nature, 2001. **413**(6852): p. 203-10.

67. Nicol, G.D., M.R. Vasko, and A.R. Evans, *Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons.* J Neurophysiol, 1997. **77**(1): p. 167-76.

68. Moriyama, T., et al., *Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins.* Mol Pain, 2005. **1**: p. 3.

69. Samad, T.A., et al., *Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity.* Nature, 2001. **410**(6827): p. 471-5.

70. Ek, M., et al., *Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier.* Nature, 2001. **410**(6827): p. 430-1.

71. Buczynski, M.W., et al., *Inflammatory hyperalgesia induces essential bioactive lipid production in the spinal cord.* J Neurochem. **114**(4): p. 981-93.

72. Maihofner, C., et al., *Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord.* Neuroscience, 2000. **101**(4): p. 1093-108.

73. Vardeh, D., et al., *COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(2): p. 287-94.

74. Dembo, G., S.B. Park, and E.D. Kharasch, *Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans.* Anesthesiology, 2005. **102**(2): p. 409-15.

75. Mehta, V., et al., *Intravenous parecoxib rapidly leads to COX-2 inhibitory concentration of valdecoxib in the central nervous system.* Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(3): p. 430-5.

76. Pflücke, D., et al., *Mechanisms of C-C-chemokine ligand 2 (CCL2)-induced hyperalgesia.* Pain, im Druck.

77. Karow, T., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 18. Auflage. 2010.

78. Molday, R.S., S.P. Yen, and A. Rembaum, *Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells.* Nature, 1977. **268**(5619): p. 437-8.

79. Fabry, T.L., *Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation.* Blood, 1987. **70**(5): p. 1572-6.

80. Boyum, A., *Separation of White Blood Cells.* Nature, 1964. **204**: p. 793-4.

81. Beelen, R.H. and W.S. Walker, *Dynamics of cytochemically distinct subpopulations of macrophages in elicited rat peritoneal exudates.* Cell Immunol, 1983. **82**(2): p. 246-57.

82. Hopper, K.E., *Kinetics of macrophage recruitment and turnover in peritoneal inflammatory exudates induced by Salmonella or thioglycollate broth.* J Leukoc Biol, 1986. **39**(4): p. 435-46.

83. Volkman, A., *The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exudates in rats.* J Exp Med, 1966. **124**(2): p. 241-54.

84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

85. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.

86. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

87. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.

88. Neuhoff, V., et al., *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.* Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-62.

89. Prichard, P.M. and M.J. Cormier, *Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of luminol.* Biochem Biophys Res Commun, 1968. **31**(1): p. 131-6.

90. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.

91. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*2007, Heidelberg; München: Elsevier, Spektrum.

92. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.

93. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

94. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2843-5.

95. Moretti, T., B. Koons, and B. Budowle, *Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase.* Biotechniques, 1998. **25**(4): p. 716-22.

96. Kato, M., et al., *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes.* J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(12): p. 1679-85.

97. Altavilla, D., et al., *Flavocoxid, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, blunts pro-inflammatory phenotype activation in endotoxin-stimulated macrophages.* Br J Pharmacol, 2009. **157**(8): p. 1410-8.

98. Melnicoff, M.J., P.K. Horan, and P.S. Morahan, *Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation.* Cell Immunol, 1989. **118**(1): p. 178-91.

99. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.* J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2552-61.

100. Peres, C.M., et al., *Thioglycolate-elicited rat macrophages exhibit alterations in incorporation and oxidation of fatty acids.* Lipids, 1999. **34**(11): p. 1193-7.

101. Schenkein, H.A. and R.B. Rutherford, *Effects of serum on C3b-stimulated release of prostaglandins and thromboxane B2 from human monocytes.* Immunopharmacology, 1984. **8**(2): p. 79-89.

102. Reinard, T., *Molekularbiologische Methoden*2010, Stuttgart.

103. Tanaka, S., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage cyclooxygenase 2 expression in colonic adenoma.* Gut, 2006. **55**(1): p. 54-61.

104. Humes, J.L., et al., *The diminished production of arachidonic acid oxygenation products by elicited mouse peritoneal macrophages: possible mechanisms.* J Immunol, 1980. **124**(5): p. 2110-6.

105. Scott, W.A., et al., *Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation.* J Exp Med, 1982. **155**(4): p. 1148-60.

106. Watanabe, S., T. Kobayashi, and H. Okuyama, *Absence of relation between the expression of cyclooxygenase isoforms and the synthesis of prostaglandin E2 in resident and thioglycollate-elicited macrophages in rats.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1998. **56**(1): p. 7-18.

107. Fernandez, N., et al., *Mannose-containing molecular patterns are strong inducers of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human macrophages.* J Immunol, 2005. **174**(12): p. 8154-62.

108. Ren, K. and R. Torres, *Role of interleukin-1beta during pain and inflammation.* Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 57-64.

109. Huang, Z.F., J.B. Massey, and D.P. Via, *Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages.* Biochem Pharmacol, 2000. **59**(2): p. 187-94.

110. Dixon, D.A., et al., *Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling.* J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2727-38.

111. Stamp, L.K., M.J. James, and L.G. Cleland, *Paracrine upregulation of monocyte cyclooxygenase-2 by mediators produced by T lymphocytes: role of interleukin 17 and interferon-gamma.* J Rheumatol, 2004. **31**(7): p. 1255-64.

112. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.* Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.

113. Kumagai, T., et al., *A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages.* J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48389-96.

114. Rollins, B.J., A. Walz, and M. Baggiolini, *Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes.* Blood, 1991. **78**(4): p. 1112-6.

115. Barrios-Rodiles, M., G. Tiraloche, and K. Chadee, *Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha.* J Immunol, 1999. **163**(2): p. 963-9.

116. Chun, K.S. and Y.J. Surh, *Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention.* Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1089-100.

117. Diaz-Munoz, M.D., et al., *Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages.* Cell Signal. **22**(10): p. 1427-36.

118. Santos, R.C., et al., *The Transcriptional Activation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Zymosan-Activated Macrophages is Dependent on NF-Kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE Sites.* Inflammation.

119. Ashida, N., et al., *Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis.* J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16555-60.

120. Cambien, B., et al., *Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration.* Blood, 2001. **97**(2): p. 359-66.

121. Jungel, A., et al., *Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(11): p. 3564-74.

122. Akama, H., et al., *Mononuclear cells enhance prostaglandin E2 production of polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor alpha.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(2): p. 857-62.

123. Talley, J.J., et al., *N-[[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration.* J Med Chem, 2000. **43**(9): p. 1661-3.

124. Urdaneta, A., et al., *Lack of correlation between the central anti-nociceptive and peripheral anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitor parecoxib.* Brain Res Bull, 2009. **80**(1-2): p. 56-61.

125. Telleria-Diaz, A., et al., *Spinal antinociceptive effects of cyclooxygenase inhibition during inflammation: Involvement of prostaglandins and endocannabinoids.* Pain. **148**(1): p. 26-35.

126. Weyrich, A.S., et al., *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation.* J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2297-303.

127. Scholz, J. and C.J. Woolf, *Can we conquer pain?* Nat Neurosci, 2002. **5 Suppl**: p. 1062-7.

7 Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylgycerol
ANOVA	Englisch: Analysis of Variance
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Englisch: bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP	Englisch: CCAAT enhancer binding protein
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCI	Englisch: chronic constriction injury
CD	Englisch: cluster of differentiation
cDNA	Englisch: complementary deoxyribonucleic acid
CFA	Englisch: complete Freund‘s adjuvant
CGRP	Englisch: calcitonin gene related protein
Cox	Cyclooxygenase
CRE	cAMP response element
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Englisch: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	Englisch: early growth response-1
ELISA	Englisch: Enzyme linked immunosorbent assay
EL-Puffer	Englisch: erythrocyte lysis buffer
FACS	Englisch: Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Englisch: fetal calf serum
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HRP	Englisch: horseradish peroxidase
HRP	Englisch: horseradish peroxidase
IASP	Englisch: International Association for the Study of Pain
IDV	Englisch: integrated density values
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid

MACS	Englisch: magnetic cell separation
MAPK	Englisch: mitogen-activated protein kinase
MDB	Englisch: membrane desalting buffer
mPGES-1	Mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1
mRNA	Englisch: messenger ribonucleic acid
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NSAID	Englisch: non steroidal anti-inflammatory drugs
PBS	Englisch: phosphate buffered saline
PGE_2	Prostaglandin E_2
PMN	Polymorphonukleäre Zellen
PPT	Englisch: paw pressure threshold
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein-Ligand 1
reg3b	Englisch: regenerating isled derived 3 beta, pancreatitis associated protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RM-ANOVA	Englisch: repeated measures analysis of variance
RT-PCR	Englisch: reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAQ	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Englisch: toll-like receptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV1	Englisch: transient receptor potential vanilloid receptor 1
TTX	Tetrodotoxin
TXA_2	Thromboxan A_2
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Priv.-Doz. Dr. Heike Rittner und Herrn Prof. Dr. Alexander Brack für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und strukturierte Einführung in Methodik und Hintergründe sowie die motivierenden Gespräche bedanken.

Für die Betreuung im Labor und hilfreiche Ratschläge bei verschiedensten praktischen Fragen bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel.

Herrn Dr. med. Christian Geis aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Würzburg danke ich für die Unterstützung bei den Liquorentnahmen und die Einweisung in die Entnahme von Rückenmark, Herrn Dr. rer. nat. Winfried Neuhaus für die Einführung in die Technik der Real-time PCR und Frau Diana Pflücke für die Durchführung der Verhaltensexperimente.

Außerdem möchte ich mich bei den Technischen Assistentinnen Frau Bianca Schneiker, Katarina Pech, Judith Skirde und Elisabeth Wilken dafür bedanken, dass sie bei alltäglichen Fragen im Labor immer als Ansprechpartnerinnen zur Verfügung standen.

Schließlich danke ich meinen Eltern ganz herzlich für die Unterstützung während meines Studiums und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, die mich durch ein Promotionsstipendium bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt hat.