

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Norbert Roewer

**Toll-like Rezeptoren regulieren die Freisetzung von Opioidpeptiden  
aus Monozyten**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Henrike Sahlbach  
aus Göttingen

Würzburg, März 2016

**Referentin:** Prof. Dr. med. Heike Rittner

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2017**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Einführung .....	1
1.2. Leukozyten als Schmerzmodulatoren .....	2
1.2.1. Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten zum Entzündungsort.....	5
1.2.2. Nozizeptorsensitivierung und periphere Hyperalgesie .....	6
1.2.3. Synthese und Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten ....	7
1.2.4. Opioidrezeptoren .....	9
1.2.5. Funktion verschiedener Leukozytenpopulationen.....	11
1.3. Monozytensubpopulationen .....	12
1.4. Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in Immunität und Schmerz ..	14
1.5. Klinische Bedeutung der endogenen Schmerzkontrolle .....	16
1.6. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....	17
1.6.1. Opioid-vermittelte Antinozizeption <i>in vivo</i> .....	17
1.7. Fragestellungen .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1. Gewinnung humaner Blutmonozyten .....	21
2.2. Immunmagnetische Separation.....	22
2.2.1. Prinzip.....	22
2.2.2. Durchführung .....	23
2.3. Gewinnung humaner CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> Monozyten.....	24
2.4. Opioidfreisetzung .....	24
2.4.1. Prinzip.....	24
2.4.2. Durchführung .....	25
2.4.3. Blockierung.....	26
2.5. Zelllyse .....	26
2.6. ELISA (= Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	27
2.6.1. Prinzip.....	27
2.6.2. Durchführung .....	28
2.7. Durchflusszytometrie.....	29

2.7.1. Prinzip.....	29
2.7.2. Gating.....	30
2.7.3. Kompensation.....	31
2.7.4. Antikörperfärbungen.....	31
2.8. Chemikalien und Kits.....	33
2.8.1. Antikörper.....	34
2.9. Lösungen und Puffer.....	34
2.10. Geräte.....	35
2.11. Software.....	35
2.12. Statistik und Auswertung.....	36
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1. Expression der Zellrezeptoren TLR2 und TLR4.....	37
3.2. Monozytenreinheit nach immunmagnetischer Separation.....	38
3.3. $\beta$ -Endorphin-Freisetzung aus Monozyten <i>in vitro</i> .....	40
3.4. Vorinkubation mit Cytochalasin B.....	42
3.5. Selektive Inhibition des TLR4-Rezeptors.....	43
3.6. Blockierung calciumabhängiger Signalwege.....	45
3.7. Differenzierung der Monozytensubpopulationen.....	46
3.8. Signalweg der TLR4-vermittelten Antinozizeption.....	48
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>49</b>
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
4.2. Diskussion der Methoden.....	49
4.2.1. Entzündungsmodell.....	49
4.2.2. Zellisolation.....	50
4.2.3. Wahl der Stimulationsdauer.....	51
4.2.4. Messung von $\beta$ -Endorphin.....	52
4.3. Diskussion der Ergebnisse.....	53
4.3.1. LPS-induzierte $\beta$ -Endorphin-Sekretion aus Monozyten <i>in vitro</i> .....	53
4.3.2. Verstärkender Effekt von Cytochalasin B.....	54
4.3.3. Intrazelluläre calciumabhängige Mechanismen.....	55
4.3.3.1. Calcium.....	55

4.3.3.2. Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) .....	57
4.3.4. TLR und Opioidpeptide in unterschiedlichen Monozytensubpopulationen .....	58
4.3.5. Rolle von TLR4 .....	59
4.3.6. Rolle von TLR2 .....	61
4.3.7. Unterschiede von TLR2 und TLR4 Aktivierung .....	62
4.3.8. LPS-induzierte opioidvermittelte Antinozizeption <i>in vivo</i> durch TLR4-Stimulation .....	64
4.3.8.1. LPS und Schmerz .....	64
4.3.8.2. Periphere Opioide und Schmerz .....	65
4.4. Ausblick .....	66
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Einführung

Die Schmerztherapie stellt in der Medizin einen Dreh- und Angelpunkt dar und ist essentiell für Genesung und Wohlbefinden. Mit der Entdeckung des Morphins zu Beginn des 19. Jahrhunderts durch Friedrich Wilhelm Sertürner brach in der Schmerztherapie eine neue Periode an. Zum heutigen Zeitpunkt, gut 200 Jahre nachdem erstmals ein reines Opioid aus der Mohnpflanze (*papaver somniferum*) isoliert wurde, blicken wir auf eine Reihe synthetischer Opioidpeptide, die im klinischen Alltag Anwendung finden [1]. Neben den exogenen Opioidpeptiden existiert auch ein endogenes System, welches der körpereigenen Schmerzkontrolle dient. Zu den endogenen Opioidpeptiden zählen  $\beta$ -Endorphin, Met-Enkephalin, Dynorphin sowie Endomorphin.

Nach Definition der *International Association for the Study of Pain* ist Schmerz ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht oder als solches beschrieben wird. Die neuronale Verarbeitung wird als Nozizeption bezeichnet [2]. Schmerz (*dolor*) gehört zu den fünf Kardinalsymptomen einer Entzündung. Neben Rötung (*rubor*), Erwärmung (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Funktionseinschränkung (*functio laesa*) ist der inflammatorische Schmerz im Wesentlichen auf die Produktion proalgetischer Mediatoren durch Immunzellen wie Leukozyten zurückzuführen. Er ist sowohl durch eine gesteigerte Antwort auf schmerzhaft mechanische oder thermische Reize (Hyperalgesie) als auch auf nicht schmerzhaft Reize (Allodynie) gekennzeichnet.

Die Funktion der Leukozyten bei einem Schmerzgeschehen ist durch gegensätzliche Wirkungen gekennzeichnet: Einerseits durch die Produktion proalgetischer Mediatoren, andererseits aber auch durch die Freisetzung analgetischer Substanzen, insbesondere endogener Opioidpeptide. Endogene Opioidpeptide sind in Leukozytenpopulationen wie Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten zu finden und werden im Falle einer Entzündung zum Ort des inflammatorischen Geschehens rekrutiert [3, 4]. Durch exogene Stimuli wie

Stress werden die endogenen Opiode freigesetzt, welche daraufhin an Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen binden [5].

Es existieren drei Arten von Opioidrezeptoren:  $\mu$  (MOP),  $\delta$  (DOP) und  $\kappa$  (KOP). Diese werden in Spinalganglienzellen synthetisiert und durch axonalen Transport zu den Nervenendigungen befördert. Liegt ein schmerzhafter Stimulus vor, werden Synthese und Transport der Opioidrezeptoren hochreguliert [6, 7].

Da der Einsatz von Morphin und anderen synthetischen Derivaten durch die unerwünschten Wirkungen wie Sedierung, Obstipation, Atemdepression und Toleranz beschränkt ist, besitzt die Entwicklung alternativer, potenter Analgetika stets klinische Relevanz. Indem endogene Opioidpeptide an periphere Opioidrezeptoren binden, werden die zentralnervös vermittelten unerwünschten Wirkungen umgangen. Die Mechanismen der endogenen Schmerzkontrolle bieten somit mögliche pharmakologische Angriffspunkte.

In dieser Arbeit sollen die Bedeutung von Monozyten in der endogenen Schmerzkontrolle und die Mechanismen, die zur Freisetzung endogener Opioidpeptide führen, genauer untersucht werden.

## **1.2. Leukozyten als Schmerzmodulatoren**

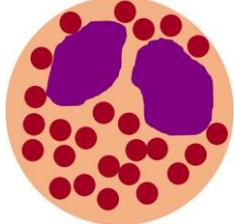
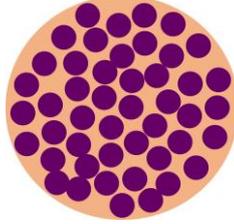
In entzündeten oder zerstörten Geweben kommt es zur Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen aus residenten oder eingewanderten Leukozyten. Zytokine sind pleiotrope lösliche Proteine, die von Immunzellen produziert werden und auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerz beteiligt sind. Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine, die über chemotaktische Eigenschaften verfügen. Sie sind deutlich kleiner und wirken über G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Die pro-inflammatorischen Zytokine, hierunter besonders Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sowie verschiedene Chemokine, tragen zur Abwehrreaktion des Körpers bei, führen jedoch zur Entstehung von Schmerz. In späteren Entzündungsphasen treten anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 als Gegenspieler in Erscheinung [8]. Deren analgetischer Effekt wird auf die Hemmung der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine sowie auf die verminderte Synthese von

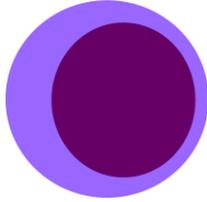
Eikosanoiden aus Makrophagen zurückgeführt und wirkt damit unabhängig von einer endogenen Opioidfreisetzung.

Die natürlichen Opioidpeptide  $\beta$ -Endorphin, Met-Enkephalin, Dynorphin und Endomorphin können in allen Immunzellen inklusive Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen werden und sind im experimentellen Entzündungsmodell vorzufinden [9, 10]. Die Entzündungsreaktion kann im Tiermodell durch die lokale (intraplantare) Gabe von abgetöteten Mykobakterien in Form von Freund's Adjuvans (CFA) in die Rattenpfote induziert werden [11]. Im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite äußert sich die Entzündungsreaktion in der behandelten Pfote durch Schwellung, Überwärmung, Rötung und eingeschränkte Bewegung. Schmerz kommt als mechanische und thermische Hyperalgesie zum Ausdruck. Die kontralaterale Pfote dient als interne Kontrolle.

In der entzündeten Rattenpfote können opioidhaltige Immunzellen nachgewiesen werden [5]. Im Frühstadium (2-6 h nach CFA-induzierter Entzündung) sind Granulozyten die Hauptquelle endogener Opiode, während im Spätstadium (nach 96 h) Monozyten/Makrophagen die quantitativ führende opioidhaltige Zellpopulation sind [12]. Eine Verminderung von Monozyten/Makrophagen durch Chlodronat-Liposomen reduziert die Schwimmstress-induzierte, periphere opioidvermittelte Analgesie [13]. Die Zahl der infiltrierenden Immunzellen sowie die Menge an  $\beta$ -Endorphin am Entzündungsort nehmen mit der Dauer der Entzündung zu. Diese Zunahme konnte durch Immunhistochemie gezeigt werden und betrifft ebenso Met-Enkephalin- und Dynorphin-haltige Zellen [14]. Der Gehalt an  $\beta$ -Endorphin in der entzündeten Pfote spiegelt somit die Rekrutierung und Migration zirkulierender Leukozyten wider.

Tab. 1 bietet einen Überblick über die verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems, ihre Differenzierung und Hauptfunktionen. Die Immunzellen sind in unterschiedlicher Weise und über verschiedene Mechanismen an der Genese und Bekämpfung von Schmerz beteiligt.

Zellreihe	Vorläuferzelle (Blut/ lymphatische Organe)	Effektorzelle (Gewebe/ Lymphknoten)	Funktion	Anteil im peripheren Blut
<b>Myeloische Reihe</b>	Monozyt	Makrophage	Phagozytose, Aktivierung bakterizider Funktionen	1-12 % Monozyten 
	Unbekannter Vorläufer	Mastzelle	Freisetzung von Granula (Histamin u.a. vasoaktive Substanzen), beteiligt an allergischen Reaktionen und Entzündung	
	Granulozyt	Neutrophile	Phagozytose, Aktivierung bakterizider Funktionen	30-85 % 
		Eosinophile	Abtötung von Parasiten, beteiligt an allergischen Reaktionen	0-6 % 
		Basophile	beteiligt an allergischen Reaktionen	0-3 % 

Zellreihe	Vorläuferzelle (Blut/ lymphatische Organe)	Effektorzelle (Gewebe/ Lymphknoten)	Funktion	Anteil im peripheren Blut
<b>Myeloische Reihe</b>	Unreife dendritische Zelle	Reife dendritische Zelle	Antigenpräsentation, Phagozytose	
<b>Lymphatische Reihe</b>	B-Zelle	Plasmazelle	Humorale Immunität, Produktion von Immunglobulinen	15-50 % Lymphozyten 
	T-Zelle	Zytotoxische T-Zelle	Zelluläre Immunität, Abtötung (virus-) infizierter Zellen	
		T-Helferzelle	Aktivierung von B-Zellen, Makrophagen	
		Regulatorische T-Zelle	Kontrolle der Immunantwort	
NK-Zelle	Aktivierte NK-Zelle	Abtötung virusinfizierter Zellen		

**Tab. 1: Zellen des Immunsystems**

Darstellung der Entwicklung und Differenzierung der Leukozytenpopulationen mit ihren Hauptfunktionen und Anteil im peripheren Blut. Keine Angabe für Zellen, die im Gewebe vertreten sind. Morphologie skizziert nach der Darstellung im Blutausstrich in Pappenheim-Färbung.

### 1.2.1. Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten zum Entzündungsort

Der Mechanismus der Migration von Immunzellen in entzündete Gewebe verläuft in mehreren Schritten und wird über Zelladhäsionsmoleküle, sogenannte Homingrezeptoren, auf Leukozyten und Endothelzellen gesteuert. Die erste Phase der Extravasation wird durch Selektine gelenkt [15, 16]. L-, P- und E-Selektin sind Glykoproteine auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Leukozyten. Sie führen über die Vermittlung eines transienten Kontakts der Leukozyten mit dem Gefäßendothel zu einer Verlangsamung des Leukozytenstroms, des Rollens entlang der Gefäßwand. Die nachfolgende Chemokinausschüttung führt zur Hochregulation von Integrinen, welche die feste Bindung der Leukozy-

ten an die Gefäßwand vermitteln und die Diapedese in das Gewebe ermöglichen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1). Eine Behandlung mit dem Selektininhibitor Fucoidin oder Antikörpern gegen ICAM-1 führt über die Hemmung der Leukozytenmigration zu einem verringerten Gehalt an lokalem  $\beta$ -Endorphin und folglich zu verminderter peripherer Analgesie [17, 18]. Die vaskuläre Expression von ICAM-1 wird im entzündeten Gewebe durch sensorische und sympathische Nervenfasern gesteigert [19].

Die Bedeutung von Chemokinen für die Rekrutierung von Leukozyten und für die Freisetzung von Opioidpeptiden konnte in Vorexperimenten der Arbeitsgruppe gezeigt werden. In der frühen Entzündungsphase einer durch intraplantare Injektion von CFA-induzierten Entzündung stellen neutrophile Granulozyten die dominante opioidpeptidhaltige Zellpopulation dar und exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR2<sup>1</sup>. Die CXCR2-positiven Zellen enthalten sowohl  $\beta$ -Endorphin als auch Met-Enkephalin. Eine kombinierte Blockade der CXCR2 Liganden MIP-2 (Makrophagen inflammatorisches Protein-2) und KC (Keratinocyten-abstammendes Chemokin) führt zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl sowie der opioidvermittelten (Naloxon-reversiblen) Analgesie um 30-40%. Beide Effekte wurden ebenfalls durch die Depletion zirkulierender Granulozyten erreicht. Damit spielt die Chemokin-induzierte Leukozytenrekrutierung eine wichtige Rolle in der peripheren opioidvermittelten Analgesie [20].

### 1.2.2. Nozizeptorsensitivierung und periphere Hyperalgesie

Neben der Rekrutierung von Immunzellen wirken Chemokine und andere proalgetische Substanzen wie Bradykinin, Histamin und Prostaglandine unter inflammatorischen Bedingungen auf Nozizeptoren und verursachen deren Sensi-

---

<sup>1</sup> Die systematische Einteilung der Chemokine erfolgt nach der chemischen Struktur: CC = zwei über Disulfidbrücken verbundene Cysteine (C), CXC = zwei Cysteine, die durch eine andere Aminosäure getrennt sind, XC = eine Disulfidbrücke am N-Terminus, CX3C = zwei Cysteine, die durch drei andere Aminosäuren getrennt sind. Die Nomenklatur erfolgt entsprechend der chemischen Struktur in die genannten vier Gruppen. Die Chemokine einer Gruppe werden durchnummeriert und erhalten zusätzlich den Terminus „L“ für Ligand; die entsprechenden Rezeptoren den Terminus „R“. Bsp.: CCL2, ursprünglich Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), bindet an CCR2. Chemokine haben eine hohe Redundanz und können an verschiedene Rezeptoren ihrer Gruppe binden.

tivierung. Das Phänomen der Nozizeptorsensitivierung äußert sich in einer Herabsetzung der Reizschwelle und gesteigerter Erregbarkeit des Rezeptors. Dies kann sowohl auf zentraler als auch auf peripherer Ebene erfolgen [21]. Inflammatorische Mediatoren können aber auch zu spontanen Entladungen nozizeptiver A $\delta$ - und C-Nervenfasern führen. Das abnormale „Feuern“ primär sensorischer Neurone resultiert in spontanem Entzündungsschmerz [22, 23].

Ein Beispiel für einen Rezeptor, dessen Ionenstrom durch Zytokine verändert und der dadurch sensitiviert wird, ist der Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 (TRPV1). TRPV1 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der unter anderem durch Hitze oder Capsaicin aktiviert wird und zur Schmerzwahrnehmung beiträgt. TNF- $\alpha$  verstärkt die Wirkung von Capsaicin auf TRPV1 [24]. Ebenso wurde ein aktivitätsfördernder Effekt des CCL3 über den CCR1 auf Spinalganglienzellen nachgewiesen [25]. Die Aktivierung von CCR1 führt einen TRPV1-vermittelten Calciumeinstrom herbei und erhöht die Sensitivität für Capsaicin. Auch andere Chemokinrezeptoren wie CXCR4 sind auf primär sensorischen Neuronen exprimiert. Ihre Aktivierung führt zu Hyperalgesie und Allodynie [26]. Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten spielen somit als Produzenten von Chemokinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung inflammatorischer Hyperalgesie [27].

Zusätzlich zu den direkten Effekten von Entzündungszellen und Schmerzmediatoren kann die Schmerzwahrnehmung im peripheren Nervensystem durch Wechselwirkungen mit klassischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie Toll-like Rezeptoren (TLR) verstärkt werden (vgl. 1.4). Qi et al. wiesen die Aktivitätssteigerung sowie die vermehrte Expression von TRPV1 nach Stimulation mit TLR-Liganden nach [28]. Außerdem wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch TLR-Bindung gesteigert [29].

### 1.2.3. Synthese und Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten

Die drei Hauptgruppen der endogenen Opioidpeptide Endorphine, Enkephaline und Dynorphine gehen auf Vorläufermoleküle zurück. Eines der wichtigsten und am besten untersuchten Opioidpeptide in der peripheren endogenen Schmerzkontrolle ist  $\beta$ -Endorphin [5]. Es leitet sich vom Proopiomelanocortin (POMC)

ab, welches in Immunzellen vor allem unter pathologischen Bedingungen produziert und weiterverarbeitet wird. In entzündeten Geweben ist die mRNA, welche für POMC codiert, heraufreguliert und  $\beta$ -Endorphin ist in Leukozyten nachweisbar [9]. Leukozyten exprimieren die komplette Ausrüstung, die zur Verarbeitung von POMC in funktionell aktives  $\beta$ -Endorphin notwendig ist [30]. Sowohl in Monozyten/Makrophagen als auch in Granulozyten und Lymphozyten steht  $\beta$ -Endorphin in sekretorischen Vesikeln in der Zellperipherie zur Freisetzung bereit. Die Sekretion erfolgt als Reaktion auf verschiedene Stimuli. Diese können von exogen induziert werden wie durch Kaltwasser-Schwimmstress im Tiermodell (*cold water swim stress*, CWS) [5] oder durch endogene Stresshormone wie Corticotropin-releasing Faktor (CRF), IL -1 $\beta$  oder Noradrenalin (NA) vermittelt sein [9, 30, 31]. Diese Substanzen bewirken auch in der Hypophyse die Freisetzung von Opioidpeptiden. Die opioidvermittelte Analgesie kann durch Immunsuppression mit Cyclosporin oder Ganzkörperbestrahlung aufgehoben werden und weist damit Immunzellen als Quelle der analgetischen Mediatoren nach [5, 32, 33]. Als weiterer Stimulus für die Sekretion von Opioidpeptiden konnte für neutrophile Granulozyten die Aktivierung durch Bestandteile von Mykobakterien über den Formylpeptidrezeptor mit nachfolgender Freisetzung von Met-Enkephalin gezeigt werden [34].

Die Sekretion von Opioidpeptiden ist calciumabhängig und kann durch Kalium stimuliert werden, was charakteristisch für vesikulären Transport und Exozytose ist und der Freisetzung aus Neuronen und endokrinen Zellen entspricht [9]. Der Signalübertragungsweg wurde in weiteren Vorexperimenten der Arbeitsgruppe an neutrophilen Granulozyten genauer untersucht. Durch Vorbehandlung mit einem intrazellulären Calciumchelator sowie durch Blockierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptors konnte die Sekretion von  $\beta$ -Endorphin und Met-Enkephalin blockiert werden. Zudem konnte eine Reduktion der Freisetzung durch Hemmung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) verzeichnet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Beteiligung calciumabhängiger Signalwege an der Freisetzung von Opioidpeptiden aus neutrophilen Granulozyten [35].

#### 1.2.4. Opioidrezeptoren

Endogene Opioidpeptide binden an Opioidrezeptoren auf sensorischen Neuronen. Die drei Opioidrezeptorklassen MOP, DOP und KOP werden in Spinalganglienzellen synthetisiert und durch axonalen Transport in die Nervenendigungen befördert [7]. Sie gehören zur Klasse der inhibitorischen G-Proteingekoppelten Rezeptoren ( $G_i$ ) und bewirken über eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels, die Öffnung von Kaliumkanälen sowie die Schließung von Calciumkanälen eine Hyperpolarisation der Zelle. Somit verringert sich die Transmitterfreisetzung, und die Signalantwort in Nervenzellen wird unterdrückt. MOP-Rezeptoren werden im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert und vermitteln sowohl auf spinaler als auch auf supraspinaler Ebene die analgetische Wirkung der endogenen und exogenen Opioiden. Allerdings sind die Rezeptoren auch im Magen-Darm-Trakt und in der Harnblase vorhanden und bewirken dort die unerwünschten Nebeneffekte wie Obstipation und Miktionsstörungen.

Die meisten synthetischen und therapeutisch relevanten Opioiden weisen eine Spezifität für MOP auf (vgl. Tab. 2). Die genauen Funktionen der Rezeptor-Subklassen konnten mit Hilfe von Rezeptor-Knockout-Mäusen erforscht werden [36]. Tab. 2 bietet eine Übersicht über die Klassen der Opioidrezeptoren und die durch sie vermittelten Wirkungen. DOP spielen eine untergeordnete Rolle in der Analgesie: Ihr Beitrag besteht in der Interaktion mit MOP und der Verstärkung analgetischer Effekte. KOP funktionieren unabhängig und sind für Analgesie und Dysphorie verantwortlich.

Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zu einer Anpassung der Rezeptoren; die opioidvermittelte Analgesie ist effektiver und gewinnt mit der Chronifizierung einer Entzündung an Bedeutung. Das ist auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen: Zum einen wird im entzündeten Gewebe die Anzahl der Bindungsstellen an MOP hochreguliert und ihre Dichte durch verstärkten axonalen Transport erhöht [37, 38]. Zum anderen wird durch die Entzündung die Kopplung von G-Protein an den Rezeptor und folglich die Signaltransduktion verstärkt [38]. Ein weiterer Parameter für die zunehmende endogene Schmerz-

kontrolle ist die mengenmäßige Zunahme peripherer Nervenendigungen durch Aussprießen [37].

Zusätzlich zu den Vorgängen am Rezeptor kommt es zu einer Verschiebung im Spektrum der endogenen Opioidpeptide: Während in der frühen Entzündungsphase (6 h) alle drei Rezeptortypen durch  $\beta$ -Endorphin, Met-Enkephalin und Dynorphin aus Immunzellen aktiviert werden, ist in der Spätphase (96 h)  $\beta$ -Endorphin das führende Opioidpeptid und vermittelt seine Wirkung über MOP und DOP [14]. Trotz dieser Anpassungsvorgänge ist die Expression der Opioidrezeptoren und nicht die Anzahl an opioidhaltigen Leukozyten der limitierende Faktor für die endogene Schmerzkontrolle [39].

Rezeptor	Endogene Liganden	Agonisten	Antagonisten	Wirkungen
$\mu$ , <b>MOP</b>	$\beta$ -Endorphin Endomorphin 1, -2	Morphin Pethidin Methadon Fentanyl Buprenorphin Tramadol	Naloxon Naltrexon Nalbuphin Pentazocin	Analgesie Sedierung Atemdepression Abhängigkeit Miosis Obstipation Übelkeit, Erbrechen Antidiurese Miktionsstörungen Euphorie
$\delta$ , <b>DOP</b>	Met-Enkephalin Leu-Enkephalin $\beta$ -Endorphin	DPDPE	Naloxon Naltrexon	Analgesie
$\kappa$ , <b>KOP</b>	Dynorphin A, -B	Pentazocin Nalbuphin U50, 488H	Naloxon Naltrexon Buprenorphin	Dysphorie Sedierung Atemdepression Abhängigkeit Miosis Analgesie

Tab. 2: Opioidrezeptoren und ihre endogenen und exogenen Liganden

### 1.2.5. Funktion verschiedener Leukozytenpopulationen

Der Beitrag der verschiedenen Leukozytenpopulationen zur peripheren opioidvermittelten Analgesie ist abhängig vom Zeitpunkt sowie den Umgebungsfaktoren im entzündeten Gewebe. Im Gegensatz zu *in vitro* Bedingungen wirken eine Reihe von Stimuli gleichzeitig und können kooperative Effekte hervorrufen. Diese analgetische Potenz soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

In Vorexperimenten der Arbeitsgruppe konnte in neutrophilen Granulozyten, als Vertreter der angeborenen Immunität der frühen Entzündungsphase, die Freisetzung von Opioidpeptiden durch CXCR1/2-Liganden induziert werden [35]. Zudem wurde die Stimulation des Formylpeptid Rezeptors (FPR) durch Mykobakterien als Trigger für die Sekretion identifiziert [34]. Dieses Ergebnis war unerwartet, da TLR2 und TLR4 als Zielrezeptoren für Mykobakterien in der Sekretion von Opioidpeptiden angenommen wurden [40]. Obwohl auch Monozyten FPR exprimieren, konnte die FPR-Stimulation von Monozyten/Makrophagen *in vitro* keine Opioidfreisetzung bewirken. Die Frage blieb somit offen, über welche Rezeptoren die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung aus Monozyten verläuft.

Als weitere bedeutende Zellpopulation in der peripheren Schmerzkontrolle wurden T-Zellen charakterisiert. In inflammatorischen [41, 42], neuropathischen [43] und viszeralen [44, 45] Schmerzmodellen wurde eine effektive opioidpeptidvermittelte Analgesie nachgewiesen. Die Freisetzung von Opioidpeptiden erfolgt nach Antigen-Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Effektorzellen. Diese Aktivierung ist unabhängig vom Th1- und Th2-Phänotyp und damit von der spezifischen Effektorfunktion der T-Zellen. Durch Blockierung der T-Zell-Rezeptorfunktion zur Interaktion mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen wird die T-Zell-vermittelte Analgesie aufgehoben. Damit ist die opioidpeptidvermittelte Analgesie eine grundlegende Funktion aktivierter T-Zellen, die der Präsenz des spezifischen Antigens bedarf [41, 42]. Gleichmaßen kann die verringerte Antinozizeption in immungeschwächten Mäusen mit chronischer Neuropathie durch den Transfer immunkompetenter T-Zellen komplett revidiert werden [43]. Dieser Effekt ist auch im viszeralen Schmerzmodell beschrieben [44]. Die unterschiedlichen Funktionen der Schmerzkontrolle einerseits und der Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren andererseits zeigen sich

auch für die Population der T-Zellen und werden am Beispiel der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen manifest, in denen Th1- und Th17-Zellen kolitogen wirken und simultan durch periphere Opioidfreisetzung analgetische Eigenschaften aufweisen [45]. Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien an Granulozyten und T-Zellen ist die Rolle der Monozyten/Makrophagen im inflammatorischen Schmerzgeschehen bisher gut charakterisiert.

Zusammenfassend sind aus den dargestellten Erkenntnissen zur Funktion von Leukozyten als Schmerzmodulatoren drei Faktoren für die immunzellvermittelte periphere Analgesie im entzündeten Gewebe entscheidend:

1. Die zunehmende Leukozytenrekrutierung im Verlauf der Entzündung.
2. Die verstärkte Expression von Opioidrezeptoren auf sensorischen Neuronen.
3. Die Steigerung der Effizienz der G-Protein gekoppelten Verarbeitung von Opioidrezeptoren sensorischer Neurone.

### **1.3. Monozytensubpopulationen**

Monozyten stellen in gesunden Individuen 5-10 % der Leukozyten im peripheren Blut dar. Sie entstammen myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark, zirkulieren im Blut und wandern unter physiologischen sowie inflammatorischen Bedingungen ins Gewebe ein. Dort erfolgt durch lokale Wachstumsfaktoren, Zytokine und mikrobielle Produkte die Differenzierung in Makrophagen oder dendritische Zellen. Die Differenzierung in Makrophagen erfolgt über zwei Wege: Der klassische Weg in den pro-inflammatorischen, antimikrobiellen M1 Makrophagen wird *in vitro* durch *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) induziert. Der alternative Weg in M2 Makrophagen für die Gewebereparatur wird durch *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und IL-10 geleitet [16, 46].

Monozyten sind eine heterogene Zellpopulation: Sie können in klassische CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, intermediäre CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und nicht-klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Subpopulationen unterteilt werden [47]. Da in dieser Arbeit nicht zwischen intermediären und nicht-klassischen Monozyten differenziert wurde, erfolgt die

weitere Unterscheidung und Nomenklatur zur Vereinfachung nur in klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und nicht-klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>Monozyten.

Alle Subpopulationen produzieren gleichermaßen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , wohingegen die Synthese des anti-inflammatorischen IL-10 in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten deutlich geringer ausfällt [48]. Außerdem unterscheiden sie sich in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten exprimieren CCR2, CD62L (L-Selektin) und Fc $\gamma$ RI (CD64). CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten fehlt CCR2, dafür ist ihr Anteil an MHC-II und Fc $\gamma$ RII (CD32) höher [49]. Die CD-Moleküle haben unterschiedliche Funktionen: CD14 ist als Bestandteil des LPS-Rezeptors wesentlich an der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt. CD16 hingegen ist Teil des Fc $\gamma$  Rezeptor Typ III und für die Bindung von IgG zuständig.

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten machen im Blut gesunder Individuen weniger als 10 % der zirkulierenden Monozyten aus. Besonderes klinisches Interesse kommt ihnen in bestimmten inflammatorischen Erkrankungen und in Infektionen mit Sepsis zu, in denen ihr Anteil deutlich ansteigen kann. So wurden in Patienten mit Komplexem Regionalem Schmerzsyndrom (CRPS) [50], Sarkoidose [51], rheumatoider Arthritis [52] und Sepsis [53] signifikant erhöhte Prozentsätze von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten nachgewiesen. Zusätzlich nehmen aber auch Inaktivität, Adipositas und Schlafstörungen Einfluss auf den Spiegel von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten im peripheren Blut.

Es wird angenommen, dass CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten aus CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten durch TNF- $\alpha$  abhängige Differenzierung heranreifen [54]. Die Beobachtung, dass TNF- $\alpha$  als Zytokin bei inflammatorischen Zuständen vermehrt gebildet wird, würde das vermehrte Auftreten von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in entzündlichen Erkrankungen erklären. Häufig wird diese Subpopulation daher auch als pro-inflammatorisch bezeichnet.

Kashiwagi et al. wiesen in einer Studie zur Bedeutung der Monozytensubpopulationen in der Genese des akuten Myokardinfarkts eine erhöhte TLR4-Expression auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten sowie eine positive Korrelation mit der Höhe des TNF- $\alpha$ -Spiegels im Blut nach [55]. Dies spricht für eine Aktivitätssteigerung dieser Zellpopulation. Eine weitere Abgrenzung der Subpopulationen

zeigten Skinner et al. in der Expression der Zellrezeptoren TLR2 und TLR4. In Abhängigkeit von LPS wurde eine stärkere Herunterregulation von TLR4 sowie eine vermehrte Hochregulation von TLR2 auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten im Vergleich zu CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten festgestellt [54].

In dieser Arbeit sollen die Unterschiede von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in Bezug auf ihr analgetisches Potential untersucht werden.

#### **1.4. Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in Immunität und Schmerz**

Das Toll-Protein geht auf *Drosophila melanogaster* zurück. In *Drosophila* erfüllt das Toll-Protein die Rolle eines transmembranären Rezeptors, welcher der Erkennung eingedrungener Mikroorganismen dient und zusätzlich zur Ausbildung der dorso-ventralen Polarität beiträgt. Im Menschen wurde Mitte der neunziger Jahre eine Familie strukturhomologer Rezeptoren entdeckt, die den Namen Toll-like Rezeptoren (TLR) tragen [56]. Derzeit sind elf humane Vertreter der TLR bekannt. Als Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems werden sie auf verschiedenen Immunzellen, inklusive Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert und dienen der Erkennung von Mikroorganismen. Monozyten exprimieren TLR-1, 2, 4, 5, 6 und 8 auf ihrer Zelloberfläche und in inneren Zellkompartimenten. Ihre Aktivierung erfolgt durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster, sogenannte PAMPs (engl. Pathogen-associated molecular patterns). Zu den PAMPs gehören unter anderem das auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien exprimierte Lipopolysaccharid (LPS). Binden LPS oder andere PAMPs an den Rezeptor, werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. TLR4 ist der Rezeptor für exogenes LPS oder endogenes Hitzeschockprotein (HSP60 und HSP70) [57, 58]. TLR2 funktioniert als Rezeptor für Bestandteile grampositiver Bakterien wie Peptidoglykan (PGN) und Lipoteichonsäure. Der endogene Ligand Hitzeschock Glykoprotein (gp96) wird als Aktivator von TLR2 in Makrophagen und der durch sie vermittelten chronischen Entzündung diskutiert [59].

Die Aktivierung von TLR4 verläuft über zwei Signalkaskaden: Der Hauptweg erfolgt über MyD88, IL-1R assoziierte Kinase (IRAK), Tumornekrosefaktor-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) und NF $\kappa$ B oder Mitogen-aktivierte Proteinkinase

(MAPK) und führt zur Synthese und Sekretion diverser Zytokine und Chemokine [29, 60].

Der TLR4 ist ein transmembranärer Rezeptor, welcher im Komplex mit dem Membranprotein MD2 vorliegt. Bindung an den Rezeptor führt zunächst zur Induktion des MyD88-abhängigen Signalwegs von der Zelloberfläche, woran sich die Internalisierung des Rezeptors in Endosomen mit konsekutivem Beginn eines MyD88-unabhängigen Signalwegs anschließt. [61]. Dieser zweite MyD88-unabhängige Signalweg verläuft über die Adaptermoleküle TRAM und TRIF und vermittelt die späte NF $\kappa$ B Signalantwort sowie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Interferon regulierender Faktor 3 (IRF3), der wiederum  $\alpha$ -Interferon reguliert [62, 63]. Die beiden Signalwege sind räumlich voneinander getrennt und erst durch Internalisierung des TLR4 möglich. Für die Transduktion extrazellulärer Signale über TLR2 ist nur der MyD88-abhängige Weg bekannt.

Neben den exogenen TLR-Liganden wurden auch endogene TLR-Aktivatoren gefunden, die sogenannten DAMPs (engl. Danger-associated molecular patterns). Zu den DAMPs zählen Hitzeschockproteine, High-mobility group protein B1 oder Bestandteile der extrazellulären Matrix, die alle in entzündeten Geweben zu finden sind. Die Bindung an TLR führt zur Auslösung von Schmerz. Sowohl im inflammatorischen als auch im neuropathischen Schmerz wurden TLR als wichtige Mediatoren identifiziert. Zum einen steigert die TLR-Aktivierung die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine und fördert so die Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe, zum anderen trägt sie über die Aktivitätssteigerung des Nozizeptors TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) und vermehrten Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen zur Schmerzentstehung bei [28, 29].

Somit ist TLR4 auf zentraler Ebene an der Genese und Aufrechterhaltung von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen beteiligt. Eine Ausschaltung von TLR4 kann das Schmerzniveau reduzieren und inflammatorische Prozesse unterbinden.

Insgesamt ist der Beitrag von TLR4 an verschiedenen zentralnervösen Mechanismen der Schmerzentstehung eingehend untersucht, über die Bedeutung in der Peripherie ist weniger bekannt.

### **1.5. Klinische Bedeutung der endogenen Schmerzkontrolle**

Wie eingangs bereits erwähnt, ist die Suche nach neuen, nebenwirkungsarmen Schmerzmedikamenten von zentraler Bedeutung. Die Mechanismen der endogenen peripheren Schmerzkontrolle bilden interessante Angriffspunkte für die Entwicklung alternativer Wirkstoffe. Zahlreiche Studien konzentrieren sich auf Ionenkanäle und Rezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen als Wirkungsort neuer Pharmaka. Erst kürzlich identifizierten Nockemann et al. den K<sup>+</sup> Kanal GIRK2 als unerlässlich für periphere opioidvermittelte Analgesie [64]. Weitere mögliche Ansätze sind die Anwendung rein peripher wirkender Opioide, die selektive Erhöhung der Liganden am Wirkungsort durch Rekrutierung opioidhaltiger Immunzellen, die Stimulierung der Freisetzung endogener Opioidpeptide sowie die Rezeptorsynthese durch Stammzell- oder Gentherapie [65].

Die selektive Stimulierung der Synthese und Freisetzung von Opioidpeptiden aus Immunzellen in entzündeten Geweben, stellt eine Therapieoption dar, die weder die zentralen Opioidnebenwirkungen wie Obstipation, Toleranz oder Sedierung noch die unerwünschten Effekte nichtsteroidaler Antirheumatika wie gastrointestinale, renale oder thrombembolische Komplikationen beinhaltet. Es besteht somit großes Interesse die Mechanismen, die zur Steigerung der endogenen Opioidfreisetzung führen, zu verstehen. Hier kommt der Funktionsweise von TLRs, insbesondere von TLR4 als PRR für das bakterielle Antigen LPS, ein besonderes Augenmerk zu. Der erste klinische Einsatz eines TLR4-Antagonisten zur Bekämpfung von Schmerz und Entzündung wurde in klinischen Phase-III-Studien zur Behandlung schwerer Sepsis durchgeführt [66]. Bisher konnte kein signifikanter Zugewinn aus dieser Behandlung gezogen werden.

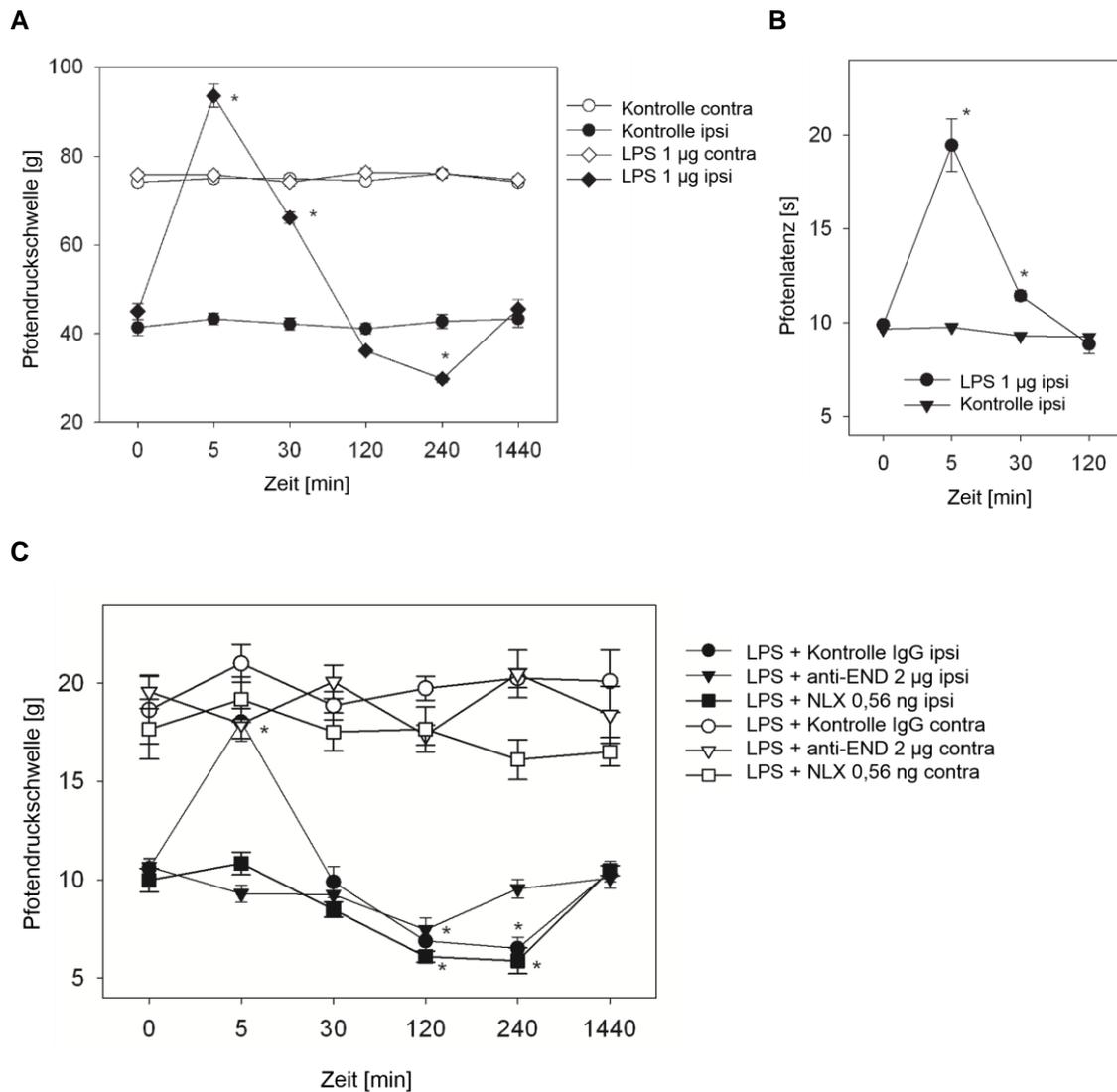
Am Ende aller Bestrebungen steht die Entwicklung immer selektiverer Schmerztherapeutika mit möglichst reduziertem Nebenwirkungsprofil.

## 1.6. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die Forschungen zu peripheren Mechanismen des Entzündungsschmerzes konzentrieren sich auf die Identifizierung von Rezeptoren und Mediatoren, die über Entzündungs- und Nervenzellen zur Schmerzentstehung beitragen bzw. modulierend auf diese einwirken. In neueren Studien wurden weitere proalgetische Funktionen von Monozyten aufgedeckt: CCL2 induziert eine Monozytenrekrutierung ins Gewebe, wo reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus Makrophagen über TRPV1 hyperalgetisch wirken [67]. Auch außerhalb der Neuropathie ruft CCL2 über NADPH-Oxydase die Bildung von ROS und damit Hyperalgesie hervor [68]. Im Gegensatz dazu soll im Weiteren das analgetische Potential von Monozyten näher untersucht werden.

### 1.6.1. Opioid-vermittelte Antinozizeption *in vivo*

Ergänzend zu den in dieser Arbeit dargestellten *in vitro* Versuchen, wurden in der Arbeitsgruppe Verhaltensexperimente zur LPS-vermittelten Antinozizeption durch Opioidpeptide unternommen (durchgeführt von Dr. rer. nat. Dagmar Hackel und Dr. rer. nat. Reine-Solange Sauer). Dazu wurde in Ratten über eine CFA-Injektion in die Hinterpfote für 4 d eine Entzündungsreaktion induziert und anschließend LPS in unterschiedlicher Konzentration intraplantar injiziert. Die mechanische Schmerzschwelle stieg konzentrationsabhängig an [69]. Der antinozizeptive Effekt nach Behandlung mit 1 µg LPS intraplantar hielt bis zu 30 min an und kehrte nach 120 min wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Gleichzeitige intraplantare Injektion von 0,56 ng Naloxon oder 2 µg Anti-β-Endorphin-Antikörper (anti-END) und mit 1 µg LPS konnte den antinozizeptiven Effekt von LPS aufheben. Damit ist eine Wirkung über periphere Opioidrezeptoren und Opioidpeptide nachgewiesen. Die Tiere zeigten keine allgemeinen Krankheitssymptome, zudem blieben die mechanische (PPT) und thermische (PWL) Schmerzschwelle der kontralateralen unbehandelten Pfote jeweils unverändert. Nach einer initialen Phase der Antinozizeption, führte LPS nach mehr als 120 min zur Abnahme der mechanischen und thermischen Schmerzschwelle und damit zur Hyperalgesie. Dieser Effekt konnte durch Naloxon, aber nicht durch Anti-β-Endorphin-Antikörper, aufgehoben werden.



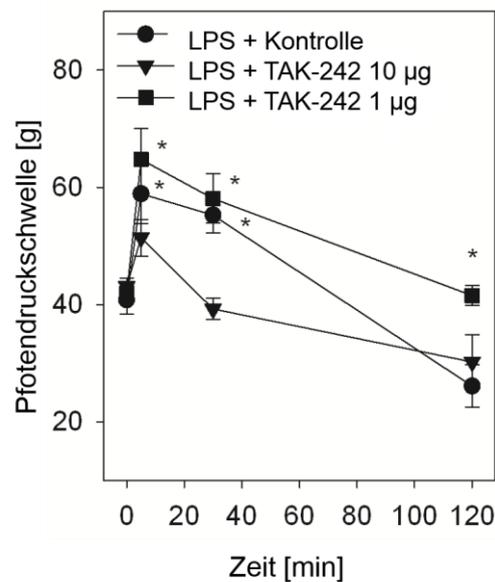
**Abb. 1: LPS-induzierte Antinozipeption im inflammatorischen Schmerzmodell**

Wistar Ratten wurde CFA intraplantar injiziert. Nach 4 d wurde 1 µg LPS intraplantar appliziert, und die Pfotendruckschwelle sowie die thermische Pfotenlatenz bestimmt (**A**, **B**). Messung der thermischen Schmerzschwellen (5 min bis 1 d) nach Behandlung mit 1 µg LPS intraplantar mit entweder Naloxon (NLX, 0,56 ng, schwarze Quadrate) oder Anti-β-Endorphin-Antikörper (anti-END, 2 µg, schwarze Dreiecke) intraplantar. Kontrolle IgG<sub>2</sub> in gleicher Dosis (schwarze Kreise). Zusätzlich wurde die kontralaterale unbehandelte Pfote gemessen (weiße Symbole) (**C**). n = 6, Two way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle p<0,05.

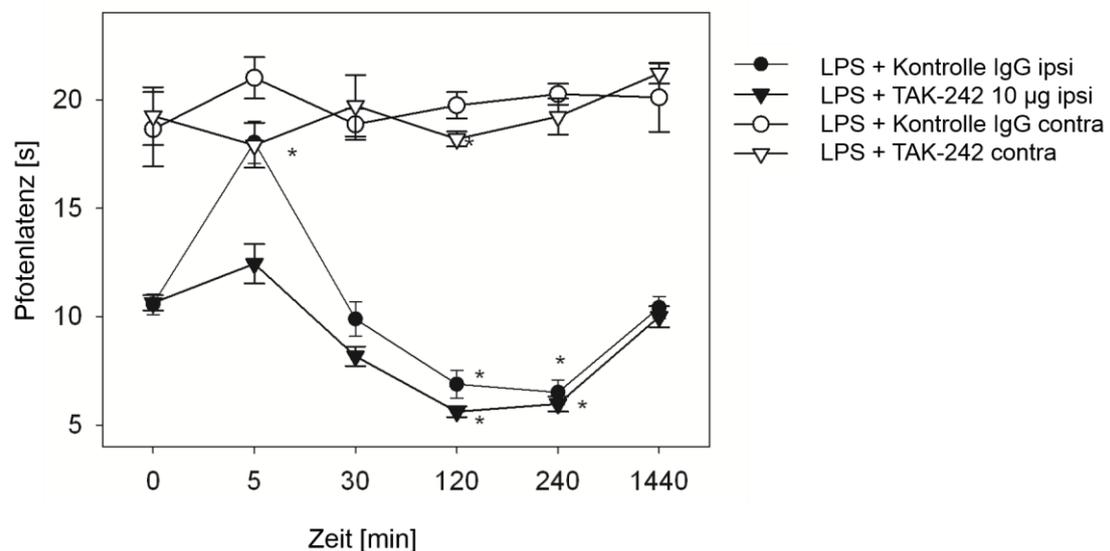
Um die Beteiligung von TLR4 an der LPS-induzierten Antinozipeption zu untersuchen, wurden die Ratten in einem nächsten Schritt begleitend mit TAK-242 behandelt, einem niedermolekularen TLR4-Antagonisten. In hoher Dosierung (10 µg) wurden sowohl die thermische als auch die mechanische Antinozipepti-

on aufgehoben. Zudem kam es zu einem Abfall der basalen Schmerzschwelle nach 120 min. Blockierung des TLR4 hebt somit die LPS-induzierte Antinozizeption auf und reduziert die Schmerzgrenze in Anwesenheit von LPS.

**A**



**B**



**Abb. 2: Aufhebung der Antinozizeption durch TLR4-Blockade**

Messung der PPT in der entzündeten Pfote nach 5-120 min ( $n = 3-7$ ) (**A**) und der PWL (**B**) nach intraplantarer Injektion von LPS ( $1 \mu\text{g}$ , schwarze Kreise) und TAK-242 ( $10 \mu\text{g}$ , schwarze Dreiecke) zu den angegebenen Zeitpunkten ( $n = 6$ ). Zum Vergleich wurde die kontralaterale Seite

dargestellt (weiße Symbole). Two way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle  $p < 0,05$ .

### 1.7. Fragestellungen

Aus den dargestellten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergeben sich die Fragestellungen, die in dieser Arbeit untersucht werden. Monozyten enthalten Opioidpeptide. Sie werden durch Chemokine zum Ort des Entzündungsgeschehens rekrutiert. Die endogene Freisetzung von Opioidpeptiden bewirkt eine periphere Analgesie. Toll-like Rezeptoren sind ubiquitäre Rezeptoren des Immunsystems, die für die Entstehung von Schmerz als Protagonisten identifiziert worden. TLR werden auf Monozyten exprimiert. Es ergibt sich untenstehende Arbeitshypothese:

Die Aktivierung von Monozyten über Toll-like Rezeptoren in inflammatorischem Gewebe führt zur Freisetzung von Opioidpeptiden und trägt somit zur peripheren Analgesie bei.

Die vorliegende Arbeit versucht anhand der folgenden Fragestellungen die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle von Monozyten in der peripheren opioidvermittelten Analgesie zu ergänzen:

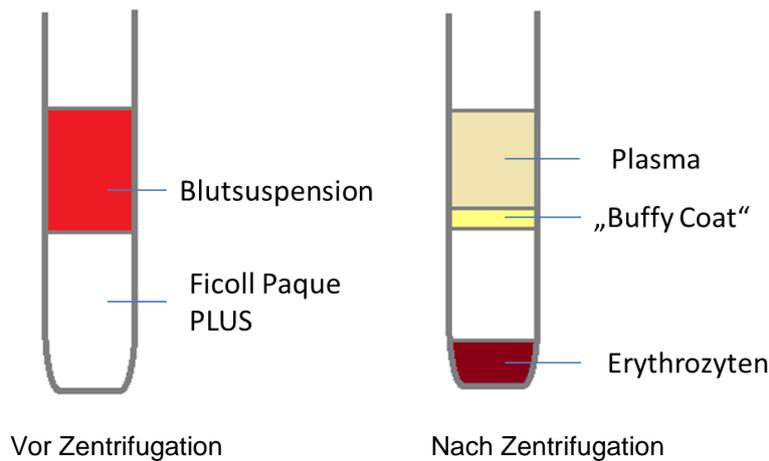
- Wird durch Aktivierung von Toll-like Rezeptor 2 und 4 eine Opioidfreisetzung aus Monozyten *in vitro* induziert?
- Unterscheiden sich die Monozytensubpopulationen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> in ihrem analgetischen Potential?
- Welche intrazellulären Signalwege vermitteln die *in vitro* Opioidfreisetzung aus Monozyten?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewinnung humaner Blutmonozyten

Als Ausgangsprodukt zur Gewinnung humaner Blutmonozyten standen sogenannte Blutzapfen oder LRSC (leukoreduction system chambers) des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Oberdürrbacher Straße 6, Universitätsklinikum Würzburg, zur Verfügung. Blutzapfen sind angereicherte Leukozytenkonzentrate, die bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten im Aphereseverfahren als Nebenprodukt entstehen. Somit stellen die Blutzapfen eine effiziente und ökonomische Quelle für funktionsfähige Monozyten dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Blutzapfen stammen von gesunden Spendern und wurden anonym gesammelt.

Zuerst wurde das Blut aus den Zapfen (ca.8 ml) in ein 50 ml Röhrchen geleert und mit 40 ml RPMI 1640 gemischt. Je 6 ml dieser Suspension wurden auf acht 15 ml Röhrchen, in die jeweils 4 ml Ficoll-Paque PLUS vorgelegt wurde, aufgeteilt. Die Blutsuspension wurde dabei vorsichtig auf die Ficoll-Paque PLUS pipettiert, sodass zwei Schichten unterschiedlicher Dichte entstehen. Dann erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1500 U für 30 min ohne Bremse. Es handelt sich bei dem Ficoll-Reagenz um eine synthetische Polysaccharoselösung mit Epichlorhydrin, Natriumdiatrizolsäure und Calcium-Dinatrium-EDTA. Die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation trennt die verschiedenen Zelltypen nach ihrer Dichte in Schichten auf. Am Boden befinden sich die Erythrozyten, darüber kommen hauptsächlich Granulozyten zu liegen, während sich die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten als sogenannter *Buffy Coat* an der Grenzfläche zwischen Plasma und Ficoll-Paque PLUS ansammeln (Abb. 3) [70]. Der *Buffy Coat* wurde durch Abpipettieren aus der Zwischenphase gewonnen und zweimalig in 10 ml RPMI 1640 gewaschen. Dazu erfolgte jeweils die Suspension des Zellsediments, eine Zentrifugation für 10 min bei 1200 U und das Absaugen des Überstandes.



**Abb. 3: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Als Nächstes wurde das Zellsediment in 12 ml kaltem MACS Puffer gelöst. Die Suspension wurde über einen MACS Pre-Separation Filter gegeben, um Zellaggregat herauszufiltern. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 3  $\mu$ l der Zellsuspension 1:100 in Trypanblau-Lösung gefärbt und die Anzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Trypanblau färbt tote Zellen blau an, somit konnte die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt werden. Anschließend folgte die in 2.2 bzw. 2.3 beschriebene Immunmagnetische Separation.

## 2.2. Immunmagnetische Separation

### 2.2.1. Prinzip

Die Immunmagnetische Separation (MACS Separation) ist ein Trennverfahren zur Positiv- oder Negativselektion von Zellen, die mit magnetischen Antikörpern markiert worden.

Durch Inkubation einer Zellsuspension mit magnetischen Antikörpern, die gegen das Oberflächenprotein CD14 gerichtet sind, den sogenannten CD14 MicroBeads, werden alle CD14<sup>+</sup> Zellen markiert. Das CD14 Antigen ist Teil des LPS-Rezeptor-Komplexes und wird stark auf Monozyten und Makrophagen, aber nur schwach auf neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert [71]. Die alleinige Bindung von CD14 MicroBeads löst keine intrazellulä-

re Signalkaskade aus, da erst die Bindung des Liganden LPS eine Interaktion mit TLR4 und den nachgeschalteten zytoplasmatischen Domänen bewirkt [16]. Nach der Inkubation wird die Zellsuspension auf eine MACS Säule geladen, welche sich im magnetischen Feld eines MACS Separators, eines starken Permanentmagneten, befindet. Alle CD14 markierten Zellen bleiben auf Grund der Bindung an die magnetischen MicroBeads im Magnetfeld der Säule fixiert, während alle anderen Zellen die Säule durchlaufen und in einem Röhrchen aufgefangen werden. Anschließend wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, die markierten Zellen werden ausgespült und in einem separaten Röhrchen als positive Zellfraktion gesammelt.

### 2.2.2. Durchführung

Die Zellen des *Buffy Coats* wurden wie in 2.1 beschrieben gewonnen. Es wurden  $10^8$  Zellen pro 800  $\mu$ l MACS Puffer gelöst und mit 200  $\mu$ l CD14 MicroBeads pro  $10^8$  Zellen für 15 min bei 4 °C auf der Schüttelplatte inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger, ungebundener MicroBeads wurde die Zellsuspension zweimal in 10 ml MACS Puffer gewaschen. Dann wurde eine MACS LS Säule in das magnetische Feld des MACS Separators eingebracht und mit einem Pre-Preparation Filter versehen. Die Säule wurde mit 3 ml MACS Puffer gespült, bevor die Zellsuspension mit  $10^8$  Zellen pro 500  $\mu$ l MACS Puffer aufgetragen wurde. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule und finden sich nach dreimaligem Spülen mit je 3 ml MACS Puffer als Negativfraktion. Die CD14 positiv markierten Zellen verbleiben in der Säule und werden nach Entfernung derselben aus dem Magnetfeld mit 5 ml MACS Puffer eluiert. Von dieser Positivfraktion wurden 5  $\mu$ l entnommen und zur mikroskopischen Zellzählung 1:20 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und gefärbt. Die Ausbeute an CD14+ Zellen lag bei durchschnittlich 16 %.

Um die Reinheit des Auftrennungsverfahrens zu überprüfen, wurden je 50  $\mu$ l der Zellsuspension vor der Auftrennung sowie aus der Negativ- und der Positivfraktion genommen und mit anti-humanen CD14 FITC Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer und ergab eine Reinheit von durchschnittlich 95 %.

### 2.3. Gewinnung humaner CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>Monozyten

Blutmonozyten können in zwei Subpopulationen aufgetrennt werden: klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und nicht-klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Die Fraktion der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> macht 5-10 % der gesamten Monozytenpopulation aus. Die Selektion von CD16<sup>+</sup> Monozyten wurde mit Hilfe des MACS CD16<sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit vorgenommen. Das Verfahren erfolgte zunächst wie in 2.1 beschrieben. Anschließend wurden die aus dem *Buffy Coat* gewonnenen Zellen in 300 µl MACS Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen suspendiert und mit je 100 µl F<sub>c</sub>R Blocking Reagent und Non-Monocyte Depletion Cocktail für 15 min bei 4 °C auf der Schüttelplatte inkubiert. Das F<sub>c</sub>R Blocking Reagent besteht aus humanem IgG und verhindert durch Bindung an den F<sub>c</sub>-Rezeptor unspezifische Bindungen. Der Non-Monocyte Depletion Cocktail beinhaltet CD15 und CD56 MicroBeads für die magnetische Markierung von CD15<sup>+</sup> Granulozyten (neutrophile und eosinophile) und CD56<sup>+</sup> NK-Zellen. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml MACS Puffer und Zentrifugieren bei 1200 U für 10 min, wurden die Zellen in 500 µl Puffer je 1,25x10<sup>8</sup> Zellen suspendiert und über eine zuvor mit 2 ml Puffer gewaschene LD Säule gegeben. Dann wurde die Säule zweimal mit 1 ml Puffer gewaschen und alle durchgelaufenen Zellen als Negativfraktion gesammelt. Diese Negativfraktion enthält die unmarkierten Monozyten und dient der weiteren Auftrennung. Die Negativfraktion wurde nach Zentrifugation (1200 U, 10 min) in 400 µl Puffer je 1x10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert und mit 100 µl CD16 MicroBeads je 1x10<sup>8</sup> Zellen für 15 min bei 4 °C auf der Schüttelplatte inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift und die Separation über die LS Säule. Die CD16<sup>+</sup> markierten Zellen bleiben im Magnetfeld der Säule hängen und wurden mit 5 ml Puffer eluiert. Der Anteil an CD16<sup>+</sup> Monozyten wurde per Zellzählung unter dem Mikroskop bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit des Trennverfahrens wurden Proben zur Färbung und Analyse in der Durchflusszytometrie gewonnen.

### 2.4. Opioidfreisetzung

#### 2.4.1. Prinzip

Monozyten sind wie alle Zellen des Immunsystems mit spezifischen Mustererkennungszepatoren, den sogenannten Pattern recognition Receptors (PRR),

besetzt. Die Bindung von Pathogenen an PRR führt zur Auslösung intrazellulärer Signalwege und trägt damit zur Immunabwehr bei [16]. Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten enthalten  $\beta$ -Endorphin- und Met-Enkephalinhaltige Granula im Zytoplasma [30, 72]. Durch adäquate Stimulation können diese Opioidpeptide aus den Immunzellen freigesetzt werden [9, 73]. In der vorliegenden Studie wurde die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin aus Monozyten durch Stimulation von TLR2 und TLR4 untersucht.

#### 2.4.2. Durchführung

Die Monozyten wurden wie in 2.1 bis 2.3 beschrieben aus dem Blut gesunder Spender gewonnen. Zur Untersuchung der Opioidfreisetzung wurden je  $5 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup>Zellen in 400  $\mu$ l HBSS\* (siehe 2.9) suspendiert und zunächst auf dem Thermomixer bei 700 rpm und 37 °C mit 1  $\mu$ l Cytochalasin B (5  $\mu$ g/ml) vorbehandelt. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l der stimulierenden Substanzen oder der Kontrollsubstanz HBSS\*. Die Stimulation wurde für 15, 60 und 120 min durchgeführt. Die gewählten Konzentrationen von LPS, Pam3CSK4 und Ionomycin beruhen auf Vorexperimenten der Arbeitsgruppe [34].

Nach der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gekühlt und anschließend über 5 min bei 400 U und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Stimulationssubstanz	Stimulationsdauer/min		
HBSS*	15	60	120
LPS (c= 0,1 $\mu$ g/ml)	15	60	120
LPS (c= 1,0 $\mu$ g/ml)	15	60	120
LPS (c= 10,0 $\mu$ g/ml)	15	60	120
Pam3CSK4 (c= 0,1 $\mu$ g/ml)	15	60	120
Pam3CSK4 (c= 1,0 $\mu$ g/ml)	15	60	120
Pam3CSK4 (c= 10,0 $\mu$ g/ml)	15	60	120
Ionomycin (c=10 $\mu$ M)	15	60	120

**Tab. 3: Stimulationsschema**

Zur Überprüfung des Einflusses der Vorbehandlung mit Cytochalasin B wurden nach demselben Versuchsprotokoll Proben im Vergleich mit bzw. ohne Vorbehandlung mit Cytochalasin B (5 µg/ml) gemessen. Es wurden die basale Freisetzung (Kontrollgruppe mit HBSS\*) sowie die Stimulation mit LPS (10 µg/ml) und Ionomycin (10 µM) für 15 min gemessen.

### 2.4.3. Blockierung

Um den Mechanismus der Opioidfreisetzung weiter zu untersuchen, wurden in einem nachfolgenden Experiment die Zellen nach der fünfminütigen Inkubation mit Cytochalasin B (5 µg/ml) über 10 min mit verschiedenen blockierenden Substanzen vorbehandelt. Als blockierende Reagenzien wurden Anti-hTLR4-IgA (10 µg/ml), ein humaner Antikörper gegen den Toll-like Rezeptor 4, BAPTA/AM (100 µM), ein zellpermeabler Calciumchelator, 2-APB (100 µM), ein IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Inhibitor, Wortmannin (100 nM), ein PI3K-Inhibitor, und TAK-242 (1/5/10 µM) ein niedermolekularer TLR4 Signal-Inhibitor, eingesetzt. Danach erfolgte die Stimulation mit LPS (10 µg/ml) oder Pam3CSK4 (10 µg/ml) über 15 min. Das weitere Procedere entspricht dem in 2.4.2.

Vorbehandlung	Dauer/min	Stimulationssubstanz		Dauer/min
Anti-hTLR4-IgA (c=10 µg/ml)	10	LPS (10 µg/ml)	Pam3CSK4 (10 µg/ml)	15
BAPTA/AM (c=100 µM)	10	LPS (10 µg/ml)	Pam3CSK4 (10 µg/ml)	15
2-APB (c=100 µM)	10	LPS (10 µg/ml)	Pam3CSK4 (10 µg/ml)	15
Wortmannin (c=100 nM)	10	LPS (10 µg/ml)	Pam3CSK4 (10 µg/ml)	15
TAK-242 (c=1/5/10 µM)	10	LPS (10 µg/ml))	Pam3CSK4 (10 µg/ml)	15

**Tab. 4: Blockierungsschema**

## **2.5. Zellyse**

Um den Gehalt an intrazellulär gespeichertem β-Endorphin in den Monozyten zu ermitteln, wurden die Zellen lysiert, sodass die Zellmembran und die intrazel-

lulären Vesikel zerstört wurden und  $\beta$ -Endorphin freigesetzt wurde. Die Zellyse erfolgte mechanisch durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Dazu wurden die nach Stimulation und Entnahme des Überstandes in den Mikroreaktionsgefäßen zurückbleibenden Monozyten ( $5 \times 10^6$  pro Probe) in 200  $\mu$ l Puffer des  $\beta$ -Endorphin EIA Kits suspendiert. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für 5-10 s schockgefroren und anschließend in 37°C warmem Wasserbad wieder aufgetaut und mit dem Vortex kräftig durchmischt. Diese Schritte wurden fünfmal wiederholt. Abschließend wurden die Proben 10 min auf Eis gekühlt und bei 0°C und 1300 U für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

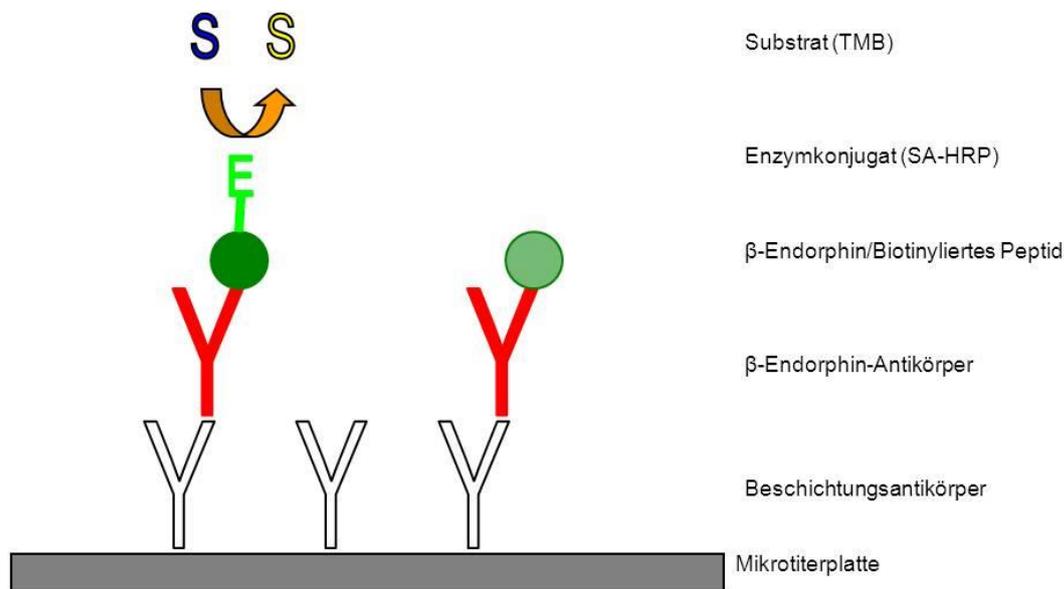
## **2.6. ELISA (= Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

### 2.6.1. Prinzip

Der ELISA (= Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht, welche eine quantitative Messung von Peptiden erlaubt. Er gehört zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA). Bei dem verwendeten Nachweisverfahren handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, bei dem das nachzuweisende Antigen mit einem zugefügten Kompetitor-Antigen um die Bindung am Antikörper konkurriert. Das Kompetitor-Antigen ist markiert und bindet in einem zweiten Schritt ein Enzym, welches die Farbreaktion des Substrats bewirkt. Die Farbentwicklung ist damit umgekehrt zur Menge an Antigen, die in der Probe enthalten ist (schwache Farbreaktion = viel Antigen) [74].

Die vorbehandelte Mikrotiterplatte trägt einen zweiten Antikörper, der in einem ersten Schritt an das F<sub>c</sub>-Fragment einer definierten Menge eines ersten Antikörpers bindet. Dieser erste Antikörper bindet mit seinem F<sub>ab</sub>-Fragment entweder eine vorgegebene Menge des biotinylierten Peptids, das Standardpeptid, oder das in der Probe enthaltene Peptid. Das biotinylierte Peptid konkurriert mit dem Standardpeptid bzw. dem zu detektierenden Peptid um die Bindung am ersten Antikörper. Nur das biotinylierte Peptid interagiert mit der in einem zweiten Schritt hinzugefügten Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP), welche die Substratreaktion katalysiert. Bei dem Substrat handelt es sich um TMB,

das eine blaue Farbentwicklung bewirkt. Der Ablauf der Reaktion wird nach einer definierten Zeit mit Salzsäure gestoppt und die Farbe schlägt nach Gelb um. Die Intensität des Gelbs ist umgekehrt proportional zur Menge des nachzuweisenden Peptids.



**Abb. 4: Prinzip des kompetitiven ELISA**

Durch das Einsetzen einer bekannten Menge des biotinylierten Peptids und einer bekannten Menge des Antikörpers erhält man die Standardkurve, eine graphische Darstellung der Antigenkonzentration in Bezug auf die gemessene Absorption. Die Antigenkonzentration wird logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen, die Absorption linear auf der Y-Achse. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einer vier Parameter logistischen Regression. So ergibt sich eine umgekehrt sigmoide Kurve. Die zu ermittelnde Konzentration des gesuchten Peptids lässt sich als Schnittpunkte einer Horizontalen durch die gemessene Absorption mit der Standardkurve ermitteln. Fällt man das Lot des Schnittpunktes auf die X-Achse, erhält man die Konzentration des Peptids in der eingesetzten Probe.

### 2.6.2. Durchführung

Die Proben aus den Opioidfreisetzungsexperimenten und der Zellyse (vgl. 2.4 und 2.5) wurden im  $\beta$ -Endorphin EIA Kit gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Nur die Verdünnungsreihe des Standardpeptids

wurde nicht wie vorgegeben im Waschpuffer angelegt, sondern wie die zu messenden Proben mit HBSS verdünnt. Somit lagen Standardpeptid und Proben im gleichen Medium vor.

Zur Messung wurden jeweils 50 µl Probe bzw. Standardpeptid im Duplikat auf die vorbeschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 25 µl biotinyliertem Peptid und 25 µl Antikörper für 2 h auf dem Schüttler bei 300-400 rpm inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Platte mit jeweils 350 µl Waschpuffer pro Napf, wurden in jeden Napf 100 µl einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung zugegeben und erneut für 1 h inkubiert. Auf einen zweiten Waschgang folgte die Zugabe von 100 µl Substrat (TMB), welches im Dunklen unter permanentem Schütteln ebenfalls 1 h einwirkte. Als Letztes wurde die Farbreaktion mit 100 µl Salzsäure gestoppt und die Farbe schlug von Blau nach Gelb um. Die Absorptionsmessung wurde mit dem Absorptions-Mikrotiterplattenleser bei 450 nm vorgenommen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Abzug des Mittelwerts des Substratleerwertes (Blank) von den gemessenen Rohwerten. Für die Statistik wurden die Mittelwerte der Duplikate verwendet. Die verwendete Magellan-Software ist eine Reader Server- und Datenreduktions-Software zur Analyse von Daten, die im Absorptions-Mikrotiterplattenleser gemessen worden sind. Sie erhebt die Standardkurve sowie die Probenkonzentrationen aus den gemessenen Absorptionen.

## **2.7. Durchflusszytometrie**

### 2.7.1. Prinzip

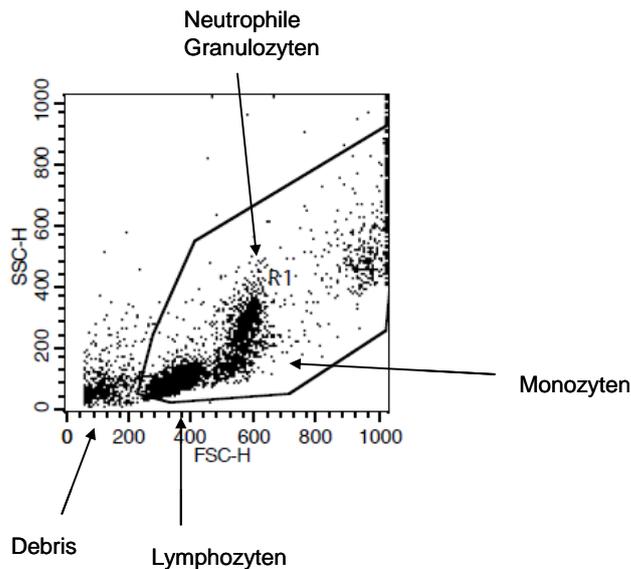
Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)) ist ein Messverfahren zur schnellen (>1000 Zellen pro Sekunde), qualitativen (Größe, Granularität, spezifische Merkmale) Analyse von Zellen. Im Durchflusszytometer werden die Zellen einer Suspension angesaugt und in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Durch die in der Probe enthaltenen Zellen wird der Laserstrahl beim Auftreffen in der Messküvette gestreut und reflektiert. Ein System aus Spiegeln und Filtern trennt die Strahlung nach ihrem Wellenlängenbereich. Die Registrierung des jeweiligen Anteils erfolgt über Detektoren. Das Vorwärtststreulicht (engl. forward scatter, FSC) gibt Auskunft über

die Größe der Partikel. Das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) wird in einem Winkel von 90 ° abgestrahlt und dient als Maß für die Granularität der Zellen, welche durch die Strukturen innerhalb der Zelle (Vesikel, Größe und Struktur des Zellkerns) bestimmt wird. Außerdem kann über Markierung der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) ein Nachweis spezifischer intrazellulärer oder oberflächlicher Strukturen erfolgen. Die Fluorochrome werden durch das vom Laser ausgesandte Licht angeregt und emittieren, je nach Farbstoff, Licht unterschiedlicher Wellenlänge wie z.B. das gelbgrüne Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) bei 519 nm oder das rote Phycoerythrin (PE) bei 578 nm, welches von Photodetektoren gemessen wird. Somit können mehrere Zelleigenschaften gleichzeitig untersucht werden [75].

Zur Auswertung der Messergebnisse werden in dieser Arbeit zwei Darstellungsformen verwendet. Zum einen der zweidimensionale Dot-Plot, ein Punktdiagramm, in dem jedem Ereignis ein Punkt im Diagramm zugeordnet wird und somit Zellpopulationen als Punktwolken erscheinen, zum anderen das eindimensionale Histogramm, bei dem die Stärke des Fluoreszenzsignals logarithmisch gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird.

### 2.7.2. Gating

Ein Prinzip der Analyse der Durchflusszytometrie ist die selektive Auswertung der Zellen, die von Interesse sind und der Ausschluss von Zellabfall bzw. anderen Zellpopulationen. Diese Selektion ist durch das sogenannte Gating möglich. Hierbei wird vom Benutzer anhand von Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) im Punktdiagramm ein *Gate* definiert, das z.B. nur eine bestimmte Zellpopulation umfasst. In der weiteren Analyse werden nur die im *Gate* liegenden Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften ausgewertet. Somit kann die Expression eines definierten Oberflächenmarkers in einer ausgewählten Zellpopulation bestimmt werden.



**Abb. 5: Identifikation von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie anhand von Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H).**

Die gewünschten Zellpopulationen können durch ein *Gate* ausgewählt werden. In den folgenden Analysen werden nur Zellen, die in diesem *Gate* liegen, registriert und charakterisiert.

### 2.7.3. Kompensation

Da es vorkommt, dass sich die Emissionsspektren zweier Fluorochrome überlappen, kann es zu falsch positiven Signalen kommen, wenn das Signal eines Farbstoffs nicht in dem für ihn vorgesehenen Photodetektor registriert wird. Durch den Kompensationsvorgang werden diese falsch positiven von den richtig positiven Signalen getrennt. Die Zellen für die Kompensationsmessung müssen von gleicher Art, Färbung und Gewinnung, wie die zu analysierenden Zellen sein, sodass zu jedem Probenstet auch Kontrollen zur Kompensationsmessung angefertigt werden. Vor der eigentlichen Messung wird in der Kompensationsmessung festgestellt, wie hoch die Kompensation sein muss und diese Berechnung für die nachfolgenden Messungen übernommen.

### 2.7.4. Antikörperfärbungen

#### Oberflächenfärbung

Zur Analyse der Reinheit der CD14<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> Zellen sowie zur Charakterisierung der Expression der Toll-like Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden direkte Oberflächenfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern durchge-

führt. Die verwendeten Zellen wurden wie in 2.1 und 2.3 beschrieben gewonnen. Anschließend wurden  $10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l MACS Puffer mit der entsprechenden Menge Antikörper (siehe Tab. 5) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS und Resuspension in 250  $\mu$ l PBS konnte die durchflusszytometrische Messung erfolgen. War es nicht möglich die Zellen gleich im Anschluss zu analysieren, wurden sie in 250  $\mu$ l PFA 1 %ige Lösung fixiert und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### Isotypkontrolle

Die Isotypkontrolle wurde eingesetzt, um das Ausmaß der unspezifischen Bindung monoklonaler Maus-Antikörper an humane Oberflächenproteine, besonders an den  $F_c$ -Rezeptor, sowie die Autofluoreszenz der Zellen abzuschätzen. Als unspezifische Hintergrundfärbung dient sie als Negativkontrolle, von der die spezifische Färbung des Primärantikörpers abgegrenzt wird. In der vorliegenden Arbeit wird die Isotypkontrolle im Histogramm angegeben.

Bezeichnung	Antigen	Zielzelle	Fluorochrom	Konzentration
Anti-Human CD282 (TLR2)	TLR2 (Transmembranprotein)	Monozyten	PE	10 $\mu$ g/ml
Anti-Human CD284 (TLR4)	TLR4 (Transmembranprotein)	Monozyten, Granulozyten, unreife dendritische Zellen	PE	20 $\mu$ g/ml
CD14-FITC, human	Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -verankertes Glykoprotein (LPS-Rezeptor)	Monozyten, interfollikuläre Makrophagen, myeloisch-dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten	FITC	5 $\mu$ l/test
CD16-PE, human	IgG $F_c$ Rezeptor ( $F_c\gamma$ RIII)	NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten	PE	5 $\mu$ l/test
PE Mouse IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$ Isotype control	IgG $F_c$ Rezeptor (unspezifisch)	Isotyp-Kontrolle	PE	20 $\mu$ l/test

**Tab. 5: Färbeschema für die Durchflusszytometrie**

## 2.8. Chemikalien und Kits

Chemikalie	Hersteller
2-APB	Calbiochem, Merck4Biosciences Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BAPTA/AM	Calbiochem, Merck4Biosciences Darmstadt, Deutschland
Bestatin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD14 MicroBeads human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16 <sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CFA	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EL Puffer (Erythrocyte Lysis Buffer)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden Freiburg
Gibco® RPMI 1640 GlutaMAX	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland ,
HBSS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Naloxon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pam3CSK4	InvivoGen, San Diego, USA
PBS	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
TAK-242 (TAK-242)	Haoyuan Chemexpress Co., Shanghai, China
Thiorphan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Wortmannin	Calbiochem, Merck4Biosciences Darmstadt, Deutschland
β-Endorphin (Human) EIA Kit	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Karlsruhe, Deutschland

**Tab. 6: verwendete Chemikalien und Kits**

### 2.8.1. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-hTLR4-IgA	InvivoGen, San Diego, USA
Anti-Human CD282 (TLR2) PE	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Anti-Human CD284 (TLR4) PE	
Anti-β-Endorphin-Antikörper	Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA
CD14-FITC, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16-PE, human	
PE Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ Isotype control	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

**Tab. 7: verwendete Antikörper**

### 2.9. Lösungen und Puffer

#### MACS Puffer

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

#### Trypanblau

Trypanblau Lösung (0,4%) mit PBS 1:10 verdünnt

#### HBSS (Hanks Balanced Sodium Solution)

1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,81 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,36 mM KCl, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136,89 mM NaCl, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,94 mM D-Glucose + 0,035 % Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub> alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland). Der Ziel pH liegt bei 7,35. Vor Gebrauch Steril-Filtrierung.

#### HBSS\* = HBSS + Proteinaseinhibitoren

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

#### Paraformaldehyd 1 % Fixierlösung

1 g PFA gelöst in 100 ml PBS, pH 7,4.

## 2.10. Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptions-Mikrotiterplattenleser	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
MACS LD Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS LS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Megafuge 16 R Zentrifuge	Thermo Scientific, Braunschweig einer von vielen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	LMS, Tokyo , Japan

**Tab. 8: verwendete Geräte**

## 2.11. Software

Programm	Hersteller	Verwendung
EndNoteX7	Thomson Reuters, USA	Literaturverwaltung
FACScan Software, BD Cellquest Pro	BD Biosciences, USA	FACS Analyse
Magellan Version 5.01	Tecan, Schweiz	ELISA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, USA	Statistik
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, USA	Textverarbeitung
Sigma Plot Version 11.0	Systat Software Inc., USA	Graphik
Sigma Stat Version 3.5	Systat Software Inc., USA	Statistik

**Tab. 9: verwendete Software**

## 2.12. Statistik und Auswertung

Die Statistische Auswertung der Opioidfreisetzungsexperimente erfolgte als Varianzanalyse (Analysis of Variance (ANOVA)). Die ANOVA testet die Hypothese, dass keine Unterschiede zwischen den Proben bestehen und prüft den Einfluss eines einzelnen Faktors auf die experimentellen Gruppen. Sie geht von normalverteilten Populationen mit derselben Varianz aus. Bedingt durch das Verfahren der Zellseparation handelt es sich bei den Daten der Freisetzungsexperimente um verschiedene Individuen. Aus diesem Grund wurde die ANOVA für wiederholte Messungen (One Way Repeated Measures (RM)) verwendet. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen und Unterschiede innerhalb der Gruppe getrennt werden. Somit wird den interindividuellen Schwankungen in der Stimulationsantwort Rechnung getragen [76].

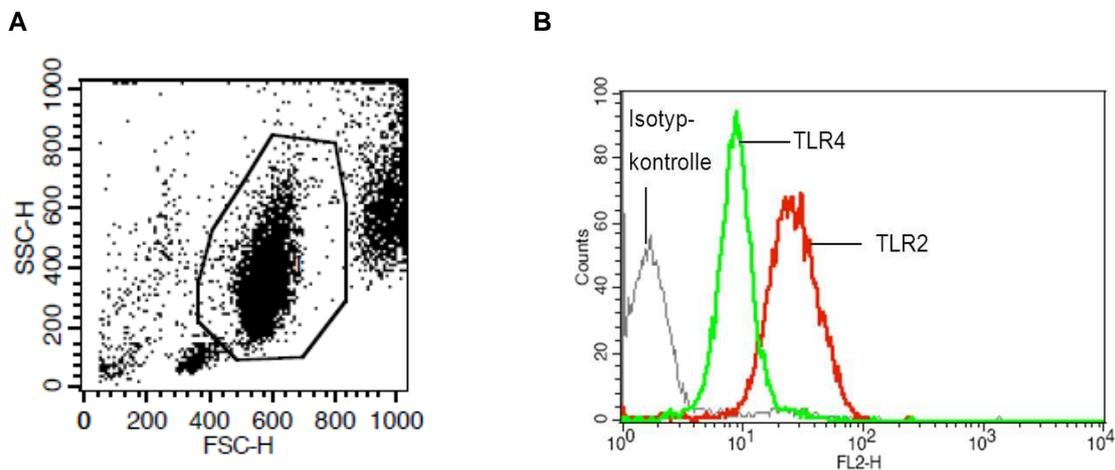
Für den Vergleich mehrerer experimenteller Gruppen gegeneinander, wie er bei den Blockierungsexperimenten vorliegt, wurde der ANOVA ein Mehrfach-Vergleiche-Test nach der Student-Newman-Keuls-Methode angeschlossen. Der Student-Newman-Keuls-Test wird als paarweiser Vergleich aller Proben gegeneinander durchgeführt. Es werden die Fehler zwischen den Tests mit den k-Mittelwerten kontrolliert und die Signifikanz der Gruppen zueinander bestimmt. Zur Charakterisierung der Monozytensubpopulationen wurde der gepaarte t-Test angewendet. Es handelt sich um ein Verfahren, dass die Änderung vor und nach einer Intervention am selben Individuum untersucht. In diesem Fall: die Eigenschaften der unterschiedlichen Monozytensubpopulationen aus demselben Spender zueinander.

Zu Grunde lagen in allen Fällen die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Ergebnisse sind signifikant falls  $p < 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression der Zellrezeptoren TLR2 und TLR4

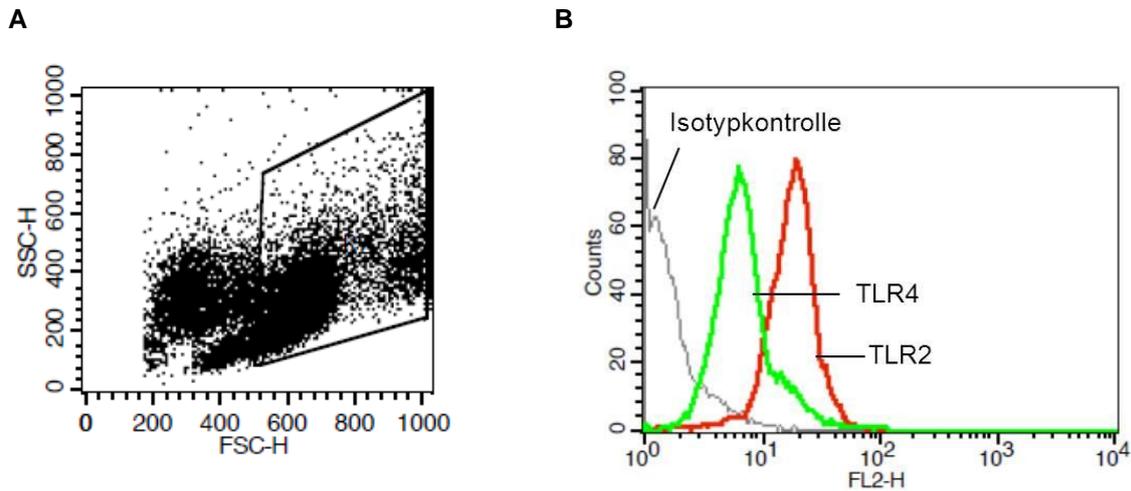
In der Durchflusszytometrie konnten auf den aufgereinigten humanen Monozyten sowohl TLR2 als auch TLR4 nachgewiesen werden. Im Histogramm (Abb. 6 B) zeigte sich die Anwesenheit dieser Zellrezeptoren durch eine Rechtsverschiebung im Mittelwert der Fluoreszenz im Vergleich zur Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>). TLR2 wurde von 99% der Monozyten exprimiert, TLR4 lag auf 98% der Zellen vor.



**Abb. 6: CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimieren stärker TLR2 als TLR4**

PBMC von humanen Spendern wurden über CD14-Microbeads aufgereinigt und mit anti-TLR2-PE oder anti-TLR4-PE angefärbt. **(A)** Identifikation der Monozytenpopulation in der Forward/Sideways Analyse (Größe und Granularität, Gate = Fenster für Monozyten), **(B)** Histogramm der TLR2-(rot) und TLR4-positiven (grün) Zellpopulationen im Vergleich zur Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>)(grau), überlappende Darstellung beider Färbungen in einem Histogramm, exemplarische Färbung aus n=3.

Auch auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten können beide Rezeptoren nachgewiesen werden. TLR2 wird auf diesen Zellen deutlich stärker exprimiert (53,9%) als TLR4, der nur auf 7,2% nachgewiesen werden konnte.

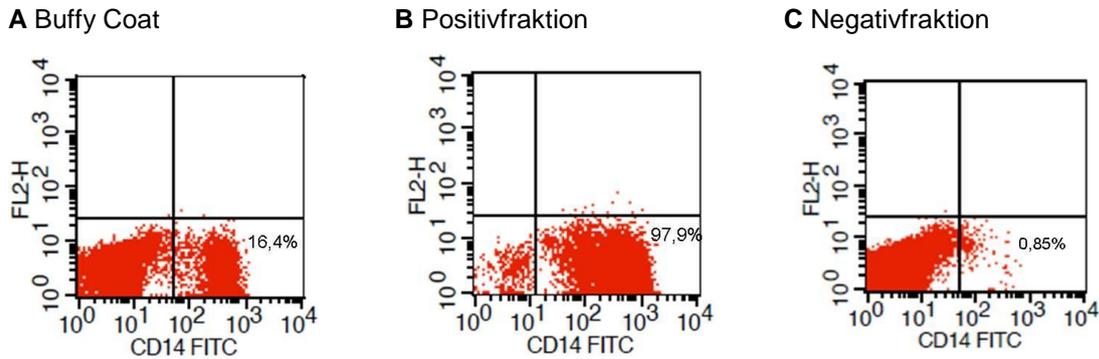


**Abb. 7: Erhöhte TLR2-Expression im Vergleich zur TLR4-Expression auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten**

PBMC von humanen Spendern wurden zunächst depletiert von allen Nicht-Monozyten und anschließend mit CD16-Microbeads aufgereinigt sowie mit anti-TLR2-PE oder anti-TLR4-PE angefärbt. **(A)** Gate=Fenster für CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten, **(B)** TLR2-(rot) und TLR4-positive (grün) Zellpopulationen im Vergleich zur Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>) (grau), überlappende Darstellung beider Färbungen in einem Histogramm, exemplarische Färbung aus n=3.

### 3.2. Monozytenreinheit nach immunmagnetischer Separation

In der dargestellten exemplarischen Probe sind vor magnetischer Auftrennung 16,4 % der Zellen des *Buffy Coats* CD14<sup>+</sup> Monozyten. In der Negativfraktion sind nur noch 0,85 % CD14<sup>+</sup> Zellen zu finden. In der Positivfraktion sind zu 97,9 % CD14<sup>+</sup> Monozyten angereichert. Da die Reinheit durchschnittlich >95 % lag (n=6), wurde in weiteren Experimenten auf eine Überprüfung verzichtet. Die effektivste Dosis von 200 µl magnetische MicroBeads pro 10<sup>8</sup> Zellen wurde den Herstellerangaben entnommen und in Vorexperimenten etabliert.

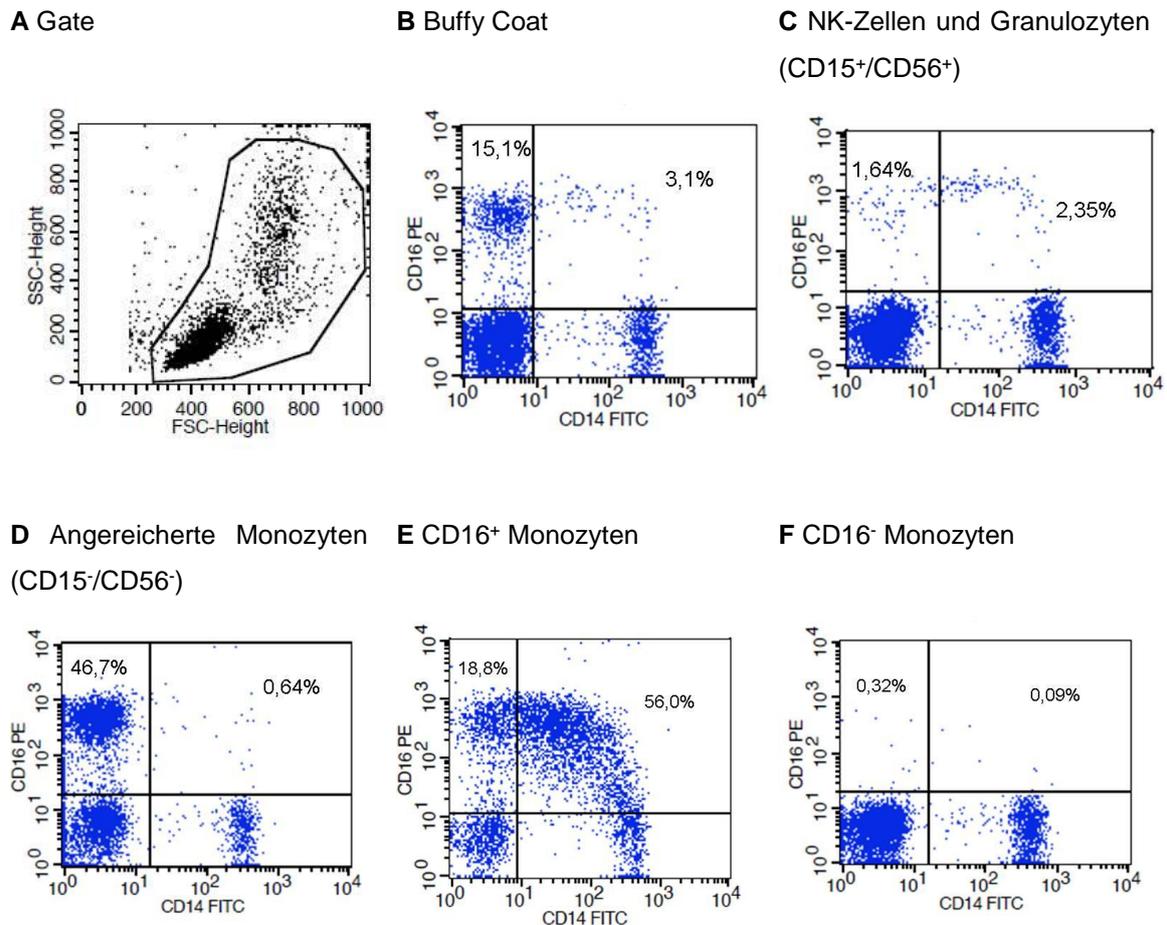


**Abb. 8: Reinheit der CD14<sup>+</sup> Zellen nach MACS Zellseparation**

Zur Überprüfung der Reinheit des Auftrennungsverfahrens wurden Zellproben vor der MACS-Separation aus der Negativfraktion sowie aus der Positivfraktion entnommen und mit CD14-FITC Antikörper gefärbt. Analyse im Durchflusszytometer. Vorauswahl der Zellen anhand ihrer Größe und Granularität im Streulicht getroffen (*Gating*), um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Zelltrümmer oder andere Zellen wie Lymphozyten vorzubeugen.

(A) Vor der immunmagnetischen Separation sind 16,4 % der Zellen positiv für CD14. (B) Nach magnetischer Markierung und Auftrennung sind 97,9 % CD14<sup>+</sup>. (C) Nur 0,85 % der Negativfraktion tragen CD14. Exemplarisch eine Färbung aus n=6.

Die Auftrennung der doppelt positiven CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten erfolgte in einem zweizeitigen Verfahren wie in 2.3 beschrieben. Zu Beginn der Auftrennung lagen unter den Zellen des *Buffy Coats* 3,1 % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten vor. Nach der Depletion von CD15<sup>+</sup> Granulozyten und CD56<sup>+</sup> NK-Zellen waren unter den angereicherten Monozyten 0,64 % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Die anschließende immunmagnetische Separation mit CD16 MicroBeads erzielte eine Anreicherung von 56 % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. Nur 0,09 % der Negativfraktion trugen CD16.



**Abb. 9: Moderate Reinheit von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten**

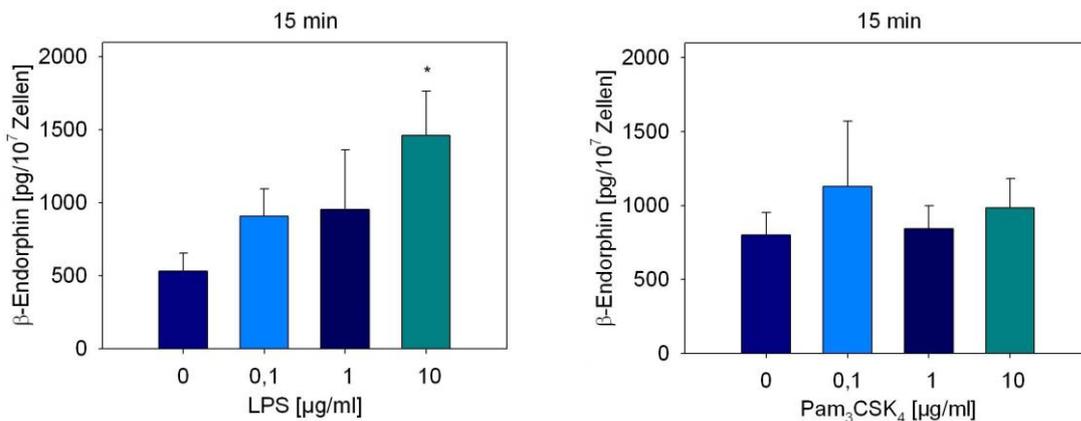
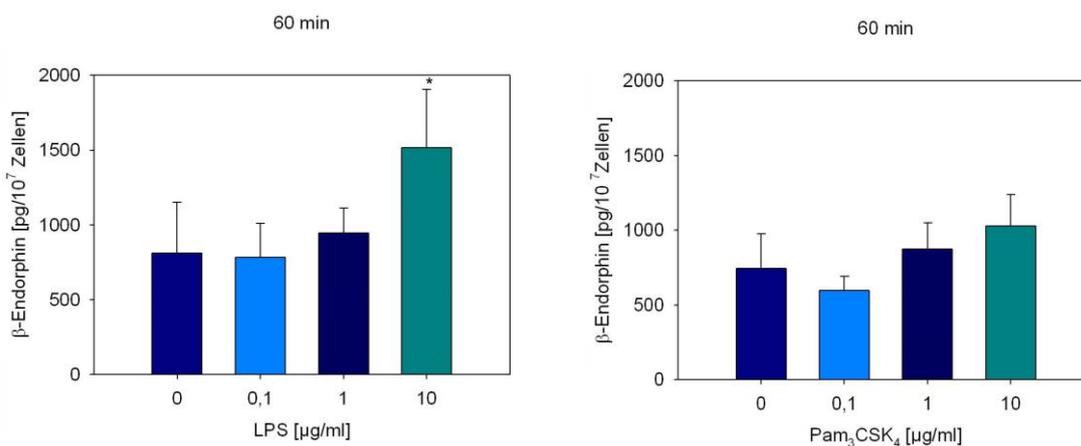
(A) Gate für Monozyten. Vor und nach jedem Separationsschritt erfolgte die Doppelfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen CD14-FITC und CD16-PE. (B) Humane PBMCs enthielten zu 3,1 % CD14 und CD16 doppelt positive Zellen. (D) Die Negativselektion der angereicherten Monozyten war zu 0,64 % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. (E) Die Positivselektion im zweiten Separationsschritt erzielte eine Reinheit von 56 % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten. (F) In der Negativfraktion waren nur 0,09 % CD16<sup>+</sup>. Exemplarisch eine Färbung aus n=8.

### 3.3. $\beta$ -Endorphin-Freisetzung aus Monozyten *in vitro*

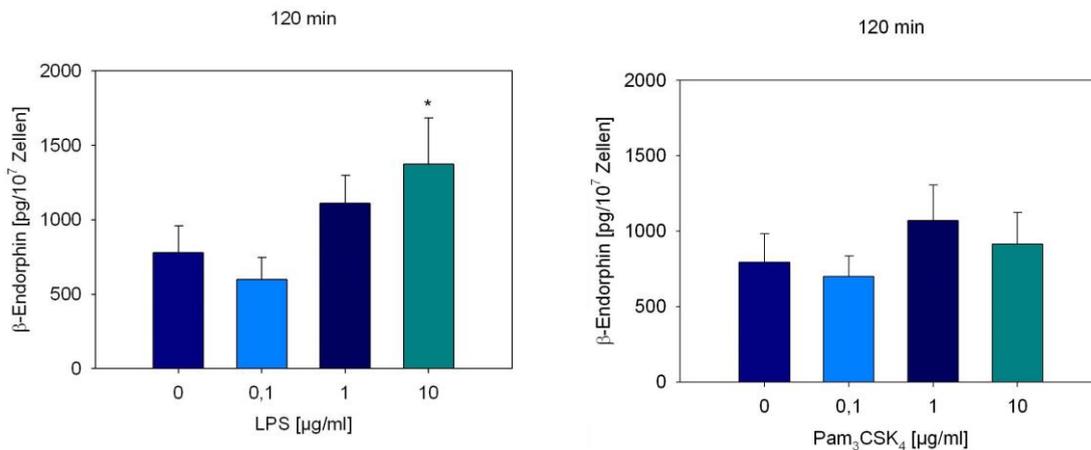
Die aus dem peripheren Blut gesunder Spender gewonnenen CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden im Stimulationsexperiment nach Vorinkubation mit Cytochalasin B für 5 min mit verschiedenen Konzentrationen des TLR2-Agonisten Pam3CSK4 (0,1; 1; 10  $\mu$ g/ml) bzw. des TLR4-Agonisten LPS (0,1; 1; 10  $\mu$ g/ml) über 15, 60 und 120 min inkubiert. Es wurde jeweils eine unstimulierte Kontrolle mit HBSS als Pufferlösung mit getestet, welche die basale Freisetzung widerspiegelt.

Die Stimulation mit LPS bewirkte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung, die sich für LPS in höchster Konzentration (10  $\mu\text{g/ml}$ ) signifikant verdoppelte. Sowohl nach 15, 60 und 120 min wurde eine signifikante Zunahme verzeichnet. Die Freisetzung war unabhängig von der Dauer der Stimulationszeit. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Experimenten nur eine Stimulationsdauer (15 min) gewählt.

Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit dem TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> unabhängig von der Stimulationsdauer nicht zu einer Zunahme der  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung.

**A****B**

C



**Abb. 10: Stimulation der  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung aus  $\text{CD14}^+$  Monozyten durch den TLR4-Agonisten LPS, aber nicht durch den TLR2-Agonisten Pam3CSK4**

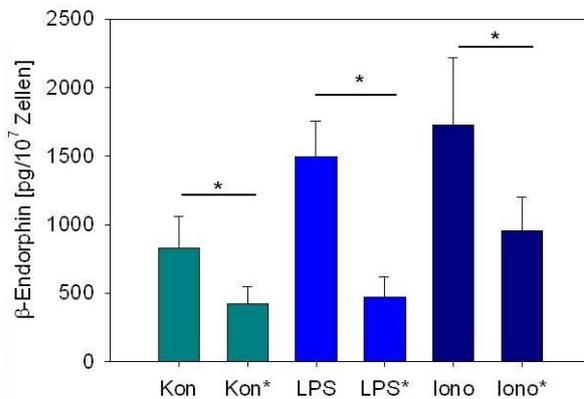
Aus dem Blut gesunder Spender gewonnene und aufgereinigte  $\text{CD14}^+$  Monozyten wurden mit dem TLR-Agonisten LPS (TLR4) in angegebener Konzentration versetzt. Nach Inkubation für 15 (A), 60 (B) oder 120 min (C) war ein signifikanter Anstieg der  $\beta$ -Endorphin-Konzentration im Überstand zu verzeichnen. Nach Stimulation mit Pam3CSK4 (TLR2) gab es keine Zunahme. Die  $\beta$ -Endorphin-Konzentration im Überstand wurde im  $\beta$ -Endorphin-EIA quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ , One Way RM ANOVA; Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle  $p < 0,05$ .

### 3.4. Vorinkubation mit Cytochalasin B

Das Mykotoxin Cytochalasin B wird als Priming Substanz vor allem bei Granulozyten eingesetzt [35]. Es bewirkt eine gesteigerte Freisetzung von Opioidpeptiden durch Voraktivierung der Zellen. Auf Monozyten hat die Vorbehandlung mit Cytochalasin B (5  $\mu\text{g/ml}$ ) ebenfalls einen verstärkenden Effekt. Es zeigt sich, dass sowohl die basale Aktivität der Monozyten (im Versuch als Kontrolle mit der Pufferlösung HBSS), als auch die stimulierte  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung mit dem TLR4-Agonisten LPS durch die Vorbehandlung mit Cytochalasin B signifikant gesteigert werden konnte. Die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (10  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle bestätigt den verstärkenden Effekt von Cytochalasin B (Abb. 11).

Ionomycin ist ein Calciumsalz aus *Streptomyces conglobatus* und wirkt als Calcium-Carrier über biologische Membranen [77]. Durch die Zunahme der intra-

zellulären Calciumkonzentration löst Ionomycin die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin und Met-Enkephalin aus [35].



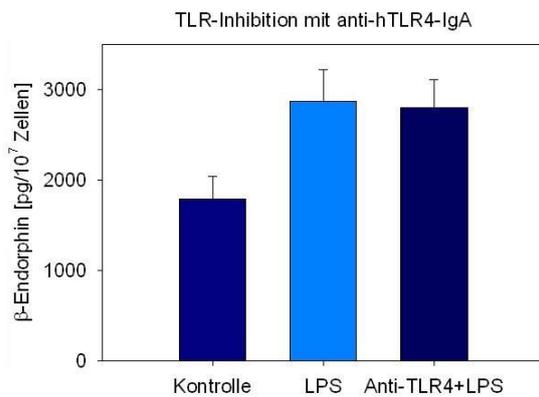
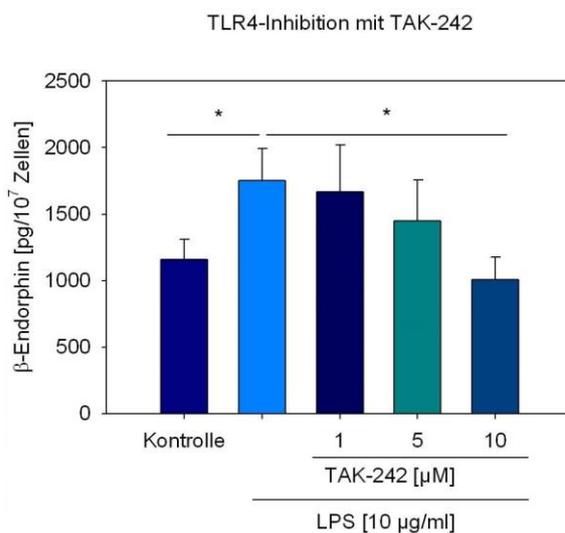
**Abb. 11: Verstärkung der  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung durch Vorinkubation mit Cytochalasin B**

Die aus dem Blut gesunder Spender gewonnenen Monozyten wurden vor der Stimulation für 5 min mit dem Mykotoxin Cytochalasin B (5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Im Vergleich zur nicht vorbehandelten Probe (\*), hatte die Inkubation mit Cytochalasin B eine positive Wirkung auf die  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung. Die Endorphin-Konzentration im Überstand wurde im  $\beta$ -Endorphin-EIA quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n= 6, One Way RM ANOVA; Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle  $p < 0,05$ .

### 3.5. Selektive Inhibition des TLR4-Rezeptors

In weiteren Experimenten wurde die Beteiligung des TLR4-Rezeptors an der stimulierten Freisetzung untersucht. Hierzu wurden als Rezeptor-Antagonisten der synthetische TLR4-Inhibitor TAK-242 und der humane Antikörper Anti-hTLR4-IgA eingesetzt.

Eine Blockierung des TLR4-Rezeptors mit Anti-hTLR4-IgA (10  $\mu$ g/ml) hatte keine signifikante Auswirkung auf die  $\beta$ -Endorphin-Sekretion. TAK-242 hingegen führte konzentrationsabhängig zu einer Inhibition der Opioidfreisetzung und blockierte diese in höchster Konzentration (10  $\mu$ M) signifikant.

**A****B**

**Abb. 12: Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von β-Endorphin durch den TLR4-Blocker TAK-242, aber nicht durch anti-TLR4**

Die aufgereinigten CD14<sup>+</sup>Monozyten wurden zunächst mit Cytochalasin B (5 μg/ml) für 5 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der selektiven TLR4-Inhibitoren: Des humanen Anti-TLR4-Antikörpers (Anti-hTLR4-IgA, 10 μg/ml) bzw. des niedermolekularen TLR4-Inhibitors TAK-242 (in aufsteigender Konzentration, 1/5/10 μM) für 10 min. Anschließend Stimulation mit LPS (10 μg/ml) für weitere 15 min.

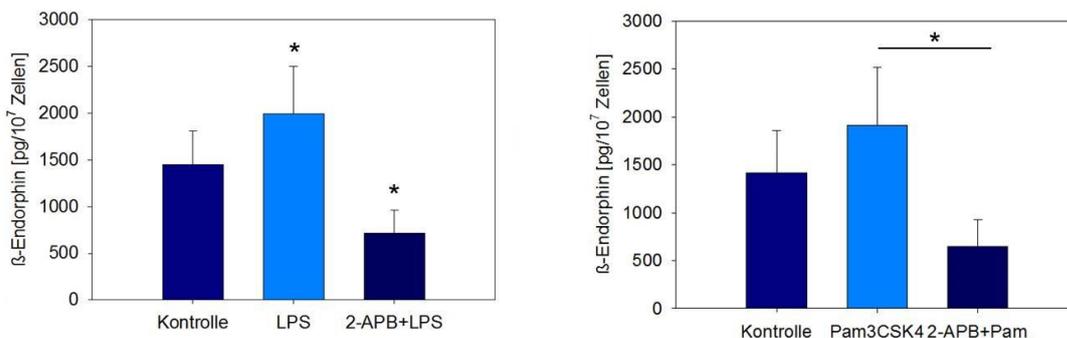
Der synthetische TLR4-Inhibitor TAK-242 inhibiert in hoher Konzentration (10 μM) die β-Endorphin-Freisetzung (**B**), Anti-hTLR4-IgA (10 μg/ml) führte zu keiner Abnahme der Sekretion (**A**). Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n= 6-14, One Way RM ANOVA; Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle p<0,05.

### 3.6. Blockierung calciumabhängiger Signalwege

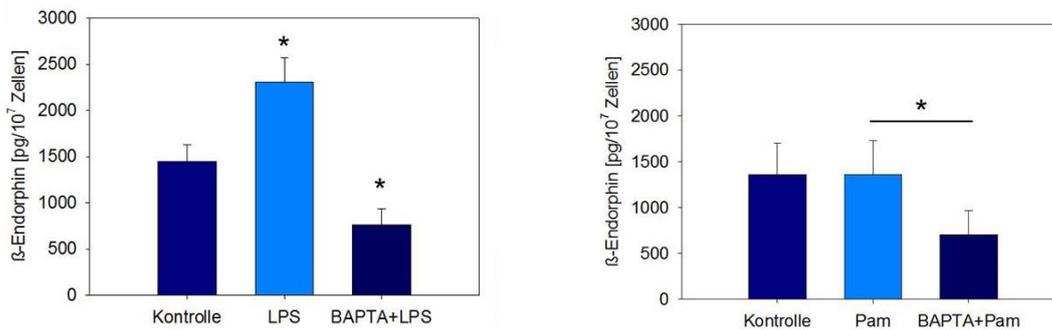
Zur weiteren Analyse des calciumabhängigen Signalwegs wurden der IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Inhibitor 2-APB (100 µM) und der zellmembranpermeable intrazelluläre Calciumchelator BAPTA/AM (100 µM) als blockierende Substanzen eingesetzt. Um eine Beteiligung des PI3K-Signalwegs zu testen, wurde der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) verwendet.

Die Vorbehandlung mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Inhibitor 2-APB (100 µM) reduzierte die β-Endorphin-Freisetzung signifikant auf Werte unterhalb der basalen Freisetzung (Kontrolle). Gleiches gilt für den zellmembranpermeablen Calciumchelator BAPTA/AM (100 µM). Die Freisetzung von Opioidpeptiden durch den TLR4-Agonisten LPS ist somit calciumabhängig. Für die Stimulierung mit dem TLR2-Agonisten Pam3CSK4 konnte wie in den Experimenten in 3.3 keine signifikante β-Endorphin-Freisetzung nachgewiesen werden. Trotzdem reduzierte die Zugabe der Inhibitoren die Freisetzung auf Werte unterhalb des basalen Niveaus. Damit wurde gezeigt, dass auch die basale Freisetzung calciumabhängig ist. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) schwächte die Opioidfreisetzung nur partiell ab. Eine Beteiligung des PI3K-Signalwegs wird vermutet.

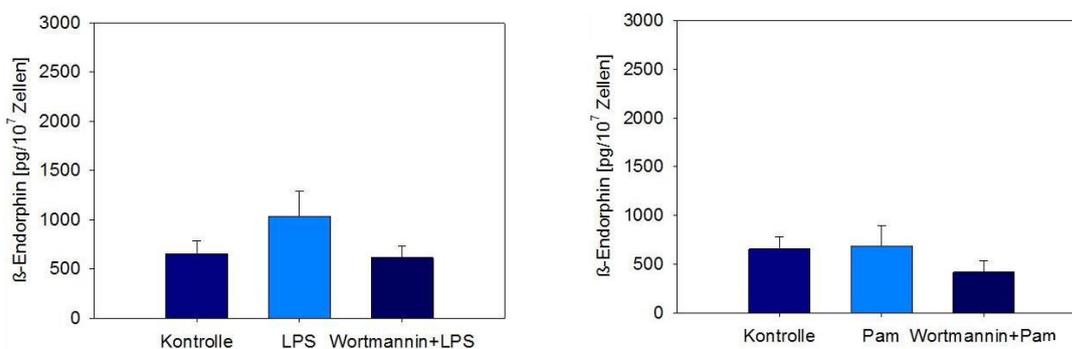
A



B



C



### Abb. 13: Die TLR4-getriggerte β-Endorphin-Freisetzung ist calciumabhängig

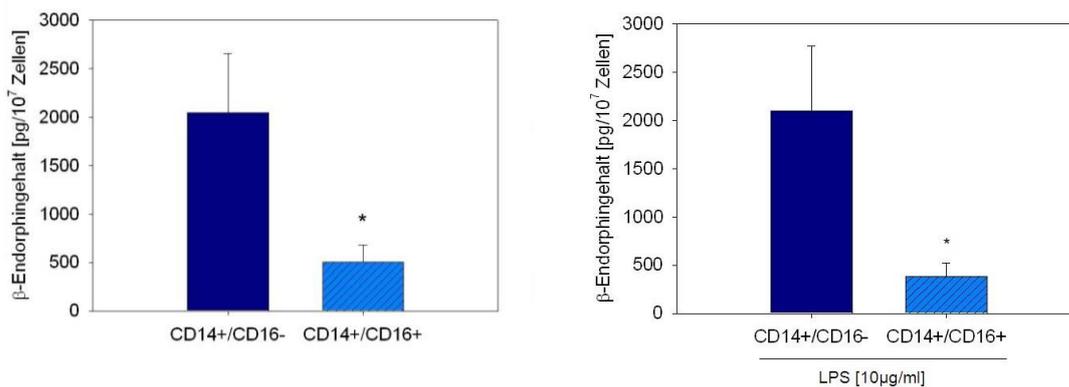
Zugabe von verschiedene Signalweg-Inhibitoren in unten angegebener Konzentration zu den separierten CD14<sup>+</sup> Monozyten für 10 min und Stimulation für weitere 15 min mit LPS (10 µg/ml) oder Pam3CSK4 (10 µg/ml). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Inhibitor 2-APB (100 µM) **(A)** sowie der intrazelluläre Calciumchelator BAPTA/AM (100 µM) **(B)** führten zu einer signifikanten Inhibition der β-Endorphin-Freisetzung auf Werte unterhalb der basalen Freisetzung. Dieser Effekt tritt sowohl bei Stimulation mit LPS als auch mit Pam3CSK4 (abgekürzt „Pam“) auf. Für den PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) wurde eine partielle, nicht signifikante Reduktion der Freisetzung verzeichnet **(C)**. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n= 6-28, One Way RM ANOVA; Student-Newman-Keuls, Signifikanz für alle p<0,05.

### 3.7. Differenzierung der Monozytensubpopulationen

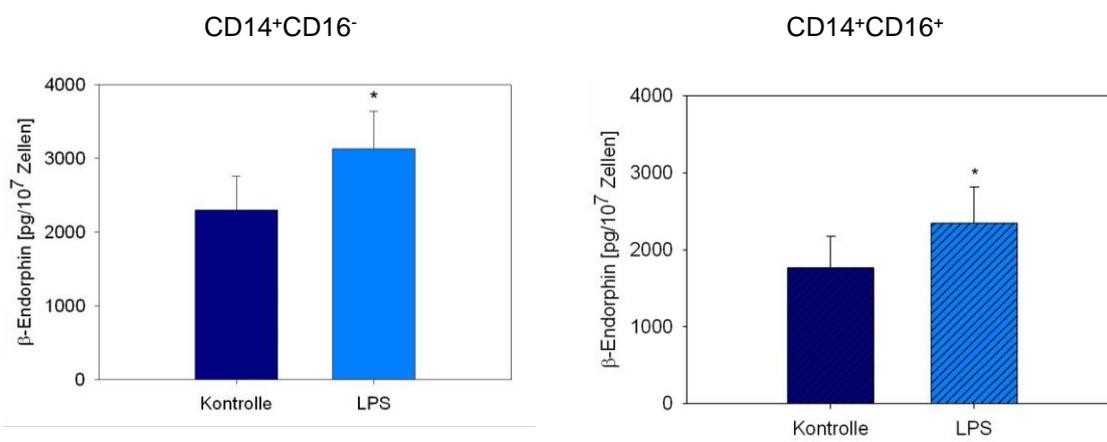
Die Monozytensubpopulation CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> wurde, in ihrer Eigenschaft β-Endorphin freizusetzen, mit CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten verglichen, die aus derselben Spenderprobe stammen. Zusätzlich wurde der Gehalt an intrazellulär gespeichertem β-Endorphin nach Zellyse untersucht.

Der Gehalt an  $\beta$ -Endorphin ist in nicht-klassischen  $CD14^+CD16^+$  Monozyten signifikant geringer als in klassischen  $CD14^+CD16^-$  Monozyten. Das gilt sowohl für den basalen Gehalt (Kontrollmessung mit HBSS), als auch für die Stimulation mit LPS. Entsprechend verhält es sich für die Freisetzung des  $\beta$ -Endorphins. Der Gehalt an freigesetzten Opioidpeptiden ist aus  $CD14^+CD16^+$  Monozyten signifikant geringer als aus  $CD14^+CD16^-$  Monozyten.

**A'**



**B**

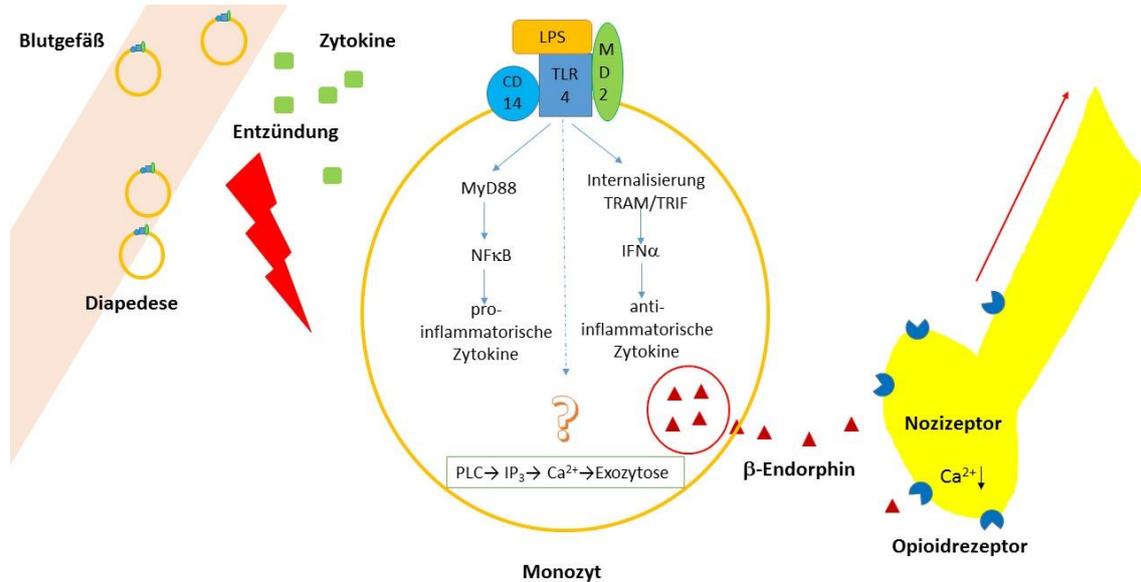


**Abb. 14:  $CD14^+CD16^+$  enthalten weniger  $\beta$ -Endorphin und setzten nach Stimulation mit LPS weniger  $\beta$ -Endorphin frei im Vergleich zu  $CD14^+CD16^-$**

Durch zweizeitige immunmagnetische Auftrennung konnten aus dem Blut gesunder Spender  $CD14^+CD16^-$  und  $CD14^+CD16^+$  Monozyten gewonnen werden. Nach Zelllyse wurde der Gehalt an  $\beta$ -Endorphin in unstimulierten Zellen sowie nach Stimulation mit LPS (10  $\mu$ g/ml) für 15 min gemessen. **(A)**. Außerdem wurde das in den Überstand sezernierte  $\beta$ -Endorphin im  $\beta$ -Endorphin EIA quantifiziert **(B)**.  $CD14^+CD16^+$  Monozyten enthalten signifikant weniger  $\beta$ -Endorphin und setzten nach Stimulation mit LPS weniger Opioidpeptide frei. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n= 7-8, gepaarter t-Test, Signifikanz für alle  $p < 0,05$ .

### 3.8. Signalweg der TLR4-vermittelten Antinozizeption

In Zusammenschau der neu gewonnenen Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien, lässt sich folgender Signalweg für die TLR4-vermittelte Antinozizeption skizzieren:



**Abb. 15 Schematische Zusammenfassung der Opioidfreisetzung aus Monozyten:**

Geleitet durch Zytokine wandern Monozyten aus dem peripheren Blut in entzündetes Gewebe ein. Nach Stimulation mit LPS über den TLR4-Rezeptor kommt es zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen über den MyD88-abhängigen Signalweg sowie anti-inflammatorischer Mediatoren über den TRAM/TRIF-Signalweg. Außerdem wird über einen noch ungeklärten Mechanismus IP<sub>3</sub> gebildet, welches durch die Freisetzung von Calcium zur Exozytose von β-Endorphin-haltigen Granula führt. β-Endorphin bindet an MOP auf primär sensorischen Neuronen und induziert eine Hyperpolarisation der Nervenzelle. Somit wird eine periphere Antinozizeption erzeugt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die über Toll-like Rezeptoren vermittelte Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin aus humanen Monozyten *in vitro* untersucht. Ergänzend wurde in Verhaltensexperimenten LPS-induzierte Antinozizeption *in vivo* nachgewiesen.

Es wurde gezeigt, dass beide Monozytensubpopulationen, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, sowohl TLR2 als auch TLR4 exprimieren. Der Gehalt und die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin ist in klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten höher als in nicht-klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten.

Eine Stimulation von TLR4 mit LPS führte zu einer signifikanten Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin aus humanen Monozyten *in vitro*. Die Sekretion wurde durch den niedermolekularen TLR4-Antagonisten TAK-242 gehemmt. Als intrazellulärer Mechanismus wurde ein calciumabhängiger Signalweg über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor identifiziert.

Die Ergebnisse werden durch die *in vivo* Experimente gestützt [69]: Hier wurde eine Opioid- und TLR4-abhängige Erhöhung der Schmerzschwelle infolge intraplantarer LPS-Injektion in die entzündete Rattenpfote festgestellt. Im späteren Entzündungsverlauf nahm die Schmerzschwelle hingegen ab. Die lokale Applikation des TLR4-Antagonisten TAK-242 in CFA-induzierter Entzündung führte *in vivo* zu mechanischer und thermischer Hyperalgesie.

### 4.2. Diskussion der Methoden

#### 4.2.1. Entzündungsmodell

Das Modell der CFA-induzierten lokalen Entzündung der Rattenpfote wurde in Vorarbeiten gut untersucht und charakterisiert [5, 11, 12]. Die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe zur Funktion neutrophiler Granulozyten [34, 35] und zur Rolle von Monozyten [13] erfolgten im gleichen Modell.

Ein alternatives Entzündungsmodell stellt die intraplantare Injektion von Carrageenan, einem Polysaccharid aus Algen dar, welche zu einer kurz anhaltenden

Entzündung von wenigen Stunden führt. Da Monozyten jedoch die wichtigste Leukozytenpopulation der Spätphase der Entzündung darstellen, sollte der Untersuchungszeitpunkt 48-96 h nach Entzündungsbeginn liegen [13]. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Carrageenan-induzierte Entzündungsreaktion bereits wieder abgeklungen. Demgegenüber steht das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis, welches exemplarisch für eine chronische Entzündung angewendet wird. Eine manifeste Entzündung liegt hier Wochen bis Monate (25-35 d) nach Beginn der intraplantaren Injektionsbehandlung mit Kollagen vor [78]. Das Arthritismodell ist zur Darstellung von Bedingungen gut geeignet, wie sie während einer chronischen Entzündung vorliegen. Da diese nicht Gegenstand der Betrachtung sein sollten, wurde auch von diesem Modell Abstand genommen.

Ein weiteres entzündungsauslösendes Agens ist Formalin, das als Reizstoff eine direkte Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren bewirkt und somit eine schnell einsetzende Entzündungsreaktion hervorruft, die nur über wenige Stunden anhält. Vergleichend dazu spiegelt das CFA-Entzündungsmodell besser den natürlichen Verlauf von Schmerzen wider wie z.B. postoperativ oder nach einem Trauma, als die kurzfristige Reizung durch Formalin.

In der Zusammenschau ist das CFA-Entzündungsmodell ein einfaches, leicht reproduzierbares Modell, das den Untersuchungszeitraum gut abdeckt. Um dem Zeitfenster der späten Entzündungsphase zu entsprechen, wurden die Ratten zunächst über 4 d mit CFA behandelt, bevor die Messungen der Pfoten-druckschwelle und der Pfotenlatenz erfolgten.

#### 4.2.2. Zellisolation

Die *in vitro* Experimente wurden mit humanen Blutmonozyten durchgeführt. Diese entstehen praktisch als „Nebenprodukt“ der Thrombapherese und sind somit leichter zu gewinnen und in größerer Anzahl verfügbar als Rattenmonozyten. Die humanen Blutmonozyten wurden aus angereicherten Leukozytenkonzentraten gesunder Spender gewonnen. Die immunmagnetische Separation ist ein etabliertes Verfahren zur Auftrennung von Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle. Hier liegt ein weiterer Vorteil der humanen Monozyten, die im Gegensatz zu Rattenmonozyten gut auf Grund ihrer extra-

zellulären Oberflächenstrukturen markiert werden können. Für Rattenmonozyten ist kein spezifischer extrazellulärer Marker für Monozyten bekannt. Laut Angabe des Herstellers führt die Bindung der verwendeten MicroBeads nicht zur Aktivierung der Monozyten. Dennoch kann eine gewisse vorzeitige Aktivierung durch das Auftrennungsverfahren und die Zellisolation nicht ausgeschlossen werden und könnte zu einem geringeren intrazellulären Opioidgehalt bzw. niedrigerer Freisetzung von Opioidpeptiden führen. Dieser Effekt könnte die deutlich niedrigere Sekretion im Vergleich zu Granulozyten erklären, welche allein über eine Dichtegradientenzentrifugation ohne anschließende MicroBead-Markierung aufgereinigt werden.

Der Anteil an Monozyten, der nach immunmagnetischer Separation gewonnen wurde, variierte innerhalb der Spender. Die Reinheit der gewonnenen Monozyten wurde im Durchflusszytometer gemessen. Für die Separation von CD14<sup>+</sup> Monozyten lag sie durchschnittlich > 95 %. In der zweizeitigen Separation von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten konnte nur eine Reinheit von durchschnittlich > 50 % erzielt werden. Der Gesamtanteil an CD16<sup>+</sup> Zellen lag bei rund 75 %. Weder zusätzliche Waschschrte, zweifache Gabe über einen Präseparationsfilter noch eine in Reihe geschaltete Separierung zunächst mit CD14 MicroBeads und nachfolgend mit dem CD16 Monocyte Isolation Kit konnten die Reinheit wesentlich verbessern. Daher müssen die Ergebnisse der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Zellen mit Vorsicht interpretiert werden.

#### 4.2.3. Wahl der Stimulationsdauer

β-Endorphin wird unter physiologischen Bedingungen schnell durch Aminopeptidasen abgebaut. Um die enzymatische Degradation durch zelleigene Proteasen zu verhindern, wurde dem Puffermedium HBSS die Proteinaseinhibitoren Bestatin, Aprotinin und Thiorphan hinzugefügt. Bestatin ist ein kompetitiver und spezifischer Inhibitor von Aminopeptidasen, Aprotinin hemmt das Verdauungsenzym Trypsin und Thiorphan ist ein spezifischer Antagonist von Neprilysin, einer weiteren Protease. Schreiter et al. zeigten, dass Aminopeptidasen von Immunzellen exprimiert werden und den Abbau endogener Opioidpeptide beschleunigen [79]. Eine Hemmung dieser Proteasen fördert die periphere opioid-vermittelte Analgesie. Die von uns gewählte Bestatin-Konzentration lag

im unteren Bereich der von Schreiter et al. getesteten Konzentrationen an Leukozyten. Die Thiorphan-Konzentration hingegen lag im oberen Bereich. Es könnte somit eine unzureichende Inhibition auf Grund zu niedrig gewählter Konzentrationen vorliegen. Allerdings wird der hemmende Effekt nur für den Abbau von Enkephalin und Dynorphin beschrieben, während die Degradation von  $\beta$ -Endorphin unabhängig von den aus Leukozyten oder peripheren Nervenendigungen freigesetzten Proteasen ist. Jedoch kann ein Abbau von  $\beta$ -Endorphin durch Proteasen aus Fibroblasten oder Endothelzellen *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin berichten Sarada et al. über ein  $\gamma$ -endorphin-generating-enzyme ( $\gamma$ -EGE) aus Leukozyten, welches den Abbau von  $\beta$ -Endorphin in  $\gamma$ -Endorphin und weitere Derivate beschleunigt [80].

Da anzunehmen ist, dass mit zunehmender Stimulationsdauer der Abbau durch zelleigene Proteinase zunimmt bzw. die Wirkung der Proteinaseinhibitoren limitiert ist [79], wurde die Stimulationsdauer auf 15 min begrenzt. Nach diesem Zeitraum war schon eine signifikante Zunahme der  $\beta$ -Endorphin-Konzentration nach Stimulation mit LPS (10  $\mu$ g) zu verzeichnen. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und anschließend bis zur Messung bei -18 °C gelagert, um die enzymatische Degradation zu stoppen.

#### 4.2.4. Messung von $\beta$ -Endorphin

Die quantitative Bestimmung von  $\beta$ -Endorphin erfolgte im kompetitiven ELISA. Da die Proben im Kulturmedium HBSS vorlagen, wurde die Verdünnungsreihe des Standardpeptids mit HBSS angefertigt. Nach Angaben des Herstellers liegt die minimale Detektionsgrenze des Assays bei 0,12 ng/ml. Somit wurden Werte, die außerhalb des Messbereiches lagen (< min), mit 0,12 ng/ml in die Bewertung mit einbezogen, um eine Berechnung zu ermöglichen.

Neben dem ELISA bietet der Radioimmunoassay (RIA) die Möglichkeit  $\beta$ -Endorphin zu quantifizieren. Dieses etablierte Immunoassay-Verfahren beruht auf der Verwendung radioaktiv markierter Antigene, die mit den in der Probe enthaltenen Antigenen um die Bindung an einen spezifischen Antikörper konkurrieren. Aufgrund des erhöhten technischen Aufwands, der Durchführung in einem Isotopenlabor und der potentiell radioaktiven Belastung wurde der RIA in

vielen Bereichen durch den ELISA abgelöst. Für die Messung von  $\beta$ -Endorphin sind beide Verfahren etabliert, sodass auch für diese Arbeit der ELISA bevorzugt wurde. Von Interesse wäre die Messung im RIA für die Proben, die in unseren Versuchen unter der Nachweisgrenze lagen, da das RIA-Kit des gleichen Herstellers (Phoenix Pharmaceuticals) eine untere Detektionsgrenze von 10 pg/ml angibt und damit deutlich niedrige Konzentrationen als im ELISA nachweisbar wären. Sonst sind beide Verfahren hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Messgenauigkeit vergleichbar.

Für die Auswertung im ELISA wird für jede Messung eine neue Standardkurve erstellt. Die Messwerte hängen somit von der Güte der Standardkurve ab. Der R-Wert (Regressionskoeffizient) lag für alle verwerteten Messungen zwischen 0,99 und 1,00.

Die Konzentrationen der einzelnen Messungen schwanken zum Teil stark. Dies kann zum einen auf die intraindividuell unterschiedlich hohen Konzentrationen an  $\beta$ -Endorphin zurückzuführen sein, zum anderen ist die sogenannte „Batch-to-batch-Variability“ in Betracht zu ziehen, eine Schwankung der Messwerte unter verschiedenen Chargen des Herstellers. Es wurden stets nur Chemikalien eines Kits zur Auswertung einer Titerplatte verwendet. Innerhalb der Versuchsreihe wurden jedoch Kits aus verschiedenen Chargen genutzt. Der Hersteller macht keine Angaben zu möglichen Messschwankungen durch die Verwendung von Materialien unterschiedlicher Chargen. Hier könnte eine mögliche Fehlerquelle liegen.

### **4.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### 4.3.1. LPS-induzierte $\beta$ -Endorphin-Sekretion aus Monozyten *in vitro*

Monozyten wurden als opioidhaltige Immunzellen identifiziert und ihre Rekrutierung zum Entzündungsort nachgewiesen [13]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Stimulation von humanen Monozyten mit LPS eine signifikante  $\beta$ -Endorphinfreisetzung bewirkt. LPS wirkt als PAMP und bindet an den TLR4.

Die analgetische Wirkung von LPS steht im Gegensatz zu den proalgetischen Effekten, die LPS über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt. In Mikrogliazel-

len führt LPS zur Produktion von IL-1 $\beta$  und somit zur Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen [81]. Meseguer et al. zeigten unlängst, dass die Sensitivierung des Nozizeptors TRPA1 unter inflammatorischen Bedingungen durch LPS bedingt ist und auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgeht: Zum einen wirkt LPS über TLR4-abhängige Signalwege, zum anderen existiert eine direkte TLR4-unabhängige Wirkung auf TRPA1 über mechanische Störung der Plasmamembran [82].

Die signifikant erhöhte  $\beta$ -Endorphinsekretion nach TLR4-Stimulation durch LPS ist nach 15, 60 und 120 min nachzuweisen. Diese über mindestens 120 min anhaltende Freisetzung steht im Gegensatz zu der schnell aktivierbaren  $\beta$ -Endorphinsekretion aus neutrophilen Granulozyten über Formylpeptidrezeptoren [34] oder durch CXCR2-Liganden [35], die bereits nach 7 min zu einer signifikanten Steigerung der Opioidfreisetzung führt. Ebenso differieren die Leukozytenpopulationen in der Menge an freigesetzten Opioidpeptiden, welche aus neutrophilen Granulozyten vervierfacht werden kann, während sich die Sekretion aus Monozyten maximal verdoppelt.

Diese Unterschiede könnten durch die verschiedenen Funktionen der Zellpopulationen bedingt sein: Neutrophile Granulozyten sind die erste Leukozytenpopulation, die zum Entzündungsort rekrutiert wird. Sie sind für die schnelle Immunantwort verantwortlich, während Monozyten erst nach Tagen in das entzündete Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen bzw. dendritischen Zellen differenzieren.

Diese *in vitro* Ergebnisse decken sich möglicherweise mit den *in vivo* Versuchen, in denen die opioidvermittelte Antinozizeption 2 h nach CFA Entzündung durch neutrophile Granulozyten nur kurzwirksam für etwa 10 min zu verzeichnen ist, während Monozyten die mechanische Schmerzschwelle 96 h nach CFA Entzündung für etwa 30 min anheben (vgl. 4.3.8.).

#### 4.3.2. Verstärkender Effekt von Cytochalasin B

Die positive Verstärkung der  $\beta$ -Endorphinfreisetzung durch Vorinkubation mit Cytochalasin B wurde in Vorexperimenten der Arbeitsgruppe in Granulozyten beschrieben [35, 72]. Weitere positive Effekte sind für die Induktion der Synthe-

se von Leukotrienen aus Monozyten bekannt [83]. Cytochalasin B ist ein Mykotoxin, das die Polymerisierung von löslichem G-Aktin zu F-Aktinfilamenten behindert. Jog et al. [84] untersuchten die Funktion des Aktin-Zytoskeletts an Hand der Exozytose der vier Granula-Subtypen von neutrophilen Granulozyten. Das Zytoskelett kontrolliert und limitiert die Exozytose und kann somit als protektiver Mechanismus vor der Freisetzung destrukturierender Enzyme charakterisiert werden. Die Hemmung der F-Aktin-Polymerisierung scheint die *in vitro* Proteinsekretion vor allem aus primären Granula zu steigern [85] und wirkt somit als positiver Verstärker auf die Freisetzung von Opioidpeptiden. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus auch für die gesteigerte Sekretion von  $\beta$ -Endorphin durch LPS oder Ionomycin aus Monozyten verantwortlich ist. Zudem wird die basale Freisetzung durch Vorinkubation mit Cytochalasin B gesteigert. Cytochalasin B übernimmt somit als Priming Substanz *in vitro* die Voraktivierung, die *in vivo* vermutlich durch die Ko-Stimulation mit anderen Mediatoren erfüllt wird. So wird beispielsweise die LPS-getriggerte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in arteriosklerotischen Läsionen durch den kooperativen Effekt von mmLDL (minimally oxidized low density lipoprotein) verstärkt [86].

#### 4.3.3. Intrazelluläre calciumabhängige Mechanismen

##### 4.3.3.1. Calcium

Analog zu den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Opioidfreisetzung aus neutrophilen Granulozyten via Formylpeptidrezeptor oder CXCR2 [34, 35] ist Calcium auch für die  $\beta$ -Endorphinsekretion aus Monozyten essentiell. Hierfür sprechen mehrere Ergebnisse:

- 1.) Der Calcium-Carrier Ionomycin induziert die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin *in vitro* und, in der Konfokalmikroskopie nachgewiesen, die Translokation von  $\beta$ -Endorphin-haltigen Vesikeln zur Zellmembran [69].
- 2.) Vorbehandlung mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptorinhibitor 2-APB und mit dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM supprimieren die  $\beta$ -Endorphinsekretion so stark, dass die Werte unterhalb der basalen Freisetzung sinken. Folglich ist schon die basale Freisetzung calciumabhängig.

Ebenso wurde für die Stimulation über TLR2 mit Pam3CSK4 eine Inhibition der basalen Freisetzung gefunden. Da über den TLR2 zuvor keine signifikante Steigerung nachgewiesen werden konnte, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass der Freisetzungsmodus unabhängig vom extrazellulären Stimulus, aber abhängig von intrazellulärem Calcium ist. Das betrifft auch die basale Freisetzung aus unstimulierten Monozyten.

Der Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptor ist Teil des Signalwegs über Phospholipase C (PLC). Die Aktivierung von PLC führt zur Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in zwei Teile: Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). IP<sub>3</sub> bewirkt über seine Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern ins Zytosol. Sind die intrazellulären Calciumspeicher erschöpft, wird Calcium von extrazellulär über die Plasmamembran mobilisiert. Das zweite Spaltprodukt DAG bleibt mit der Plasmamembran assoziiert und aktiviert Proteinkinase C. Calcium als Second Messenger aktiviert Calmodulin und löst damit weitere Signalwege aus [16]. Sowohl 2-APB als auch BAPTA/AM greifen in diesen Signalweg ein. Ionomycin hingegen fördert als Calcium-Carrier den Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum und wirkt verstärkend auf die Signalkaskade.

Regulierte Exozytose wird durch einen Trigger ausgelöst, durch Calcium kontrolliert und über SNARE-Proteine vermittelt [87]. Die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung wird durch LPS über TLR4-vermittelte Signalwege getriggert und ist abhängig von intrazellulärem Calcium. Damit erfüllt sie die Voraussetzungen für den regulierten, vesikulären Transport und entspricht den Mechanismen, die auch in Neuronen und endokrinen Zellen die Freisetzung von Opioidpeptiden kontrollieren [9].

Liu et al. wiesen die Bedeutung von Calcium im TLR-Signalweg nach. Sie zeigten, dass die vollständige Aktivierung des MyD88-Signalwegs durch TLR4, -9 und -3 Liganden in Makrophagen calciumabhängig ist. Die Ligandenbindung führt zum Calciumeinstrom und induziert die CaMKII (Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II), eine ubiquitäre Serin-Threonin-Proteinkinase. Erst die Interaktion mit dem Calcium/CaMKII-Signalweg ermöglicht die komplette

Immunantwort in Makrophagen [88]. Insofern sprechen die Ergebnisse dafür, dass sowohl die basale als auch die LPS-induzierte TLR4-vermittelte Opioidfreisetzung aus Monozyten calciumabhängig sind.

#### 4.3.3.2. *Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Mitogenaktivierte Protein-kinase (MAPK)*

Ein weiterer Bestandteil des Signalwegs ist die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K). Der PI3K-Signalweg ist unabhängig von der Calciummobilisation. In neutrophilen Granulozyten kann über Blockierung der PI3K $\delta$  die durch fMLP und TNF1 $\alpha$  induzierte Freisetzung aus primären Granula inhibiert werden [89]. Auch in der Arbeit von Rittner et al. wurde eine partielle Suppression der Opioidsekretion aus neutrophilen Granulozyten bestätigt [72]. In der vorliegenden Arbeit konnte Wortmannin Vorbehandlung keine signifikante Verminderung der  $\beta$ -Endorphinfreisetzung bewirken.

Wortmannin ist ein zellpermeabler PI3K-Inhibitor, der in hohen Konzentrationen (200-300 nM) auch die MAP Kinase, die Myosinleichtkettenkinase und die PI4 Kinase hemmt. Die von uns gewählte Konzentration (100 nM) ist für eine alleinige Blockierung der PI3K ausreichend hoch und zu gering, um die anderen Kinasen zu beeinflussen. Dennoch kann eine Wirkung auf die oben genannten Enzyme nicht komplett ausgeschlossen werden. Die PI3K spielt in der LPS-induzierten Opioidfreisetzung eher eine untergeordnete Rolle, somit ist diesbezüglich keine weiterführende Analyse erfolgt.

Als weiterer intrazellulärer Signalweg könnte die MAPK von Bedeutung sein. MAPK sind Tyrosin- und Serin/Threoninkinasen, die über eine Kinasekaskade zur direkten Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führen [16]. Mócsai et al. zeigten, dass die MAPK an der Exozytose der Granulozyten Granula infolge fMLP Stimulation beteiligt ist [90]. Ebenso ist die Opioidfreisetzung aus neutrophilen Granulozyten über CXCR1/2 von p38 MAPK abhängig [72]. Sowohl der Formylpeptidrezeptor als auch CXCR1/2 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche jedoch aus Monozyten keine Opioidfreisetzung vermitteln [34]. Im Gegensatz zu diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, erfolgt die MAPK Aktivierung nach TLR4-Stimulation über den MyD88-

abhängigen Signalweg. Die MAPK Kaskade endet in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren regulieren [29]. Insgesamt hat es den Anschein, als sei der TLR4/MAPK-Signalweg in Monozyten vornehmlich an der proinflammatorischen Antwort beteiligt, daher wurden in dieser Richtung keine zusätzlichen Experimente unternommen.

Insgesamt scheint die Calciummobilisation nach TLR-Aktivierung der wichtigste Weg in Monozyten für die Opioidfreisetzung zu sein.

#### 4.3.4. TLR und Opioidpeptide in unterschiedlichen Monozytensubpopulationen

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der Expression von TLR2 und TLR4 in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten im Vergleich zu CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten gesunder Spender festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte TLR4-Expression auf zirkulierenden CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in Patienten mit akutem Herzinfarkt [55] sowie eine vermehrte TLR2-Expression und erhöhte Plasmalevel in Patienten mit Perivaskulitis retinae (Morbus Eales) gefunden [91]. Auch im Alter scheint sich die Rezeptordichte auf Monozyten zu verändern. Nyugen et al. identifizierten eine Abnahme von TLR1 mit zunehmendem Lebensalter, die Expression von TLR2 und TLR4 war unverändert. Durch die Heterodimerisierung von TLR1/2 wäre jedoch eine Beeinträchtigung der TLR2-Antwort möglich. Diese Anpassung könnte die gesteigerte Infektanfälligkeit und verminderte Impfantwort älterer Personen erklären und auch auf das Schmerzempfinden Einfluss nehmen [92].

In dieser Arbeit wurde keine quantitative Analyse der Rezeptorexpression auf den beiden Monozytensubpopulationen durchgeführt. Skinner et al. konnten nachweisen, dass nach LPS-Stimulation (Sepsis-Modell) sowohl der Anteil an CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten als auch die Expression von TLR2 heraufreguliert werden und zur Produktion von Zytokinen beitragen. Das Level an TLR4 bleibt sowohl auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> als auch auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten unverändert [54]. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen stützt es die Hypothese, dass die  $\beta$ -Endorphin-Sekretion vornehmlich aus CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten über TLR4-Aktivierung stattfindet.

Die funktionelle Antwort der Opioidsekretion auf TLR4 Stimulation verläuft in beiden Subpopulationen identisch, allerdings enthalten klassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten signifikant mehr  $\beta$ -Endorphin und setzen nach Stimulation mit LPS auch mehr Opioidpeptide frei. Im Hinblick auf die erhöhten Blutspiegel an CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in Patienten mit Komplexen Regionalem Schmerzsyndrom (CRPS) [50], könnte diese Tatsache das erhöhte Schmerzlevel der Patienten erklären.

Der geringere Gehalt an  $\beta$ -Endorphin in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten deckt sich mit der Charakterisierung dieser Subklasse als pro-inflammatorisch. Wie bereits eingangs erörtert (vgl. 1.3), ist die Synthese des anti-inflammatorischen IL-10 in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten deutlich erniedrigt, während pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 gleichermaßen exprimiert werden [48]. Die Verschiebung des Gleichgewichts hin zu pro-inflammatorischen Faktoren spiegelt sich in dem gesteigerten Anteil an CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in inflammatorischen Erkrankungen wie Sarkoidose [51], rheumatoider Arthritis und Lupus erythematodes [52] wider.

In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen stützt es die Hypothese, dass die  $\beta$ -Endorphin-Sekretion vornehmlich aus CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten über TLR4-Aktivierung stattfindet.

#### 4.3.5. Rolle von TLR4

Die meisten der bisher durchgeführten Studien konzentrierten sich auf die nozizeptive Verarbeitung auf spinaler Ebene und berichten eine proalgetische Funktion von TLRs:

In Mäusen mit Nervenläsionen, die keine bzw. defekte TLR2 oder -4 exprimieren, ist das Schmerzniveau herabgesetzt [93, 94]. Auftretende proalgetischen Effekte infolge lokaler, peripherer Entzündung können größtenteils auf die Sensibilisierung sensorischer Neurone, die an der Schmerzverarbeitung und Weiterleitung beteiligt sind, zurückgeführt werden. Auf spinaler Ebene fördert die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten über TLRs, wie sie nach Nervenläsionen, chirurgischen Eingriffen oder chronischer Opioidtherapie stattfindet, die Aufrechterhaltung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen

und ist damit wesentlich an der Pathogenese chronischer Schmerzen beteiligt [29, 95]. Die Beteiligung von TLR4 am Übergang von akuten in chronische Schmerzen nach dem Abklingen der akuten Entzündung wurde im Modell der Serum-transferierten Arthritis nachgewiesen [96]. Eine Blockierung von TLR4 in der Übergangsphase der Erkrankung konnte persistierende Schmerzen verhindern. Eine weitere Rolle kommt TLR4 in der spinalen opioidvermittelten Hyperalgesie zu: Die Interaktion von Morphin mit dem TLR4-assoziierten MD-2 Protein führt zur Oligomerisation des Rezeptors und damit zum proinflammatorischen Stimulus und zur Neuroinflammation im ZNS [97].

Unsere Ergebnisse hingegen zeigen eine Schmerzkontrolle über TLRs. Die Expression von TLR2 und TLR4 sowohl auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> als auch auf CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> wurde in der Durchflusszytometrie gezeigt und bildet die Grundlage für die Stimulationsexperimente. *In vitro* Blockierung mit TAK-242 suppressierte die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung auf Werte unterhalb der basalen Sekretion. TAK-242 bindet selektiv an TLR4 und unterbindet die Interaktion von TLR4 mit Adaptermolekülen und somit die nachfolgende Signalkaskade. Eine Kreuzreaktivität mit zehn anderen TLRs konnte ausgeschlossen werden. TAK-242 bindet direkt über Cys747 an die TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain) von TLR4. Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung wirkt sich auf die Bindung nachfolgender Adaptermoleküle aus [98].

Die Wirkung von LPS wird daher über den TLR4 vermittelt. Ein IgA-Antikörper gegen den humanen TLR4 konnte in *in vitro* Experimenten die Freisetzung durch LPS nicht beeinflussen. Wir vermuten, dass bei hohen LPS-Konzentrationen (10  $\mu$ g/ml) die Konzentrationen des Antikörpers zu gering gewählt waren. Da mit TAK-242 ein potenter TLR4-Inhibitor zur Verfügung stand, wurden die Experimente mit Anti-hTLR4-IgA nicht weiter verfolgt. Weitere mögliche Fehlerquellen könnten in Kreuzreaktionen oder Instabilität des Antikörpers liegen.

Die Entwicklung von TAK-242 erfolgte primär zur Blockierung der über TLR4-vermittelten Zytokinproduktion und damit zur Anwendung in der Behandlung von Sepsis. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten klinischen Studie konnte kein signifikanter Effekt auf die Zytokinlevels in Patienten mit schwerer

Sepsis festgestellt werden [99]. Eine Weiterentwicklung des Wirkstoffs wurde mittlerweile vom Konzern eingestellt.

In unseren *in vivo* Experimenten führte die Applikation von TAK-242 in die entzündete Rattenpfote (4 d nach CFA-induzierter Entzündung) zu einem sofortigen Abfall von Pfotendurchschwelle und Pfotenlatenz und damit zur weiteren Verschlechterung der peripheren Hyperalgesie. Die proalgetische Wirkung von TAK-242 betrifft auch die Blockierung der tonischen Opioidfreisetzung [69]. Da in der CFA Entzündung primär kein LPS im Pfotengewebe vorhanden ist, das basal die Freisetzung von Opioidpeptiden auslöst, könnten z.B. endogene TLR4-Liganden wie Hitzeschockproteine 22, 60, 70 und 72, High-mobility Group Box Protein B1 oder Bestandteile der extrazellulären Matrix diese Funktion übernehmen [29]. Darüber hinaus kam es nur mit einer Latenz von 2-3 h zu einer Verstärkung der thermalen Hyperalgesie nach TAK-242 Injektion. Diese zeitlich versetzte Reaktion könnte auch ein Effekt der zentralen Nozizeptorsensitivierung sein (vgl.1.2.2). Insgesamt vermuten wir, dass das Zusammenspiel zentraler und peripherer Mechanismen die Hyperalgesie durch TLR4-Blockade bestimmt.

#### 4.3.6. Rolle von TLR2

Die Stimulation von TLR2 durch den synthetischen Agonisten Pam3CSK4 konnte keine Steigerung der  $\beta$ -Endorphinsekretion hervorrufen. Möglicherweise ist die geringe Opioidfreisetzung von Monozyten auf Pam3CSK4 der Spezifität des Liganden geschuldet. Im Gegensatz zu intakten Bakterien oder Bakterienbestandteilen wie LPS, die über multiple Rezeptoren wirken, ist Pam3CSK4 spezifisch für die TLR2-L-Untereinheit. Infolge seiner Aktivierung bildet TLR2 heterophile Dimere mit TLR1 und TLR6. Bei Bindung des spezifischen Liganden Pam3CSK4 erfolgt die Dimerisierung entweder nur mit TLR1 oder nur TLR6. Dementgegen stehen Ergebnisse, welche die durch Pam3CSK4 induzierte und über TLR2-vermittelte pro-inflammatorische Antwort in antigenpräsentierenden Zellen gemessen an der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nachweisen [100]. Der synthetische TLR2-Agonist ruft in diesen Versuchen sogar eine stärkere pro-inflammatorische Antwort als komplette mikrobielle Präparati-

onen hervor. Grundsätzlich scheint Pam3CSK4 ein potenter TLR2-Agonist zu sein, ein Effekt auf die Opioidfreisetzung konnte jedoch nicht belegt werden. Dass TLR2 auch an der Entstehung von neuropathischem Schmerz nach Nervenläsion beteiligt ist, zeigten Shi et al. Die Hauptkomponente wird durch die pro-inflammatorische Antwort infiltrierender Makrophagen peripher am Ort der Nervenläsion getragen. Die Aktivierung von Mikrogliazellen hingegen wird nicht über TLR2 gesteuert [101]. Dementgegen wiesen Chiu et al. eine direkte Wirkung bakterieller Antigene an primär sensorischen Neuronen nach, welche unabhängig von der TLR2 Aktivierung durch Immunzellen ist. *Staphylococcus aureus* bewirkt über FPR1 und Porenbildung durch  $\alpha$ -Hämolysin ( $\alpha$ HL) einen Ioneneinstrom in die Nervenzelle. Der Schmerz ist demnach nicht ein Effekt, der durch Immunzellen hervorgerufenen inflammatorischen Reaktion in bakteriellen Infektionen, sondern eine direkte Pathogen-Neuron Interaktion. Diese wiederum kann über die nachfolgende Freisetzung von Neuropeptiden die lokale Immunreaktion beeinflussen [102]. Somit wirken TLR2-Liganden neben der Produktion pro-inflammatorische Zytokine über den NF $\kappa$ B-Signalweg auch über eine direkte Wirkung am Nozizeptor proalgetisch. Ein Beitrag von TLR2 zu antinozizeptiven Effekten konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

#### 4.3.7. Unterschiede von TLR2 und TLR4 Aktivierung

Die Lokalisierung von TLRs in unterschiedlichen Zellkompartimenten ist wichtig für den regulierten Ablauf der Immunantwort. Während TLR4 sowohl an der Zelloberfläche, als auch in der endosomalen Zellmembran exprimiert ist, ist über die Lokalisation von TLR2 in Endosomen wenig bekannt. TLR2 wurde jedoch ebenfalls in intrazellulären Organellen nachgewiesen. Zudem zeigten Brandt et al., dass die Induktion von NF $\kappa$ B durch den TLR2 Liganden Pam3CSK4 von der Endozytose des TLR2 über Clathrin-gecoatete Pits abhängig ist und über CD14 reguliert wird [103]. Somit ist ein paralleler Mechanismus für die TLR2- bzw. TLR4-Signaltransduktion belegt. Im Gegensatz zu TLR4 bedarf TLR2 nicht der Anwesenheit des akzessorischen MD-2-Proteins [104].

Die Aktivierung spezifischer TLR führt zu einer leicht unterschiedlichen Expression von Genprofilen. Während der TLR4-Signalweg in der Induktion von  $\alpha$ -Interferon endet, ist dieses kein Produkt der TLR2-Antwort auf bakterielle Stimuli [58]. Möglicherweise ist die spezifische Rezeptorantwort auf die unterschiedliche Lokalisation derselben zurückzuführen. Die räumliche Trennung verschiedener Signalwege ist auch für den Epidermal Growth Factor Rezeptor, den Tumornekrose Faktor Rezeptor und verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschrieben [63]

TLR4 nimmt eine besondere Stellung unter den TLRs ein, da er als einziger Rezeptor seiner Klasse beide Signalwege, den MyD88-abhängigen Weg und die Transduktion über TRAM/TRIF, induziert (vgl. 1.4). Aksoy et al. zeigten, dass diese beiden Wege das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischer Zellantwort in dendritischen Zellen steuern. Die Zellantwort ist auch hier in verschiedenen Kompartimenten organisiert. Als Schlüsselmolekül wurde interessanterweise die p110 $\delta$  Isoform der PI3K identifiziert, die von einer MyD88-abhängigen pro-inflammatorischen Phase hin zu einer MyD88-unabhängigen anti-inflammatorischen Phase leitet [105]. Entgegen diesen Erkenntnissen führte die Inhibition der PI3K in unseren Experimenten zu keiner signifikanten Abnahme der  $\beta$ -Endorphinfreisetzung.

Zahlreiche Moleküle können als Korezeptoren oder akzessorische Moleküle den TLR4 und damit die LPS-induzierte Immunantwort sowohl positiv als auch negativ regulieren. Einer dieser Regulatoren ist das Integrin  $\alpha_M$  (CD11b). Die LPS-vermittelte Antwort in dendritischen Zellen aber nicht in Makrophagen wird durch (CD11b) positiv reguliert. In Abwesenheit von CD11b ist die LPS-Antwort in dendritischen Zellen fehlerhaft, in Makrophagen hingegen ist sie unverändert [61]. Durch dieses Beispiel wird veranschaulicht wie komplex die Feinregulierung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem verschaltet ist. Entsprechende modulierende Einflüsse sind auf die  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung nach TLR4-Stimulation zu vermuten.

Die hier beschriebenen Besonderheiten im TLR4-Signalweg können eine Begründung sein, warum TLR4 aber nicht TLR2 die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung aus Monozyten triggert. Möglicherweise hat der Signalweg über TLR2 eine andere

Kinetik, als die TLR4-Antwort, wodurch Effekte zu den gewählten Messzeitpunkten noch nicht bzw. nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

#### 4.3.8. LPS-induzierte opioidvermittelte Antinozizeption *in vivo* durch TLR4-Stimulation

##### 4.3.8.1. LPS und Schmerz

Die vorliegenden *in vivo* Ergebnisse zeigen, dass die lokale Administration von LPS in inflammatorisches Gewebe (4 d nach CFA Entzündung) zu einer vorübergehenden kurzfristigen Antinozizeption mit einem Maximum nach 5 min und einer Dauer von 30 min führt, die durch den Opioidantagonisten Naloxon reversibel ist. Da wir davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt Monozyten die führende Zellpopulation am peripheren Entzündungsort sind und diese Opioidpeptide enthalten [13], werden sie als Quelle der peripheren Antinozizeption angenommen. Die Phase der Antinozizeption wird gefolgt von einem Abfall der thermischen und mechanischen Schmerzschwellen. Diese zweite Phase der Hyperalgesie wird auch in anderen Studien beschrieben, die eine LPS-induzierte Zytokin-vermittelte Hyperalgesie im Tiermodell nachweisen [106]. Auch intrathekale LPS-Injektion führt abhängig von einer IL-1 $\beta$  Freisetzung über purinerge Rezeptoren zu mechanischer Hyperalgesie in der Rattenpfote [81]. Neben den Zytokin-vermittelten Effekten konnte eine direkte Nozizeptor-Aktivierung durch LPS gezeigt werden, welche unabhängig vom TLR4-Signalweg verläuft. Durch Porenbildung kommt es zum Calciumeinstrom und zur Depolarisation des TRPA1 [82]. Es ist anzunehmen, dass *in vivo* beide Mechanismen synergistisch zur Abwehrreaktion des Körpers auf bakterielle Infektionen beitragen.

Der von uns gezeigte antinozizeptive Effekt hebt sich somit von den bisherigen Erkenntnissen zu LPS ab. Zusammenfassend scheinen die pro- versus analgetischen Eigenschaften von LPS von Zeitpunkt, Lokalisation und verwendetem Schmerzmodell abzuhängen.

#### 4.3.8.2. Periphere Opiode und Schmerz

Verschiedene Leukozytenpopulationen tragen zur opioid-vermittelten Antinozizeption bei. Dass Immunzellen Ursprung für endogene Schmerzkontrolle sind, wird durch die Zunahme der mechanischen Hyperalgesie infolge Immunsuppression mittels Cyclophosphamid belegt [69]. Neutrophile Granulozyten setzen Opioidpeptide nach Stimulation mit Formylpeptiden oder Chemokinen frei [34, 72]. T-Zellen sind in verschiedenen Modellen von inflammatorischem, neuropathischem und viszeralem Schmerz als potenzielle Quelle von endogenen Opioidpeptiden beschrieben [41-45]. In immunsupprimierten Mäusen mit chronischer Neuropathie kann die Hyperalgesie in der Spätphase durch den Transfer von T-Zellen aufgehoben werden [107]. Gleichzeitig wird ein Wechsel im Sekretionsmuster von T-Zellen von pro-inflammatorischen Zytokinen in der Frühphase hin zu analgetischen Opioidpeptiden im weiteren Verlauf der chronischen Neuropathie beschrieben. Auch Monozyten konnten in unseren *in vivo* Versuchen die mechanische Schmerzschwelle 96 h nach CFA Entzündung für etwa 30 min anheben. Sie zeigen damit einen deutlich länger anhaltenden analgetischen Effekt als neutrophile Granulozyten.

Die neu gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass dem natürlichen Abbau der Opioidpeptide über Aminopeptidasen aus Leukozyten oder Nervenzellen [79] durch eine länger andauernde Opioidfreisetzung aus Monozyten begegnet wird und somit *in vivo* eine länger anhaltende Antinozizeption resultiert. Während der Degradation von  $\beta$ -Endorphin unter inflammatorischen Bedingungen wird das 31 Aminosäuren-messende Molekül durch Peptidasen in N-terminale Fragmente gespalten, welche nicht nur am MOP, sondern auch am DOP und KOP wirken und die reine  $\beta$ -Endorphinwirkung ergänzen [108]. Zusätzlich könnte die supplementäre Wirkung der  $\beta$ -Endorphin Spaltprodukte an anderen Opioidrezeptoren als dem MOP dem Abbau durch Peptidasen entgegenwirken.

Eine spezielle Bedeutung kommt den besonderen Umgebungsfaktoren in entzündetem Gewebe zu. In diesem Zusammenhang zeigten Zollner et al., dass in der lokalen Anwendung synthetischer Opiode unter inflammatorischen Bedingungen keine Toleranzentwicklung an MOP stattfindet, im Gegensatz zur Anwendung im nicht entzündeten Gewebe. Dieser Effekt wird auf die tonische

Freisetzung endogener Opioidpeptide in entzündetem Gewebe zurückgeführt, welche über vermehrtes Rezeptorrecycling und Erhalt der G-Proteingekoppelten Signaltransduktion der Toleranzentwicklung gegensteuern. [109]. Insgesamt enthalten alle Leukozytenpopulationen Opioidpeptide und können diese auf unterschiedliche Stimuli freisetzen. Eine Immunsuppression führt dementsprechend zur Zunahme von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen. *In vivo* nehmen zusätzlich Umgebungsfaktoren im entzündeten Gewebe (wie Priming-Faktoren oder Proteasen) Einfluss auf die Art und Intensität der Immunzellantwort.

#### 4.4. Ausblick

Welche klinische Relevanz haben die vorliegenden Ergebnisse und welcher praktische Nutzen kann aus ihnen gezogen werden?

Über TLR4 sezernieren Monozyten  $\beta$ -Endorphin, welches basal antinozizeptive Wirkungen erzielt. Könnte TLR4-Stimulation somit ein möglicher Angriffspunkt für eine selektive Analgetikatherapie sein? LPS induziert zwar die Opioidfreisetzung, eine Injektion beim Menschen ist jedoch nicht umsetzbar, da es eine systemische inflammatorische Reaktion auslöst. Somit kämen nur andere Agonisten in Frage, die diese Nebenwirkung nicht hätten.

Zugleich muss das komplexe Netzwerk aus anti- und pro-inflammatorischen Mechanismen der Immunantwort bedacht werden. Klinisch konnte eine verstärkte Zellantwort auf TLR-Agonisten (TLR2, TLR4 und TLR7) in chronischen Schmerzpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden, welche sich in der Produktion von IL-1 $\beta$  äußert [110]. Das TLR-System von Schmerzpatienten kann durch endogene TLR-Liganden wie HSP als „geprimt“ angesehen werden. Chronischer Schmerz könnte somit als Dysregulation des angeborenen Immunsystems verstanden werden.

Zahlreiche klinische Modelle weisen einen Einfluss des Immunsystems auf die endogene Schmerzkontrolle nach und zeigen analgetische Wirkungen auf viszeralen Schmerz (unter anderem in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen), postoperativen Wundschmerz, Arthritis oder Krebs [44, 45, 111-113]. Weitere Möglichkeiten zur Schmerztherapie bieten alternative Heilverfahren wie

z.B. aus der Traditionell Chinesischen Medizin die Akkupunktur. Wang et al. zeigten, dass Elektroakkupunktur an frei bewegenden Ratten über eine Beteiligung von Opioidrezeptoren zu einer langfristigen Antinozizeption in frühem inflammatorischen Schmerz beiträgt [114].

Die gegensätzlichen Funktionen des Immunsystems zur Induktion von Entzündung und Schmerz einerseits und endogener Schmerzkontrolle andererseits dienen in gesunden Individuen der Abwehr und Bekämpfung von Krankheitserregern. Kommt es zu einer Dysbalance in diesem komplexen Gefüge, kann es zur Entstehung chronischer Schmerzzustände oder entzündlicher Erkrankungen beitragen. Ein Eingriff in das System mit selektiver Aktivierung analgetischer Mechanismen könnte eine Therapiealternative darstellen.

Ein kontroverses Beispiel in klinischer Erprobung bietet der TLR4-Antagonist Eritoran, der als Therapeutikum zur Behandlung der schweren Sepsis untersucht wird [66]. Möglicherweise kann eine Behandlung mit TLR4-Antagonisten über den Eingriff in die endogene Schmerzkontrolle unerwartet zur vorübergehenden Verschlimmerung von Schmerz führen. Es ist daher von vorrangigem Interesse die molekularen Grundlagen zu verstehen, um zielgerichtete Therapeutika zu entwickeln.

## 5. Zusammenfassung

Schmerz gehört zu den Kardinalsymptomen einer Entzündung. Im Wesentlichen kann die Entstehung von Schmerz am Ort des Entzündungsgeschehens auf das Einwandern (Diapedese) von Leukozyten aus dem peripheren Blutstrom in das Gewebe zurückgeführt werden. Dort findet sowohl die Produktion von Zytokinen und Chemokinen statt, welche weitere Entzündungszellen rekrutieren und die Entzündungsreaktion verstärken, als auch die Freisetzung von Opioidpeptiden, die schmerzlindernd wirken. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine Opioidfreisetzung aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen oder Chemokinen *in vitro* nachgewiesen werden. Diese führen *in vivo* eine Antinozizeption herbei. Für neutrophile Granulozyten wurden der Chemokinrezeptor CXCR1/2 sowie der Formylpeptidrezeptor als Signal-transmittierende Rezeptoren identifiziert. Über den klassischen Mechanismus der Exozytose gelangt das  $\beta$ -Endorphin somit in das Gewebe und interagiert mit Opioidrezeptoren auf primär sensorischen Nervenendigungen. *In vivo* äußerte sich die Freisetzung des Opioidpeptids in einer Anhebung mechanischer Schmerzschwellen, die durch den Opioidrezeptorantagonisten Naloxon aufgehoben werden konnten. Die Bindung, vornehmlich an MOP, führt zur Erniedrigung des cAMP-Spiegels, zur Hyperpolarisation der Nervenzelle und zur Verminderung von Schmerzschwellen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Monozyten als führende Zellpopulation der späten Entzündungsphase. Es sollte untersucht werden, welche Rezeptoren eine Opioidfreisetzung aus Monozyten vermitteln sowie welche intrazellulären Signalwege involviert sind.

Humane Monozyten wurden isoliert und *in vitro* mit dem bakteriellen Antigen Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert. Dieses steht exemplarisch für mikrobielles Infektgeschehen und Entzündung. In den Zellüberständen wurde mittels ELISA die  $\beta$ -Endorphin-Konzentration ermittelt. Weiterhin wurden Opioidgehalt und -freisetzung in der nicht-klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytensubpopulation im Vergleich zu klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten analysiert. Zur weiteren Auf-

klärung des Rezeptors, welcher die Opioidfreisetzung vermittelt, wurde der niedermolekulare TLR4-Antagonist TAK-242 genutzt.

Wir fanden eine Zunahme der  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Eine Zugabe des TLR4-Inhibitors reduzierte die  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung signifikant. TLR4 agiert somit als PRR für die Opioidfreisetzung aus Monozyten.  $CD14^+CD16^+$  Monozyten enthalten einen geringeren Anteil an  $\beta$ -Endorphin und setzten dementsprechend weniger frei. Ihre Rolle als pro-inflammatorisch und ihre Beteiligung an der Genese inflammatorischer Krankheitsbilder wird dadurch gestützt.

Die Signalkaskade, über die diese Freisetzung erfolgt, konnte durch den Einsatz von Rezeptorinhibitoren dahingehend entschlüsselt werden, dass eine Beteiligung des  $IP_3$ -Rezeptors sowie von intrazellulärem Calcium wichtig ist. Ferner wurde evident, dass auch eine basale Freisetzung existiert, die über denselben Weg verläuft.

Durch die Behandlung mit dem TLR4-Antagonisten TAK-242, der die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin *in vitro* unterdrückt, wird auch die analgetische Wirkung von LPS *in vivo* aufgehoben. TLR4 Agonisten sind daher potentielle alternative Analgetika, welche die endogene Schmerzkontrolle unterstützen könnten. Jedoch fließen viele Wechselwirkungen wie z.B. proalgetische Wirkungen von TLR4 in das komplexe Gefüge der Immunzellantwort ein. Diese wurden nicht weiter untersucht. Vor einer klinischen Anwendung müssten solche Effekte näher betrachtet werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ANOVA	Varianzanalyse, engl. Analysis of variance
BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Tetra(acetoxymethyl) Ester
CaMKII	engl. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II
CD	engl. Cluster of differentiation
CFA	engl. Freund's Complete Adjuvant
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRF	engl. Corticotropin-releasing Factor
CWS	Kaltwasser-Schwimmstress (engl. Cold water swim stress)
DAMPs	engl. Danger-associated Molecular Patterns
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOP	$\delta$ -Opioidrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflusszytometrie, engl. Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
FPR	Formylpeptid Rezeptor
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor
$\alpha$ HL	$\alpha$ -Hämolysin
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KOP	$\kappa$ -Opioidrezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LRSC	engl. Leukoreduction System Chamber

MACS	engl. Magnetic Cell Separation
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating Factor
MD2	engl. Myeloid Differentiation Factor 2; Adapterprotein des TLR4
MOP	$\mu$ -Opioidrezeptor
NA	Noradrenalin
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster engl Pathogen-associated Molecular Patterns
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, engl. Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
POMC	Proopiomelanocortin, Vorläuferprotein des $\beta$ -Endorphins
PPT	Pfotendruckschwelle, engl. Paw pressure threshold
PRR	Mustererkennungszepetor engl. Pattern recognition Receptor
PWL	Pfotenwegziehlatenz, engl. Paw withdrawal threshold
RIA	Radioimmounassay
RM ANOVA	Wiederholte-Messungen-Varianzanalyse, engl. Repeated Measures Analysis of Variance
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. Reactive oxygen species
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten, am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute entwickelt
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. Side scatter)
TLR	engl. Toll-like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRPV1	engl. Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1

## 7. Literaturverzeichnis

1. Klockgether-Radke, A.P., [*F. W. Serturmer and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids*]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2002. **37**(5): p. 244-9.
2. IASP. *International Association for the Study of Pain: Taxonomy*. 22.05.2012 [cited 2014; Available from: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>].
3. Stein, C., M. Schafer, and H. Machelska, *Attacking pain at its source: new perspectives on opioids*. *Nat Med*, 2003. **9**(8): p. 1003-8.
4. Rittner, H.L., A. Brack, and C. Stein, *Pain and the immune system*. *British journal of anaesthesia*, 2008. **101**(1): p. 40-4.
5. Stein, C., A.H. Hassan, R. Przewlocki, C. Gramsch, K. Peter, and A. Herz, *Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(15): p. 5935-9.
6. Puehler, W., C. Zollner, A. Brack, M.A. Shaqura, H. Krause, M. Schafer, and C. Stein, *Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction*. *Neuroscience*, 2004. **129**(2): p. 473-9.
7. Stein, C., M.J. Millan, T.S. Shippenberg, K. Peter, and A. Herz, *Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989. **248**(3): p. 1269-75.
8. Cunha, F.Q. and S.H. Ferreira, *Peripheral hyperalgesic cytokines*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **521**: p. 22-39.
9. Cabot, P.J., L. Carter, C. Gaiddon, Q. Zhang, M. Schafer, J.P. Loeffler, and C. Stein, *Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **100**(1): p. 142-8.
10. Mousa, S.A., H. Machelska, M. Schafer, and C. Stein, *Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain*. *J Neuroimmunol*, 2002. **126**(1-2): p. 5-15.
11. Millan, M.J., A. Czlonkowski, B. Morris, C. Stein, R. Arendt, A. Huber, V. Holtt, and A. Herz, *Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat*. *Pain*, 1988. **35**(3): p. 299-312.
12. Rittner, H.L., A. Brack, H. Machelska, S.A. Mousa, M. Bauer, M. Schafer, and C. Stein, *Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain*. *Anesthesiology*, 2001. **95**(2): p. 500-8.
13. Brack, A., D. Labuz, A. Schiltz, H.L. Rittner, H. Machelska, M. Schafer, R. Reszka, and C. Stein, *Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(1): p. 204-11.

14. Machelska, H., J.K. Schopohl, S.A. Mousa, D. Labuz, M. Schafer, and C. Stein, *Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation*. J Neuroimmunol, 2003. **141**(1-2): p. 30-9.
15. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
16. Murphy, K.M., Travers, Paul, Walport, Mark, *Janeway Immunologie*. 7 ed. 2009, Heidelberg: Springer, Spektrum Akademischer Verlag.
17. Machelska, H., P.J. Cabot, S.A. Mousa, Q. Zhang, and C. Stein, *Pain control in inflammation governed by selectins*. Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1425-8.
18. Machelska, H., S.A. Mousa, A. Brack, J.K. Schopohl, H.L. Rittner, M. Schafer, and C. Stein, *Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(13): p. 5588-96.
19. Mousa, S.A., M. Shaqura, U. Brendl, M. Al-Khrasani, S. Furst, and M. Schafer, *Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(8): p. 1310-23.
20. Brack, A., H.L. Rittner, H. Machelska, K. Leder, S.A. Mousa, M. Schafer, and C. Stein, *Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells*. Pain, 2004. **112**(3): p. 229-38.
21. Woolf, C.J. and M.W. Salter, *Neuronal plasticity: increasing the gain in pain*. Science, 2000. **288**(5472): p. 1765-9.
22. Djouhri, L., S. Koutsikou, X. Fang, S. McMullan, and S.N. Lawson, *Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors*. J Neurosci, 2006. **26**(4): p. 1281-92.
23. Xiao, W.H. and G.J. Bennett, *C-fiber spontaneous discharge evoked by chronic inflammation is suppressed by a long-term infusion of lidocaine yielding nanogram per milliliter plasma levels*. Pain, 2008. **137**(1): p. 218-28.
24. Uceyler, N., M. Schafers, and C. Sommer, *Mode of action of cytokines on nociceptive neurons*. Exp Brain Res, 2009. **196**(1): p. 67-78.
25. Zhang, N., S. Inan, A. Cowan, R. Sun, J.M. Wang, T.J. Rogers, M. Caterina, and J.J. Oppenheim, *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.
26. Oh, S.B., P.B. Tran, S.E. Gillard, R.W. Hurley, D.L. Hammond, and R.J. Miller, *Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5027-35.
27. Cunha, T.M., W.A. Verri, Jr., I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha, *Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 824-32.

28. Qi, J., K. Buzas, H. Fan, J.I. Cohen, K. Wang, E. Mont, D. Klinman, J.J. Oppenheim, and O.M. Howard, *Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons*. Journal of immunology, 2011. **186**(11): p. 6417-26.
29. Liu, T., Y.J. Gao, and R.R. Ji, *Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch*. Neurosci Bull, 2012. **28**(2): p. 131-44.
30. Mousa, S.A., M. Shakibaei, N. Sitte, M. Schafer, and C. Stein, *Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain*. Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1331-41.
31. Binder, W., S.A. Mousa, N. Sitte, M. Kaiser, C. Stein, and M. Schafer, *Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(1): p. 92-100.
32. Schafer, M., L. Carter, and C. Stein, *Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4219-23.
33. Schafer, M., S.A. Mousa, Q. Zhang, L. Carter, and C. Stein, *Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6096-100.
34. Rittner, H.L., D. Hackel, P. Voigt, S. Mousa, A. Stolz, D. Labuz, M. Schafer, M. Schaefer, C. Stein, and A. Brack, *Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils*. PLoS pathogens, 2009. **5**(4): p. e1000362.
35. Rittner, H.L., D. Labuz, M. Schaefer, S.A. Mousa, S. Schulz, M. Schafer, C. Stein, and A. Brack, *Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006. **20**(14): p. 2627-9.
36. Kieffer, B.L. and C. Gaveriaux-Ruff, *Exploring the opioid system by gene knockout*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(5): p. 285-306.
37. Mousa, S.A., Q. Zhang, N. Sitte, R. Ji, and C. Stein, *beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue*. J Neuroimmunol, 2001. **115**(1-2): p. 71-8.
38. Zollner, C., M.A. Shaqura, C.P. Bopaiah, S. Mousa, C. Stein, and M. Schafer, *Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(2): p. 202-10.
39. Brack, A., H.L. Rittner, H. Machelska, M. Shaqura, S.A. Mousa, D. Labuz, C. Zollner, M. Schafer, and C. Stein, *Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression*. Pain, 2004. **108**(1-2): p. 67-75.
40. Basu, J., D.M. Shin, and E.K. Jo, *Mycobacterial signaling through toll-like receptors*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 145.

41. Boue, J., C. Blanpied, P. Brousset, N. Vergnolle, and G. Dietrich, *Endogenous opioid-mediated analgesia is dependent on adaptive T cell response in mice*. Journal of immunology, 2011. **186**(9): p. 5078-84.
42. Boue, J., C. Blanpied, M. Djata-Cabral, L. Pelletier, N. Vergnolle, and G. Dietrich, *Immune conditions associated with CD4+ T effector-induced opioid release and analgesia*. Pain, 2012. **153**(2): p. 485-93.
43. Labuz, D., A. Schreiter, Y. Schmidt, A. Brack, and H. Machelska, *T lymphocytes containing beta-endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(7): p. 1045-53.
44. Verma-Gandhu, M., P. Bercik, Y. Motomura, E.F. Verdu, W.I. Khan, P.A. Blennerhassett, L. Wang, R.T. El-Sharkawy, and S.M. Collins, *CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1721-8.
45. Boue, J., L. Basso, N. Cenac, C. Blanpied, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist, N. Vergnolle, and G. Dietrich, *Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic CD4(+) T cells in mice*. Gastroenterology, 2014. **146**(1): p. 166-75.
46. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
47. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn, and M.B. Lutz, *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
48. Frankenberger, M., T. Sternsdorf, H. Pechumer, A. Pforte, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis*. Blood, 1996. **87**(1): p. 373-7.
49. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
50. Ritz, B.W., G.M. Alexander, S. Nogusa, M.J. Perreault, B.L. Peterlin, J.R. Grothusen, and R.J. Schwartzman, *Elevated blood levels of inflammatory monocytes (CD14+ CD16+ ) in patients with complex regional pain syndrome*. Clinical and experimental immunology, 2011. **164**(1): p. 108-17.
51. Okamoto, H., K. Mizuno, and T. Horio, *Circulating CD14+ CD16+ monocytes are expanded in sarcoidosis patients*. J Dermatol, 2003. **30**(7): p. 503-9.
52. Cairns, A.P., A.D. Crockard, and A.L. Bell, *The CD14+ CD16+ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2002. **21**(5): p. 189-92.
53. Fingerle, G., A. Pforte, B. Passlick, M. Blumenstein, M. Strobel, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients*. Blood, 1993. **82**(10): p. 3170-6.
54. Skinner, N.A., C.M. MacIsaac, J.A. Hamilton, and K. Visvanathan, *Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+*

- monocytes in response to sepsis-related antigens*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 270-8.
55. Kashiwagi, M., T. Imanishi, Y. Ozaki, K. Satogami, T. Masuno, T. Wada, Y. Nakatani, K. Ishibashi, K. Komukai, T. Tanimoto, Y. Ino, H. Kitabata, and T. Akasaka, *Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2012. **221**(1): p. 249-53.
56. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
57. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira, *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3749-52.
58. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
59. Huang, Q.Q., R. Sobkoviak, A.R. Jockheck-Clark, B. Shi, A.M. Mandelin, 2nd, P.P. Tak, G.K. Haines, 3rd, C.V. Nicchitta, and R.M. Pope, *Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4965-73.
60. Takeuchi, O. and S. Akira, *Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(4): p. 625-35.
61. Ling, G.S., J. Bennett, K.J. Woollard, M. Szajna, L. Fossati-Jimack, P.R. Taylor, D. Scott, G. Franzoso, H.T. Cook, and M. Botto, *Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3039.
62. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
63. Kagan, J.C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov, *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 361-8.
64. Nockemann, D., M. Rouault, D. Labuz, P. Hublitz, K. McKnelly, F.C. Reis, C. Stein, and P.A. Heppenstall, *The K(+) channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(8): p. 1263-77.
65. Stein, C., *Targeting pain and inflammation by peripherally acting opioids*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 123.
66. Opal, S.M., P.F. Laterre, B. Francois, S.P. LaRosa, D.C. Angus, J.P. Mira, X. Wittebole, T. Dugernier, D. Perrotin, M. Tidswell, L. Jauregui, K. Krell, J. Pachi, T. Takahashi, C. Peckelsen, E. Cordasco, C.S. Chang, S. Oeyen, N. Aikawa, T. Maruyama, R. Schein, A.C. Kalil, M. Van Nuffelen, M. Lynn, D.P. Rossignol, J. Gogate, M.B. Roberts, J.L. Wheeler, J.L. Vincent, and A.S. Group, *Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial*. JAMA, 2013. **309**(11): p. 1154-62.

67. Pflucke, D., D. Hackel, S.A. Mousa, A. Partheil, A. Neumann, A. Brack, and H.L. Rittner, *The molecular link between C-C-chemokine ligand 2-induced leukocyte recruitment and hyperalgesia*. J Pain, 2013. **14**(9): p. 897-910.
68. Hackel, D., D. Pflucke, A. Neumann, J. Viebahn, S. Mousa, E. Wischmeyer, N. Roewer, A. Brack, and H.L. Rittner, *The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63564.
69. Sauer, R.S., D. Hackel, L. Morschel, H. Sahlbach, Y. Wang, S.A. Mousa, N. Roewer, A. Brack, and H.L. Rittner, *Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation*. Mol Pain, 2014. **10**(1): p. 10.
70. Boyum, A., *Separation of White Blood Cells*. Nature, 1964. **204**: p. 793-4.
71. Pickl, W.F., O. Majdic, P. Kohl, J. Stockl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, and W. Knapp, *Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes*. Journal of immunology, 1996. **157**(9): p. 3850-9.
72. Rittner, H.L., D. Labuz, J.F. Richter, A. Brack, M. Schafer, C. Stein, and S.A. Mousa, *CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo*. Brain, behavior, and immunity, 2007. **21**(8): p. 1021-32.
73. Cabot, P.J., L. Carter, M. Schafer, and C. Stein, *Methionine-enkephalin- and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain*. Pain, 2001. **93**(3): p. 207-12.
74. Porstmann, T. and S.T. Kiessig, *Enzyme immunoassay techniques. An overview*. J Immunol Methods, 1992. **150**(1-2): p. 5-21.
75. Rieseberg, M., C. Kasper, K.F. Reardon, and T. Scheper, *Flow cytometry in biotechnology*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56**(3-4): p. 350-60.
76. Rowe, P., *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten*. 2012, Weinheim: Wiley-VCH Verlag&Co.KGaA.
77. Liu, C. and T.E. Hermann, *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
78. Cunha, T.M., M.M. Barsante, A.T. Guerrero, W.A. Verri, Jr., S.H. Ferreira, F.M. Coelho, R. Bertini, C. Di Giacinto, M. Allegretti, F.Q. Cunha, and M.M. Teixeira, *Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(2): p. 460-70.
79. Schreiter, A., C. Gore, D. Labuz, M.C. Fournie-Zaluski, B.P. Roques, C. Stein, and H. Machelska, *Pain inhibition by blocking leukocytic and neuronal opioid peptidases in peripheral inflamed tissue*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 5161-71.
80. Sarada, B., D. Thiele, T. Dang, A. Safavi, L.B. Hersh, and G.L. Cottam, *Increased expression of an endopeptidase (gamma-EGE/IDE) hydrolyzing beta-endorphin during differentiation and maturation of bone marrow macrophages*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(6): p. 753-60.
81. Clark, A.K., A.A. Staniland, F. Marchand, T.K. Kaan, S.B. McMahon, and M. Malcangio, *P2X7-dependent release of interleukin-1beta and*

- nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide*. J Neurosci, 2010. **30**(2): p. 573-82.
82. Meseguer, V., Y.A. Alpizar, E. Luis, S. Tajada, B. Denlinger, O. Fajardo, J.A. Manenschijn, C. Fernandez-Pena, A. Talavera, T. Kichko, B. Navia, A. Sanchez, R. Senaris, P. Reeh, M.T. Perez-Garcia, J.R. Lopez-Lopez, T. Voets, C. Belmonte, K. Talavera, and F. Viana, *TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3125.
83. Williams, J.D., J.L. Robin, R.A. Lewis, T.H. Lee, and K.F. Austen, *Generation of Leukotrienes by Human-Monocytes Pretreated with Cytochalasin B and Stimulated with Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*. Journal of Immunology, 1986. **136**(2): p. 642-648.
84. Jog, N.R., M.J. Rane, G. Lominadze, G.C. Luerman, R.A. Ward, and K.R. McLeish, *The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1690-700.
85. Bentwood, B.J. and P.M. Henson, *The sequential release of granule constituents from human neutrophils*. J Immunol, 1980. **124**(2): p. 855-62.
86. Wiesner, P., S.H. Choi, F. Almazan, C. Benner, W. Huang, C.J. Diehl, A. Gonen, S. Butler, J.L. Witztum, C.K. Glass, and Y.I. Miller, *Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappa B and activator protein-1: possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 56-65.
87. Stojilkovic, S.S., *Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(3): p. 81-3.
88. Liu, X., M. Yao, N. Li, C. Wang, Y. Zheng, and X. Cao, *CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4961-70.
89. Sadhu, C., K. Dick, W.T. Tino, and D.E. Staunton, *Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 764-9.
90. Mocsai, A., Z. Jakus, T. Vantus, G. Berton, C.A. Lowell, and E. Ligeti, *Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4321-31.
91. Sen, A., I.H. Chowdhury, D. Mukhopadhyay, S.K. Paine, A. Mukherjee, L.K. Mondal, M. Chatterjee, and B. Bhattacharya, *Increased Toll-like receptor-2 expression on nonclassic CD16+ monocytes from patients with inflammatory stage of Eales' disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(9): p. 6940-8.
92. Nyugen, J., S. Agrawal, S. Gollapudi, and S. Gupta, *Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans*. J Clin Immunol, 2010. **30**(6): p. 806-13.

93. Tanga, F.Y., N. Nutile-McMenemy, and J.A. DeLeo, *The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5856-61.
94. Kim, D., M.A. Kim, I.H. Cho, M.S. Kim, S. Lee, E.K. Jo, S.Y. Choi, K. Park, J.S. Kim, S. Akira, H.S. Na, S.B. Oh, and S.J. Lee, *A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14975-83.
95. Sorge, R.E., M.L. LaCroix-Fralish, A.H. Tuttle, S.G. Sotocinal, J.S. Austin, J. Ritchie, M.L. Chanda, A.C. Graham, L. Topham, S. Beggs, M.W. Salter, and J.S. Mogil, *Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice*. J Neurosci, 2011. **31**(43): p. 15450-4.
96. Christianson, C.A., D.S. Dumlao, J.A. Stokes, E.A. Dennis, C.I. Svensson, M. Corr, and T.L. Yaksh, *Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis*. Pain, 2011. **152**(12): p. 2881-91.
97. Wang, X., L.C. Loram, K. Ramos, A.J. de Jesus, J. Thomas, K. Cheng, A. Reddy, A.A. Somogyi, M.R. Hutchinson, L.R. Watkins, and H. Yin, *Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6325-30.
98. Matsunaga, N., N. Tsuchimori, T. Matsumoto, and M. Ii, *TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules*. Mol Pharmacol, 2011. **79**(1): p. 34-41.
99. Rice, T.W., A.P. Wheeler, G.R. Bernard, J.L. Vincent, D.C. Angus, N. Aikawa, I. Demeyer, S. Sainati, N. Amlot, C. Cao, M. Ii, H. Matsuda, K. Mouri, and J. Cohen, *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis*. Crit Care Med, 2010. **38**(8): p. 1685-94.
100. Gambhir, V., C. Yildiz, R. Mulder, S. Siddiqui, C. Guzzo, M. Szewczuk, K. Gee, and S. Basta, *The TLR2 agonists lipoteichoic acid and Pam3CSK4 induce greater pro-inflammatory responses than inactivated Mycobacterium butyricum*. Cell Immunol, 2012. **280**(1): p. 101-7.
101. Shi, X.Q., H. Zekki, and J. Zhang, *The role of TLR2 in nerve injury-induced neuropathic pain is essentially mediated through macrophages in peripheral inflammatory response*. Glia, 2011. **59**(2): p. 231-41.
102. Chiu, I.M., B.A. Heesters, N. Ghasemlou, C.A. Von Hehn, F. Zhao, J. Tran, B. Wainger, A. Strominger, S. Muralidharan, A.R. Horswill, J. Bubeck Wardenburg, S.W. Hwang, M.C. Carroll, and C.J. Woolf, *Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation*. Nature, 2013. **501**(7465): p. 52-7.
103. Brandt, K.J., C. Fickentscher, E.K. Kruithof, and P. de Moerloose, *TLR2 Ligands Induce NF-kappaB Activation from Endosomal Compartments of Human Monocytes*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80743.
104. Akira, S., *TLR signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 1-16.

105. Aksoy, E., S. Taboubi, D. Torres, S. Delbauve, A. Hachani, M.A. Whitehead, W.P. Pearce, I.M. Berenjeno, G. Nock, A. Filloux, R. Beyaert, V. Flamand, and B. Vanhaesebroeck, *The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(11): p. 1045-54.
106. Cunha, J.M., F.Q. Cunha, S. Poole, and S.H. Ferreira, *Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist*. *Br J Pharmacol*, 2000. **130**(6): p. 1418-24.
107. Liou, J.T., F.C. Liu, C.C. Mao, Y.S. Lai, and Y.J. Day, *Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model*. *Anesthesiology*, 2011. **114**(3): p. 660-72.
108. Asvadi, N.H., M. Morgan, H.M. Herath, A.K. Hewavitharana, P.N. Shaw, and P.J. Cabot, *Beta-endorphin 1-31 biotransformation and cAMP modulation in inflammation*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90380.
109. Zollner, C., S.A. Mousa, O. Fischer, H.L. Rittner, M. Shaqura, A. Brack, M. Shakibaei, W. Binder, F. Urban, C. Stein, and M. Schafer, *Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain*. *The Journal of clinical investigation*, 2008. **118**(3): p. 1065-73.
110. Kwok, Y.H., M.R. Hutchinson, M.G. Gentgall, and P.E. Rolan, *Increased responsiveness of peripheral blood mononuclear cells to in vitro TLR 2, 4 and 7 ligand stimulation in chronic pain patients*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e44232.
111. Awad, H., M. Abas, H. Elgharably, R. Tripathi, T. Theofilos, S. Bhandary, C. Sai-Sudhakar, C.K. Sen, and S. Roy, *Endogenous opioids in wound-site neutrophils of sternotomy patients*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47569.
112. Sevcik, M.A., B.M. Jonas, T.H. Lindsay, K.G. Halvorson, J.R. Ghilardi, M.A. Kuskowski, P. Mukherjee, J.E. Maggio, and P.W. Mantyh, *Endogenous opioids inhibit early-stage pancreatic pain in a mouse model of pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(3): p. 900-10.
113. Inglis, J.J., K.E. McNamee, S.L. Chia, D. Essex, M. Feldmann, R.O. Williams, S.P. Hunt, and T. Vincent, *Regulation of pain sensitivity in experimental osteoarthritis by the endogenous peripheral opioid system*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(10): p. 3110-9.
114. Wang, Y., D. Hackel, F. Peng, and H.L. Rittner, *Long-term antinociception by electroacupuncture is mediated via peripheral opioid receptors in free-moving rats with inflammatory hyperalgesia*. *Eur J Pain*, 2013. **17**(10): p. 1447-57.

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Heike Rittner für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die außerordentliche Unterstützung während der Fertigstellung derselben sowie für die Betreuung und Beratung auch außerhalb der wissenschaftlichen Tätigkeit bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Prof. Dr. Alexander Brack, Dr. Dagmar Hackel, Dr. Reine-Solange Sauer und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Würzburg für die theoretische und praktische Einführung in Methodik und Hintergründe.

Dr. Dagmar Hackel und Dr. Reine-Solange Sauer danke ich besonders für die Bereitstellung der *in vivo* Daten sowie die vielen hilfreichen Ratschläge und die Betreuung im Labor. Ebenso geht mein Dank an Dr. Laura Morschel für die ergänzenden Experimente, die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei allen praktischen Fragen.

Weiterhin möchte ich Dr. Anna Partheil, Dr. Annick Neumann und Alexander Böcker für die schöne Zusammenarbeit während der Zeit im Labor danken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern ganz herzlich, die mir das Studium ermöglicht und mich stets darin unterstützt haben.